

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BATNA 1

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière:

Sciences vétérinaires

Option:

Pathologie des Animaux Domestiques

Présentée par:

BOUDAOU D Amine

THEME

**Caractérisation Moléculaire Des Virus
Sauvages De La Maladie De Gumboro**

JURY

Président : ALLOUI Nadir

Examineur : MEHENNAOUI Smail

Examineur : AOUN Leila

Examineur : GUETARNI Djamel

Examineur : BENSOUILAH Mourad

Rapporteur : MAMACHE Bakir

Grade

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Université

U. Batna

U. Batna

U. El-Tarf

U. Blida

U. Annaba

U. Batna

AU : 2014 - 2015

REMERCIEMENTS /

Nous remercions Allah, le tout puissant, de nous avoir donné l'énergie nécessaire pour aller au bout de ce projet.

La présente thèse a été revue, corrigée et approuvée par le Professeur MAMACHE Bakir. Nous le remercions avant tout de la confiance qu'il a manifestée à notre égard, mais aussi pour ses conseils avisés et son soutien tant moral que scientifique.

Nos remerciements s'adressent également,

Au Professeur ALLOUI Nadir pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de soutenance, mais pas seulement. Nous le remercions aussi et avant tout pour nous avoir initiés au travail de la recherche, pour sa disponibilité constante et sa gentillesse qui n'a point de bornes.

Aux Professeurs, MEHENNAOUI Smail de l'université de Batna et AOUN Leila de l'Université d'El-Tarf, ainsi qu'aux Professeurs GUETARNI Djamel et BENSOUILAH Mourad, de l'Université de Blida et Annaba respectivement. Nous les remercions pour avoir accepté de prendre part au jury chargé d'examiner notre travail.

Nos remerciements les plus vifs s'adressent également à Mr. GHRAM Abdeljelil, Biologiste Principal et Chef du Laboratoire d'Epidémiologie et Microbiologie Vétérinaire, à l'Institut Pasteur de Tunis (IPT). Nous ne le remercierons jamais assez pour son aide précieuse, son soutien inestimable et surtout pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé dans son laboratoire, si restreint mais si prolifique. Qu'il en soit ici le plus sincèrement remercié. Des remerciements particuliers vont à l'adresse de tout le staff technique du Laboratoire. Nous citerons notamment TOMBARI Wafa, LACHHEB Jihene, Biologistes, LARABI Imene et N'SIRI Jihene, vétérinaires principales et Mme GRIBAA Latifa, Infirmière Principale, aujourd'hui à la retraite, une retraite amplement méritée.

Nous tenons aussi à remercier les responsables des laboratoires et services de l'IPT, sollicités par Mr. GHRAM pour leur contribution. Nous pensons particulièrement à Mme ABDELHAK Sonia, Biologiste Principale et Chef du Laboratoire de Génomique Biomédicale et Oncogénétique.

Nous ne manquerons pas d'exprimer notre profonde gratitude à nos confrères et amis, les Dr. CHORFA Abdelhafid et AMRANI Malik, qui de façon passionnée et dévouée ont accepté d'apporter leur soutien si déterminant. Merci pour les prélèvements, sans lesquels, ce travail n'aurait pu voir le jour.

Enfin, Merci au Professeur Daral JACKWOOD, du département de la médecine vétérinaire préventive de l'Université de l'état de l'Ohio, aux USA, pour avoir si bien orienté nos choix et décisions. Nous tenons à saluer en lui son humilité, lui qui a été tout simplement, la référence la plus citée dans cet ouvrage.

INTRODUCTION.....	01
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
TAXONOMIE DU VIRUS DE LA MALADIE DE GUMBORO.....	03
MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VIRUS	04
LES PROTEINES VIRALES.....	06
LE GENOME VIRAL	12
ISOLEMENT DU VIRUS	15
IDENTIFICATION DU VIRUS	17
EVOLUTION DES VIRUS DE LA MALADIE DE GUMBORO.....	18
<i>Mécanisme de diversification virale des virus à ARN.....</i>	18
<i>Emergence des variants antigéniques et pathotypiques</i>	19
LES DETERMINANTS VIRAUX DE LA VIRULENCE	22
<i>Détermination des marqueurs de la virulence par construction de virus recombinants</i> <i>inter-pathotypes.....</i>	23
<i>Détermination des marqueurs de la virulence par construction de virus p NS-déficients...</i>	23
<i>Détermination des marqueurs de la virulence par l'étude de la réactivité des virus vis-à-</i> <i>vis d'Ac monoclonaux</i>	24
<i>Détermination des marqueurs de la virulence par l'usage des enzymes de restriction.....</i>	26
<i>Détermination des marqueurs de la virulence par alignement des séquences et</i> <i>mutagenèse contrôlée de sites.....</i>	26
DETERMINANTS VIRAUX DU TROPISME CELLULAIRE	29
BASES MOLECULAIRES DE L'ANTIGENICITE.....	33
LA REPLICATION VIRALE.....	37
PATHOGENIE.....	43
<i>Apoptose.....</i>	46
<i>Immunosuppression.....</i>	47
IMPACT DES MUTATIONS VIRALES SUR L'EFFICACITE DE LA VACCINATION.....	49
PARTIE EXPERIMENTALE	
PROBLEMATIQUE.....	52
OBJECTIFS.....	55
CARACTERISATION MOLECULAIRE DES VIRUS SAUVAGES DE LA MALADIE DE GUMBORO	
MATERIEL ET METHODES.....	57

Description de l'expérience.....	57
Collecte des échantillons.....	58
Extraction de l'ARN viral.....	60
Préparation des échantillons.....	60
Extraction de l'ARN.....	61
Quantification et contrôle de la pureté de l'ARN total par absorptiomètre UV.....	64
Transcription inverse et amplification en chaîne par polymérase : rt-PCR.....	65
Choix des amorces.....	65
Mise en œuvre de la rt-PCR.....	69
Contrôle des produits d'amplification sur gel d'agarose.....	71
Séquençage des amplimères.....	73
Préparation des produits PCR.....	75
Réaction de séquence.....	76
Purification de la réaction de séquence.....	77
Détermination de la séquence des amplimères.....	78
Détermination de la séquence consensus.....	78
Analyse des séquences nucléotidiques.....	79
Analyse des séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques.....	81
Etablissement des cartes de restriction.....	81
Analyse phylogénétique.....	82
RESULTATS ET INTERPRETATION.....	83
Quantification de l'ARN total par absorptiométrie UV.....	83
Révélation des produits PCR sur gel d'agarose.....	86
Résultats du séquençage et analyses des séquences.....	88
Déduction et analyse des séquences d'acides aminés.....	95
Construction et analyse des cartes de restriction.....	100
Analyse phylogénétique.....	106
DISCUSSION.....	109
CONCLUSION.....	115
RECOMMANDATION.....	116
REFERENCES	118
<i>RESUMES</i>	141
<i>ANNEXES</i>	144

LISTE DES FIGURES

<u>Figure n°1</u> : Taxonomie des Birnaviridae.....	04
<u>Figure n°2</u> : Représentation 3D de la structure de VP2.....	09
<u>Figure n°3</u> : Représentation 3D des trimères et séquence des résidus du domaine P de la région hypervariable de VP2.....	10
<u>Figure n°4</u> : Organisation schématique du génome de l'IBDV.....	15
<u>Figure n°5</u> : Détermination des résidus de VP2 responsables de la virulence par alignement des séquences du domaine hypervariable des souches virulentes et des souches adaptées à la culture cellulaire avec celui de la souche atténuée D78.....	27
<u>Figure n°6</u> : La séquence conservée riche en sérine "S-W-S-A-S-G-S" distingue les souches virulentes des souches atténuées.....	28
<u>Figure n°7</u> : Le réassortiment génétique entre la souche atténuée D78 et la souche virulente IM, démontrant l'implication de VP1 (RdRp) dans le tropisme cellulaire de l'IBDV.....	33
<u>Figure n°8</u> : Distinction des virus variants et classiques par comparaison des sites de restriction.....	37
<u>Figure n°9</u> : Représentation schématique du mécanisme de la réplication de l'IBDV.....	42
<u>Figure n°10</u> : Mécanisme pathologique de l'IBDV faisant intervenir les cellules T et les macrophages.....	44
<u>Figure n°11</u> : Pathogénie de l'immunosuppression IBDV-induite.....	49
<u>Figure n°12</u> : Distribution des variants antigéniques et pathotypiques du virus de la maladie de Gumboro.....	54
<u>Figure n°13</u> : Résumé graphique du protocole expérimental.....	58
<u>Figure n°14</u> : Etapes d'extraction de l'ARN viral par adsorption de l'acide nucléique sur membrane de silice.....	63
<u>Figure n°15</u> : Chevauchement spectral entre l'ARN et les protéines.....	65
<u>Figure n°16</u> : Alignement de séquences montrant l'absence de mésappariement entre la séquence des amorces et celle des souches virales de référence.....	66
<u>Figure n°17</u> : Spécificité des amorces : Résultat partiel du BLAST.....	68
<u>Figure n°18</u> : Principe de la méthode de SANGER.....	74

<u>Figure n° 19</u> : Fichier rendu par le logiciel GeneMapper, contenant le chromatogramme et la séquence nucléotidique.....	78
<u>Figure n° 20</u> : Le "Contig" obtenu dans le logiciel DNA Baser.....	79
<u>Figure n° 21</u> : Répartition des concentrations en ARN totaux extraits à partir de BF.....	85
<u>Figure n° 22</u> : Répartition des ratios DO260/DO280, reflétant le niveau de contamination des extraits d'ARN par les protéines.....	85
<u>Figure n° 23</u> : Répartition des ratios DO260/DO230, reflétant le niveau de contamination des extraits d'ARN par les sels chaotropiques.....	86
<u>Figure n° 24</u> : Révélation des produits PCR sur gel d'agarose.....	87
<u>Figure n° 25</u> : Le chromatogramme de la séquence F de l'échantillon n°21.....	88
<u>Figure n° 26</u> : Alignement multiple des séquences nucléotidiques.....	91
<u>Figure n° 27</u> : Alignement multiple des séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques.....	96
<u>Figure n° 28</u> : Carte de restriction "BstNI"	101
<u>Figure n° 29</u> : Carte de restriction "MboI"	101
<u>Figure n°30</u> : Carte de restriction "SspI"	102
<u>Figure n° 31</u> : Carte de restriction "BspMI"	102
<u>Figure n° 32</u> : Nombre et tailles des fragments de restriction par l'enzyme BstNI sur les 5 souches de l'étude.....	103
<u>Figure n° 33</u> : Nombre et tailles des fragments de restriction par l'enzyme MboI sur les 5 souches de l'étude.....	104
<u>Figure n° 34</u> : Arbre phylogénétique consensus, construit à partir de l'alignement de séquences nucléotidiques (analyse génétique).....	107
<u>Figure n° 35</u> : Arbre phylogénétique consensus, construit à partir de l'alignement de séquences d'acides aminés (analyse phénotypique).....	108

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau n°1</u> : Réactivité des pathotypes Européens, Américains et Africains (Cote D'ivoire) vis-à-vis d'une batterie de 8 ACM de souris.....	25
<u>Tableau n°2</u> : Résidus critiques pour la fixation des AMC.....	25
<u>Tableau n°3</u> : Tropisme cellulaire des différents pathotypes du virus de la maladie de Gumboro.....	31
<u>Tableau n°4</u> : Caractérisation des virus variants Américains par réactivité vis-à-vis d'ACM	35
<u>Tableau n°5</u> : Identification des élevages dont sont issus les oiseaux autopsiés.....	59
<u>Tableau n°6</u> : Caractéristiques des amorces.....	66
<u>Tableau n°7</u> : Identification des souches virales utilisées dans l'alignement multiple de séquences.....	80
<u>Tableau n°8</u> : Sites spécifiques de restriction des 4 enzymes.....	81
<u>Tableau n°9</u> : Classification des souches virales de la maladie de Gumboro selon le profil de digestion enzymatique.....	82
<u>Tableau n°10</u> : Concentration et pureté des ARN totaux obtenus par extraction à partir de BF	83
<u>Tableau n°11</u> : Principales substitutions de nucléotides partagées, de façon exclusive ou non, par les souches de l'étude avec les virus hypervirulents.....	92
<u>Tableau n°12</u> : Similitude entre séquences nucléotidiques des 5 souches de l'étude avec les souches des différents pathotypes.....	94
<u>Tableau n°13</u> : Les substitutions de résidus que partagent les souches de l'étude avec le virus virulents.....	97
<u>Tableau n°14</u> : Similitude entre séquences d'acides aminés des 5 souches de l'étude avec les souches des différents pathotypes.....	99
<u>Tableau n°15</u> : Comparaison des RFLP des 5 souches de l'étude avec celui des 6 groupes moléculaires de Jackwood et Sommer (1999).....	105

LISTE DES PHOTOS

<u>Photo n°1</u> : Structure icosaédrique et tubulaire du birnavirus.....	05
<u>Photo n°2</u> : Motifs des prélèvements sur les poussins présentés pour autopsie.....	59

Lettres et symboles designant les acides aminés et leur correspondance aux codons ADN

<i>Ac. aminé</i>	<i>Lettre</i>	<i>Symbole</i>	<i>Codons</i>
- Ac. aspartique	D	Asp	GAC , GAT
- Ac. Glutamique	E	Glu	GAA , GAG
- Alanine	A	Ala	GCA , GCC , GCG , GCT
- Arginine	R	Arg	CGA , CGC , CGG , CGT , AGA , AGG
- Asparagine	N	Asn	AAC , AAT
- Cystéine	C	Cys	TGC , TGT
- Glutamine	Q	Gln	CAA , CAG
- Glycine	G	Gly	GGA , GGC , GGG , GGT
- Histidine	H	His	CAC , CAT
- Isoleucine	I	Ile	ATA , ATC , ATT
- Leucine	L	Leu	CTA , CTC , CTG , CTT , TTA , TTG
- Lysine	K	Lys	AAA , AAG
- Méthionine	M	Met	ATG
- Phenylalanine	F	Phe	TTC , TTT
- Proline	P	Pro	CCA , CCC , CCG , CCT
- Sérine	S	Ser	TCA , TCC , TCG , TCT , AGC , AGT
- Thréonine	T	Thr	ACT , ACC , ACG , ACT
- Tryptophane	W	Trp	TGG
- Tyrosine	Y	Tyr	TAC , TAT
- Valine	V	Val	GTA , GTC , GTG , GTT

ABREVIATIONS /

- ACM: Anticorps Monoclonal
- ADNc: ADN complémentaire
- AOM: Anticorps d'Origine Maternelle
- ARNm: ARN messenger
- BET: Bromure d'Ethidium
- BF : Bourse de Fabricius
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
- CEB: Chicken Embryo Bursa
- CEF: Chicken Embryo Fibroblasts
- CEK: Chicken Embryo Kidney
- CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CPE: Cytopathic Effect
- CRAb: Chicken Recombinant Anti-body
- CsCl: Caesium Chloride
- ddNTP : didéoxynucléotide
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- dNTP : déoxynucléotide
- DO: Densité Optique
- DOV: Date Optimale de Vaccination
- dsRNA: double-stranded RNA
- DXV: Drosophilla X Virus
- ECP: Effet Cytopathogène
- F: Forward
- GALT: Gut Associated Lymphoïde Tissue
- HVT: Herpes Virus of Turkey
- IBDV: Infectious Bursal Disease Virus
- IDG: Immuno-Diffusion sur Gélose
- IL: Interleukine
- IPNV: Infectious Pancreatic Necrosis Virus
- Kb: Kilo base
- kDa: kilo dalton
- m/v: masse/volume
- NCR: Non Coding Region
- NO: Nitric Oxyde
- ORF: Open Ready Frame
- pb: paire de base
- PBS: Phosphat Buffered Saline
- PI: Post-inoculation
- PM: Poids Moléculaire
- pNS: protein Non Structurale
- R: Reverse
- RdRp: RNA-dependant-RNA-polymerase
- RFLP : Restriction fragment Length polymorphism
- RIN : RNA Integrity Number
- rt-PCR: reverse transcriptase-PolyChain Reaction
- SAP : Shrimp Alkaline Phosphatase
- SPF: Specific Pathogen Free
- ssRNA: single strand RNA
- Tm: melting Temperature
- TNF: Tumor Necrosis factor
- trs/mn: tours/minute
- UEI: Unité Elisa Idexx
- UV: Ultraviolet
- Vero: Vervet Origin (Monkey Kidney Cell-line)
- VP: Viral Protein
- VLP: Viral Like Protein
- VPg: genome linked Viral Protein
- vIBDV: very virulent Infectious Bursal Disease Virus

AVANT-PROPOS /

La présente étude, réalisée pour l'obtention de Doctorat en sciences vétérinaires, a pour objet d'identifier les pathotypes viraux incriminés dans les échecs de vaccination contre la maladie de Gumboro.

La thématique de la présente thèse s'inscrit dans la continuité du sujet déjà traité dans le cadre du Magister. Ainsi, après avoir évalué l'innocuité des vaccins vivants, nous nous sommes proposés de vérifier la relation de cause à effet entre l'échec vaccinal et le niveau de pathogénicité des virus sauvages circulants.

Loin d'être exhaustive, la présente étude articule deux parties :

Dans la première, sont exposées les dernières mises à jour concernant la structure moléculaire du virus de la maladie de Gumboro, ses marqueurs de virulence et d'antigénicité, ses caractères culturels et son évolution génétique et phénotypique. Dans cette partie, est explicitement développé l'impact des mutations virales sur l'efficacité de la vaccination ainsi que les solutions les plus récentes proposées au problème de l'échec vaccinal.

La deuxième partie représente notre contribution personnelle, laquelle a consisté à caractériser, sur le plan moléculaire, certains isolats sauvages responsables d'épisodes cliniques de la maladie de Gumboro. Le matériel génétique des virus a été extrait, amplifié puis séquencé, avant d'être soumis à une analyse génétique et phénotypique et enfin, comparé à celui des souches de référence.

INTRODUCTION /

La maladie de Gumboro ou bursite infectieuse fait aujourd'hui peser une menace grandissante sur les populations de volailles commerciales. Si les pertes économiques que fait subir la maladie de Gumboro à l'industrie des volailles restent difficilement quantifiables en raison du caractère insidieux de sa forme immunodépressive, il n'est pas du tout outrancier de dire que ces pertes prennent aujourd'hui des dimensions catastrophiques.

La situation épidémiologique confuse de la maladie de Gumboro, le choix irrationnel des souches vaccinales et la vaccination en aveugle sur des poussins de statut immunitaire inconnu, ne peuvent que perpétuer une conjoncture déjà pénalisante pour nos élevages aviaires. Une conjoncture caractérisée notamment par des échecs de vaccination de plus en plus fréquents, conduisant à des états d'immunodéficiência qui rendent les volailles plus susceptibles aux agents pathogènes les plus anodins. Ceci a pour effet d'encourager une utilisation plus importante et moins rationnelle des antibiotiques, ce qui n'est pas sans conséquence sur le développement d'une antibio-résistance préjudiciable à la santé humaine et animale.

Les épisodes cliniques et sub-cliniques de la maladie surviennent aujourd'hui malgré le renforcement des programmes de vaccination. Si les causes les plus triviales expliquent en partie cette hausse de la fréquence de l'échec vaccinal (mauvaise conservation du vaccin, vaccin arrivé à péremption, technique de vaccination défectueuse...etc), l'essentiel de ces échecs est lié à :

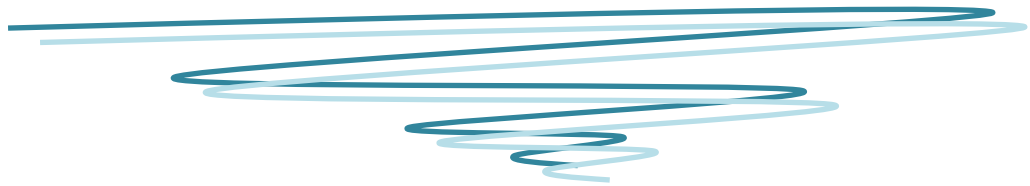
1. La variabilité antigénique et pathotypique du virus de la bursite infectieuse.

La caractérisation des virus hypervirulents a fait appel à différentes techniques telles que le test de neutralisation virale, le séquençage nucléotidique et la rt-PCR/RFLP (reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction/Restriction fragment Length Polymorphism). Si ces techniques restent utiles pour le typage in vitro des virus sauvages, le test de protection croisée in vivo reste incontournable dans l'établissement définitif des caractères antigéniques et immunologiques des virus.

Par ailleurs, diverses techniques moléculaires hautement sensibles sont aujourd'hui utilisées pour détecter des mutations mineures dans le génome viral. De telles mutations ne sont pas toujours suffisantes pour qualifier les virus de "variants antigéniques", sinon au risque de créer une confusion dans la nomenclature des souches virales. Il est intéressant de signaler que la plus part des changements de séquences génétiques ne sont pas corrélés à l'antigénicité ou à l'immunogénicité des virus. De la même façon, la présence ou l'absence des sites de restriction des enzymes au sein des séquences nucléotidiques des virus, sont le plus souvent la conséquence de mutations silencieuses n'ayant aucune répercussion sur le phénotype viral.

2. La neutralisation, par les anticorps maternels, du virus vaccinal. En effet, des vaccins appliqués sur des poussins possédant un taux d'anticorps résiduels supérieur au seuil de prise vaccinale du vaccin choisi, ne peut que conduire à sa neutralisation avec comme conséquence une absence de séroconversion. Entre appliquer le vaccin à un âge précoce et accepter le risque d'un échec vaccinal ou l'appliquer tardivement et s'exposer à une contamination par un virus sauvage endémique, le choix est difficile. La solution à cette problématique réside dans le choix d'un âge de vaccination qui soit suffisamment précoce pour éviter une contamination virale, mais en même temps suffisamment tardif pour éviter la neutralisation du vaccin : C'est le concept du "choix de la date optimale de vaccination".

Synthese Bibliographique



SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

TAXONOMIE DU VIRUS DE LA MALADIE DE GUMBORO/

Dans les toute premières études et en raison de sa taille, le virus de la maladie de Gumboro ou IBDV (Infectious Bursal Disease Virus), était classé en tant que Picornavirus (*Cho et Edgar, 1969*). Plus tard, le virus sera classé "Réo-like" à cause de sa ressemblance, sous microscopie électronique, avec les Réovirus (*Lukert et Davis, 1974*). Une similitude morphologique du virus avec celui de la nécrose pancréatique du saumon (IPNV: Infectious Pancreatic Necrosis Virus) a été rapportée une première fois par *Almeida et Morris (1973)*, puis confirmée plus tard par *Harkness et al. (1975)*. Un génome viral composé seulement de 2 segments d'ARN bicaténaire et une capsidite faite d'une seule couche, étaient des points communs partagés par le virus de la maladie de Gumboro (genre Avibirnavirus) avec le Drosophila X (genre Ontomobirnavirus), l'IPNV et 2 autres virus infectant les mollusques bivalves (genre Aquabirnavirus)

En 1979, *Dobos et al.* ont proposé de regrouper tous ces virus dans une nouvelle famille dont ils ont proposé le nom de Birnaviridae. En 1985, le comité international de la taxonomie des virus avait créé la nouvelle famille où le préfixe "bi" prend une double signification pour traduire bisegmenté et bicaténaire (*fig. n°1*)

La relation taxonomique entre tous les virus de la famille des Birnaviridea est basée sur la morphologie, l'organisation du génome viral (ARN double brins) et la similitude entre les protéines de la capsidite comme démontrée par ultracentrifugation et électrophorèse sur gel d'agarose. Un test de séro-neutralisation permet cependant, de distinguer les virus aquatiques (Aquabirnavirus) de celui des insectes (drosophila X) et du poulet (IBDV) (*Dobos et al., 1979*)

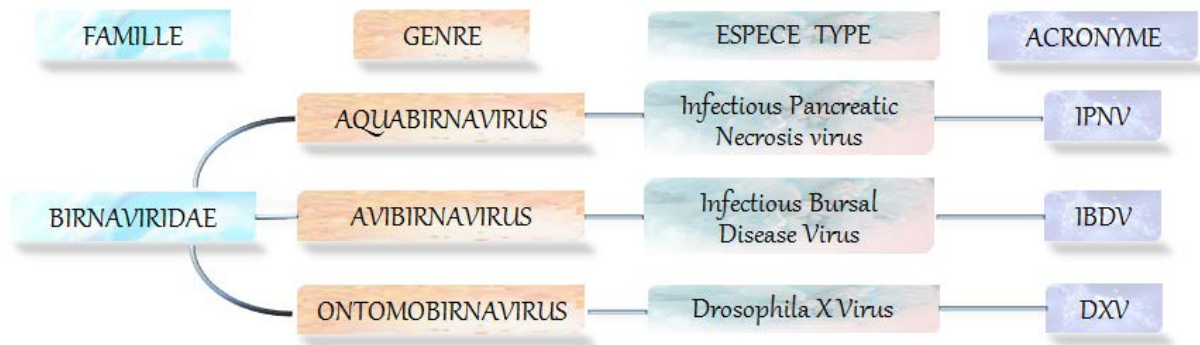


Figure n°1 : Taxonomie des Birnaviridae

MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VIRUS DE LA MALADIE DE GUMBORO/

Le virus de la maladie de Gumboro, seul représentant du genre Avibirnavirus, est un virus non enveloppé à ARN bicaténaire et bisegmenté, ayant un diamètre de 700 Å et protégé d'une capsidie simple icosaédrique de 32 capsomères (Kibenge et al., 1988b ; Bottcher et al., 1997). La capsidie des birnavirus est unique : Elle est dépourvue de la couche interne caractérisant les autres virus à ARN double brins (dsRNA: double-stranded RNA) (Bottcher et al., 1997)

Les particules virales obtenues par purification ont une densité variant de 1.29 à 1.33 g/ml dans du CsCl (cesium chloride) (Bottcher et al., 1997). Les densités inférieures à 1.33 g/ml sont celles de particules virales incomplètes avec ou sans ARN ou alors des particules de forme irrégulière avec un faible assemblage et une quantité anormale d'ARN double brins (Müller et Becht, 1982). Ces dernières sont généralement obtenues par passages répétés sur fibroblastes d'embryon de poulet (FEP ou CEF : Chicken Embryo Fibroblasts) et ne sont que rarement retrouvées au cours de la réplication virale dans la bourse de Fabricius (BF) (Müller et Becht, 1982). La formation de particules virales incomplètes expliquerait la perte de pathogénicité des virus adaptés à la culture cellulaire (Mcferran et al., 1980 ; Jungman et al., 2001)

La cryo-microscopie électronique a permis d'obtenir une image 3D de l'IBDV (Bottcher et al., 1997). Les sous-unités de la capsidie virale ainsi cartographiée se présentent sous forme de trimères

groupés, visibles aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur de la capsid. La coque du virus est faite d'une répétition de nombreuses sous-unités identiques liées entre elles. On y trouve ainsi, 780 copies de VP₂ (Viral protein 2), 600 copies de VP₃ et 60 copies de VP₄ (Dobos *et al.*, 1979). Un minimum d'information génétique est donc consacré aux composants de structure, ce qui procure au génome viral plus de solutions pour le problème d'encapsidation et celui de l'auto-assemblage.

Une purification de l'IBDV par gradient de densité a permis d'obtenir des formes virales icosaédriques et des formes tubulaires (*photo n°1*). Les tubules de type I et de type II ont respectivement un diamètre de 60 et 24-26 nm (Hirai *et Shimakura*, 1974 ; Nick *et al.*, 1976). Les tubules de type I, constitués de sous-unités régulièrement répétées, sont fréquemment observés dans les cellules infectées par les virus de la famille des birnaviridae (Granzow *et al.*, 1997) alors que les tubules de type II n'ont été retrouvés que dans les cellules IBDV-infectées (Harkness *et al.*, 1975 ; Granzow *et al.*, 1997). La présence de la structure tubulaire à l'intérieur des noyaux des cellules B de la BF n'a été signalée que par Kaufér *et Weiss* (1976). La coexistence dans les cellules IBDV-infectées de particules virales de différentes tailles expliquent la confusion faite par certains auteurs qui avaient classé, à tort, l'IBDV tant que picornavirus et réovirus.

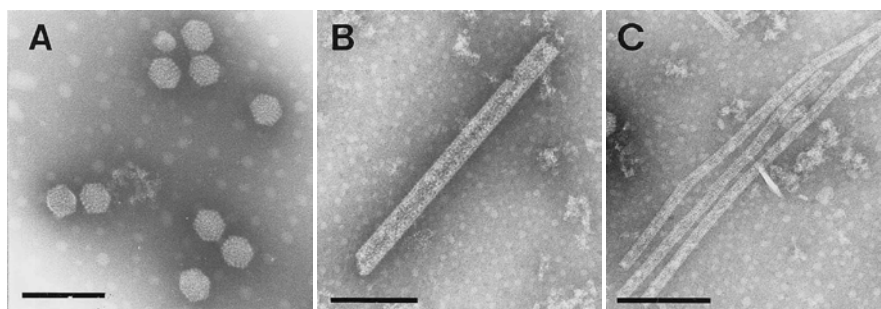


Photo n°1 : Structure icosaédrique (A) et tubulaire (tubules de type I (B) et de type II (C)) du birnavirus, déterminées par cryomicroscopie électronique (structure cristallographique) (Granzow *et al.*, 1997).

L'infection des cellules d'insectes et de mammifères par des virus vecteurs recombinants tels que le baculovirus et le virus de la vaccine, qui peuvent alors exprimer sélectivement différentes parties du génome viral de l'IBDV, a permis de mieux comprendre la structure du virus. Ainsi, l'expression de VP₃ seule n'a permis de détecter aucune structure virale alors que l'expression de la protéine précurseur de VP₂ (pVP₂) conduit à la formation de structures tubulaires. Seule l'expression de la polyprotéine a permis d'engendrer des VLP (Virus Like-Particules) dont la forme et la taille rappellent celles du virion. Par ailleurs, la maturation finale de VP₂ (pVP₂ → VP₂) ne peut avoir lieu que dans les particules virales, jamais dans les VLP. Cette maturation est en effet associée aux étapes ultimes du cycle viral (*Kibenge et al. 1999*)

Enfin, la structure cristallographique des birnavirus, déterminée par *Coulibaly et al. (2005)* montre une homologie structurale avec les autres virus icosahédriques tels que les virus à ARN bicaténaire et les virus à ARN+ monocaténaire.

LES PROTEINES VIRALES /

Sept à neuf polypeptides ont été retrouvés à l'intérieur des virions (*Müller et Becht, 1982*), un nombre bien plus important que celui des protéines virales identifiées dans les formes matures du virus. Ceci suggère l'existence d'une relation précurseur-produit entre ces divers polypeptides. Des discordances caractérisent les résultats des recherches quant au nombre des protéines virales et leurs poids moléculaires (*Hirai et al., 1979*). Ces contradictions sont attribuées à des différences dans les méthodes utilisées dans la culture et la purification virale ainsi qu'aux protocoles de séparation des protéines par électrophorèse.

La capside du virus, dans laquelle est empaqueté le génome viral, est constituée de protéines de structures. D'autres protéines, dites non structurales, n'entrent pas dans la constitution du virion et ne sont retrouvées que dans les cellules hôtes infectées. L'une des fonctions majeures des protéines virales de structure est de préserver la stabilité du virus dans le milieu extérieur et

maintenir son infectiosité à l'intérieur des cellules cibles. Quant aux protéines non structurales, notamment celles des virus à ARN, elles sont impliquées dans la pathogénicité et la virulence.

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 et comporte le motif conservé retrouvé dans toutes les ARN-polymérases (*Duncan et al., 1991; Dobos, 1995*). C'est une protéine de 97-kDa (kilo dalton), ne représentant que 3% des protéines virales. Elle est présente dans la capside sous deux formes, liée et libre (*Müller et Nitschke, 1987*).

La forme liée, notée VPg (Viral genome-linked protein), est associée de façon covalente aux extrémités 5' du génome bisegmenté, formant une structure en "manche de casserole" ce qui est supposé la protéger de la dégradation par les ribonucléases (*Müller et al., 1979*). Cette liaison permet aux 2 segments génomiques de s'organiser en cercle pour former une structure en anneau (*Müller et Nitschke 1987*). VPg est impliquée dans l'initiation de la réplication et dans l'assemblage lors du recrutement des ARNs génomiques.

La forme libre de VP₁ est celle qui porte l'activité ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp: RNA-dependant RNA-polymerase), associant une activité guananyl-transférase et méthyl-transférase, impliquée dans le masquage des copies d'ARN lors de la réplication virale (capping activity) (*Morgan et al., 1988; Spiess et al., 1989*).

Le recrutement de VP₁ et des segments génomiques dans la capside virale s'effectue par le biais d'une interaction avec VP₃, la protéine de structure formant la face interne de la capside (*Tacke et al., 2000*). Cette même interaction permet d'immobiliser la polymérase sur la surface interne de la capside et facilite l'accès à l'ARN double brins (*Lombardo et al., 1999; Tacke et al., 2000*)

L'activité polymérase de VP₁ nécessite la présence de l'ion Mg²⁺, lequel peut être partiellement remplacé par l'ion Mn²⁺ ou Co²⁺ (*von Einem et al., 2004*). Ceci indique le rôle essentiel de la coordination des ions métaux dans l'étape de la polymérisation.

Enfin, outre son rôle d'enzyme polymérase, la protéine VP₁ semble être impliquée dans le tropisme cellulaire (*Brandt et al., 2001*) et le contrôle de la virulence (*Liu et Vakharia, 2004*)

La protéine VP₂ est la protéine de structure majeure. C'est un polypeptide de 41-kDa, représentant 51% des protéines virales. L'analyse structurale montre que VP₂ forme des sous-unités trimères pour l'édification de la structure externe de la capsidie (*Bottcher et al., 1997*). Elle serait la seule protéine composant la capsidie virale (*Coulibaly et al., 2005*).

La structure de VP₂ offre à étudier 3 domaines distincts (*fig. n°2*): Un domaine B (Base) en hélices alpha, formé par les extrémités N et C-terminales de la chaîne polypeptidique, constituant la "Base" du trimère de VP₂; un domaine de surface S (Shell) assurant le contact entre trimères et l'étanchéité de la particule virale et un domaine P (Projection) formant les projections ou spécules et correspondant à la région centrale de VP₂, dite aussi hypervariable (ac. aminés 206 à 350) (*Bayliss et al., 1990; Garriga et al., 2006*) où sont présents des épitopes conformationnels spécifiquement reconnus par les anticorps monoclonaux (ACM) neutralisants (*Fahey et al., 1989*) permettant de différencier entre sérotype 1 et 2. Cette région hypervariable comporte également des épitopes linéaires non neutralisants spécifiques de groupe et communs aux 2 sérotypes (*Becht et al., 1988*). Récemment, *Wang et al. (2005)* ont démontré l'existence de 2 épitopes linéaires neutralisants correspondant aux positions 197 à 209 et 329 à 337 à l'intérieur de VP₂. Les anticorps (Ac) générés par ces 2 épitopes ont permis d'obtenir la neutralisation de la souche virulente H₄ et la souche vaccinale B87.

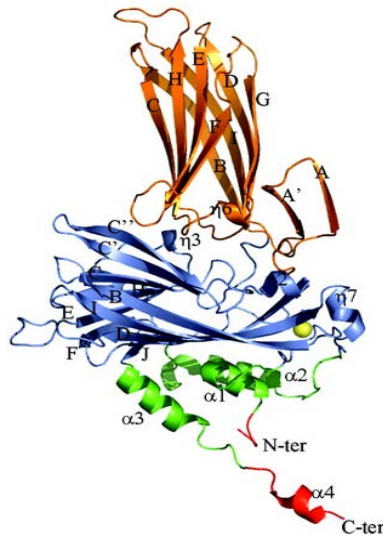


Figure n°2 : Représentation 3D de la structure de VP2. Les 3 domaines sont colorés par différentes couleurs. Le domaine B en vert, le domaine S en bleu et le domaine P en orange (Garriga et al., 2006)

VP2 est une protéine hydrophobe qui présente, dans sa région hypervariable, 2 pics hydrophiles majeurs A et B (entre résidus 212-223 et 314-324 respectivement) (Azad et al., 1987) où sont présents, à la surface du virus, des épitopes neutralisants exposés à la pression de sélection exercée par le système immunitaire du poulet. Le domaine variable de VP2 comporte également 2 autres pics mineurs (entre résidus 249-254 et 279-290) qui sont aussi responsables de l'antigénicité du virus. Les mutations à l'intérieur ou à l'extérieur de ces pics sont à l'origine de variants antigéniques et pathotypiques.

Les 2 pics majeurs A et B de la région hypervariable de VP2 constituent, respectivement, les boucles PBC et PHI à l'extrême partie du domaine P. Les délétions d'ac. aminés à l'intérieur de ces boucles sont cruciales pour les variations antigéniques derrière l'émergence de variants échappant à la neutralisation virale (Letzel et al., 2007). Par ailleurs, les 2 pics mineurs comportent, au sommet du domaine P de VP2, 2 autres boucles désignées PDE et PFG comprenant respectivement le résidu 253 et 284 incriminés dans l'infectivité des cultures cellulaires et la pathogénicité du virus chez le poulet (Mundt, 1999).

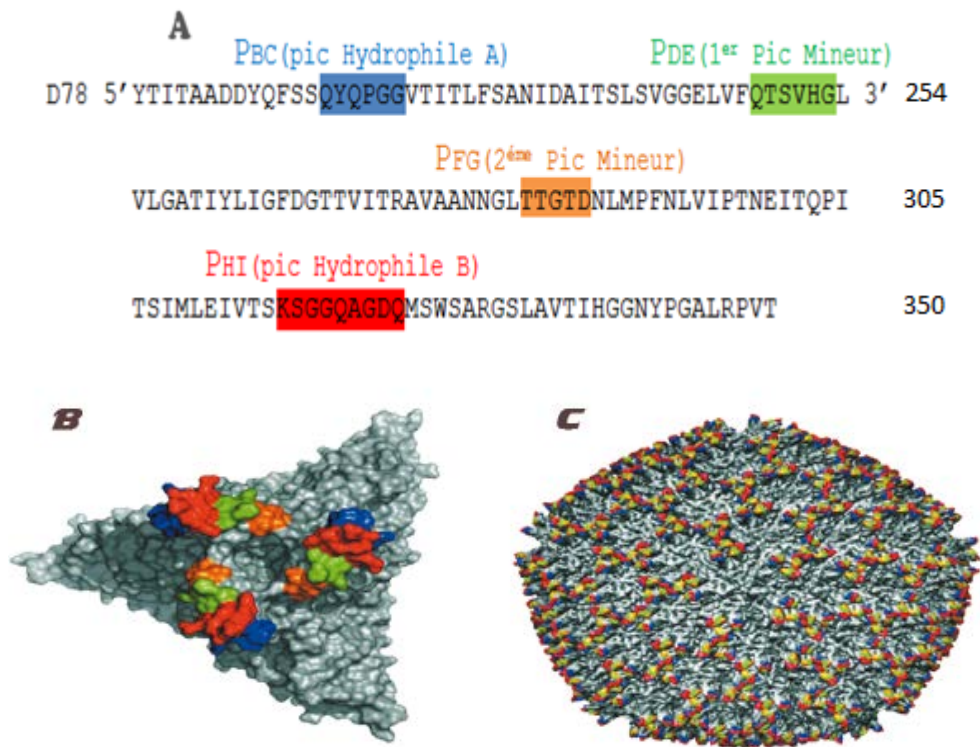


Figure n° 3 : (Letzel et al., 2007)

(A) Localisation des séquences de résidus constituant les structures en boucle dans le domaine P de la région hypervariable de VP2.

(B) Représentation 3D des trimères de VP2 avec leurs structures en boucle colorées selon les couleurs correspondantes dans l'alignement des séquences.

(C) Localisation des trimères et des boucles dans la structure générale du virus.

Snyder et al. (1992) ont identifié, à l'intérieur de la région hypervariable des virus classiques du sérotype 1, au moins 5 épitopes définis par les ACM neutralisants B69, R63, 179, 8 et 10. L'altération de l'un de ces épitopes n'affecte pas significativement la fixation des ACM sur les autres sites antigéniques. L'ACM B69 est spécifique aux souches virales classiques de sérotype 1 alors que l'ACM R69 neutralise les virus des 2 sérotypes y compris les virus variants (*Snyder et al., 1988a*)

Enfin, VP2 est impliquée dans le tropisme, la virulence et la pathogénicité du virus (*Mundt, 1999 ; Brandt et al., 2001 ; van Loon et al., 2002*)

La protéine VP₃ est une protéine de structure de 32-kDa, représentant 40% des protéines virales. Elle est considérée comme le composant antigénique majeur du virus et est responsable de l'intégrité structurale du virion. VP₃ forme des sous-unité trimères édifiant la structure interne de la capside (Hudson et al., 1986; Bottcher et al., 1997) et interagit avec la protéine VP₁ et l'ARN double brins du virus (Tacken et al., 2000). L'interaction VP₃-VP₁ jouerait un rôle majeur dans l'efficacité de l'encapsidation (Lombardo et al., 1999; Tacken et al., 2000).

Les épitopes linéaires retrouvés à l'intérieur de VP₃ sont spécifiques de groupes (Becht et al., 1988) et sont tous communs aux 2 sérotypes (Oppling et al., 1991). La région immunodominante de VP₃ se situerait entre les résidus 860 et 923 (Jagadish et Azad, 1991). Whetzel et Jackwood (1995) ont signalé l'existence à l'intérieur de VP₃ d'un épitope spécifique de l'ACM neutralisant 33E8. Cet ACM anti-VP₃ serait capable de neutraliser l'infectivité du virus jusqu'à l'étape de la pré-incubation mais pas après l'adsorption virale (Reddy et al., 1992). Signalons que d'autres travaux ont démontré que tous les ACM neutralisants sont spécifiques de VP₂ et qu'aucun d'eux n'est reconnu par VP₃ (Yamaguchi et al., 1996a).

Le rôle hypothétique de la protéine VP₃ dans la protection contre l'IBDV a fait l'objet de plusieurs travaux. Si Fahey et al. (1985) ont démontré que les Ac anti-VP₃ procurent une protection passive aux poussins, les travaux réalisés plus tard (Pitcovski et al., 1999) indiquent que la protéine recombinante VP₃, donnée comme vaccin sub-unitaire n'a pu protéger les poussins contre une infection par l'IBDV malgré la production d'un haut niveau d'AC. Ces données contradictoires dénotent de la complexité de la structure antigénique de VP₃.

La protéine VP₄ est un polypeptide de 28-KDa, représentant 6% des protéines du virus. Elle serait responsable du clivage de la polyprotéine virale (Jagadish et al., 1988) et sa présence dans le virion en tant que protéine de structure est encore controversée. Elle n'existerait que sous forme tubulaire (tubules de type II) à l'intérieur des cellules IBDV-infectées (Granzow et al., 1997).

L'activité protéolytique de VP₄ permet le processing de la polyprotéine VP₀ (pVP₂-VP₄-VP₃) encodée par le segment large du virus. La position exacte du clivage entre VP₄ et VP₃ est le site

MAA situé entre les résidus 754 et 756 (*Sanchez et Rodriguez, 1999*). Le site LAA, constitué par les acides aminés en position 511 à 513 est le lieu de clivage entre VP₄ et pVP₂ (précurseur de VP₂). La maturation de VP₂ (pVP₂ → VP₂), qui a lieu durant l'assemblage du virion, consiste en une série de clivages, dont les sites se situeraient entre les résidus 441-442, 487-488, 494-495, 501-502 et 512-513 (*Da Costa et al., 2002*)

Le site actif de la protéase virale a été déterminé et comprend les ac. aminés Ser-652 et Lys-692 situés dans la partie C-terminale de VP₄ (*Lejal et al., 2000; Birghan et al., 2000*). Ces 2 résidus sont essentiels pour l'activité protéolytique de VP₄ puisque leur suppression abolie complètement le processing de la polyprotéine virale.

La partie N-terminale (ac. aminés 1 à 222) et C-terminale (ac. aminés 335 à 503) de la protéase VP₄ sont respectivement conservées à 99% et 100% dans les différentes souches virales d'IBDV (*Lana et al., 1992*). Ces 2 portions de la protéine sont considérées ainsi comme essentielles à l'activité protéolytique de l'enzyme.

La protéine non-structurale VP₅: Sa participation dans la structure virale n'a pu être démontrée. Elle est donc désignée sous le nom de protéine non structurale (pNS). L'expression transitoire de la protéine VP₅ entraîne son accumulation à l'intérieur de la membrane plasmique de la cellule infectée, conduisant à l'altération de la morphologie cellulaire, à la disruption de la membrane plasmique et à la réduction drastique de la viabilité de la cellule infectée (*Lombardo et al., 2000*). La protéine VP₅ ne semble pas être immunogène. En effet, les virus mutants pNS-déficients auraient induit des titres en AC identiques à ceux obtenus par les souches parentales (*Yao, 1998*)

LE GENOME VIRAL /

Le dsRNA de l'IBDV est bisegmenté. Il est constitué d'un large segment A de 3.2 Kb (Kilobase) et d'un petit segment B de 2.9 kb, pouvant être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ou polyacrylamide (*Liu et al., 1994*). Les virus du sérotype 2 exhibent des segments

génomiques de plus petite taille. Ils sont en effet, plus petits de quelques 70 et 20 pb (paire de base) pour le segment A et B respectivement (*Becht, 1980*)

Le petit segment B est monocistronique. Il comporte un seul cadre de lecture ouvert ou ORF (Open Reading Frame) qui débute au nucléotide 112 en 5' terminal et code pour une seule protéine de 879 ac. aminés (94 k-Da) qui n'est autre que le polypeptide VP₁ (*Hudson et al., 1995*)

Le segment A est polycistronique. Il comporte 2 ORFs se chevauchant partiellement. Le 1^{er} ORF large débute au nucléotide 131 en 5' terminal et code pour une polyprotéine de 1012 ac. aminés (110 k-Da) (*Azad et al., 1985 ; Hudson et al., 1986*). Le 2^{ème} ORF moins large, débute au nucléotide 97 en 5' terminal et code pour une protéine non structurale de 145 ac. aminés (17 k-Da) qui n'est autre que le polypeptide VP₅ (*Mundt et al., 1995*)

La polyprotéine précurseur du virion est encodée par l'ORF large du segment A dans l'ordre suivant: NH₂-VP₅-VP₂-VP₄-VP₃-COOH. (*Azad et al., 1987*). Elle est ensuite clivée par autolyse pour donner naissance aux protéines de structure VP₂, VP₃ et la protéase VP₄ (*Morgan et al., 1988*)

Les 2 segments A et B sont flanqués de régions non codantes ou NCR (Non Coding Regions), dont la taille est similaire à celle des autres virus à ARN double brins (*Mundt et Müller, 1995*). La région non codante en 5' terminal est située 96 nucléotides avant le codon initiateur de VP₅ dans le segment A et 111 nucléotides en amont du codon initiateur de VP₁ dans le segment B. A l'intérieur de la 5'NCR des segments A et B, les 32 premiers nucléotides constituent un motif très bien conservé entre segments et entre sérotypes. La région non codante en 3' terminal dans le segment A des virus de sérotype 1 et 2 est constituée de 95 nucléotides. Sa taille dans le segment B est différente selon le sérotype: Elle est constituée de 82 nucléotides pour les virus de sérotype 1 et de 79 nucléotides pour les virus de sérotype 2.

Les séquences répétées directes et inverses (inverted repeat sequences) en 5' et 3'NCR pourraient contenir d'importants signaux pour la réplication virale, la transcription et l'encapsidation (*Kibenge et al., 1996*). Ces séquences permettent la formation des structures en

"manche de casserole", similaires à celles rapportées pour les influenza virus, où elles sont reconnues par la RdRp pour l'initiation de la transcription à un endroit spécifique du génome (Fodor et al., 1994). Cependant, la fonction précise des NCR est encore inconnue. En utilisant la génétique inverse, l'échange des NCR entre virus de sérotype 1 et 2 montre que les séquences non codantes ne sont pas impliquées dans la virulence de l'IBDV (Schroder et al., 2000).

Les 2 segments d'ARN A et B des birnavirus sont capables de former, dans les 25 derniers nucléotides de l'extrémité 3'NCR, des structures en tiges et en boucles (stem-loop structures), connues sous le nom de structures en épingle à cheveux (hairpin loop). De telles structures existent aussi dans d'autres virus comme les picornavirus et les coronavirus chez lesquels elles semblent jouer un rôle important dans la réplication de l'ARN, l'encapsidation du génome viral et la protection contre les exonucléases (Boot et Pritz-Verschuren, 2004). On pense que ces structures assumeraient des fonctions similaires chez les birnavirus, quoiqu'aucune étude ne l'ait encore confirmé.

von Einem et al. (2004) ont démontré que l'activité polymérase de VP₁ dépendait des séquences 3' terminal des segments A et B et que cette enzyme, en combinaison avec la séquence 3' terminal, pourrait être responsable d'une certaine spécificité dans l'étape de réplication. Ceci supporte l'idée que "la boucle en épingle à cheveux" interviendrait dans l'initiation du processus de réplication.

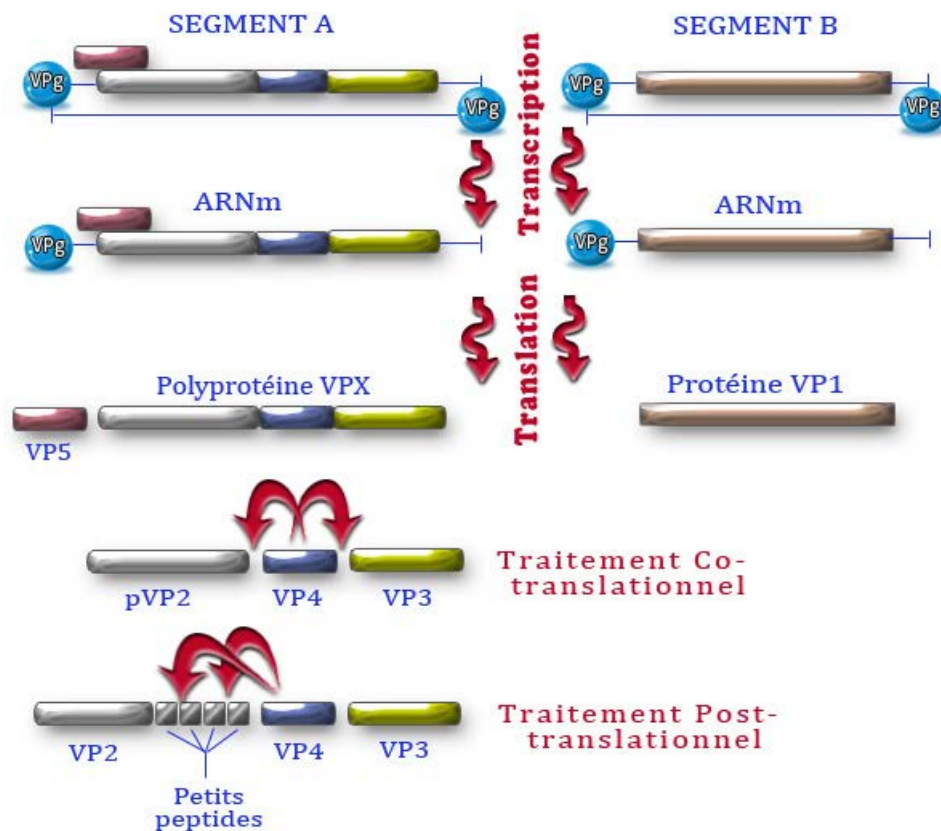


Figure n° 4: Organisation schématique du génome de l'IBDV (Fauquet et al., 2005)

ISOLEMENT DU VIRUS /

L'inoculation à des œufs embryonnés de poussins SPF entre 9 et 11 jours d'incubation via la membrane chorio-allantoïdienne est considérée comme la méthode la plus efficace pour la propagation/isolément de l'IBDV (Hitchner, 1970). Les Ac maternels, s'ils sont présents dans l'embryon, seraient capables d'inhiber la multiplication virale.

Le virus peut être isolé à partir du tissu bursal obtenu durant la phase aiguë de l'infection. A cet effet, le virus contenu dans l'homogénat des BF infectées est propagé sur des poulets de 3 à 6 semaines d'âge ou des œufs embryonnés SPF à 9-11 jours d'incubation. On fait moins appel aux systèmes de propagation utilisant des cultures cellulaires dans la mesure où les virus sauvages du terrain ne leurs sont pas toujours spontanément adaptés. Les cellules de rein ou de BF d'embryon

de poulet (CEK, CEB) peuvent être utilisées pour la propagation de l'IBDV (*Lukert et Davis, 1974*), mais une adaptation est requise pour propager le virus sur les fibroblastes d'embryons (CEF) (*Mcferran et al., 1980*).

Si l'isolement a été effectué sur poulets SPF, des lésions seront recherchées dans la BF, 72 à 80 heures PI. L'importance de ces lésions est fonction de la pathogénicité de la souche d'IBDV, mais aussi du titre viral de l'échantillon soumis à l'isolement. Dans le cas où la propagation est faite sur œufs embryonnés, les lésions seront recherchées seulement sur les embryons morts après 48 heures post-inoculation (PI). Les virus virulents classiques provoquent la mort des embryons entre 3 et 5 jours suivant l'inoculation intravitelline ou par voie chorio-allantoïdienne. Enfin, si la propagation a été faite sur culture cellulaire, on recherchera quotidiennement et pendant 6 jours PI l'apparition d'un effet cytopathique (ECP).

Les BF des poulets SPF infectés par un virus de sérotype 1 apparaissent jaunâtres et œdématisées (parfois hémorragiques). Les plis des bourses présentent des pétéchies et un œdème entoure parfois l'organe. Les embryons qui meurent au-delà de 48 heures PI montrent un œdème sous-cutané, une congestion et des hémorragies sous cutanées ou intracrâniennes. Le foie est habituellement hypertrophié, avec des tâches de congestion lui donnant un aspect marbré. En cas de mort tardive, le foie peut être hypertrophié et verdâtre, avec des zones de nécrose. Contrairement aux virus classiques du sérotype 1, les variants Américains occasionnent tout au plus un retard de croissance des embryons avec une décoloration, une splénomégalie, une stase biliaire, des lésions de nécrose hépatiques et un œdème abdominal chez les poussins qui naissent infectés. Enfin, l'ECP sur cellules cultivées est non spécifique. Il se manifeste par l'apparition de cellules rondes et réfringentes avec granulations cytoplasmiques périnucléaires et un détachement des cellules (*Kibenge et Mckenna, 1991*).

En l'absence de mort embryonnaire, il convient de broyer stérilement et de clarifier les embryons récoltés à l'issu du premier passage, puis de procéder à 2 passages séries supplémentaires. Dans le cas de la culture cellulaire, l'absence d'ECP au terme des 6 jours

d'observation, oblige à procéder à la congélation-décongélation des tapis cellulaires et à réinoculer le lysat obtenu à des cultures cellulaires fraîches. Ce protocole peut devoir être répété au moins 3 fois.

Enfin, La spécificité des lésions, éventuellement causées par la multiplication du virus, doit être démontrée en neutralisant l'effet viral avec un sérum monospécifique anti-IBDV.

IDENTIFICATION DU VIRUS /

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

L'épreuve d'immunodiffusion sur gélose (IDG) est largement utilisée. Elle est basée sur la confrontation sur milieu gélosé de petits fragments de tissu bursal infecté avec un antisérum de positivité connue vis-à-vis de l'IBDV. Le titre viral peut être amélioré par des cycles de congélation/décongélation du tissu bursal en favorisant le relargage des antigènes viraux.

L'identification par immunofluorescence est basée quant à elle sur la recherche d'une fluorescence à la surface de coupes ultrafines de BF mises en contact avec un antisérum spécifique de l'IBDV marqué à la fluorescéine.

L'identification de l'IBDV par méthode ELISA indirecte est basée sur la réaction antigène viral-anticorps de capture, réaction révélée par un anticorps de détection. Selon que l'on désire une simple identification virale ou alors une caractérisation du virus, on peut utiliser comme anticorps de capture un sérum polyclonal ou des anticorps monoclonaux respectivement.

L'identification par les techniques moléculaires est plus rapide que les autres techniques passant par l'isolement du virus. La méthode moléculaire la plus utilisée est la détection du génome viral par transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (rt-PCR). Les protocoles de base pour la rt-PCR comprennent 3 étapes : l'extraction des acides nucléiques à partir de l'échantillon étudié, la transcription inverse de l'ARN viral en ADNc

(ADN complémentaire), puis l'amplification de l'ADNc par PCR. Les deux dernières étapes exigent que l'utilisateur définisse des amorces oligonucléotidiques qui consistent en de courtes séquences complémentaires et spécifiques de la séquence nucléotidique du génome viral. Différentes régions du génome viral peuvent être amplifiées selon la position dans le génome des amorces qui ont été sélectionnées.

EVOLUTION DES VIRUS DE LA MALADIE DE GUMBORO /

Mécanismes de diversification virale des virus à ARN :

Durant la réplication virale, des erreurs de transcription peuvent avoir lieu, conduisant à des mutations. En raison de leur stratégie de réplication dépourvue de mécanismes efficaces de lecture durant la transcription, les virus à ARN génèrent un plus haut degré de mutation que les virus à ADN (Domingo et Holland, 1997). En conséquence, un nombre important de mutants émergent durant le cycle de l'infection, même si leur transmission n'est pas toujours couronnée de succès. Le phénomène est connu sous le nom de "*boulet d'étranglement*". Dans le cas où les mutations aléatoires génèrent des mutants capables d'une transmission efficace, d'une propagation parmi les populations sensibles et d'un échappement aux mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, ces mutants persistent parmi la progéniture de virus agents de la maladie.

L'accumulation des mutations génétiques ponctuelles conduit à une "*dérive génétique*", laquelle, si elle se solde par une altération du code génétique encodant les acides aminés des protéines virales, peut engendrer une "*dérive antigénique*". Dans certaines populations de virus, les variants antigéniques peuvent coexister, dans d'autres, les variants émergents remplacent la génération de variants antérieurs. Ceci est connu sous le nom d'évolution virale. Les variations génétiques et les variations antigéniques qui leur sont associés, peuvent être la conséquence de délétions ou de réarrangements causés par des phénomènes de recombinaison ou de réassortiments. Le réassortiment est un mécanisme de variation antigénique bien connu chez les virus à ARN segmenté.

La survie des virus variants et leur persistance est conditionnée essentiellement par leur infectivité et leur aptitude à échapper à la réponse immune de l'hôte. Ainsi les variants à haute infectivité se transmettent et donc se propagent de manière plus efficace. De la même façon, les variants présentant des altérations de sites antigéniques impliqués notamment dans la neutralisation virale, peuvent échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

Emergence des variants antigéniques et pathotypiques du virus de la maladie de Gumboro:

Les virus de la maladie de Gumboro se distinguent par leurs caractères antigéniques mais aussi par leur virulence. Les souches appartenant aux 2 sérotypes majeurs 1 et 2, ne sont pas toutes pathogènes pour le poulet. Les virus, agents de la maladie clinique, appartiennent tous au sérotype 1. Les souches de sérotype 2 sont apathogènes (*McFerran et al., 1980*).

L'adaptation des virus du sérotype 1 via une série de passages sur cultures cellulaires a donné naissance à des souches atténuées utilisées comme vaccins, ne provoquant pas de mortalité mais possédant toutes, une pathogénicité résiduelle.

Enfin, au cours de leur évolution, les virus virulents classiques du sérotype 1 ont donné naissance à 2 types de variants, antigéniques et pathotypiques. Ces derniers sont aussi connus sous le nom de virus hypervirulents.

L'émergence de nouvelles souches virales est un mécanisme courant de diversification génétique des virus à ARN. Certaines mutations se produisant durant le cycle viral de l'IBDV sont incompatibles avec la survie du virus. D'autres au contraire, lui permettent d'augmenter son habilité à se multiplier dans l'organisme du poulet. Ainsi, les mutants qui naissent durant la réplication virale, comme conséquence des erreurs de transcription, subissent une sélection positive dictée par divers facteurs de l'environnement dont le plus important est la pression vaccinale (*Snyder, 1990*). En effet, l'utilisation extensive de vaccins inactivés anti-Gumboro, présentant un répertoire limité d'épitopes neutralisants, pourrait présenter le risque d'une sélection de virus mutants, notamment durant les réponses immunes sub-optimales.

Des études récentes menées sur les virus hypervirulents du Nigeria ont estimé que la fréquence de mutation par nucléotide à travers la région hypervariable de VP2 avoisinait les 0.24% (Owoade et al., 2004). Comparé au rotavirus, un autre virus à ARN segmenté, le taux de mutation dans cette région du génome, est 10x plus élevé chez les birnavirus.

Le génome segmenté de l'IBDV, à l'identique des influenza virus, rend théoriquement possible l'existence de phénomènes de réassortiment génétique entre souches virales apparentées durant les co-infections (Sun et al., 2003; Kong et al., 2004). Ceci peut se produire notamment chez les poulets qui reçoivent un vaccin vivant au moment où ils incubent un virus sauvage. Ce qui limite la naissance de virus reassortants ou du moins leur transmission et favorise donc la coévolution des 2 segments, serait un mécanisme de contrôle de compatibilité entre segments, impliquant par exemple des interactions entre la protéine VP3 encodée par le segment A et VP1 encodée par le segment B (Tacken et al., 2000 ; Tacken et al., 2002)

Le Nouën et al. (2006) ont conclu à une coévolution des 2 segments A et B quand ils ont procédé à la caractérisation moléculaire et l'analyse phylogénétique d'une cinquantaine d'isolats. Cependant, 26% des souches examinées ont exhibé une position phylogénétique différente selon le segment analysé. Le segment A de l'une de ces souches (la souche GX) était apparenté aux vIBDV (very virulent Infectious Bursal Disease Virus) alors que son segment B en était distinct.

Les résultats des travaux de Le Nouën et al. se heurtent cependant à ceux d'autres auteurs. Ainsi, les analyses phylogénétiques effectuées par Islam et al. (2003) sur le segment B ont montré que les vIBDV formaient un groupe distinct suggérant que ces souches virales avaient acquis le segment B d'une source non identifiée, probablement par réassortiment génétique (Müller et al., 2003 ; Hon et al., 2006).

L'évolution des virus de la maladie de Gumboro, par mutations ponctuelles ou par réassortiments génétique, a amené, au milieu des années 1980, une situation épidémiologique différente de la maladie de Gumboro en Europe et aux USA.

Aux USA, cette nouvelle situation, caractérisée notamment par une plus grande fréquence des échecs de vaccination, était liée à une dérive antigénique à l'origine de virus variants ayant une identité antigénique différente de celle des virus standards du sérotype 1. Ces variants antigéniques ont également été signalés en Australie (*Sapats et Ignjatovic, 2000*), en Amérique centrale et en Amérique du sud (*Banda et al., 2003*). Des virus sauvages, montrant une antigénicité atypique ont été identifiés en Europe (*Etteradossi et al., 1998; Letzel et al., 2007*), mais n'ont pas pour autant remplacé les variants pathotypiques qui restent prédominants.

Les variants antigéniques, absents dans les pays d'Europe et d'Afrique (ils seraient présents en Europe de l'Ouest et en Afrique du Sud selon *Jaccwood (2013)*, n'ont apporté aucune augmentation du taux de mortalité mais contrairement aux virus classiques, induisent une atrophie rapide de la BF avec une faible réaction inflammatoire et une absence de symptômes cliniques (*Box, 1989*). Ceci explique la prédominance de la forme sub-clinique de la maladie dans les élevages de poulets aux USA.

Le variant MD a été isolé pour la 1^{ère} fois aux USA par *Saif en 1984* sur des poulets suffisamment protégés par des Ac spécifiques au sérotype 1 standard. 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 (1985)*. Aujourd'hui, l'existence de virus transitionnels entre virus classiques et variants est de plus en plus évidente (*Bayyari et al., 1996*)

Les virus responsables des échecs de vaccination en Europe étaient par contre des variants pathotypiques qui restent antigéniquement apparentés aux virus classiques de sérotype 1 standard (*Brown et al., 1994*). L'étude récente menée par *Owoade et al. (2004)* suggère que les vIBDV d'Europe proviennent de l'Afrique de l'Ouest puisque un haut degré de diversité génétique a été rapporté parmi les vIBDV au Nigéria. Depuis leur émergence en Europe au milieu des années 1980, les virus hypervirulents ont été isolés au Japon, dans des pays Asiatiques, Africains et dans certains pays de l'Amérique latine (*Di Fabio et al., 1999a,b*). Ils sont aujourd'hui de distribution mondiale.

Certains pays tels, le Canada, l'Australie et la Nouvelle Zélande sont restés jusque-là indemnes (*Snyder, 1990; Proffitt et al., 1999; Sapats et Ignjatovic, 2000*).

Aujourd'hui on ne sait pas encore si ces vIBDV représentent une forme d'évolution des virus classiques ou alors préexistaient dans la nature dans d'autres espèces aviaires (*Islam et al., 2001*)

LES DETERMINANTS VIRAUX DE LA VIRULENCE /

Diverses approches basées sur les systèmes génétiques inverses ont permis de comprendre la signification des éléments viraux de structure, leurs propriétés et leurs rôles biologiques. Ces nouvelles approches consistent en la création de virus VP5-déficients, réassortants et recombinants inter-sérotypes ou inter-pathotypes et en la génération de mutations induites par des délétions ou des substitution d'ac. aminés par mutagenèse contrôlée de sites (site-directed mutagenesis)

Les déterminants viraux spécifiques de virulence, élucidés par les différents travaux, ne sont pas unanimement reconnus. De plus, le séquençage des segments A et B des souches pathogènes (sérotipe 1) et apathogènes (sérotipe 2) a révélé des nucléotides différents le long des 2 segments, suggérant une nature multigénique de la virulence. Ceci dit, entre souches pathogènes et apathogènes, le pourcentage d'identité nucléotidique à l'intérieur du segment A est moins important que celui retrouvé à l'intérieur du segment B (83 à 84% vs 89%) (*Kibenge et al., 1991; Brown et Skinner, 1996*). Cette faible identité génétique dans le segment A entre sérotipe 1 et 2 est attribuée essentiellement à la séquence codant la région hypervariable de la protéine de structure VP2.

Pour identifier les déterminants viraux responsables de la virulence on a eu le plus souvent recours à la création de virus chimères, à l'étude de la réactivité des virus vis-à-vis d'Ac monoclonaux et à l'alignement des séquences d'acides aminés à l'intérieur des protéines virales des différentes souches d'IBDV.

Détermination des marqueurs de la virulence par construction de virus recombinants inter-pathotypes :

Les virus chimères r1MVP₂ et rGLSVP₂ construits par *Brandt et al. (2001)*, comportant les séquences génomiques codant la protéine VP₂ de la souche virulente 1M (r1MVP₂) et du variant GLS (rGLSVP₂) ont provoqué respectivement une destruction et une atrophie de la BF, semblables à celles causées par les virus parents 1M et GLS. Ceci n'a pas été le cas des virus chimères r1MVP₄, r1MVP₃, rGLSVP₄ et rGLSVP₃. Ceci prouve que les marqueurs de virulence se situent dans la protéine virale VP₂ et non pas dans les protéines VP₃ et VP₄.

Bien que les changements d'ac. aminés à l'intérieur de VP₂ constituent la base moléculaire des variations pathotypiques, VP₂ n'est pas le seul marqueur de pathogénicité du virus de la maladie de Gumboro. En effet, la substitution du gène VP₂ de la souche hypervirulente D6948 par le gène correspondant de la souche atténuée CEF94 n'a pas affecté la pathogénicité de la souche v1BDV. Ceci confirme que VP₂ n'est pas le seul déterminant de virulence (*Boot et al., 2000a; Boot et al., 2004*).

Détermination des marqueurs de la virulence par construction de virus pNS-déficients :

En vue d'étudier la fonction de la protéine VP₅ in vivo, des virus pNS-déficients ont été créés à partir de virus reconnus pour leur capacité à provoquer des lésions au niveau de la BF. Ces virus mutants ont conservé leur aptitude à se répliquer au niveau de la BF des poulets inoculés, mais sans pouvoir induire de lésions. Ceci démontre que la protéine VP₅ est directement impliquée dans la pathogénicité de l'IBDV, mais elle n'est pas requise pour la réplication virale (*Mundt et al., 1997; Yao, 1998*). Par ailleurs, et alors que la pNS est très bien conservée dans toutes les souches virales du sérotype 1 (plus de 95% d'identité), celle des virus du sérotype 2 apparaît différente et ne montre pas plus de 73% d'identité. Les souches virales appartenant au sérotype 2 étant naturellement apathogènes, on peut en déduire que la pNS joue un rôle déterminant dans la pathogénicité de l'IBDV (*Yao, 1998*). Le mécanisme d'action de la pNS (VP₅) est encore mal connu. Son action se situerait à la fin du cycle de réplication du virus et consisterait à provoquer la rupture

de la membrane plasmique de la cellule infectée, permettant ainsi la libération des particules virales.

Détermination des marqueurs de la virulence par l'étude de la réactivité des virus vis-à-vis d'Ac monoclonaux (ACM):

Bien qu'il n'existe pas pour le moment des Ac spécifiques réagissant exclusivement avec les virus hypervirulents, différentes batteries d'ACM sont aujourd'hui utilisées pour "l'identification présomptive" des vIBDV. L'usage des ACM a l'avantage, par rapport à la carte de restriction utilisant les endonucléases, d'être plus fiable. En effet, l'épitope identifiant l'ACM est directement dicté par des ac. aminés encodés et ne peut être affecté par des éventuelles mutations silencieuses, comme c'est le cas des sites de restriction.

Exceptées la souche hautement pathogène isolée en Cote d'Ivoire (la souche 88180) (*Pina et Gardin, 2003*) et la souche Egyptienne (99323) (*Etteradossi et al., 2004*), la plupart des virus hypervirulents se distinguent par leur profil de réactivité vis à vis d'ACM référencés. En effet, contrairement aux souches virulentes classiques et atténuées, les vIBDV, notamment ceux d'origine Européenne, réagissent faiblement avec l'ACM₃ et l'ACM₄ (*Domanska, 2004*) (*tab. n°1*). Les virus variants Américains quant à eux ne fixent aucun des 8 ACM. D'autre part, seules les souches hypervirulentes semblent réagir avec l'ACM₂₁ (*Mengel-Whereast, 1995; Shan, 2001*).

Tableau n°1: Réactivité des pathotypes Européens, Américains et Africains (Cote D'ivoire) vis-à-vis d'une batterie de 8 ACM de souris (Domanska et al., 2004).

Souche Virale	Origine	Virulence (S. cliniques)	ACM 1	ACM 3	ACM 4	ACM 5	ACM 6	ACM 7	ACM 8	ACM 9
F52/70	G. Bretagne	Classique	72%	71	58	59	88	96	91	76
Cu1 wt	Allemagne	Classique	68	135	106	58	116	107	133	50
D78	Pays bas	Atténuée	+	+	+	+	+	+	+	+
PBG98	G. Bretagne	Atténuée	+	+	+	nt	+	+	+	+
Var. E	USA	Subclinique	nt	2	nt	nt	6	nt	8	nt
Var. GLS	USA	Subclinique	nt	0	nt	nt	0	nt	0	nt
88180	C. D'ivoire	vvIBDV	111	2	9	58	124	132	77	107
89163	France	vvIBDV	58	1	6	27	95	86	76	73
91168	France	vvIBDV	62	1	15	46	96	50	3	68
9448	Pologne	vvIBDV	65	1	8	39	109	112	84	76
Moh/96	Hongrie	vvIBDV	78	5	17	82	152	171	136	49

Plus élevé est le %, plus haute est l'affinité de la souche pour l'ACM.

« + », « - » indiquent respectivement une neutralisation ou une absence de neutralisation.

nt : non testée.

Tableau n°2 : Résidus critiques pour la fixation des AMC (Etteradossi et al., 1998)

ANTICORPS MONOCLONAUX								
	ACM 1	ACM 3	ACM 4	ACM 5	ACM 6	ACM 7	ACM 8	ACM 9
Résidus Critiques pour la fixation à l'ACM	?	Pro 222 et Gly 223		Gln 249		Séquence 318-323	Gln 324	?

Récemment, une étude faite sur différents pathotypes d'IBDV de diverses origines (Afrique, Europe, Asie, Amérique Latine) a présenté l'ACM CRAb 88 (Chicken Recombinant Antibody 88) comme possible marqueur de la virulence. Cet ACM a en effet, réagit de façon exclusive avec les vvIBDV provenant d'Angleterre, de France, de Belgique, des Pays bas, de Chine, d'Indonésie, du Brésil et d'Afrique. Les résidus 256(1) et 294(1), spécifiques aux virus hypervirulents, joueraient un rôle dans la fixation de l'ACM CRAb 88 (Sapats et al., 2006)

Détermination des marqueurs de la virulence par l'usage des enzymes de restriction :

La recherche des sites de restriction de différentes enzymes sur les produits de la rt-PCR a également été utilisée pour distinguer les différents pathotypes d'IBDV (*Jackwood et Jackwood, 1994 ; Jackwood et Nielsen, 1997 ; Jackwood et Sommer, 1997*). Six endonucléases, supposées avoir des sites de restriction dans un fragment de 394 bases du gène VP₂ ont été utilisées.

Le site de restriction BspMI, correspondant à la substitution (P→A) en position 222 est responsable de la perte de neutralisation des vIBDV par les ACM dans un test d'ELISA capture et a été proposé comme marqueur des souches hypervirulentes (*Etteradossi et al., 1998*). Celles-ci partagent également le site de restriction SspI qui est souvent utilisée pour caractériser les virus hautement pathogènes (*Jackwood et Sommer, 1997*). La souche Ouest-Africaine 88180 fait cependant exception, puisqu'elle est dépourvue des 2 sites BspMI et SspI (*Etteradossi et al., 1999*)

La région de restriction AccI-SpeI, est très bien conservée chez la plus part des vIBDV, ce qui les distingue des autres virus classiques et variants (*Brown et al., 1994*).

L'enzyme BstNI reconnaît une séquence de 6 bases dans les produits de la rt-PCR. Elle est donc moins efficace dans la discrimination entre les souches virales que l'enzyme MboI qui elle, reconnaît une séquence de seulement 4 bases (*Jackwood et Sommer, 1998*)

Détermination des marqueurs de la virulence par alignement des séquences et mutagenèse contrôlée de sites:

Pour déterminer avec précision les résidus de VP₂ responsables de virulence, *Brandt et al. (2001)* ont utilisé l'alignement des résidus de la protéine VP₂ de souches virales d'inégale pathogénicité. La *figure n°5* montre l'alignement des séquences dans les souches virales hypervirulentes (HK46, UK661 et OKYM), virulentes classiques (Edgar, STC, IM) et souches atténuées (D78 et OKYMT: la souche OKYM atténuée par passage sur culture cellulaire).

		279	284	
D78	SVHGLVVLGATIYLIIGFDGTTVITRAVAANNGLTTGTDNLMPFNLVIPTNE			300
IM	Q-----A-----D-----A-----S	D	A	300
EDGAR	Q-----A-----D-----A-----S	D	A	300
STC	Q-----F-----D-----A-----S	D	A	300
OKYMT	Q T-----A-----N-----I-----S	N	I	300
OKYM	Q I-----A-----D-----A-----I-----S	D	A	300
UK661	Q I-----A-----D-----A-----I-----S	D	A	300
HK46	Q I-----A-----D-----A-----I-----S	D	A	300

Figure n°5: Détermination des résidus de VP2 responsables de la virulence par alignement des séquences du domaine hypervariable des souches virulentes (IM, EDGAR, STC, OKYM, UK661, Hk46) et des souches adaptées à la culture cellulaire (OKYMT) avec celui de la souche atténuée D78 (Brandt et al., 2001).

- Le tiret sous la lettre indique que l'ac. aminé de la souche virale est le même que celui retrouvé dans la souche D78 à la même position
- La lettre indique un changement de l'ac. aminé dans la souche virale par rapport à celui retrouvé dans la souche D78 à la même position

Les acides aminés en position 279 et 284 sont les mêmes dans les souches virulentes (lettres en rouges dans la figure) et sont différents dans les souches atténuées. Ils sont donc considérés comme des marqueurs de virulence et de pathogénicité. Ainsi, la présence simultanées des 2 acides aminés D et A, en position 279 et 284 confère le phénotype virulent, comme démontré par d'autres travaux (Yamaguchi et al., 1996b). Les substitutions au niveau de ces 2 résidus engendreraient une perte du caractère hydrophile de la région hypervariable de VP2 et pourrait altérer la conformation de la structure de surface du virion. Signalons toutefois que le résidu D en position 279 est bien conservé chez les 2 souches apathogènes du serotype 2: OH et 23/82. De même, les souches virulentes GLS et Cu-1 partagent avec les souches naturellement apathogènes du sérotype 2 le résidu T en position 284 (Nagarajan et Kibenge, 1997).

Toutes les substitutions de résidus constatées chez les vIBDV, exceptée une, sont localisées dans le domaine hypervariable de VP2 (Schnitzler et al., 1993). Par ailleurs, les substitutions d'ac. aminés communes aux vIBDV d'Europe et du Japon sont situées entre les 2 régions hydrophiles de VP2. Une seule d'entre elles concerne le résidu en position 222 (P→A), dans la 1^{ère} région hydrophile. Signalons que les substitutions dans la 2^{ème} région permettraient aux virus d'échapper à la neutralisation virale, ce qui est le cas des variants antigéniques.

La séquence supposée être associée à la virulence est l'héptapeptide adjacent à la 2ème région hydrophile du domaine VP2 (entre résidus 326 et 332) (*Brown et al., 1994*), laquelle comporte invariablement, chez les vIBDV du Japon et d'Europe, mais aussi chez les variants isolés aux USA, la séquence conservée riche en sérine "SWSASGS" (*Brown et Skinner, 1996 ; Dormitorio et al., 1997*). Signalons tout de même que la souche hypervirulente OKYM a conservé, après atténuation (souche OKYMT), l'héptapeptide riche en sérine (*Yamaguchi et al., 1996b ; Brandt et al., 2001*) (fig. n°6)

D78	ITQPITSIMLEIVTSKSGGQAGDQMSWSARGSLAVTIHGGNYPGALRPVT	350
IM	-----S-----	350
EDGAR	-----S-----	350
STC	-----V-----S-----	350
OKYMT	-----F-----S-----	350
OKYM	-----S-----	350
UK661	-----S-----	350
HK46	-----S-----	350

Figure n°6: La séquence conservée riche en sérine "S-W-S-A-S-G-S" distingue les souches virulentes des souches atténuées (*Brandt et al., 2001*).

Il semblerait que les souches les plus virulentes sont celles qui ont le plus de résidus sérine dans cette région du domaine VP2 (*Vakharia et al., 1994a*). Les liaisons hydrogènes présentes au niveau du motif riche en sérines permettraient des interaction intra- et inter-molécules, ce qui est déterminant pour la virulence. De telles interactions ne sont pas possibles chez les virus apathogènes ou faiblement pathogènes, car la substitution d'un ou 2 sérines (S) par d'autres résidus prendrait plus d'espace dans la structure (*Heine et al., 1991*). Dans cette région riche en sérines, les virus apathogènes de sérotype 2 présentent 3 substitutions. Ces mêmes virus sont caractérisés par l'insertion du résidu sérine en position 249 à l'intérieur de VP2 et la délétion du résidu en position 680 dans la protéine VP4 (*Kibenge et al., 1991*).

En plus de la séquence riche en sérine, les vIBDV du Japon et d'Europe partagent, tous et de façon simultanée, des ac. aminés uniques en position 222, 256 et 294, lesquels ne sont pas retrouvés chez les virus moins virulents (*Etteradossi et al., 1999*). D'autres auteurs (*Brown et Skinner, 1996 ; Cao et al., 1998 ; Chen et al., 1998*) considèrent que les résidus en positions 222(A), 256(I), 294(I) et 299(S) sont caractéristiques de tous les virus hypervirulents, exceptée la souche Ivoirienne.

L'alignement de séquences du gène codant la protéine non structurale VP₅ a également permis de retrouver de façon exclusive chez les vIBDV, 2 ac. aminés uniques en position 49 (R) et 137 (W). Ceci atteste que les marqueurs de virulence existent aussi en dehors de la protéine VP₂, d'autant plus que VP₅ est très bien conservée parmi les souches de sérotype 1 (plus de 95% d'apparenté), mais présente une hétérogénéité de séquences entre virus de sérotype 1 et virus apathogènes de sérotype 2 (73% d'apparenté).

Une nouvelle méthode pour l'identification des marqueurs de la virulence consisterait à isoler les virus mutants résistants aux Ac à partir de souches sauvages parentales par une série de passages sur culture cellulaire sous une pression de sélection immune. L'analyse moléculaire du virus mutant partiellement résistant à la neutralisation, pouvant émerger durant les passages en série en présence de dilutions minimales restrictive d'Ac polyclonaux neutralisants, procurerait probablement des informations relatives à la localisation des régions génomiques impliquées dans la virulence ou l'atténuation de la virulence.

DETERMINANTS VIRAUX DU TROPISME CELLULAIRE /

Le tropisme cellulaire des virus est leur habilité à se propager dans certains types de cellules. Parmi tous les birnavirus, seul l'IBDV est capable de se multiplier dans des cellules de mammifères, il a cependant un tropisme spécial pour la BF et l'infection est en étroite relation avec le développement de cet organe. L'âge le plus réceptif étant entre 3 et 6 semaines, quand le développement de BF est à son maximum (*Fadly et Nazerian, 1983*). Des études in vitro ont confirmé que tous les stades de différenciation des cellules B ne sont pas permissifs à l'infection et que l'IBDV se multiplie exclusivement dans les lymphocytes B en pleine division (*Müller, 1986*), jamais dans les lymphoblastes immatures ou les lymphocytes B compétents (*Becht, 1980*). Ceci est lié au fait que, seules les cellules B en pleine différenciation, exprimant l'immunoglobuline de surface M (IgM+), présentent des récepteurs de surface comportant des protéines N-glycosylées, spécifiques au virus de la maladie de Gumboro (*Ogawa et al., 1998*). Les monocytes et les

macrophages sont aussi susceptibles à l'infection mais le mécanisme de pénétration du virus dans ces cellules est encore inconnu.

In vitro, les souches d'IBDV montrent différents tropismes cellulaires (*tab. n°3*). C'est ainsi que les souches atténuées classiques peuvent être multipliées à hauts titres sur culture cellulaire primaire ou en lignée établie sans variations phénotypiques ou génomiques (*Cowen et Braune, 1988 ; Hassan et al., 1996*). Les virus hypervirulents ne sont pas adaptés à la culture cellulaire. Signalons tout de même que la lignée continue LSCC-BK₃ permettrait la propagation des souches virulentes, quoique sans effet cytopathique (*Tsukamoto et al., 1995a*). Quant aux souches du sérotype 2, elles possèdent des récepteurs spécifiques sur les cellules lymphoïdes mais sont incapables de s'y multiplier. Ce paradoxe met en évidence la complexité de la notion de tropisme tissulaire qui ne doit pas être réduite à la simple présence de récepteurs à la surface des cellules. En effet, certains virus sauvages seraient inaptes à se multiplier sur cultures cellulaires non pas parce que les cellules sont dépourvues de récepteurs qui leurs sont spécifiques, mais plutôt parce qu'ils sont incapables d'y pénétrer. Ainsi, l'utilisation de la lipofectine pour la transfection de particules virales à l'intérieur des FEP, en permettant au virus de contourner la membrane cellulaire, a permis de propager le virus variant GLSBD (GLS Bursal Derived) sur culture cellulaire (*Meihong et Vakharia, 2004*)

A l'identique des souches de sérotype 1 adaptées à la culture cellulaire, les virus de sérotype 2 se multiplient dans les FEP. En effet, ces dernières possèdent des récepteurs cellulaires communs aux 2 sérotypes et des récepteurs spécifiques pour chaque sérotype (*Nieper et Müller, 1996*).

Tableau n°3: Tropisme cellulaire des différents pathotypes du virus de la maladie de Gumboro

	PATHOTYPE	TROPISME CELLULAIRE				VIRULENCE	
		<i>Cellules B</i>	<i>Macrophages</i>	<i>FEP</i>	<i>VERO</i>	<i>Mortalité</i>	Lésions
SEROTYPE 1	Virulents classiques	+	+	-	-	20-30%	BF
	vvIBDV	+	+	-	-	Jusqu'à 70%	BF, thymus, AC, MO
	Variants antigéniques	+	+	-	-	(-) de 5%	BF (Atrophie)
	Souches adaptées à la culture cellulaire	+	+	+	+	Sans	Légères à intermédiaires
SEROTYPE 2		-	+	+	+	Apathogène	

BF : Bourse de Fabricius

AC : Amygdales caecales

MO : Moelle osseuse

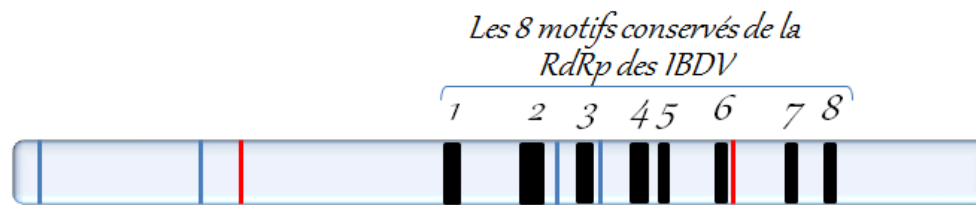
Les changements au niveau des protéines virales de structure qui interagissent avec les récepteurs cellulaires du virus sont susceptibles d'affecter son tropisme cellulaire. Ainsi, les variations dans la structure de VP2 changent le tropisme cellulaire de l'IBDV, puisque la protéine VP2 comporte les motifs interagissant avec les récepteurs des cellules hôtes (Nieper et Müller, 1996). C'est ainsi que des changements de résidus de VP2 en position 279 (D→N) et 284 (A→T) permettent l'infektivité des cultures cellulaires par des virus virulents (Lim et al., 1999 ; van Loon et al., 2002). Ces 2 mêmes résidus confèrent le caractère hautement pathogène aux virus d'Europe et du Japon (Yamaguchi et al., 1996a), ce qui rendrait possible l'existence d'une corrélation entre virulence et tropisme cellulaire. Le caractère apathogène des virus du sérotype 2 est d'ailleurs attribué entre autres à une absence de tropisme pour la BF (Cummings et al., 1986).

Les travaux de Brandt et al. (2001) ont permis de préciser que le résidu en position 253 était l'acide aminé capable d'empêcher ou de permettre l'infektivité des cultures cellulaires par les IBDV virulents. Mundt (1999) a démontré que les substitutions de la Glutamine par l'Histidine (Q→H) en position 253 et de l'alanine par la thréonine (A→T) en position 284, étaient capables de

permettre l'infectivité des FEP par le virus variant E/Del. Ces mêmes résultats concordent avec ceux de *Kwon et Kim (2004)*

Par ailleurs, l'adaptation de la souche hypervirulente HK46 à la culture sur FEP a été obtenue par *Lim et al. (1999)* grâce à 2 substitutions en position 279 (D→N) et 284 (A→T) dans la protéine VP2. L'acquisition des résidus N et T en position 279 et 284 respectivement permettrait au virus d'acquérir de nouveaux sites de fixation aux récepteurs cellulaires au niveau des FEP (*Nieper et Müller, 1996*).

Avant les travaux de *Brandt (2001)*, toutes les données attestaient que le tropisme cellulaire de l'IBDV était dicté uniquement par VP2. En effet, *Brandt* n'a pu propager dans des cellules VERO (Vervet Origin : Monkey Kidney Cell-line) un virus recombinant r1MB constitué d'un segment A d'une souche atténuée (D78) et d'un segment B d'une souche virulente (1M). Le blocage de cette propagation est lié à la présence du segment B (codant pour la seule protéine VP1) puisque la multiplication de la souche D78 est tout à fait possible dans les cellules VERO. Deux substitutions en positions 115 (G→R) et 653 (K→E) dans la protéine VP1 ont été requises pour obtenir la propagation de la souche r1MB dans les cellules VERO et FEP (*fig. n°7*). Ces résultats sont en totale contradiction avec ceux obtenus par *Boot et al., (2000b)* une année auparavant. Ces chercheurs ont pu en effet, multiplier sur fibroblastes, un virus recombinant comportant le segment A de la souche atténuée CEF94 et le segment B de la souche virulente D6948. La souche virulente étant incapable de se multiplier sur culture cellulaire, les auteurs ont déduit que la protéine VP1 n'était pas impliquée dans le tropisme cellulaire. La multiplication du virus recombinant construit par *Boot* sur fibroblastes serait liée à des mutations qui se seraient produites sur le segment B codant la polymérase VP1, ce qui expliquerait la contradiction entre les résultats des travaux de *Brandt* et ceux de *Boot*.



- Les lignes verticales rouges et bleues désignent les substitutions opérées sur la souche rIMB
- Les lignes verticales rouges désignent les substitutions en position 115 et 653

	Les ac. aminés dans le segment B (encodant la RdRp)					
	13	115	147	515	546	653
Souche D78	T	R	G	E	L	E
Souche IMB sauvage	K	G	D	D	P	K
"recovered IMB" (rIMB)	K	R	D	D	P	E

Figure n° 7 : Le réassortiment génétique entre la souche atténuée D78 et la souche virulente IM, démontrant l'implication de VP₁ (RdRp) dans le tropisme cellulaire de l'IBDV (Brandt et al., 2001)

BASES MOLECULAIRES DE L'ANTIGENICITE /

Deux sérotypes antigéniquement distincts ont été identifiés en Europe et aux USA. Un test de séro-neutralisation permet de distinguer, parmi les virus de la maladie de Gumboro, 2 sérotypes majeurs (Jackwood et al., 1982), lesquels, ne procurent pas, in vivo, une protection croisée (Jackwood et al., 1985). Ils sont aussi différents par le profil de migration de leur ARN génomique ainsi que par le poids moléculaire (PM) de leurs protéines virales. La différence majeure entre sérotype 1 et 2 implique un PM plus élevé de la protéine VP₂ chez les souches de sérotype 2 (Kibenge et al., 1988b). Les 2 sérotypes sont cependant indiscernables par le test ELISA (True et al., 1993), ce qui indique que les souches de sérotype 1 et 2 partagent des épitopes non-neutralisants communs.

Les 1^{ères} analyses génomiques du segment B des 2 sérotypes 1 et 2, basées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) et l'usage d'enzymes de restriction sur un fragment de quelques

651 pb, ont conclu à l'existence d'un haut degré de conservation du segment B (*Kibenge et Qian, 1994*). Cependant, le séquençage du segment en entier a révélé plus tard des différences entre les souches virales appartenant au même sérotype (*Brown et Skinner, 1996* ; *Yamaguchi et al., 1997*). Une diversité antigénique existe aussi bien parmi les virus du sérotype 1 (30% d'apparenté antigénique) que ceux du sérotype 2 (33% d'apparenté seulement)

Les résultats obtenus sur les 2 souches de sérotype 1, UK661 et 002-73 montrent que certaines séquences du segment B sont plus apparentées aux virus de sérotype 2, 23/82 et OH par rapport à une autre souche de sérotype 1, Cu-1 (*Brown et Skinner, 1996*). D'autre part, le séquençage du segment B de la souche OKYM a révélé des similitudes avec des virus de sérotype 2. Ces observations indiquent que les segments génomiques des IBDV auraient subi des réassortiments.

La séquence génomique des souches du sérotype 1 est relativement conservée, exception faite pour la région centrale de VP2 située entre les résidus 206 et 350 (fragment de restriction *AccI-SpeI*) dans le segment A. Le domaine hypervariable de VP2 comporte en effet, 2 régions hydrophiles (*Dormitorio et al., 1997*). La 1^{ère} région, située entre les résidus 212 et 223 (*Vakharia et al., 1994a*) pourrait être responsable de la stabilisation de la conformation des épitopes, alors que la 2^{ème} région hydrophile, située entre les résidus 314 et 324 (*Vakharia et al., 1994a*) serait responsable de la reconnaissance par les Ac neutralisants (*Hein et al., 1991*). Une substitution des ac. aminés dans la 2^{ème} région, entraînant probablement des modifications conformationnelles des épitopes viraux, peut permettre aux virus variants d'échapper à la neutralisation par les Ac induits par les virus vaccinaux standards (*Hein et al., 1991* ; *Yamaguchi et al., 1997*).

Récemment, la détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine de capsid VP2 a démontré que le récepteur alternatif que possèdent les virus hypervirulents à la surface des lymphocytes était associé à deux ac. aminés situés aux sommets des spicules de VP2. Ces résidus critiques sont entourés par une couronne d'acides aminés impliqués dans la dérive antigénique du virus. Ainsi, seuls quelques résidus sur les 441 de VP2 semblent contrôler ce mécanisme de fuite de la réponse immunitaire (*Coulibaly et al., 2005*).

Comparée à la séquence d'ac. aminés du domaine VP₂ des virus classiques, celle du variant A comporte 6 substitutions de résidus (*Lana et al., 1992*), alors que celles des variants E/Del, GLS et DS₃₂₆ montrent 1 à 2 substitutions dans chacune des 2 régions hydrophiles de VP₂ (*Hein et al., 1991, Vakharina et al., 1992*). Tous ces variants présentent la substitution Gln → Lys en position 249 (*Nagarajan et Kibenge, 1997*)

Une étude basée sur l'usage d'une batterie d'ACM a permis par ailleurs, d'identifier les épitopes disparus ou altérés à la surface des virus variants isolés aux USA. Ainsi, l'épitope B69 présent à la surface de tous les virus classiques (exceptée la souche vaccinale PBG98), s'est révélé absent chez les variants Delaware (variant A, D, G et E). La perte de l'épitope B69 serait liée à la substitution Gln → Lys en position 249 (*Vakharina et al., 1994a*). La capacité de la souche Bel-IBDV à fixer l'ACM B69 avec le résidu His en cette position suggère cependant, que plusieurs ac. aminés en position 249 peuvent accommoder cette fixation (*Letzel et al., 2007*).

Un second épitope désigné R63, habituellement retrouvé à la fois chez les variants Delaware et les virus classiques de sérotype 1, était absent chez 50% des 319 virus isolés dans la région de Delmarva aux USA (*Snyder et al., 1988b*). Ces isolats ont formé une nouvelle population de variants connue sous le nom de variants GLS. La même étude a permis de distinguer une autre population de variants désignée DS₃₂₆ regroupant des variants antigéniques isolés dans la région de Delmarva et dans le Sud-Ouest des USA. Les variants DS₃₂₆ ont perdu, en plus de l'épitope B69 et R63, l'épitope reconnu par l'ACM 179, présent à la surface des virus de sérotype 1, des variants Delaware et des variants GLS. Les variants GLS et DS₃₂₆ partagent l'épitope 57 alors que le variant E/Delaware se distingue par les épitopes 67 et BK9 (*Vakharina et al., 1994a*) (Tab. n°4).

Tableau n°4 : Caractérisation des virus variants Américains par réactivité vis-à-vis d'ACM (ELISA Capture) selon *Vakharia et al. (1994)* avec modification

ACM	Résidus Critiques pour la fixation à l'ACM	Virus Classiques		Virus Variants (USA)		
		Virulents Classiques	vvIBDV	E/DEL	GLS	DS326
B69	Gln 249 (a)	+	+	-	-	-
R63	?	+	+	+	-	-
21	Gln 253, Asp 279, Ala 284 (b)	-	+	-	-	-
8	?	+	+	+	+	+
10	Gly 318, Asp 323 (c)	+	+	-	+	+
179	Glu 311, Gln 320 (a)	+	+	+	+	-
57	Glu 321 (a)	-	-	-	+	+
67	Pro ou Ser 222, Ala 321 (c)	-	-	+	-	-
BK9	?	-	-	+	-	-

(a) *Vakharia et al., 1994a*

(b) *Brandt et al., 2001*

(c) *Letzel et al., 2007*

L'analyse de restriction par les endonucléases, effectuée par *Jackwood et Nielsen (1997)* sur 22 souches virales, a indiqué que la présence simultanée des 2 sites de restriction BstNI et Styl, situés respectivement au niveau des codons 222 et 253, permet de différencier entre les variants antigéniques et les virus classiques.

La comparaison des cartes de restriction obtenues par l'action de 8 endonucléases sur le segment A de la souche classique STC, et des variants MD et GLS a révélé l'absence du site EcoRI chez les 2 variants (MD et GLS). Les 2 sites XmaI et SmaI, présents chez le variant GLS et la souche classique STC, se sont révélés absents chez le variant MD. La région hypervariable de VP2 du variant MD comporte le site BamHI, lequel est présent chez le virus classique STC et absent chez le variant GLS. Enfin, les 2 variants se distinguent par rapport au virus classique par la présence, dans le gène de VP4, d'un site de restriction BamHI supplémentaire (*Dybing et Jackwood, 1996*). (Fig. n°8)

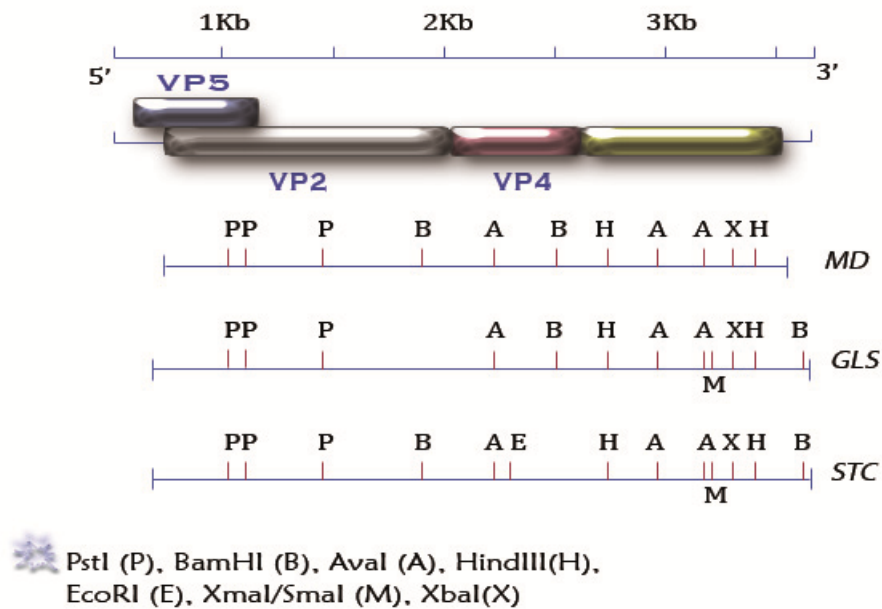


Figure n°8 : Distinction des virus variants et classiques par comparaison des sites de restriction

(Dybing et Jackwood, 1996)

La caractérisation par électrophorèse des fragments de restriction obtenus par digestion d'une séquence de 743 pb du domaine VP2 par 2 enzymes de restriction, a permis d'identifier 6 groupes moléculaires parmi les virus testés (Jackwood et Sommer 1999)

LA REPLICATION VIRALE /

Plusieurs facteurs ont constitué une entrave à l'étude de la réplication du virus de la maladie de Gumboro. Parmi ces facteurs, citons le nombre limité des cellules infectées in vitro, supportant la réplication virale (Hirai et al., 1979 ; Müller, 1986) et la sensibilité du virus à l'actinomycine D, habituellement utilisée pour inhiber sélectivement la synthèse de l'ARN cellulaire (Müller, 1982)

Globalement, les informations concernant la réplication des virus à ARN double brin sont applicables aux birnavirus. Par ailleurs, la plus part des informations disponibles concernent la réplication de l'IPNV, le plus représentatif des birnavirus. Trois formes d'ARN viral ont été décrites durant le cycle de réplication de ce virus: Les intermédiaires de réplication, produits à une étape

précoce du cycle viral, l'ARN simple brin (ssRNA: simple stranded RNA), supposé être l'ARN messenger et enfin, l'ARN double brin (dsRNA: double stranded RNA) que l'on ne peut distinguer de l'ARN du virion par centrifugation ni par électrophorèse (*Kibenge et al., 1988a*)

Le cycle de multiplication du virus débute par l'attachement à la cellule cible, viennent ensuite les étapes de pénétration et de réplication du génome viral et sa transcription en ARNm (ARN messenger), eux-mêmes traduits en protéines virales. L'assemblage des copies du génome et des protéines virales donne enfin naissance aux virions qui finissent par quitter la cellule pour aller infecter d'autres cellules et débiter un autre cycle de vie. Le cycle de multiplication de l'IBDV est un cycle productif qui se solde par la mort de la cellule infectée (cycle lytique).

L'attachement requiert une interaction entre le virus et des récepteurs cellulaires. Concernant l'IBDV, ces derniers ne sont pas encore connus mais il semble que le récepteur viral soit composé de protéines N-glycosylées associées principalement aux lymphocytes B IgM+ (*Ogawa et al., 1998*). Trois molécules de la membrane plasmique de la lignée des cellules B, de 70, 82 et 110-kDa semblent interagir avec l'IBDV (*Ogawa et al., 1998 ; Setiyono et al., 2001*)

Du côté du virus, la protéine virale interagissant avec le récepteur cellulaire semble être la protéine VP2 (*Nieper et Müller, 1996*). VP2 est aussi la seule protéine virale suscitant la synthèse d'Ac neutralisants (*Yamaguchi et al., 1996a*). Ceci expliquerait le fait que l'étape de l'infection qui échoue le plus souvent est l'étape de fixation et de pénétration dans la cellule. Contrairement à l'ACM 27/B1 dirigé contre VP3, les ACM 17/82 et 1/A6, spécifiques de VP2 possèdent une activité neutralisante, ce qui met en évidence le rôle important de la protéine de structure VP2 dans l'adsorption.

Parce qu'il code pour sa propre Polymérase virale, qui reste transcriptionnellement active sans protéolyse préalable ou une dégradation de la capsid, l'IBDV peut directement initier la réplication de son acide nucléique juste après avoir surmonter la barrière de la double couche lipidique de la membrane cellulaire sans une mise à nue du génome viral (*Spies et al., 1987*); ce qui n'est pas le cas des autres virus à ARN bicaténaire (réovirus) qui doivent subir une partielle

décapsidation, nécessaire à l'activation de leurs ARN-polymérase, avant de commencer la réplication et la transcription (*Skehel et Joklik, 1969*)

Dans le cytoplasme des cellules hôtes, le génome viral se réplique selon un mode de semi-conservation, le nouveau brin demeurant apparié au brin ayant servi de matrice (*Spies et al., 1987*). L'extrémité 3' de cette dernière, amorce la synthèse du brin anti-sens qui se replie sur lui-même pour former une "boucle en épingle à cheveux". La démonstration de la forme de VP₁ liée au génome (VPg) indique que le virus réplique son acide nucléique par un mécanisme de déplacement de brins.

Tel un virus à ARN bicaténaire, l'IBDV dispose de sa propre machinerie de réplication et de transcription, en l'occurrence la protéine VP₁. La forme liée de VP₁ (VPg) permet à la polymérase (forme libre de l'enzyme) d'amorcer la séquence primer afin d'accomplir tout d'abord sa fonction de répliqueuse et initier la réplication du génome et la synthèse des 2 segments d'ARN (*Boot et al., 1999*). Grâce à la même polymérase, qui se comporte cette fois-ci comme une transcriptase (*Spies et al., 1987*), les brins sens des 2 segments sont transcrits, avant de subir, sous le contrôle des protéines virales, des modifications post-transcriptionnelles.

Les ARNm ainsi synthétisés, peuvent alors quitter le virus à travers des pores minuscules qui perforent la paroi de la capsid, transformée en un filtre permettant le passage des transcrits et autres métabolites (*Caston et al., 1997*). Les brins sens sont de cette façon utilisés par la machinerie cellulaire (ribosomes et autres) pour la traduction en protéines virales mais sont aussi empaquetés dans des procapsides vides où elles servent de matrices pour la synthèse de mini-brins d'ARN anti-sens complémentaires (*Caston et al., 1997*). Signalons que les ARNm des birnavirus ne possèdent pas, en leur extrémité 3', de queue polyA. On ne sait donc pas comment les birnavirus traduisent leurs transcrits en protéines virales, la séquence polyA étant connue pour son rôle dans le recrutement des facteurs de traduction. Des études récentes ont toutefois mis en évidence la présence de structures en boucles (stem-loop) qui semblent être impliquées dans l'étape de la traduction et bien d'autres étapes du cycle viral (*Boot et Pritz-Verschuren, 2004*).

Il est vraisemblable que la réplication de l'IBDV n'interfère en aucune manière avec la synthèse des protéines cellulaires puisqu'aucune différence n'a été constatée sur les 2 modèles de protéines synthétisées par les cellules infectées et non infectées (*Becht, 1980*)

Il semblerait que durant les stades de transcription et de réplication, les doubles brins d'ARN de l'IBDV ne s'exposent jamais au cytoplasme de la cellule hôte mais restent confinés à l'intérieur de la capsid virale tout au long du processus (*Cheng et al., 1994 ; Caston et al., 1997*)

Les cellules eucaryotes n'étant pas équipées pour traduire les ARNm polycystroniques en petits polypeptides individuels, la polyprotéine encodée par le segment large doit donc subir, avant l'assemblage des virions, une maturation moléculaire qui consiste en un auto-clivage par la protéase VP4, donnant naissance au précurseur de VP2 (pVP2) et aux protéines VP4 et VP3. Une autre protéine dite non structurale (VP5) est produite en petite quantité dans les cellules infectées et n'est détectée qu'aux stades précoces de l'infection (*Mundt et al., 1995*).

La maturation de VP2, qui comprend une série de clivages protéolytiques de pVP2 par des mécanismes encore inconnus (*Azad et al., 1987 ; Lejal et al., 2000*) conduit à la formation de 4 petits peptides entre les résidus 442 et 487, 488 et 494, 495 et 501 et enfin entre les résidus 502 et 512. Trois d'entre eux au moins sont associés aux particules virales. Le polypeptide entre 442 et 487 et celui entre 502 et 512 sont nécessaires pour la viabilité du virus alors que les 2 autres peptides auraient un rôle relativement secondaire (*Da Costa et al., 2002*). Contrairement aux autres protéines virales, VP2 n'est pas accumulée dans le cytoplasme de la cellule infectée, ce qui mène à penser que la conversion pVP2 → VP2 a lieu durant les dernières étapes du cycle viral (*Müller et Becht, 1982*)

L'expression des gènes de structure de l'IBDV dans divers systèmes génétiques a donné naissance à des VLP (Virus-Like Particles). L'étude extensive de ces VLP a permis de mieux comprendre la morphogénèse de la capsid. Ainsi, l'expression de VP3 seule n'a donné aucun type de particule virale (*Martinez-Torrecuadrada et al., 2000*). L'expression de pVP2 seule, conduit à la formation de structures tubulaires et des particules isométriques (*Caston et al., 2001 ; Chevalier et*

al., 2002). L'expression unique de VP₂ permet la formation de particules dodécaédriques pouvant s'assembler en de larges et fragiles capsides icosaédriques (*Caston et al., 2001*). Seule l'expression de la polyprotéine virale est capable de donner naissance à des VLP dont la taille et la forme sont similaires à celles des particules authentiques de l'IBDV.

Un contrôle de l'expression des gènes au cours de l'étape de traduction a été démontré pour les birnavirus. Dans les cellules infectées, la quantité de VP₁ produite est jugée faible au regard de la relative abondance des transcrits (ARNm). Il est possible que le gène de VP₁ dans le segment B soit réprimé par les produits du segment A puisqu'une quantité importante de VP₁ a été enregistrée dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant transportant le clone de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène du segment B (*Magyr et Dobos, 1994*)

Les protéines virales de structure ainsi produites s'assemblent avec le brin sens pour former une particule pro-virale où le brin anti-sens de l'ARN bisegmenté est synthétisé afin de reformer le génome viral double brin (*Koonin, 1992*)

Les virions néo-formés sont libérés à la faveur d'une destruction de la cellule infectée par un phénomène d'apoptose qui serait le résultat d'une action combinée entre la protéine VP₂ et la protéine non structurale VP₅ (*Fernandez-Arias et al., 1997 ; Yao, 1998 ; Yao et Vakharia, 2001*)

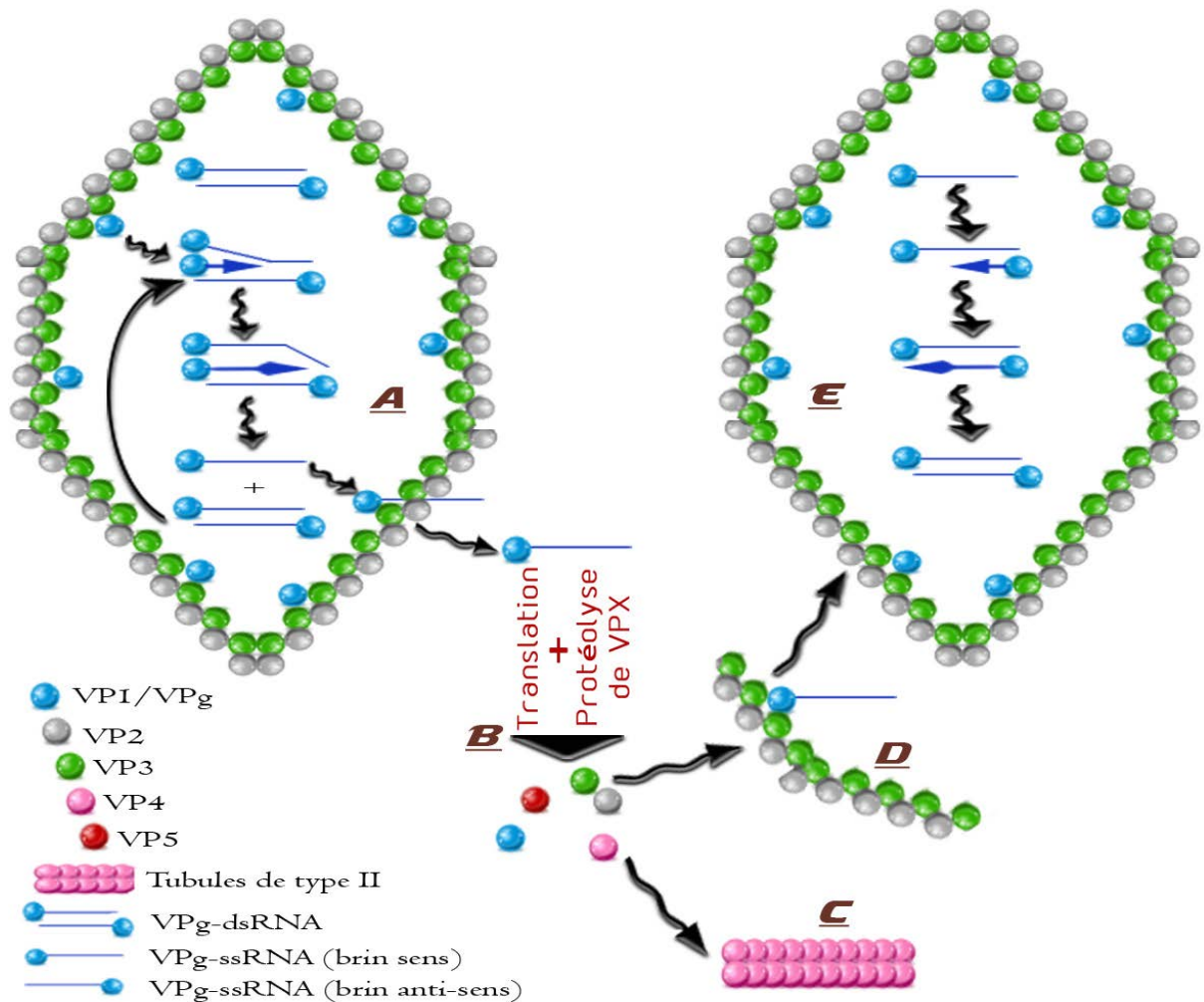


Figure n°9: Représentation schématique du mécanisme de la réplication de l'IBDV.

- A) Sans décapsidation, VP₁ amorce la synthèse du brin anti-sens grâce à une réplication semi-conservative par déplacement de brins.
- B) Traduction des ARNms et protéolyse de la polyprotéine.
- C) Formation des tubules de type II (VP₄)
- D) Assemblage des protéines de la capsid et maturation virale.
- E) A l'intérieur de la capsid néoformée, l'ARN simple brin (VPg-ssRNA) sert de modèle pour la synthèse de l'ARN double brins (VPg-dsRNA)

PATHOGENIE /

La pathogénie est définie comme étant le mécanisme par lequel le virus cause des dommages à l'hôte avec mortalité, maladie et/ou immunosuppression comme conséquences (*van den Berg et al., 2000*). Les préjudices causés par l'IBDV peuvent être évalués à l'échelle de l'organisme, de l'organe ou de la cellule hôte. Le devenir de l'infection dépend en fait de la souche virale, de la dose infectante, de l'âge et la souche du poulet, de la voie d'inoculation et de la présence ou non d'Ac neutralisants (*Müller et al., 2003*)

L'IBDV peut atteindre la BF très rapidement après infection. Aussitôt après sa pénétration dans l'organisme hôte, l'IBDV doit traverser la barrière muqueuse pour aller se distribuer aux différents sites de réplication primaire, notamment le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT: Gut Associated Lymphoïde Tissue).

Dans le cas d'une infection orale, les antigènes viraux sont retrouvés, 4 heures après, dans les macrophages et les lymphocytes du caecum et 5 heures après, dans les cellules lymphoïdes du duodénum et du jéjunum. Les macrophages associés au tube digestif transportent le virus dans la circulation sanguine occasionnant une virémie primaire qui permet au virus d'atteindre le foie, les reins et la BF où l'essentielle de la réplication virale a lieu. Il s'en suit alors une seconde et massive virémie qui permet au virus de se distribuer aux autres tissus et organes lymphoïdes dont le thymus, la rate, les glandes caecales et la moelle osseuse.

Chez les poussins SPF expérimentalement inoculés, le virus persiste dans la BF jusqu'à 3 semaines. La présence d'AOM (Ac d'Origine Maternelle) écourte le séjour du virus dans la BF (*Abdel-Alim et Saif, 2001*).

L'IBDV se multiplie de manière productive et lytique dans les cellules B IgM+ en pleine division et différenciation sans qu'il y ait une baisse du niveau des Ac circulants (*Kim et al., 1999*). Il se multiplie aussi, mais de manière productive et persistante dans la lignée monocytes-macrophages. Il a été suggéré que ces cellules pourraient jouer un rôle dans la dissémination du virus (*Sharma et Lee, 1983*). L'incapacité des virus du sérotype 2 à utiliser cette lignée de cellules

pour sa distribution dans l'organisme du poulet, explique en partie leur caractère apathogène (Weiss et al., 1994).

Le mécanisme pathologique conduisant à la mort des poulets infectés n'est pas encore clair, mais ne semble pas en rapport avec la sévérité des lésions de la BF. Les macrophages pourraient participer à l'exacerbation de l'infection en libérant des cytokines à activité inflammatoire tels que le TNF (Tumor Necrosis Factor) et l'interleukine 6, occasionnant ainsi un choc septique (van den Berg et al., 1991; Kim et al., 1998) qui pourrait expliquer les épisodes cliniques de la maladie chez la poulette au-delà de l'âge de 12-14 semaines au moment où la BF est complètement involuée (Okoye et Ozoukwu, 1981)

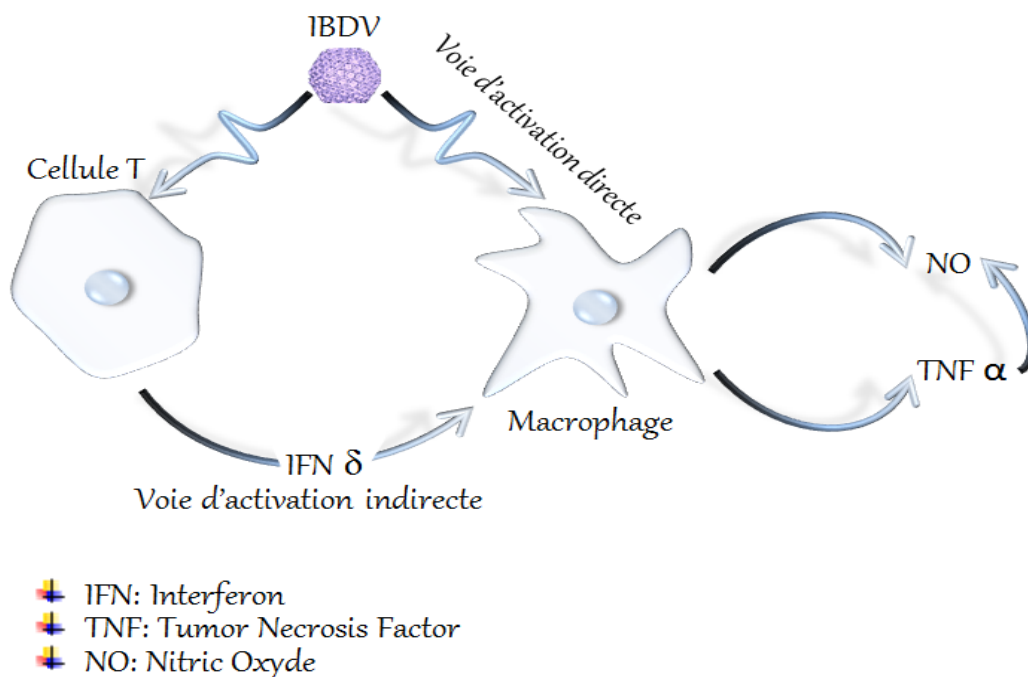


Figure n° 10 : Mécanisme pathologique de l'IBDV faisant intervenir les cellules T et les macrophages. L'activation directe (infection persistante par l'IBDV) ou indirecte (par l'IFN gamma issu des cellules T viro-induites) des macrophages aboutit à la sécrétion des médiateurs apoptotiques (TNF ou NO) (van Den Berg, 2000)

Les cellules CD4 et CD8 pourraient aussi participer au mécanisme pathologique en synthétisant l'interféron qui stimule l'activité des macrophages (Tanimura et Sharma, 1997 ; Kim et al., 1998). De plus, les cellules infectées, exprimant à leur surface les antigènes viraux, constituent

une cible potentielle pour l'action cytotoxique des cellules T8. On pense également que les cellules T viro-induits stimulent, probablement par l'intermédiaire des cytokines, la synthèse par les macrophages de l'oxyde nitrique qui peut alors promouvoir la destruction cellulaire (*fig. n°10*)

Les lésions qui résultent de la multiplication intensive du virus dans les cellules cibles, sont le résultat d'un effet pathogène direct mais aussi la conséquence du dépôt de complexes immuns notamment dans les glomérules rénaux (*Ivanyi et Morris, 1976 ; Skeeles et al., 1979*). Les lésions histologiques au niveau de la BF ressemblent à une réaction d'Arthus, où les complexes Antigène-Ac-Complément induisent des facteurs chémotactiques à l'origine d'hémorragie et d'infiltration leucocytaire (*Skeeles et al., 1979*). L'augmentation des niveaux du complément au cours de l'âge est associée à une plus grande sévérité des lésions chez les poussins plus âgés (*Skeeles et al., 1980*). Certains auteurs incriminent un plus faible taux de certains facteurs de coagulation dans les hémorragies constatées au niveau de la BF et dans certains tissus musculaires (*Skeeles et al., 1979*).

La BF dont les cellules B en différenciation constituent la première cible du virus, n'est pas indispensable pour l'établissement de l'infection mais semble l'être pour la manifestation clinique de la maladie (*Okoye et Uzoukwu, 1990*). La pathogénicité des souches d'IBDV semble bien corrélée avec la distribution des antigènes viraux au niveau des structures lymphoïdes "non-bursales" (*Tanimura et al., 1995*). C'est ainsi que les lésions causées par les virus hypervirulents au niveau du thymus, la rate et les glandes caecales sont plus sévères que celles causées par les virus virulents classiques (*Tsukamoto et al., 1995b*), alors que les lésions causées par les 2 pathotypes au niveau de la BF restent similaires.

Quant aux lésions causées par les virus variants, elles sont moins sévères avec un minimum d'inflammation et une rapide atrophie de la BF (*Vakharia et al., 1994b*). Cette différence dans la pathogénicité des virus variants par rapport à ceux des virus classiques s'expliquerait par le fait que l'effet cytopathologique induit par les virus variants est obtenu essentiellement par un mécanisme d'apoptose (*Vasconcelos et Lam, 1994*)

Apoptose:

L'apoptose est définie comme une séquence d'événements génétiquement contrôlée, faisant suite à des signaux cellulaires spécifiques et conduisant à des dommages cellulaires irréparables avec un minimum de préjudice pour les cellules et les tissus environnants.

Plusieurs auteurs ont rapporté la présence de cellules apoptotiques dans les BF infectées par l'IBDV (*Tanimura et al., 1998; Ojeda et al., 1997; Lam, 1997*). D'ailleurs, l'effet cytopathique (ECP) du virus sur les cultures cellulaires s'explique essentiellement par une mort cellulaire programmée (*Nieper et Müller, 2001*) dans laquelle seraient impliquées la protéine de structure VP2 et la protéine non structurale VP5 (*Vasconcelos et Lam, 1994 ; Fernandez-Arias et al., 1997 ; Lambardo et al., 2000 ; Jungman et al., 2001 ; Yao et Vakharia, 2001*). Cependant, la présence de cellules apoptotiques dans des BF en l'absence d'Ag viraux (*Tanimura et Sharma, 1998*) indique que l'apoptose est aussi la conséquence d'un effet viral indirect à travers une interaction entre les cellules intervenant dans le processus immunitaire, ce qui explique d'ailleurs le nombre bien plus important des cellules apoptotiques par rapport aux cellules IBDV-infectées (*Ojeda et al., 1997*)

Dans plusieurs situations, l'apoptose constitue un mécanisme de défense limitant la réplication virale en provoquant la mort de la cellule infectée avant que le virus n'achève son cycle de vie. Pour empêcher la mort précoce de la cellule infectée, qui serait synonyme d'échec pour l'infection, le génome viral de certains virus code pour des protéines spécifiques chargées tout d'abord d'inhiber l'apoptose de la cellule (*Liu et Vakharia, 2006*) puis de l'initier dans la phase ultime de l'infection pour faciliter la libération des virions et favoriser la dissémination du virus (*Boya et al., 2001 ; Hay et Kannourakis, 2002*). Dans le cas de l'IBDV, l'effet anti-apoptotique durant les phases précoces de l'infection serait exercé par la pNS VP5 qui prévient la mort de la cellule infectée jusqu'au terme du cycle viral.

Dans les conditions *in vitro*, la mort de la cellule infectée par l'IBDV serait la conséquence d'une perturbation du flux de potassium dans la cellule (*Repp et al., 1998*) entraînant un trouble

de la perméabilité membranaire et de l'homéostasie intracellulaire, ce qui contribue à la lyse de la cellule hôte.

Outre son rôle clé et direct dans la pathogénicité du virus, on pense que l'apoptose permet la dissémination des particules virales dans des corpuscules d'inclusion apoptotiques où elles demeurent à l'abri du système immunitaire.

Les phénomènes de nécrose et d'apoptose expliquent l'essentiel de la déplétion des follicules lymphoïdes dans la BF. Ces deux phénomènes ne devraient pas être confondus du moment que chacun représente une série d'événements totalement indépendants quoiqu'avec certains chevauchements. La nécrose résulte de dommages physiques, elle n'est d'aucune façon génétiquement contrôlée et est caractérisée par une destruction des organelles cytoplasmiques et une perte de l'intégrité de la membrane plasmique. L'apoptose est quant à elle une réponse cellulaire, génétiquement prédéterminée, à un environnement de stimuli spécifiques. Elle est associée à une condensation de la chromatine, à des fractures de l'ADN et se distingue de la nécrose par l'absence de phénomène inflammatoire.

Immunosuppression:

L'effet immunosuppresseur de l'IBDV est une conséquence d'une action virale ciblée à la fois vers l'immunité humorale et cellulaire. Ses conséquences sur l'élevage sont encore plus pénalisantes que celles consécutives à la mortalité directe car elle rend les volailles plus sensibles aux agents pathogènes et réduit leur réponse aux vaccinations.

Au plus jeune sera le poulet à l'infection, au plus sévère sera l'immunodépression. Celle-ci est le plus souvent à caractère réversible (*Kim et al., 1999*), mais une infection à l'âge d'un jour conduirait à une immunodéficiences permanente. L'immunosuppression est plus sévère quand elle fait suite à une infection par des virus variants, connus pour leur fort potentiel immunodépresseur ou alors quand l'action du virus est combinée avec celle d'un autre virus immunosuppresseur (virus de la maladie de Marek, virus de l'anémie infectieuse).

L'effet lytique de l'IBDV sur les lymphocytes B IgM+ conduit à une réponse suboptimale en Ac. Celle-ci serait également le résultat d'une altération de la coopération cellulaire impliquant notamment les cellules T helpers (*Sharma et al., 1989*). L'effet déprimant de l'IBDV s'exerce sur l'immunité humorale systémique et locale. Une perturbation de l'immunité muqueuse, s'exprimant par des faibles niveaux d'IgA, notamment dans la glande de Harder et l'épithélium intestinal (*Dohm et Jaeger, 1988*), contribuerait à rendre les poulets IBDV-infectés plus susceptibles aux infections respiratoires et digestives (*Wyeth, 1975; Thompson et al., 1997*). Rappelons toutefois que seule la réponse humorale primaire est affectée (*Rodenberg et al., 1994*). La réponse secondaire étant sous le contrôle de cellules B extra-bursales matures réfractaires au virus (cellules B mémoires). Dans ces conditions, l'immunosuppression semble être la conséquence d'un trouble de l'ensemencement périphérique des cellules B chez les jeunes poussins (*Ivanyi et Morris, 1976*)

Contrairement aux cellules B, la susceptibilité des lymphocytes T à l'infection par le virus de la maladie de Gumboro est encore sujette à controverses. Aussi bien in vitro qu'in vivo, les résultats des travaux de divers auteurs restent contradictoires. *Giambrone et al. (1977)* n'ont noté aucune différence entre poulets IBDV-infectés et poulets non infectés quand ils ont examiné leur réaction de rejet de greffe de peau ou leur réaction d'hypersensibilité retardée à l'injection de tuberculine. Selon *Sharma et Fredericksen (1987)*, la prolifération mitogénique ainsi que la production de l'interleukine 2 (IL-2) par les splénocytes issues de poulets IBDV-infectés sont sérieusement compromises.

Concernant l'impact négatif de l'IBDV sur les réponses aux vaccinations, il serait plus net dans le cas d'un virus vaccinal stimulant les 2 types d'immunité, à médiation cellulaire et humorale (maladie de Newcastle). Dans le cas de la vaccination contre la laryngotrachéite, le virus vaccinal suscite quasi exclusivement l'immunité cellulaire et la réponse immune au vaccin ne serait par conséquent que partiellement affectée (*Cloud et al., 1992*).

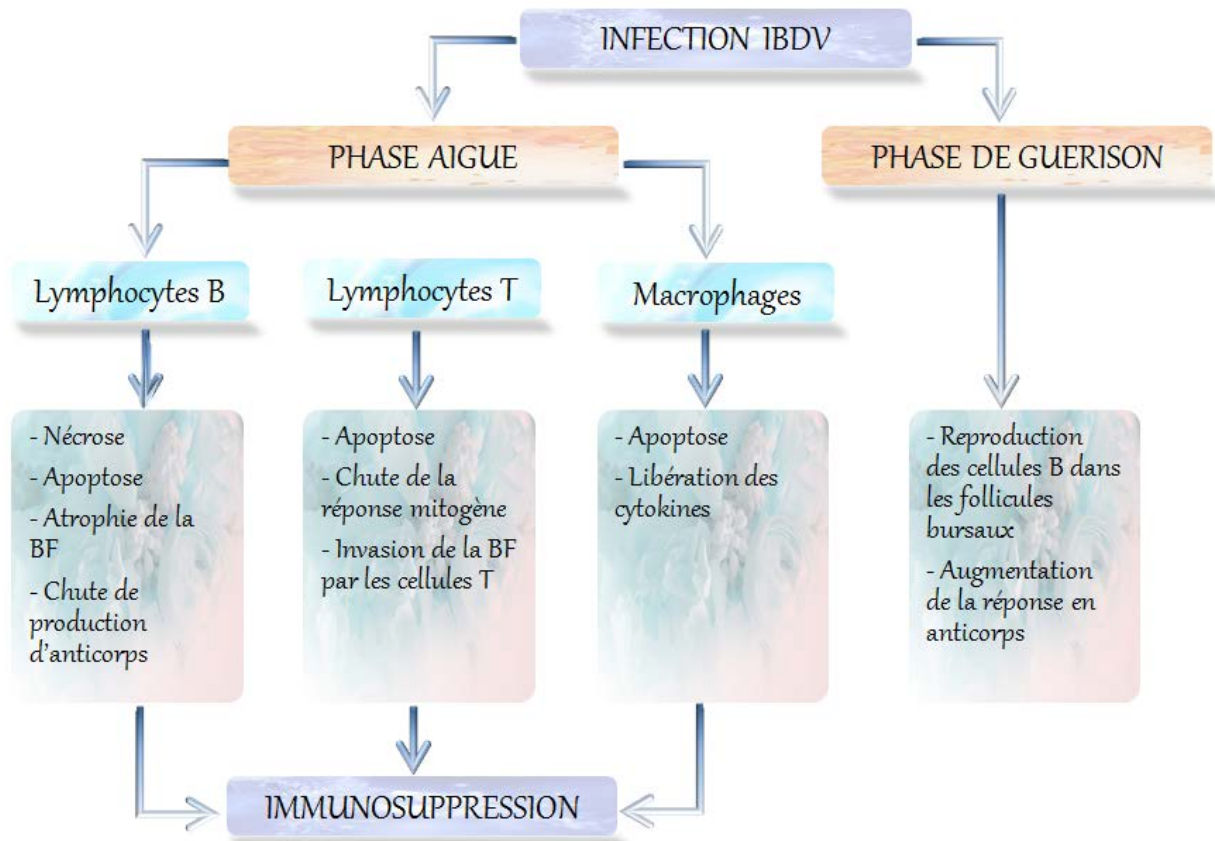


Figure n° 11: Pathogénie de l'immunosuppression IBDV-induite

IMPACT DES MUTATIONS VIRALES SUR L'EFFICACITE DE LA VACCINATION /

Jusqu'au milieu des années 1980, la bursite infectieuse était parfaitement contrôlée par la vaccination et ne provoquait pas plus de 2% de mortalité spécifique dans les bandes de poulet de chair. Par la suite, les épisodes de Gumboro clinique se sont faits de plus en plus fréquents. Si les techniques vaccinales défectueuses et les conditions inappropriées de conservation des vaccins expliquent une partie des échecs de vaccination, l'essentiel de ces échecs constitue la résultante d'un bouleversement épidémiologique de la maladie de Gumboro occasionné par l'émergence des variants antigéniques et pathotypiques (virus hypervirulents).

Les variants antigéniques ne peuvent être contrôlés par les vaccins classiques de sérotype 1 en raison de la distance antigénique entre les souches sauvages et les souches vaccinales (Rosenberger et Cloud, 1985). Pour produire des vaccins dirigés contre des virus présentant une variabilité

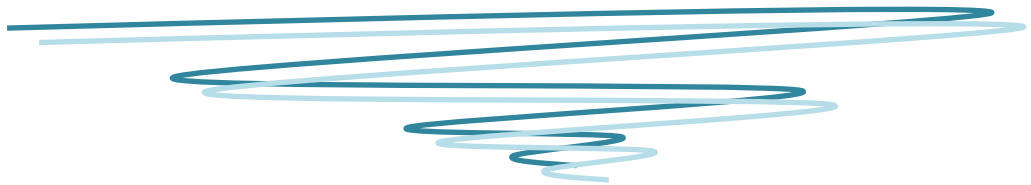
antigénique, on doit disposer d'une méthode permettant de mesurer la distance antigénique entre les souches et de mieux appréhender les relations entre ces distances et les mécanismes de protection croisée. Une telle méthode nécessite une surveillance permanente du terrain pour des actions rectificatives en temps réel. Une nouvelle méthode de modélisation informatique permettant de chiffrer la distance entre souches, appelée « cartographie antigénique », a été appliquée aux virus de la grippe humaine et équine dans le but d'élucider l'évolution de ces virus par rapport aux souches vaccinales (*Mumford, 2007*). Cette méthode est parfaitement applicable à d'autres agents pathogènes présentant une variabilité antigénique, dont le virus de la maladie de Gumboro. Aux USA, où prédominent les variants antigéniques, la réadaptation des programmes de vaccination a consisté essentiellement à incorporer les nouveaux motifs antigéniques des virus isolés du terrain dans les vaccins vivants et inactivés, élargissant ainsi le spectre antigénique de la vaccination.

Dans certains pays, notamment aux USA, des études épidémiologiques ont démontré la très grande diversité antigénique parmi les virus sauvages en circulation et les vaccins commercialisés sont loin de répondre à cette diversité. Dans cette situation, les autovaccins se proposent comme une solution aux échecs de vaccination constatés dans certaines régions. L'analyse des séquences de nucléotides et la confirmation des changements d'épitopes neutralisants sur les virus responsables de ces échecs, constituent la première étape dans la sélection des candidats autovaccins. Il est contraignant de savoir que seule l'étude vaccination-challenge peut permettre d'identifier les vrais variants antigéniques. Pourtant, les nouvelles informations sur la structure cristallographique de VP2 suggèrent qu'il est possible de prévoir les dérives antigéniques en étudiant la structure moléculaire tridimensionnelle de l'isolat (*Coulibaly et al., 2005*). En effet, il est maintenant possible de déterminer si une mutation d'acides aminés sera enterrée dans la molécule ou exposée à la surface de la protéine VP2. Les mutations à la surface sont plus susceptibles de changer l'antigénicité et de contribuer à la dérive antigénique.

Contrairement aux variants antigéniques, de nombreux travaux ont démontré l'existence d'une protection croisée entre les virus hypervirulents et les virus virulents classiques de sérotype 1. En effet, dans des conditions expérimentales (où il est possible de maîtriser l'intervalle de temps entre la vaccination et le challenge), une protection efficace contre des virus hypervirulents a pu être obtenue grâce à des souches vaccinales classiques (*Etterdossi et al., 2004*). Malgré cette identité antigénique entre les virus classiques et les variants pathotypiques, ces derniers sont parmi les causes les plus incriminées dans les échecs de vaccination. Ceci s'explique par le fait que le niveau de l'immunité maternelle résiduelle, empêchant une bonne prise vaccinale et protégeant contre une éventuelle contamination par des virus classiques, est le plus souvent insuffisant pour contrecarrer une infection par des virus hypervirulents. Ces derniers sont donc tout à fait capables de sévir avant même l'installation effective d'une immunité post-vaccinale, d'où l'échec de la vaccination. En Europe, en Asie et en Afrique, où prédominent les virus hypervirulents, la réadaptation des programmes de vaccination a consisté à utiliser des vaccins plus invasifs capables d'installer une immunité même en présence de taux élevés d'Ac résiduels.

Avant l'avènement des virus hypervirulents, l'immunité passive transférée aux poussins était suffisante pour une protection d'au moins 3 à 4 semaines. Aujourd'hui, l'augmentation de la pathogénicité des virus sauvages a fait baisser l'âge de susceptibilité des poussins, de sorte que des contaminations précoces, avant 21 jours d'âge, sont tout à fait possibles. Dans ces conditions, la régression de l'immunité passive chez le poussin doit être compensée le plus rapidement possible par une immunité active (*van den Berg et Meulemans, 1991*). Ceci a été à l'origine de la problématique relative au choix de la date optimale de vaccination permettant une bonne prise vaccinale pour un relai efficace entre les AOM et les Ac vaccinaux.

Contribution Personnelle



PROBLEMATIQUE /

En dépit des avancées technologiques dans le domaine de la "vaccinologie", la maladie de Gumboro reste imparfaitement contrôlée, si bien que l'échec vaccinal est aujourd'hui un élément clé de l'épidémiologie de la maladie. Cette situation est d'autant plus pénalisante que les mesures sanitaires sont quasi sans effet sur la circulation du virus, connu pour son extrême résistance aux agents désinfectants. Bien au-delà des causes triviales, l'échec vaccinal est certainement en rapport avec l'évolution des virus sauvages.

Dans une logique de systématisation de la vaccination, les virus de la maladie de Gumboro, à l'identique des virus à ARN, subissent de surcroît une pression de sélection accrue, à l'origine de nouvelles souches ayant de nouvelles propriétés, avec une variation antigénique et une augmentation de la virulence.

Depuis les premiers échecs de vaccination au milieu des années 1980, on assiste à une évolution des virus circulants qui a fait émerger des variants antigéniques et pathotypiques (virus hypervirulents). Si aujourd'hui, il est certain que les virus sauvages de la maladie de Gumboro ont évolué, les vaccins contre cette maladie ne sont malheureusement pas encore en phase avec cette évolution.

L'hétérogénéité génétique restreinte parmi les virus vaccinaux de la maladie de Gumboro contraste avec une plus grande diversité génétique parmi les virus sauvages contaminant les volailles commerciales (*Jackwood et Sommer, 1998*). Entre virus classiques et variants, existent des virus transitionnels (*Bayyari et al., 1996*) qui peuvent ne pas avoir de conséquence sur l'efficacité de la vaccination. Cependant, lorsque la distance génétique entre les variants antigéniques et les virus vaccinaux classiques est suffisamment importante pour empêcher une protection croisée, l'échec vaccinal devient inéluctable.

La difficulté à contrôler les virus hypervirulents est liée quant à elle, à une autre difficulté à obtenir une réponse immune précoce chez les poulets plutôt qu'à une dérive antigénique parmi les virus sauvages.

Afin d'assurer un parfait appariement entre les souches vaccinales et les souches sauvages, des programmes de surveillance visant à identifier les pathotypes en circulation et à retracer leur évolution, sont mis en œuvre en concertation entre plusieurs groupes de pays.

Deux cas de figure prévalent aujourd'hui :

1^{er} cas de figure : Une prédominance des variants antigéniques (cas des USA, du Canada, de l'Australie...) obligerait à élargir le spectre antigénique des vaccins. Les variants antigéniques, possédant des épitopes neutralisants modifiés, sont capables de se soustraire à l'action de l'immunité des volailles même les plus immunisées d'entre elles.

2^{ème} cas de figure : Une prévalence des virus hypervirulents (cas de l'Europe, de l'Amérique latine, de l'Asie et certains pays de l'Afrique) obligerait à opter pour des vaccins plus agressifs, de façon à pouvoir vacciner prématurément et obtenir une immunisation effective avant une contamination par des virus hypervirulents, sévissant à des âges de plus en plus précoces des volailles. Cette dernière option bute sur une autre contrainte, celle de la neutralisation du vaccin par les anticorps maternels résiduels, dont le taux est d'autant plus élevé que l'âge des poussins est plus précoce, d'où l'intérêt d'un monitoring du niveau d'anticorps sérique chez les poussins à l'éclosion.

L'émergence de variants antigéniques hautement pathogènes (concomitance des 2 cas de figures) n'est pas à exclure. Ce qui aurait pour effet de rendre encore plus compliquée la vaccination des volailles.

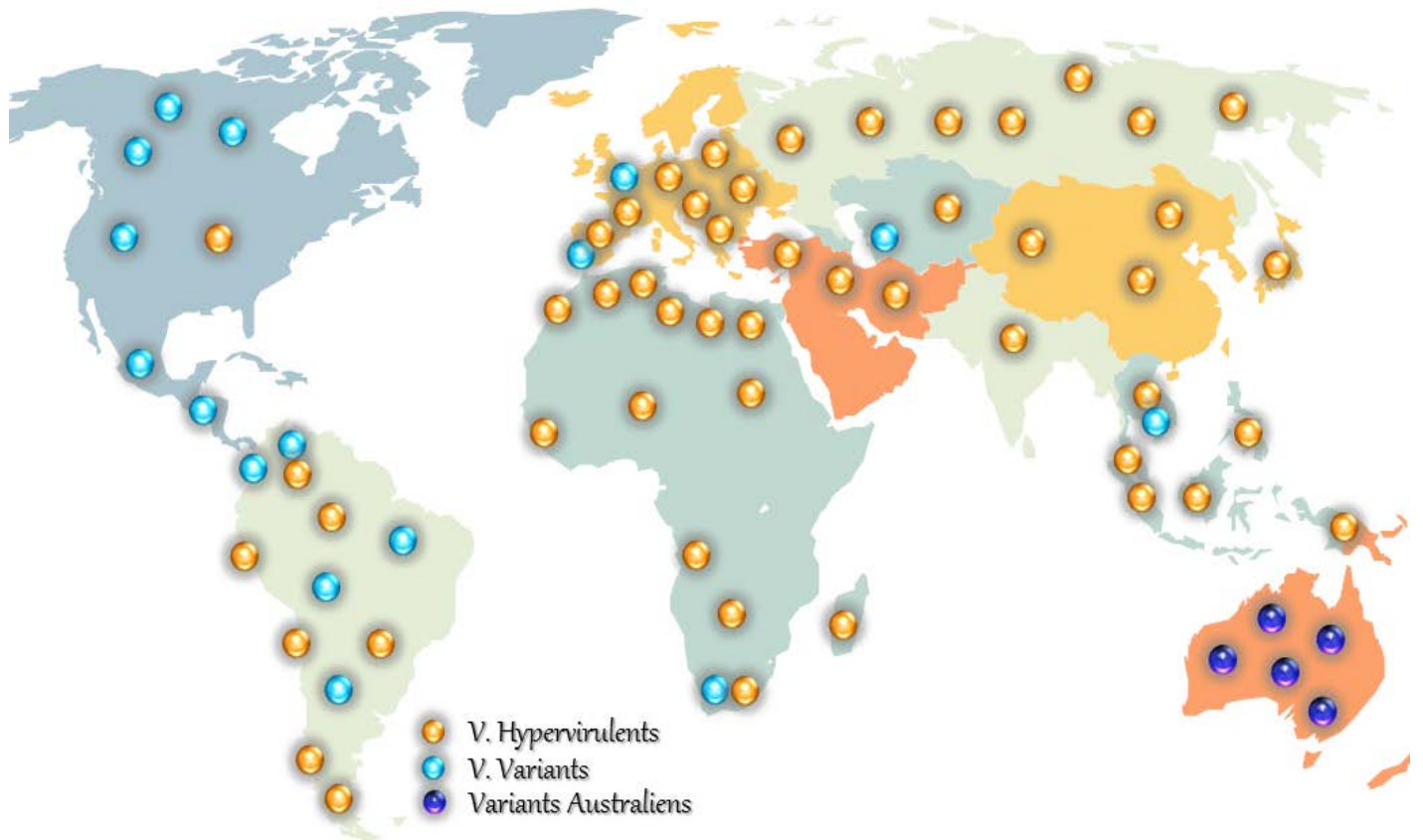


Figure n°12 : Distribution géographique des variants antigéniques et pathotypiques du virus de la maladie de Gumboro selon *Jackwood, 2013*, avec quelques modifications.

OBJECTIFS /

En réponse à une problématique faisant état d'une plus grande fréquence des échecs de vaccination contre la maladie de Gumboro, la présente étude se propose d'être la première contribution dans la détermination de l'identité génétique et phénotypique des virus sauvages "Algériens" incriminés dans l'échec vaccinal.

Les épisodes de Gumboro clinique se soldant par des taux de mortalités élevés sur des cheptels correctement vaccinés et à des âges de plus en plus précoces, sont probablement le fait d'une hausse sensible de la pathogénicité du virus. La réadaptation des protocoles de vaccination qui consiste essentiellement à revoir les dates de vaccination et la nature des souches vaccinales, passe avant tout par une meilleure connaissance des pathotypes circulants.

Les virus Gumboro hypervirulents sont aujourd'hui de distribution mondiale. L'Algérie ne fait malheureusement pas exception, même si aucune étude épidémiologique n'est venue confirmer ce constat. Se basant sur la réactivité du virus vis-à-vis d'une batterie d'anticorps monoclonaux, *Allamigeon et Comte (2001)* ont révélé le caractère hypervirulent d'un isolat originaire du Nord-Est Algérien. Bien qu'indicative, cette étude reste insuffisamment pertinente.

Nous nous proposons à travers cette étude, de caractériser, sur le plan moléculaire, quelques isolats sauvages incriminés dans la flambée de la maladie clinique durant l'année 2013.

La caractérisation virale visant à identifier les mutations à l'intérieur du génome viral, supposées être en rapport avec la hausse de la pathogénicité du virus, a consisté à :

1. Amplifier le fragment du génome viral codant la région hypervariable de la protéine de capside VP₂ (la plus sujette aux mutations). L'amplification génique *in vitro* est réalisée par transcription inverse couplée à une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (rt-PCR). Il s'agit d'une rt-PCR qualitative en point final utilisant une paire d'amorces flanquant un fragment de 743 pb.

2. Déterminer la séquence nucléotidique du fragment amplifié, puis l'aligner avec celles des autres pathotypes de référence.
3. Rechercher, au sein du fragment amplifié, la présence des sites de restriction enzymatique puis étudier le polymorphisme de taille des produits de la digestion enzymatique virtuelle.
4. Réaliser une analyse phylogénétique qui permettra d'établir des liens de parenté entre les isolats de l'étude et les souches virales de référence, mais aussi les virus circulant dans les pays frontaliers.

CARACTERISATION MOLECULAIRE DES VIRUS SAUVAGES DE LA MALADIE DE GUMBORO

1- MATRIEL ET METHODES /

1- Description de l'expérience

A partir de foyers suspects de la maladie de Gumboro, déclarés sur des cheptels de poussins chair ou ponte élevés dans diverses localités de la wilaya de Setif et Oum El-Bouaghi, des bourses de Fabricius (BF) ont été prélevées sur des sujets euthanasiés sinon sur des cadavres frais. L'ARN viral sensé être présent dans les échantillons est ensuite extrait avant qu'une partie du gène codant la protéine de capsid VP₂ ne soit amplifiée dans une réaction de rt-PCR qualitative, utilisant un couple d'amorces s'hybridant spécifiquement avec des séquences nucléotidiques choisies dans des régions bien conservées du génome viral.

Les fragments d'ADN complémentaires (ADNc) obtenus, subissent subséquentement un séquençage et les séquences générées font alors l'objet d'une double investigation :

- Un alignement de séquences avec des souches de référence représentatives des virus atténués, classiques, hypervirulents et variants. L'alignement des séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques permettra de déceler les éventuelles mutations spécifiques de pathotype.
- Une analyse visant à rechercher la présence éventuelle de sites de restriction spécifiques de certaines endonucléases. Le nombre et la position des sites de restriction de l'enzyme dans le gène codant la région hypervariable de la protéine VP₂, permettra alors d'établir une carte de restriction, puis de la confronter à celles d'autres pathotypes de références. Le polymorphisme de taille des fragments de digestion virtuelle (RFLP : Restriction Fragment length Polymorphism) servira à classer les différents isolats en groupes moléculaires.

Enfin, une analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques et amino-acidiques, servira à préciser les relations de parenté des différents isolats avec les virus virulents classiques, atténués, variants et hypervirulents.

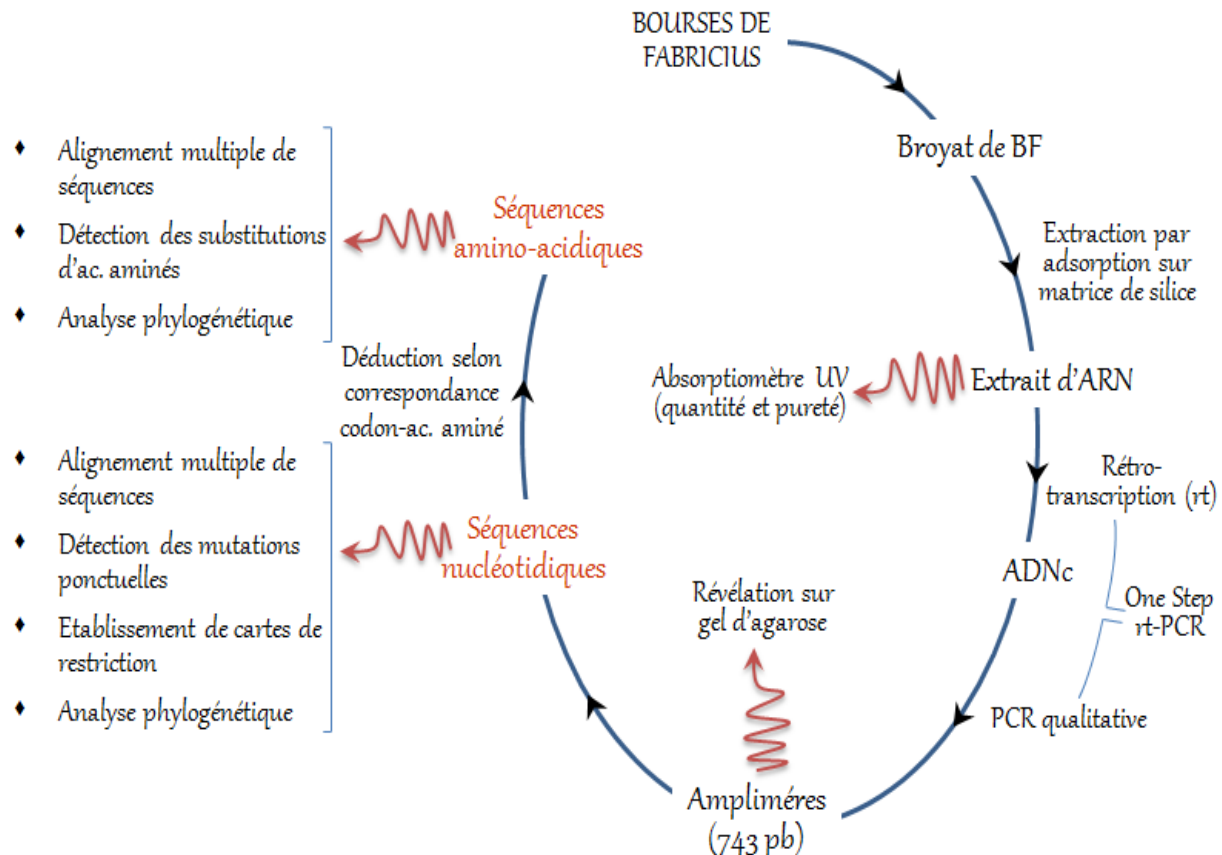


Figure n°13 : Résumé graphique du protocole expérimental

2- Collecte des échantillons

Les échantillons ont été récupérés sur des sujets malades ou des cadavres frais provenant de foyers suspects. La décision de prélever des bourses de Fabricius sur les volailles présentées pour autopsie, a été à chaque fois prise après constatation de lésions évoquant une contamination par le virus de la maladie de Gumboro : BF hypertrophiées, œdémateuses ou hémorragiques, associées ou non à des pétéchies sur le muscle de la cuisse ou du bréchet, ou alors à des lésions de néphrites (photo n°2).

En fonction du nombre de volailles présentées pour autopsie, 1 à 5 bourses ont été prélevées par foyer. Immédiatement après prélèvement, les bourses sont saupoudrées d'amoxicilline avant d'être conservées à -20°C dans des sacs en plastique hermétiquement fermés.

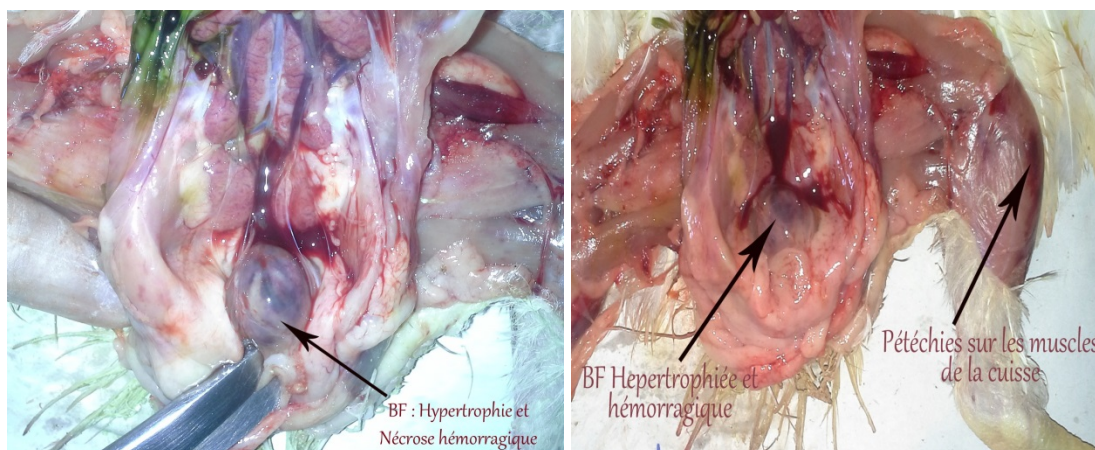


Photo n° 2: Motifs des prélèvements sur les poussins présentés pour autopsie (Chorfa Abdelhafid, 2013)

Sur les 50 prélèvements réalisés, seuls 14 ont pu être identifiés : la filière, le nom du vaccin, l'âge à la vaccination et/ou l'âge à la contamination.

Tableau n°5 : Identification des élevages dont sont issus les oiseaux autopsiés.

Identifiant	Filière	Âge à la vaccination	Souche vaccinale	Âge à la contamination
n°1	Chair	-	Souche chaude (IBDL)	-
n°2	Chair		Non vacciné	31 jours
n°3	Ponte	-	Intermédiaire (CH80)	22 jours
n°4	Chair		Intermédiaire (GM97)	21 jours
n°5	Chair		Intermédiaire (GM97)	-
n°6	Chair		Intermédiaire (GM97)	-
n°7	Chair	14 à 15 jours	Souche chaude (IBDL)	-
n°8	Chair		Souche chaude (IBDL)	36 jours
n°9	Chair		Souche chaude (IBDL)	-

Suite tableau n°5 :

Identifiant	Filière	Âge à la vaccination	Souche vaccinale	Âge à la contamination
n°10	Chair	14 à 15 jours	Intermédiaire (GM97)	32 jours
n°11	Chair		-	44 jours
n°12	Chair		Souche chaude (IBDL)	28 jours
n°13	Chair		Souche chaude (IBDL)	-
n°14	Chair		Souche chaude (IBDL)	-
n°15 à n°50	nd*	nd	nd	nd

*nd : non déterminé

3- Extraction de l'ARN viral

3-1. Préparation des échantillons

Matériel:

- ⊕ Hotte à flux laminaire
- ⊕ Broyeur à rotor
- ⊕ Parafilm
- ⊕ Pince
- ⊕ Tubes secs en plastique
- ⊕ Solution de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 1% de pénicilline-streptomycine
- ⊕ Gants en latex
- ⊕ Glace pilée

Sous hotte à flux laminaire, les bourses de Fabricius issues d'un même foyer, sont broyées dans une solution de DMEM additionnée de 1% de pénicilline-streptomycine. Le broyat est ensuite réparti sur 2 tubes en plastique de 5 ml. Le 2^{ème} tube est destiné à être conservé à -80°C. Il servira d'échantillon de réserve.

Une partie du broyat du 1^{er} tube est transférée dans un aliquote soumis à une centrifugation de 10000 trs/mn pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant récupéré fera l'objet d'une extraction d'ARN.

3-2. Extraction de l'ARN

Matériel:

- ⊕ Tubes Eppendorf (aliquotes)
- ⊕ Cônes de pipetage
- ⊕ Micropipettes à volume variable
- ⊕ Vortex
- ⊕ Solution d'éthanol absolu
- ⊕ Bain marie
- ⊕ Kit d'extraction d'ARN (Viral Gene-spin kit, iNTRON Biotechnology Inc.) livré avec les composants suivants :
 - Tampon de lyse
 - Tampon de liaison
 - Solution de lavage A
 - Solution de lavage B
 - Solution d'éluion
 - Tubes Eppendorf RNase-free
 - Colonnes et tubes de collection



L'extraction de l'ARN est réalisée grâce un kit utilisant un protocole basé sur une réaction d'adsorption de l'acide nucléique sur une matrice de silice disposée en colonne, en présence de sels chaotropiques. L'élimination des protéines, de l'ADN, des sels et des résidus d'éthanol est obtenue par lavages et centrifugations. Enfin, l'éluion est réalisée grâce à une solution aqueuse alcaline exempte d'ARNase (Rnase-free)

Avant d'entamer l'extraction de l'ARN, les 10 ml de *la solution de lavage B* sont dissouts dans 40 ml d'éthanol absolu. Le protocole d'extraction suit les recommandations du fabricant avec quelques modifications.

Grâce à une micropipette, 300 µl du surnageant du broyat de bourses sont transférés dans un tube Eppendorf, dans lequel sont ajoutés 500 µl du *tampon de lyse*. Le mélange est alors vortexé puis incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Après incubation, 700 µl du *tampon de liaison* est ajouté à l'aliquote. Le mélange subit une agitation au vortex avant d'être transféré dans une colonne montée sur un tube de collection. On réalise alors une centrifugation à 13000 trs/mn pendant 1 minute à +4°C.

Le liquide récupéré dans le tube de collection est éliminé et la colonne est replacée dans le même tube de collection. 500 µl de la *solution de lavage A* sont transférés dans la colonne qui est alors centrifugée à 13000 trs/mn pendant 1 minute à +4°C. Le liquide récupéré dans le tube est de nouveau éliminé et la colonne est replacée dans le tube de collection avant d'y ajouter 500 µl de la *solution de lavage B*. On procède alors à 1 centrifugation à 13000 trs/mn pendant 1 minute à +4°C pour ensuite éliminer le liquide collecté dans le tube. La colonne est replacée dans le tube et une 2^{ème} centrifugation à sec est réalisée pour se débarrasser de toute trace d'éthanol contenu dans la *solution de lavage B*.

La colonne est retirée du tube collecteur puis placée dans l'aliquote RNase-free. 25 µl de la solution d'élution sont ajoutés directement dans la membrane de la colonne. Après une incubation d'une minute à température ambiante, on procède à une centrifugation à 13000 trs/mn pendant 1 minute à +4°C.

L'aliquote Rnase-free contenant la solution d'élution est chauffé pendant 5 minutes dans un bain marie porté à 56°C. L'aliquote est ensuite laissé à température ambiante pendant quelques minutes avant d'être conservé à -80°C.

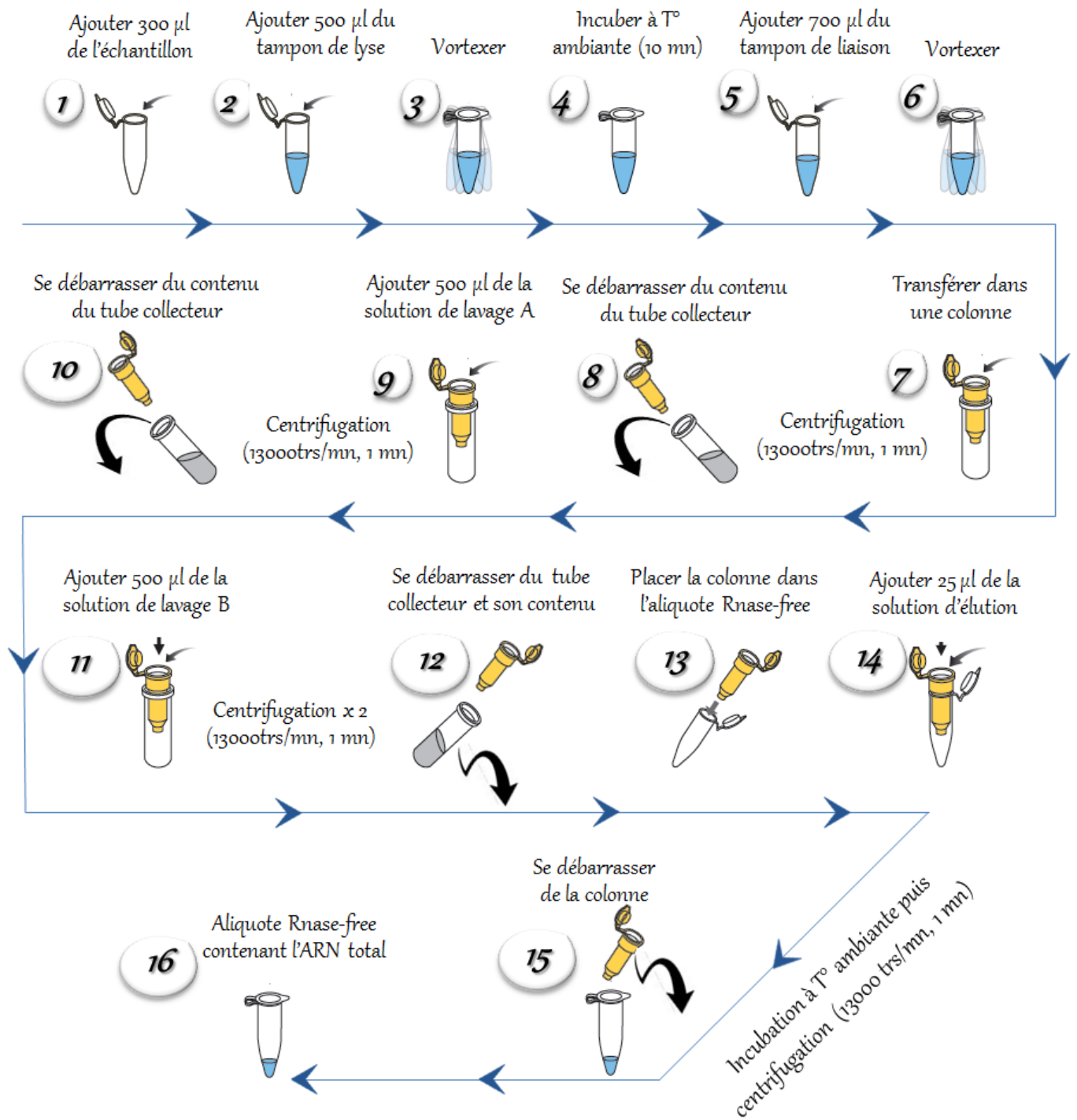


Figure n°14 : Etapes d'extraction de l'ARN viral par adsorption de l'acide nucléique sur membrane de silice

4- Quantification et contrôle de la pureté de l'ARN total par absorptiométrie UV

Matériel:

- ⊕ Nanodrop 1000
- ⊕ Micropipette
- ⊕ Cônes de pipetage blancs (1-10 µl)
- ⊕ Echantillon à blanc : Solution d'éluant (Eluant du kit ayant servi à l'extraction de l'ARN)

La quantité et la pureté de l'ARN total extrait sont évaluées par la mesure de l'absorbance de l'échantillon dans l'ultra-violet (UV) à 230, 260 et 280 nm.

Le principe de la quantification et de l'évaluation de la pureté de l'ARN par absorptiomètre repose sur 2 faits:

a) L'ARN absorbe fortement dans l'UV à 260 nm (Densité Optique 260: DO_{260}). Une unité d'absorbance à 260 nm équivaut à 40 µg/ml d'ARN. La quantité de l'ARN total contenu dans l'échantillon sera alors égale à : $(40 \times DO_{260})$ µg/ml.

b) Les protéines absorbent fortement dans l'UV à 280 nm (DO_{280}), alors que les solvants ou les sels chaotropiques (utilisés dans l'extraction des acides nucléiques) absorbent idéalement dans l'UV à 230 nm (DO_{230}). La pureté de l'ARN extrait pourra alors être estimée à travers les rapports DO_{260}/DO_{280} et DO_{260}/DO_{230} . Des ratios faibles traduiront forcément des contaminations qui pourraient éventuellement interférer avec la rt-PCR (*Sambrook et al., 1989; Manchester, 1996*)

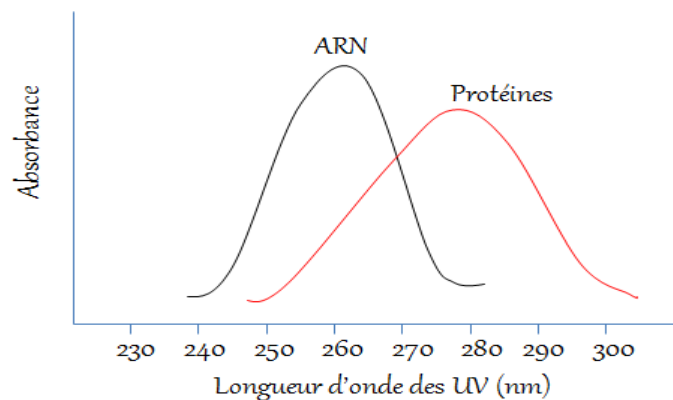


Figure n°15 : Chevauchement spectral entre l'ARN et les protéines

La spectrophotométrie UV des extraits d'ARN a été réalisée grâce à un Nanodrop relié à un microordinateur. 2 μ l de l'ARN total extrait sont déposés par micropipette sur le piédestal inférieur (surface de mesure) de l'appareil. Le bras du Nanodrop est alors abaissé, ce qui permet de compresser la goutte de l'échantillon entre les 2 surfaces de mesure. Les mesures d'absorbance, la quantité de l'ARN et les différents rapports de densités optiques sont directement obtenus grâce au logiciel ND-1000 v3.1.0. Entre deux échantillons, les 2 surfaces de mesures sont soigneusement essuyées à l'aide de papier absorbant.

Préalablement à la série de mesure, on a pris le soin de faire le blanc du Nanodrop (absorptiométrie de l'éluant du kit ayant servi à l'extraction de l'ARN)

5- Transcription inverse et amplification en chaîne par polymérase: rt-PCR

5-1. Choix des amorces

Le couple d'amorces choisi, flanque un fragment de 743 pb (paires de bases) dans le segment A du génome viral, codant la région centrale de la protéine de capsid VP2 où sont situés les épitopes neutralisants conformationnels, les plus exposés à la pression immunitaire et de ce fait les plus sujets aux mutations. Le fragment d'intérêt est situé entre les nucléotides en position 737 et 1479 (selon la numérotation de *Bayliss et al., 1990*).

Dans le tableau n°6 figurent les séquences de l'amorce sens (F : Forward) et anti-sens (R : Reverse) ainsi que leurs températures de fusion respectives (Melting Temperature : Tm), leurs position dans le segment A et leurs teneurs en bases C+G

Tableau n°6 : Caractéristiques des amorces

	Séquences nucléotidiques	Positions	Tm	% en (C+G)
Amorce F	5' -GCCCAGAGTCTACACCAT- 3'	737 à 754	56°C	55%
Amorce R	5' -CCCGGATTATGTCTTTGA- 3'	1479 à 1462	52°C	44%

La figure ci-dessous montre bien que les séquences nucléotidiques des 2 amorces sont consensuelles au sein des souches virales de références. Ceci montre leur capacité à s'hybrider avec les virus sans distinction entre virus classiques, atténués, hypervirulents ou variants. L'alignement des séquences a été réalisé grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.5 dont l'interface peut être consultée en "Annexe A".

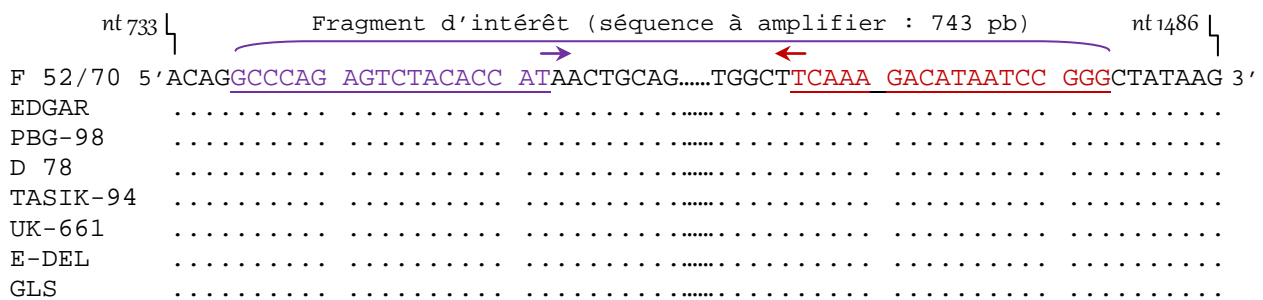


Figure n°16 : Alignement de séquences montrant l'absence de mésappariement entre la séquence des amorces et celle des souches virales de référence : V. classiques (F52/70, Edgar), V. atténués (PBG-98, D78), V. hypervirulents (Tasik-94, UK-661) et V. variants (E-Del, GLS). Les séquences soulignées représentent l'amorce sens (en bleu) et la séquence complémentaire de l'amorce anti-sens (en rouge). Les 2 flèches indiquent le sens de l'amplification. Les points indiquent une similitude de bases entre les différentes souches virales. nt : nucléotide.

Spécificité des amorces :

Le couple d'amorces doit amplifier spécifiquement la séquence d'intérêt (le fragment de 743 pb du gène codant la région hypervariable de VP2 du virus de la maladie de Gumboro) et ne doit pas s'hybrider avec un acide nucléique contaminant. Pour évaluer la spécificité des amorces on a eu recours à l'outil primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur le site de NCBI (National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Un aperçu de l'interface Web du logiciel primer-BLAST est donné en "Annexe B".

BLAST permet, grâce à un alignement de séquence, de rechercher dans sa banque de gènes, des séquences complémentaires à celles des amorces. Ci-après, le résultat du BLAST sur le couple d'amorces :

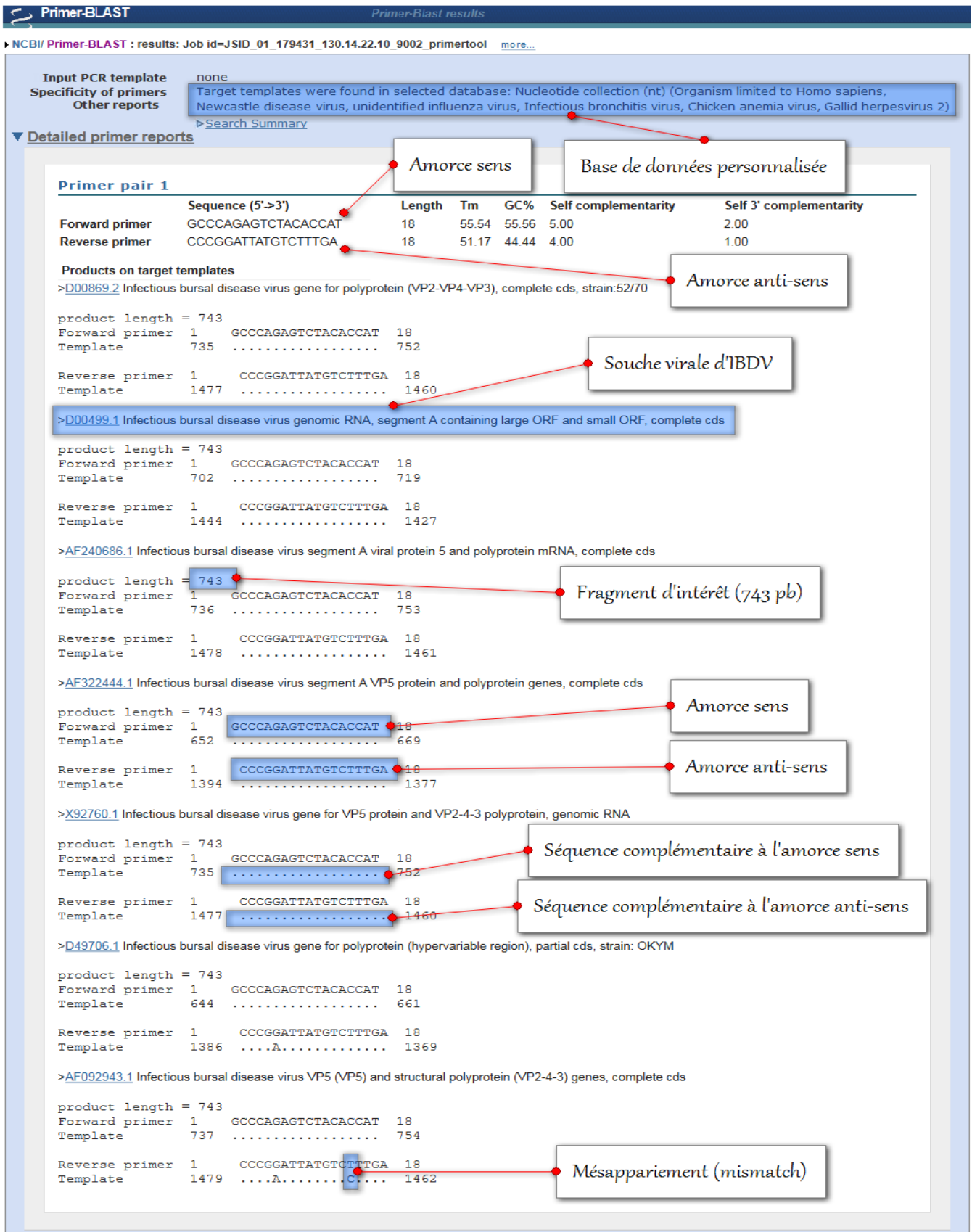


Figure n°17 : Spécificité des amorces : Résultat partiel du BLAST (1 sur 70 pages environ)

La base de données utilisée par BLAST a été personnalisée en fonction des contaminants probablement présents dans l'environnement où a lieu la rt-PCR (laboratoire de microbiologie vétérinaire): Génome humain, virus de la maladie de NewCastle, de la grippe aviaire, de la Bronchite infectieuse, de l'anémie infectieuse du poulet et de la maladie de Marek.

Les résultats du BLAST confirment la haute spécificité des amorces :

- Les 500 organismes (7 seulement sont visibles sur la fig. n°17) ayant une complémentarité de séquences avec les 2 amorces sont tous des souches virales de la maladie de Gumboro.
- Cette complémentarité concerne le gène codant la région hypervariable de la protéine VP2 dans le segment A et la taille du fragment généré est de 743 pb (fragment d'intérêt)

Notons que pour certaines souches, des mésappariements (mismatches) entre 1 à 2 nucléotides ont été constatés.

5-2. Mise en oeuvre de la rt-PCR

Matériel:

- ⊕ Thermocycleur Biometra
- ⊕ Hotte à flux laminaire
- ⊕ Micropipettes
- ⊕ Connes à filtres pour PCR
- ⊕ Tubes PCR
- ⊕ Eau RNase-free
- ⊕ Solution mère de l'amorce sens (F : Forward) : 100 µM oligo solution
- ⊕ Solution mère de l'amorce antisens (R :Reverse) : 100 µM oligo solution
- ⊕ Kit PreMix one step rt-PCR (iNtRON Biotechnology Inc.) contenant:

- Un OptiScript™ RT (optimise la réaction de transcription inverse)
- Un tampon rt-PCR
- dNTPs (dinucléotides triphosphate)
- i-StarTaq DNA polymerase
- Tampon stabilisateur

Avant de réaliser le mélange réactionnel, une solution de stock d'environ 60 µl, concentrée à 25 µM, est préparée à partir de la solution mère de chacune des amorces F et R :

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \quad (C : \text{Concentration}, V : \text{Volume}, i : \text{initial}, f : \text{final})$$

$$100 \mu\text{M} \times V_i = 25 \mu\text{M} \times 60 \mu\text{l}$$

$$V_i = (25 \mu\text{M} \times 60 \mu\text{l}) / 100 \mu\text{M} = 15 \mu\text{l}$$

La solution de stock concentrée à 25 µM est donc obtenue en diluant 15 µl de la solution mère dans 60 µl d'eau RNase free.

Sous hotte à flux laminaire on réalise, dans des tubes PCR, un mélange réactionnel sous un volume total de 25 µl :

- 8 µl du PreMix
- 1 µl de chacune des amorces F et R (puisés dans la solution de stock)
- 5 µl de l'extrait d'ARN (échantillon)
- 10 µl d'eau RNase-free.

Un contrôle négatif (-) a été inclus dans la réaction rt-PCR. Le mélange réactionnel du contrôle (-) comprend 8 µl du PreMix, 1 µl de chacune des 2 amorces F et R et 15 µl d'eau RNase-free, pour un volume total de 25 µl.

Les tubes ainsi préparés sont mis dans un thermocycleur préalablement chauffé à 50°C.

L'appareil est programmé pour une "rt-PCR one step" comprenant :

- ✚ Une phase de transcription inverse (rt) :
 - 45°C pendant 60 minutes

- 94°C pendant 10 minutes

✚ Une phase PCR (35 cycles):

- 94°C pendant 45 secondes (Dénaturation)

- 52°C pendant 1 minute (Hybridation)

- 72°C pendant 90 secondes (Extension)

✚ Une phase d'extension finale :

- 72°C pendant 15 minutes

5-3. Contrôle des produits d'amplification sur gel d'agarose

Matériel :

- ⊕ Moule, peigne et cuve électrophorétique horizontale (Bio-Rad)
- ⊕ Générateur à électrophorèse (Bio-Rad)
- ⊕ Balance de précision
- ⊕ Eprouvette graduée
- ⊕ Fiole Erlenmeyer
- ⊕ Gants en latex
- ⊕ Cônes et micropipette
- ⊕ Table à ultraviolet (UV)
- ⊕ Poudre d'agarose
- ⊕ Tampon Tris-Acétate-EDTA 50x (TAE 50x, PH : 8)
- ⊕ Marqueur de taille
- ⊕ Bromure d'éthidium (BET)
- ⊕ Solution de charge (bleu de bromophénol + saccharose + glycérol)
- ⊕ Eau distillée

5-3.1. Préparation du gel d'agarose a 1% (m/v):

Dans une fiole Erlenmeyer contenant un aimant, 500 mg de poudre d'agarose, sont mélangés à 49 ml d'eau distillée et 1 ml de tampon TAE 50x. La solution est portée à ébullition en plaçant la fiole sur une plaque chauffante.

Après ébullition, on laisse refroidir la solution d'agarose (50°C environ) avant d'y ajouter 2 µl de BET. La solution d'agarose est alors coulée dans le moule avec le peigne, sans toutefois submerger le sommet des dents du peigne. Au besoin, les bulles d'air en surface seront éliminées au moyen d'un cône.

On laisse se gélifier la solution d'agarose pendant 30 mn à température ambiante. Le gel alors figé et opalescent est débarrassé délicatement de son peigne, avant d'être égoutté et placé dans la cuve électrophorétique, puits disposés coté cathode. On termine par remplir la cuve avec le tampon TAE 1x pour recouvrir le gel de quelques millimètres.

5-3.2. Dépôt des échantillons, électrophorèse et contrôle des produits PCR:

Le produit PCR de chaque échantillon est densifié sur un morceau de parafilm par l'ajout de 2 µl d'une solution de charge à 7 µl du produit PCR. Grâce à une pipette, l'échantillon ainsi densifié est déposé lentement et bien verticalement dans un puits du gel immergé sous le tampon. La solution de charge assure le maintien du dépôt dans le puits sans se dissoudre dans la solution tampon. Dans un des puits, est déposé un marqueur de taille (100 à 1500 pb) qui permettra de réaliser un étalonnage du gel.

On termine par brancher la cuve fermée, au générateur avant d'appliquer une tension de 100 volts et laisser se faire déplacer les fragments d'ADN sur le gel pendant une trentaine de minutes. Le colorant bleu de la solution de charge, migrant toujours plus vite que les fragments d'ADN (se comporte comme un fragment de 300 pb), permet de visualiser l'évolution de l'électrophorèse.

Quand le colorant bleu est à environ 1 cm du bord du gel, la cuve électrophorétique est débranchée et le gel est contrôlé par trans-illumination sur une table à UV. Les fragments d'ADN

qui auront migré dans le gel seront ainsi visualisés sous forme de bandes qui fluorescent grâce au BET intercalé entre les paires de base de l'acide nucléique.

6- Séquençage des amplimères

La détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides au sein des amplimères est réalisée grâce à un séquençage automatique mais fondamentalement basé sur la méthode de SANGER (Méthode des interrupteurs de chaîne), adaptée à la fluorescence.

Principe de la méthode de SANGER :

L'ADN à séquencer est amplifié *in vitro* dans un mélange réactionnel contenant, en plus des ingrédients habituels (Taq polymérase, dNTPs, amorce (F ou R)), des ddNTPs (didéoxynucléotides) interrupteurs de chaîne. L'incorporation aléatoire des ddNTPs par la Taq polymérase conduit à une interruption de la polymérisation. Ainsi les fragments simples brins formés, porteront à leur extrémité une base A, C, T ou G selon le ddNTP incorporé (ddATP, ddCTP, ddTTP ou ddGTP). Pour chaque échantillon d'ADN, seront préparés 4 milieux réactionnels contenant chacun des ddATPs, des ddCTPs, des ddTTPs ou des ddGTPs.

Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur taille. Les plus petits fragments migreront plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial (voir illustration ci-dessous)

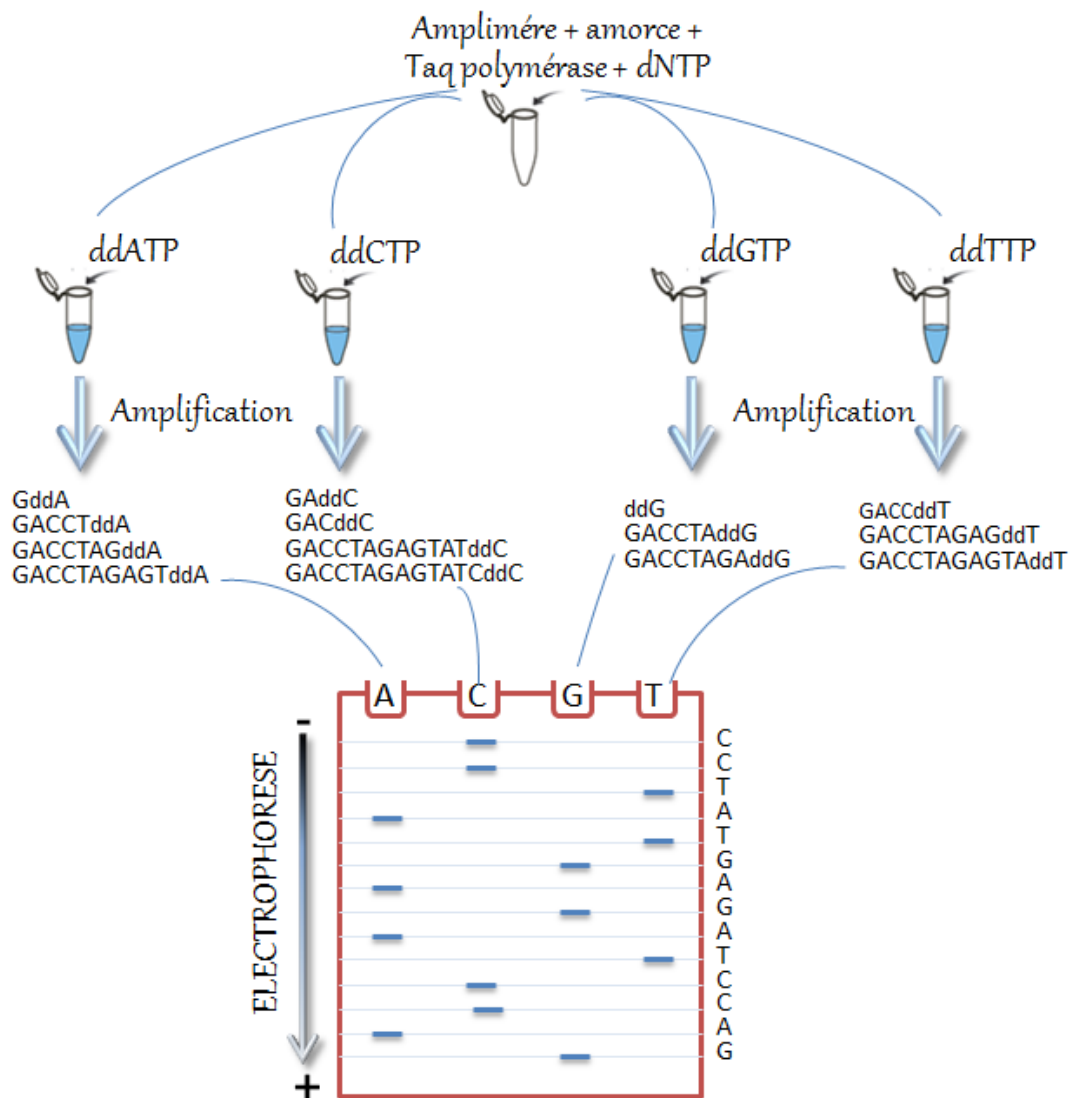


Figure n°18 : Principe de la méthode de SANGER

Adaptation de la méthode de SANGER à la fluorescence:

Afin de pouvoir automatiser le séquençage, chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent, dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale permettra alors de faire la distinction entre les 4 fluorochromes, associer la base correspondante (A, T, C ou G) et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Cette adaptation de la technique de SANGER à la fluorescence a permis, pour chaque échantillon, de réaliser la réaction de séquence dans un tube unique contenant les 4 types de ddNTPs.

6-1. Préparation des produits PCR: Purification des amplimères

Matériel

- ⊕ Thermocycleur
- ⊕ Pipettes multicanaux et monocanal
- ⊕ Plaque PCR 96 puits adaptée au thermocycleur (Applied Biosystems)
- ⊕ Tubes PCR
- ⊕ Cônes
- ⊕ Bouchons en strip
- ⊕ Eau ultrapure RNase/DNase
- ⊕ Enzymes :
 - Exonucléase I
 - SAP : Shrimp Alkaline Phosphatase (phosphatase alcaline de crevette)

Les produits PCR bruts renferment des résidus d'amorces et des dNTPs non consommés durant la rt-PCR et éventuellement des fragments d'ADN simples brins de moins de 100 pb. Ces résidus peuvent interférer avec la technique de séquençage et doivent donc être préalablement dégradés. Cette étape dite de purification est réalisée comme suit :

Pour un produit PCR à purifier, on prépare dans un tube PCR, un mix contenant 5 µl d'eau ultrapure, 0,5 µl d'Exonucléase (dégrade les ADN simples brins) et 0,5 µl de SAP (hydrolyse les dNTPs libres). La quantité du mix est adaptée au nombre d'échantillons à purifier.

Dans chacun des puits de la plaque, 6 µl du mix sont mélangés à 4 µl du produit PCR pour un volume total de 10 µl.¹ On termine par fermer la plaque avec les bouchons en strip.

La plaque ainsi préparée est mise dans le thermocycleur, lancé avec le programme suivant :

¹ La quantité du produit PCR prélevée varie de 1 à 4 µl en fonction de la netteté de la bande sur le gel de l'électrophorèse : Pour les bandes de grande intensité, prévoir moins de 4 µl. Dans ce cas la quantité du mix ajoutée doit donner un volume final de 10 µl.

- ⊕ 37°C pendant 15 minutes (optimisation de l'action enzymatique)
- ⊕ 80°C pendant 15 minutes (inactivation des enzymes)
- ⊕ 4°C (le moins longtemps possible)

6-2. Réactions de séquence

Pour chaque produit PCR, 2 réactions de séquence seront réalisées séparément, chacune utilisant l'amorce F (Forward) ou R (Reverse). Ceci permettra d'obtenir pour chaque échantillon un brin sens (F) et un brin antisens (R) qui seront alignés plus tard pour déterminer la séquence consensus ou "Contig".

Matériel

- ⊕ Thermocycleur
- ⊕ Pipettes multicanaux et monocanal
- ⊕ Plaque PCR 96 puits
- ⊕ Tubes PCR
- ⊕ Capuchons PCR
- ⊕ Cônes
- ⊕ Film adhésif
- ⊕ Tampon 5x (Applied Biosystems)
- ⊕ Amorce F et R 10 µM (solution mère 100 µM diluée 10x)
- ⊕ Eau ultrapure DNase/RNase
- ⊕ Kit BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems), livré avec les composants suivants :
 - AmpliTaq (Taq polymérase)
 - dNTPs
 - ddNTPs marqués
 - MgCl₂

Pour un produit PCR à séquencer, on prépare dans un tube PCR, un mix contenant 4 μ l d'eau ultrapure, 1 μ l de l'amorce, 1 μ l du BigDye Terminator et 4 μ l du tampon 5x. La quantité du mix est adaptée au nombre d'échantillons à séquencer.

Dans chacun des puits de la plaque, 10 μ l du mix sont mélangés à 10 μ l du produit PCR purifié Exo-SAP, pour un volume total de 20 μ l. On termine par fermer la plaque avec les capuchons PCR.

La plaque ainsi préparée est mise dans le thermocycleur, lancé avec le programme suivant :

- ✚ Une étape de dénaturation : 96°C pendant 3 minutes
- ✚ Une étape PCR (25 cycles) :
 - 96°C pendant 10 secondes (Dénaturation)
 - 52°C pendant 5 secondes (Hybridation)
 - 60°C pendant 2 mn et 30 sec (Extension). L'étape d'extension est stoppée par l'incorporation d'un ddNTP

6-3. Purification de la réaction de séquence: Précipitation de l'ADN

L'étape de purification sert à éliminer les excès de Mix, notamment les fluorochromes utilisés précédemment pour la réaction de séquence. Elle consiste en une précipitation à l'éthanol à 80%, ajouté à raison de 50 μ l par tube de plaque. Après une centrifugation à 4000 trs/mn pendant 15 mn à 15°C, le surnageant est éliminé en donnant un coup sec à la plaque, laquelle est laissée à l'envers pendant quelque temps. Pour éliminer toute trace d'éthanol, la plaque, retournée, est une nouvelle fois centrifugée à 1000 trs/mn pendant une minute, avant de la laisser sécher à l'air libre pendant une nuit.

Avant de passer à l'électrophorèse capillaire, on procède à la dénaturation de l'ADN par l'ajout de 20 μ l de formamide, suivie d'une centrifugation à 4000 trs/mn pendant 1 minute à 15 °C.

6-4. Détermination de la séquence des amplimères

La détermination de la séquence nucléotidique des amplimères est réalisée grâce à un analyseur génétique à 96 capillaires (Analyseur 3730 XL DNA, ABI Prism 377, DNA sequencer, Applied Biosystem) et consiste en une séparation des fragments de la réaction de séquence en électrophorèse capillaire, suivie d'une analyse spectrale de la fluorescence spécifique des 4 ddNTPs interrupteurs de chaîne. Au bout de cette analyse, réalisée grâce au logiciel GeneMapper V4.0, une assignation de bases (Base Calling) est effectuée avant de rendre la séquence nucléotidique du brin matrice sous forme de fichier contenant le chromatogramme et la suite en bases sous forme de texte (voir exemple ci-dessous)

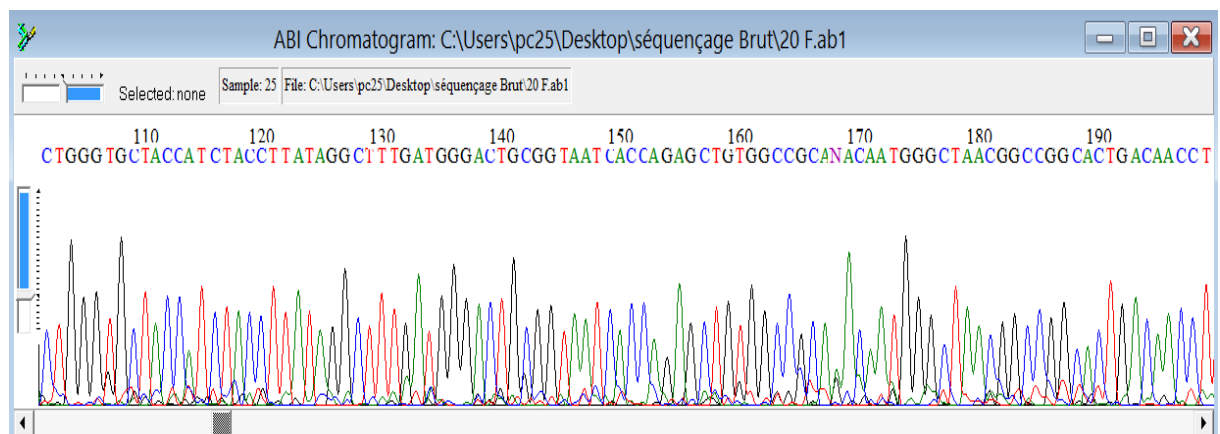


Figure n°19 : Fichier rendu par le logiciel GeneMapper, contenant le chromatogramme et la séquence nucléotidique.

6-5. Détermination de la séquence consensus

Pour chaque échantillon, le séquençage a permis d'obtenir la séquence nucléotidique du brin sens (F) et brin antisens (R). La détermination de la séquence consensus, dite aussi "Contig", consiste en un premier temps à obtenir la séquence complémentaire de la séquence R, puis de

l'aligner avec la séquence F et enfin, d'assembler les 2 séquences. Cet alignement/assemblage est réalisé grâce au logiciel DNA Baser V4.12.0

Le "Contig" obtenu dans le logiciel DNA Baser est finalement aligné, grâce au logiciel BioEdit V7.2.5, avec des séquences de souches virales de référence pour corriger les mésappariements (mismatches) et les lacunes de bases (gaps), résultant des éventuelles erreurs de séquençage.

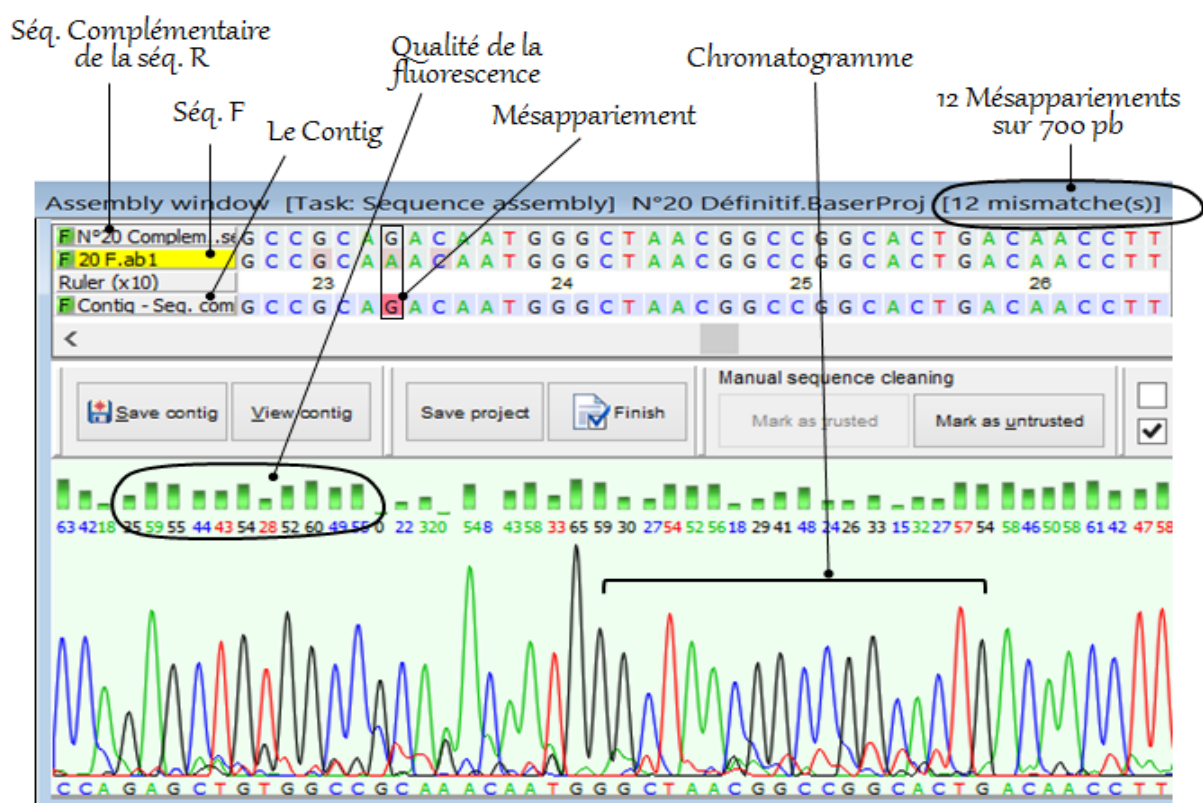


Figure n°20 : Le "Contig" obtenu dans le logiciel DNA Baser

7. Analyse des séquences nucléotidiques

Grâce à un alignement multiple de séquences, les souches virales de l'étude ont été comparées à d'autres pathotypes de référence ou de simples isolats originaires de différents pays. Ces derniers sont identifiés dans le tableau suivant où figurent aussi leurs numéros d'accès

respectifs dans la GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/nucleotide/>)

Tableau n°7 : Identification des souches virales utilisées dans l'alignement multiple de séquences

Souche	Virulence	Origine géographique	Numéro d'accès
Cu-1 M	Atténuée	Allemagne	AF362771
P2	Atténuée	Allemagne	X84034
PBG- 98	Atténuée	Angleterre	D00868
52-70	Classique	Angleterre	Y14958
Edgar	Classique	USA	A33255
Irwin M	Classique	USA	AY029166
STC	Classique	USA	D00499
849VB	Hypervirulente	Belgique	AY321949
HK46	Hypervirulente	Hong Kong	AF092943
D6948	Hypervirulente	Hollande	AF240686
SC9	Hypervirulente	Brésil	JN982254
KK1	Hypervirulente	Corée du sud	AF165150
OKYM	Hypervirulente	Japan	D49706
P07	Hypervirulente	Tunisie	AY665672
Tasik-94	Hypervirulente	Indonésie	AAN52492
UK661	Hypervirulente	Angleterre	X92761
E/DEL	Variant	USA	X54858
GLS	Variant	USA	M97346
OH	Apathogène (sérotypé 2)	USA	M66722

L'alignement multiple des séquences a été réalisé grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.5., intégrant l'algorithme ClustalW.

8- Analyse des séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques

Les séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques ont été obtenues grâce au logiciel Mega V6.0.5 dont l'interface peut être consultée en "Annexe C". Les séquences amino-acidiques obtenues ont été alignées puis comparées avec celles des souches de références grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.5.

9- Etablissement de cartes de restriction

Les séquences nucléotidiques des souches virales ont été soumises au logiciel Geneious R7.1 pour révéler la présence et la position des sites de restriction par les enzymes, BstNI, MboI, SspI et BspMI. Ceci a permis d'établir une carte de restriction pour chacune des souches virales de l'étude.

L'interface du logiciel Geneious peut être consultée en "Annexe D"

Dans le tableau dressé ci-après, sont identifiés les sites de restriction des 4 enzymes

Tableau n°8 : Sites spécifiques de restriction des 4 enzymes.

Enzyme	Sites spécifiques de restriction
BstNI	CC [^] WGG ¹
MboI	[^] GATC
SspI	AAT [^] ATT
BspMI	[^] NNNNNNNNGCAGGT ² ACCTGCNNNN ^{^3}

¹ W = A ou T

^{2,3} N = A, C, G ou T

Le chapeau "[^]" indique la position de clivage de l'enzyme

Par ailleurs, le profil électrophorétique des fragments de digestion virtuelle par les 2 enzymes BstNI et MboI, obtenu grâce au logiciel Geneious, ont permis de faire appartenir les souches virales étudiées aux 6 groupes moléculaires connus du virus de la maladie de Gumboro.

Dans le tableau ci-dessous, figurent les 6 groupes moléculaires du virus de la maladie de Gumboro, distingués par *Jackwood et Sommer (1999)* selon la taille et le nombre des fragments de restriction par les enzymes BstNI et MboI.

Tableau n°9 : Classification des souches virales de la maladie de Gumboro selon le profil de digestion enzymatique (*Jackwood et Sommer, 1999*)

Groupes Moléculaires	BstNI : Taille des fragments de restriction (pb)							MboI : Taille des fragments de restriction (pb)				
	424	350	209	172	154	139	119	480	403	362	234	229
1	x			x			x				x	x
2	x			x			x		x			x
3				x	x	x	x			x		x
4			x	x	x		x			x		x
5	x			x			x	x				x
6	x			x			x			x		x

10- Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences nucléotidiques et amino-acidiques du domaine hypervariable de VP2 des souches virales de l'étude a été réalisée grâce au logiciel Mega V6.0.5 en choisissant l'algorithme "Neighbor Joining" avec un Bootstrap de 1000 répliques (voir "Annexe E"). La valeur du bootstrap calcule la probabilité pour que l'arbre généré représente la véritable phylogénie des virus (*Brinkman et Leipe, 2001*). Il représente une mesure de la validité statistique des branches de l'arbre. Plus élevée est sa valeur, plus fiables seront les ramifications à l'intérieur de l'arbre.

Les souches virales de sérotype 1, recrutées pour l'analyse phylogénétique sont celles figurant dans le tableau n°7. La souche de sérotype 2, désignée OH, a été choisie comme extra-groupe. Le résultat est visualisé sous forme d'un arbre phylogénétique (phylogramme)

II- RESULTATS ET INTERPRETATION

1- Quantification de l'ARN total par absorptiométrie UV

Les résultats concernant la quantité et la pureté de l'ARN total extrait des échantillons de BF sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°10 : Concentration et pureté des ARN totaux obtenus par extraction à partir de BF

Identifiant de l'échantillon	Concentration de l'ARN total ($\mu\text{g/ml}$)	Ratio $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$	Ratio $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$
1	341.2	1.59	0.56
2	379.8	2.05	0.66
3	1634.4	2.06	1.72
4	3327.9	2.10	0.61
5	1262.5	2.09	1.84
6	1136.3	1.98	0.62
7	792.3	2.04	1.03
8	931.2	2.03	1.30
9	1520.7	2.01	2.09
10	1081.1	2.08	0.36
11	243.1	2.07	0.47
12	920.8	2.09	0.41
13	455.5	2.09	1.47
14	1214.4	2.04	1.82
15	2075.1	2.03	2.00
16	443.0	2.12	2.06
17	1911.6	2.09	0.64
18	679.7	2.04	0.11
19	247.6	2.07	0.51
20	2411.7	2.02	1.83
21	1675.8	2.01	1.78
22	3168.7	2.06	1.66
23	393.3	1.94	nt
24	1910.2	2.04	0.81
25	893.1	2.05	1.12
26	411.3	1.86	nt
27	181.1	2.2	0.30
28	nt*	nt	nt

Suite tableau n°10

Identifiant de l'échantillon	Concentration de l'ARN total ($\mu\text{g/ml}$)	Ratio $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$	Ratio $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$
29	2522.6	2.08	1.17
30	526.6	2.05	0.07
31	nt	nt	nt
32	384.9	1.93	nt
33	2553.2	2.07	nt
34	826.7	2.10	0.25
35	423.7	2.09	1.95
36	434.2	2.06	1.59
37	2251	2.08	0.71
38	918	2.03	0.71
39	423.7	2.13	0.69
40	3967	1.97	1.48
41	308.9	1.87	1.53
42	407.9	2.07	0.59
43	1002.9	2.09	0.24
44	1925	2.07	0.81
45	195.7	1.98	0.36
46	309.0	2.29	nt
47	86.2	2.08	0.17
48	537.5	2.04	0.82
49	416.4	2.04	0.58
50	3560	2.02	1.52

Les échantillons surlignés en jaune feront l'objet d'une rt-PCR

* nt : non testé

Pour une meilleure lecture des résultats figurant dans le tableau n°10, 3 histogrammes ont été construits. Ils révèlent les niveaux de contamination de l'ARN extrait et la concentration de celui-ci dans les échantillons de bourses.

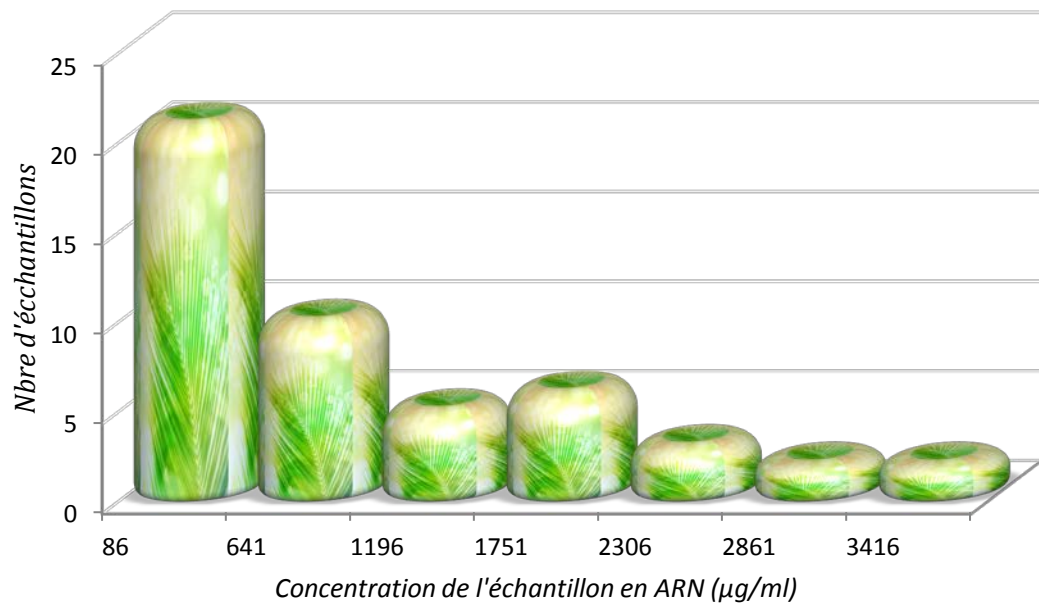


Figure n°21 : Répartition des concentrations en ARN totaux extraits à partir de BF

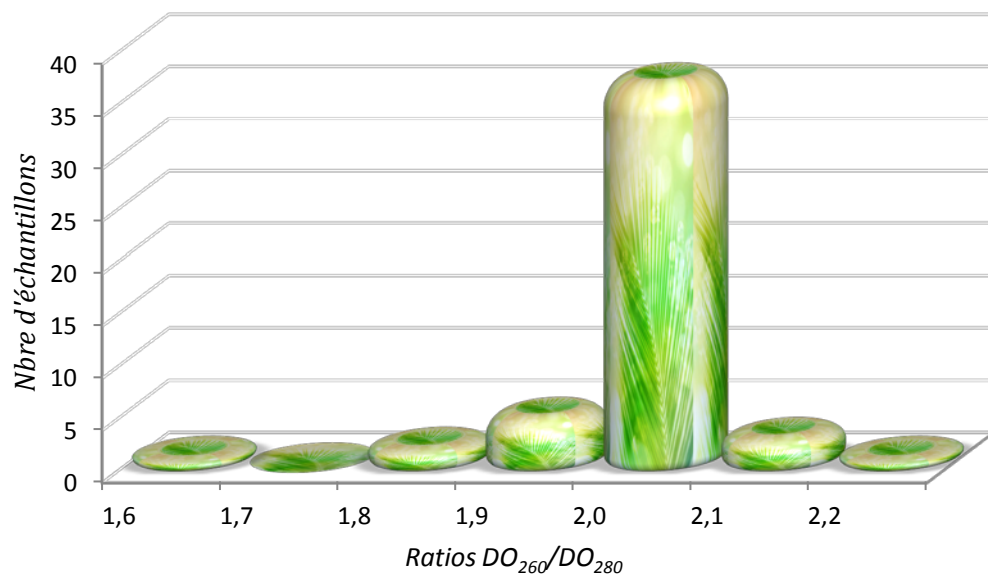


Figure n°22 : Répartition des ratios DO_{260}/DO_{280} , reflétant le niveau de contamination des extraits d'ARN par les protéines.

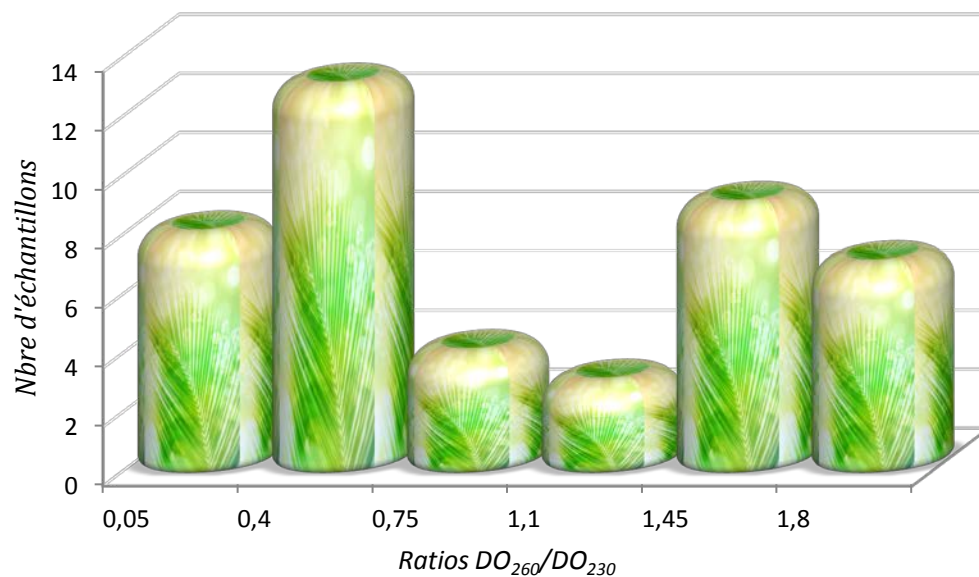


Figure n°23 : Répartition des ratios DO_{260}/DO_{230} , reflétant le niveau de contamination des extraits d'ARN par les sels chaotropiques

Plus de 40% des échantillons avaient une concentration en ARN total supérieure à 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Autant de prélèvements étaient faiblement concentrés en ARN total (concentrations inférieures à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Quant au niveau de contamination des extraits d'ARN par les protéines, il est jugé très faible pour la quasi-totalité des échantillons. Seul un prélèvement avait un ratio DO_{260}/DO_{280} inférieur à 1.8. Par contre, une contamination par les sels chaotropiques, reflétée par un ratio DO_{260}/DO_{230} inférieur à 1.8, pouvait s'observer sur presque tous les échantillons. Seul 7 échantillons avaient un faible niveau de contamination ($DO_{260}/DO_{230} > 1.8$)

2- Révélation des produits PCR sur gel d'agarose

Tous les prélèvements de bourses ont fait l'objet d'une extraction d'ARN, mais l'amplification génique in vitro du gène viral codant pour la région hypervariable de VP2 n'a concerné qu'une partie des prélèvements. Nous avons en effet, jugé qu'il était inutile de caractériser un grand nombre d'isolats : la zone et la période de prélèvement étaient trop restreintes pour s'attendre une grande diversité génétique parmi les virus circulants. Ainsi, 13 échantillons sur 50 ont subi le test

rt-PCR. Les échantillons en question sont surlignés en jaune dans le tableau n°10. Il s'agit du n°3, 5, 9, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 35, 38, 40, et 50.

Le choix des échantillons à tester a été dicté par la quantité et la pureté de l'ARN extrait. C'est ainsi que tous les échantillons recrutés pour le test avaient une concentration élevée en ARN total avec un minimum de contamination. La quantité de l'ARN extrait reflète la charge virale au niveau des BF alors que son niveau de contamination conditionne la réussite de l'amplification du fragment d'intérêt (*Sambrook et al., 1989; Manchester, 1996*)

Notons que l'échantillon n°38 avait été testé par erreur puisqu'il ne répondait à aucun des critères de choix établis (extrait d'ARN faible et visiblement très contaminé)

Sur les 13 échantillons testés, 6 se sont révélés positifs. Il s'agit du n°3, 9, 20, 21, 38 et 50. Les échantillons positifs ont révélé des bandes de 743 pb sur des gels d'agarose différents mais ont été regroupés sur un seul gel représenté ci-dessous

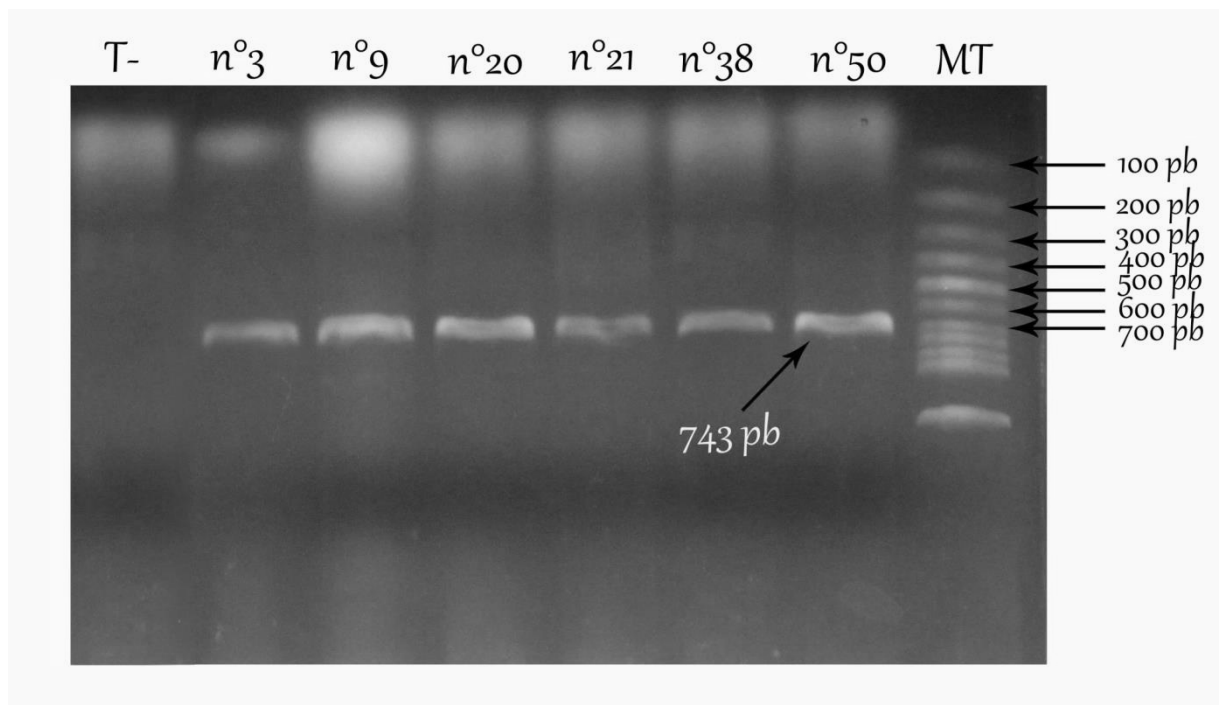


Figure n°24 : Révélation des produits PCR sur gel d'agarose étalonné. Les 6 numéros indiquent l'identifiant des échantillons positifs. T- (témoin négatif), MT (Marqueur de taille : 100pb)

3- Résultats du séquençage et analyses des séquences

Sur les 6 fragments amplifiés, 5 seulement ont pu être séquencés. Le chromatogramme de l'échantillon n°21 était fortement bruité et non exploitable. Comme on peut le voir sur le chromatogramme ci-dessous, il y a un chevauchement de pics anarchiques engendrant une fluorescence non spécifique. L'analyse du chromatogramme de l'échantillon n°21 par le logiciel Geneious a révélé plus de 21% de "N" (Base inconnue) et plus de 25% de bases ambiguës.

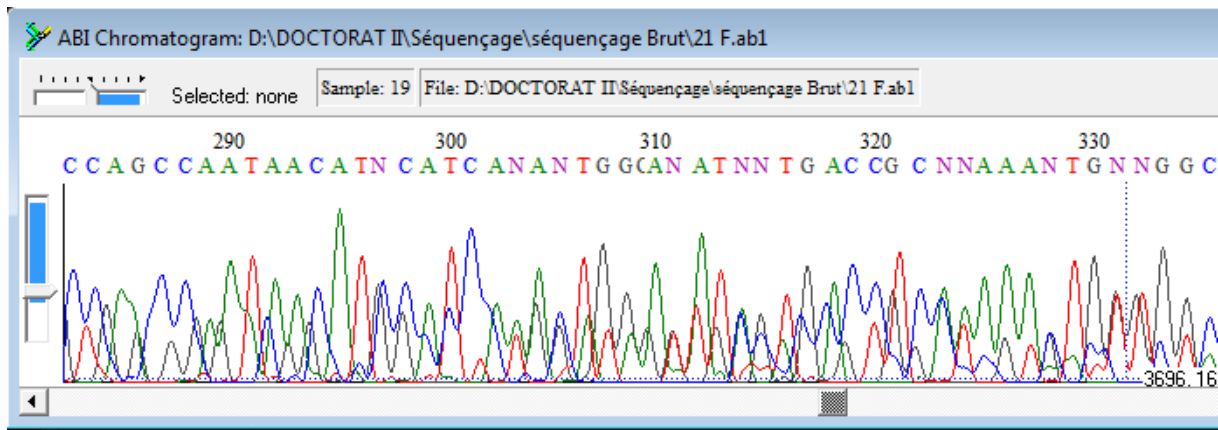


Figure n°25 : Le chromatogramme de la séquence F de l'échantillon n°21 : pics anarchiques ayant entraîné un trouble d'assignation de base (pourcentage élevé de "N")

Les séquences nucléotidiques des échantillons n°3, 9, 20, 38 et 50 (03ALG, 09ALG, 20ALG, 38ALG et 50ALG) ont été soumises à la Genbank du NCBI (National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/nucleotide/>) où elles peuvent être consultées et téléchargées grâce aux numéros d'accès suivants:

03ALG: [KP729478](#)

09ALG: [KP729479](#)

20ALG: [KP729480](#)

38ALG: [KP729481](#)

50ALG: [KP729482](#)

Les séquences nucléotidiques obtenues pour les 5 souches, ont été comparées, grâce à un alignement multiple, à celles d'autres pathotypes de référence (voir fig. n°26)

	746	756	766	776	786	796	806	816	826	836	
52/70	GCCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATTACCAATTCTCATCACAGTACCAACCAGGTGGGGTAACAATCACACTGTTCTCAGCCAACATTGAT									
STC									
PBG-98									
P2									
HK46G.....T..T..C..									
849VBG.....T..T..C..									
P07G.....T..T..C..									
SC9TC.....G.....T..T..C..									
D6948G.....T..T..C..									
OKYMG.....T..T..C..									
UK661C.....G.....T..T..C..									
E-DELA.....									
GLST.....A.....C.....									
03 ALGG.....T..T.....									
09 ALGG.....T..T.....									
20 ALGG.....T..T.....									
38 ALGC.....G.....T..T.....									
50 ALGG.....T..T.....									

	846	856	866	876	886	896	906	916	926	936	
52/70	GCTATCACAAAGCCTCAGCATTGGGGGAGAGCTCGTGTTCAAACAAAGCGTCCAAGGCCTTGACTGGGCGCCACCATCTACCTTATAGGCTTGATGGGA									
STCG.....T.....T.....									
PBG-98C.....G.....G.....C.....C.....									
P2C.....G.....G.....C.....A.....C.....									
HK46C.....C.....A.....A.....A.....T..T.....									
849VBC.....C.AG.....G.....C.....A.....A.....T..T.....									
P07C.....C.....A.....A.....A.....T..T.....									
SC9C.....C.....A.....A.....A.....T..T.....									
D6948C.....C.....A.....A.....A.....T..T.....									
OKYMC.....C.....A.....CA.....T..T.....									
UK661C.....C.....A.....A.....A.....T..T.....									
E-DELC.....T.....G.....CA.....A.....									
GLSC.....G.....A.....CA.....A.....T									
03 ALGC.....A.....A.....A.....T..T.....									
09 ALGG.....A.....A.....A.....T..T.....									
20 ALGA.....A.....A.....A.....T..T.....									
38 ALGC.....A.....A.....A.....T..T.....									
50 ALGA.....A.....A.....A.....T..T.....									

	946	956	966	976	986	996	1006	1016	1026	1036	
52/70	CTGCGGTAATCACCAGAGCTGTGGCCGAGATAATGGGCTGACGGCCGGCACCGACAATCTTATGCCATTCAATCTGTGTCATTCCAACCAATGAGATAAC									
STCA.....G.....C.....A.....C.....C.....A.....C.....G.....A.....C.....									
PBG-98AA.....G.....A.....C.....C.....A.....C.....G.....A.....C.....									
P2A.....G.....A.....C.....A.....C.....C.....G.....A.....C.....									
HK46C.....C.....A.....T.....C.....CA.....G.....GC.....									
849VBC.....A.....T.....C.....A.....G.....C.....									
P07C.....A.....T.....C.....A.....G.....GC.....									
SC9C.....A.....T.....C.....A.....G.....GC.....									
D6948C.....A.....T.....C.....A.....G.....GC.....									
OKYMC.....A.....T.....C.....A.....G.....GC.....									
UK661C.....T.....C.....A.....G.....GC.....									
E-DELA.....C.....T.....G.....									
GLST.....A.....C.....A.....G.....C.....									
03 ALGC.....A.....T.....C.....CA.....C.....G.....C.....GC.....									
09 ALGC.....A.....T.....C.....CA.....C.....G.....C.....GC.....									
20 ALGC.....A.....T.....C.....CA.....C.....G.....C.....GC.....									
38 ALGC.....A.....T.....C.....C.....CA.....C.....G.....C.....GC.....									
50 ALGC.....A.....T.....C.....CA.....C.....G.....C.....GC.....									

	1046	1056	1066	1076	1086	1096	1106	1116	1126	1136
52/70	CCAGCCAATC	CACATCCATCAA	AACTGGAGATAG	TGACCTCCAAA	AGTGGTGGTC	CAGGCAGGGG	GATCAGATGTC	ATGGTCGGCA	AGTGGGAGC	CTAGCAGTG
STC				G		C				
PBG-98								T		A
P2										A
HK46						G			A	
849VB						G				
P07						G	A		A	
SC9						G			A	
D6948						G			A	
OKYM						G			A	
UK661			A			G			A	
E-DEL					A			A		
GLS						A		C		
03 ALG					C	G			A	C
09 ALG	A				C	G			A	C
20 ALG	A				C	G			A	C
38 ALG					C	G			A	C
50 ALG	A			T		C			A	C

	1146	1156	1166	1176	1186	1196	1206	1216	1226	1236
52/70	ACGATCCATGG	TGGCAACTATCC	AGGGGCCCTCC	GTCCCGTCACA	CTAGTAGCCTAC	GAAAGAGTGG	CAACAGGATCC	CGTCGTTACGG	TCGCTGGGGTGA	
STC		C								
PBG-98				G	G					
P2				G	G					
HK46		C	A					G	T	C
849VB	A	T		A		G	G			
P07		C						A		C
SC9		C						T		C
D6948		C						T		C
OKYM		C		C				G	T	C
UK661		C						T		C
E-DEL			A			G		T		
GLS	T							T		
03 ALG		C						T		
09 ALG		C						T		
20 ALG		C			T			T		
38 ALG		C						T		
50 ALG		C						T		

	1246	1256	1266	1276	1286	1296	1306	1316	1326	1336
52/70	GTA	ACTTCGAGCT	GATTCCAAATC	CTGAACTAGCA	AAAGAACCTGG	TACAGAATAC	GCGCCGATTG	ACCCAGGAGCC	ATGAACTACACA	AAATTGATACT
STC		C								
PBG-98		C								
P2		C								
HK46		C			C			G		
849VB		C								
P07		C			C					
SC9		C			C					
D6948		C			C					
OKYM		C			C			G		
UK661		C			C					
E-DEL		C				T				G
GLS		C								
03 ALG		C			C					
09 ALG		C			C					C
20 ALG		C			C					C
38 ALG		C			C			G		
50 ALG		C			C					C

	1346	1356	1366	1376	1386	1396	1406
52/70	GAGT	GAGAGGG	ACCGTCTT	GGCATCA	AAGACCGT	CTGGCCAACA	AGGGAGTACACTGATTTTC
STC							C..C.....
PBG-98							C.....A.....
P2							C.....A.....
HK46				A.....			C...C.....
849VB							C.....A.....
P07				A.....			C.....
SC9				T..A.....			C...C.....
D6948				A.....			C...C.....
OKYM				A.....			C...C.....
UK661				A.....			C...C.....
E-DEL		C.....					C.....
GLS		C.....	A.....	G.....			C...C.....
03 ALG				A.....			C.....
09 ALG				A.....			C...C.....
20 ALG				A.....			C.....
38 ALG				A.....			C.....
50 ALG				A.....			C.....

Figure n°26 : 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 vert), les souches hypervirulentes (en bleu) et les virus variants (en gris).

- ☞ Le point sous la lettre indique que la base dans la souche virale est la même que celle retrouvée dans la souche 52/70 à la même position
- ☞ 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

L'alignement multiple de séquences dressé ci-dessus révèle les changements de nucléotides au sein de chaque souche virale et permet d'identifier les nucléotides que partagent les 5 souches de l'étude avec chacun des 4 pathotypes (Classiques, atténués, hypervirulents et variants)

Le tableau suivant permet de mieux voir les substitutions de nucléotides que partagent de façon exclusive les souches de l'étude avec les virus hypervirulents.

Tableau n°11 : Principales substitutions de nucléotides partagées, de façon exclusive ou non, par les souches de l'étude avec les virus hypervirulents

Pathotype	Positions des Nucléotides (selon la numérotation de <i>Bayliss et al., 1990</i>)																		
	795	827	830	866	897	905	908	966	977	981	989	1011	1027	1094	1115	1145	1283	1370	
Souches Virulentes Classiques (52/70, STC)	C	C	C	G	G	C	C	G	G	G	C	C	A	A	G	T ⁸	T	C	
Souches Atténuées (PBG-98, P2)	C	C	C	G	G	C	C	A	G	A	C	C	A	A	G	T	T	C	
Virus Variants (E/DEL, GLS)	A	C	C	G	G	C	C	A	G	A ³	C	C	A	A	G	T	T	C	
Souches Hypervirulentes (HK46, 849VB, Po7, KK1, SC9, D6948, OKYM, TASIK 94, UK661)	G	T	T	A ¹	A	T	T	G	A ²	G	T	A	G ⁴	G	A ⁷	C ⁹	C ¹⁰	A ¹¹	
Isolats de l'étude (03 ALG, 09 ALG, 20 ALG, 38 ALG, 50 ALG)	G	T	T	A	A	T	T	G	A	G	T	A	G ⁵	G ⁶	A	C	C	A	
¹ "G" au lieu de "A" pour la souche 849VB																			
² "G" au lieu de "A" pour la souche UK661																			
³ "G" au lieu de "A" pour la souche E/DEL																			
⁴ "A" au lieu de "G" pour la souche 849VB																			
⁵ "A" au lieu de "G" pour la souche 20 ALG																			
⁶ "A" au lieu de "G" pour la souche 50 ALG																			
⁷ "G" au lieu de "A" pour la souche 849VB																			
⁸ "C" au lieu de "T" pour la souche STC																			
⁹ "T" au lieu de "C" pour la souche 849VB																			
¹⁰ "T" au lieu de "C" pour la souche 849VB																			
¹¹ "C" au lieu de "A" pour la souche 849VB																			

Les substitutions de nucléotides au niveau des positions surlignées en vert ont apporté un changement d'acides aminés dans la séquence de la protéine VP2 (substitution non synonymes)

Les 5 souches de l'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. Il s'agit là de 2 substitutions non synonymes² (966(A→G) et 981(A→G))

Les autres substitutions non synonymes sont exclusivement partagées par les virus de l'étude avec les virus hypervirulents. Il s'agit des mutations 795(C→G), 897(G→A), 1011(C→A) et 1027 (A→G).

Enfin, les souches de l'étude et les virus hypervirulents partagent de façon distinctive des substitutions silencieuses³ et ce en position 827, 830, 866, 905, 908, 977, 989, 1094, 1115, 1145, 1283 et 1370.

L'analyse des séquences a également consisté à confronter l'identité génétique des isolats de l'étude avec celle des souches de référence. La similitude entre séquences nucléotidiques des souches de l'étude avec les virus des différents pathotypes a donc été chiffrée en pourcentage grâce au logiciel Mega 6. Les résultats sont détaillés dans le tableau n°12.

La matrice complète du pourcentage de similitude entre souches virales deux à deux peut être consultée en "Annexe F"

² Substitution non synonyme = mutation génétique engendrant un changement de l'acide aminé encodé.

³ Substitution silencieuse = mutation génétique n'entraînant pas un changement de l'acide aminé encodé.

Tableau n°12 : Similitude entre séquences nucléotidiques des 5 souches de l'étude avec les souches des différents pathotypes (comparaison des identités génétiques)

Pathotype	Souche	03 ALG	09 ALG	20 ALG	38 ALG	50 ALG
V. Classiques	52/70	95.72	95.13	95.43	95.28	95.28
	Edgar	94.84	94.25	94.25	94.40	94.40
	Irwin M	95.87	95.28	95.28	95.43	95.43
	STC	95.58	94.99	94.99	95.13	95.13
V. Atténués	PBG-98	94.40	93.66	93.66	93.95	93.81
	Cu-1 M	94.40	93.66	93.66	94.25	93.81
	P2	94.69	93.95	93.95	94.25	94.10
Virus Hypervirulents	HK46	98.08	97.64	97.05	97.94	97.20
	849VB	96.17	95.43	95.43	95.72	95.28
	P07	98.23	97.49	97.20	97.79	97.35
	KK1	97.79	97.35	96.76	97.64	96.90
	SC9	98.08	97.64	97.05	97.64	97.20
	D6948	98.53	98.08	97.49	98.08	97.64
	OKYM	97.94	97.49	96.90	97.79	97.05
	TASIK 94	97.64	96.90	96.61	97.49	96.76
	UK661	98.08	97.64	97.05	97.94	97.20
Virus Variants	E/DEL	94.25	93.66	93.95	93.81	93.81
	GLS	94.10	93.36	93.36	93.66	93.51
Sérotype 2	OH	77.73	77.58	77.73	77.29	78.02
Isolats de l'étude	03 ALG					
	09 ALG	99.26				
	20 ALG	98.97	98.97			
	38 ALG	99.56	98.82	98.53		
	50 ALG	99.12	99.12	99.26	98.67	

Le plus faible pourcentage de similitude de nucléotides est enregistré avec la souche de sérotype 2, désignée OH (pas plus de 78% d'identité)

Le pourcentage de similitude avec les virus de sérotype 1 (classiques, atténués, hypervirulents et variants) est quant à lui variable selon le niveau de pathogénicité de ces derniers : il est relativement faible s'agissant des virus atténués et variants (93.36% à 94.69%) et nettement plus élevé avec les virus hypervirulents (95.28% à 98.53%). Notons qu'entre elles, les 5 souches de l'étude ont montré entre 98.53% et 99.56% d'identité génétique.

4- Déduction et analyse des séquences d'acides aminés

Pour les 5 souches de l'étude, les séquences d'acides aminés ont été déduites des séquences nucléotidiques (selon la correspondance codon ADN – acides aminés), puis alignées dans le logiciel Mega 6 avec les séquences amino-acidiques des souches de référence (Fig. n°27)

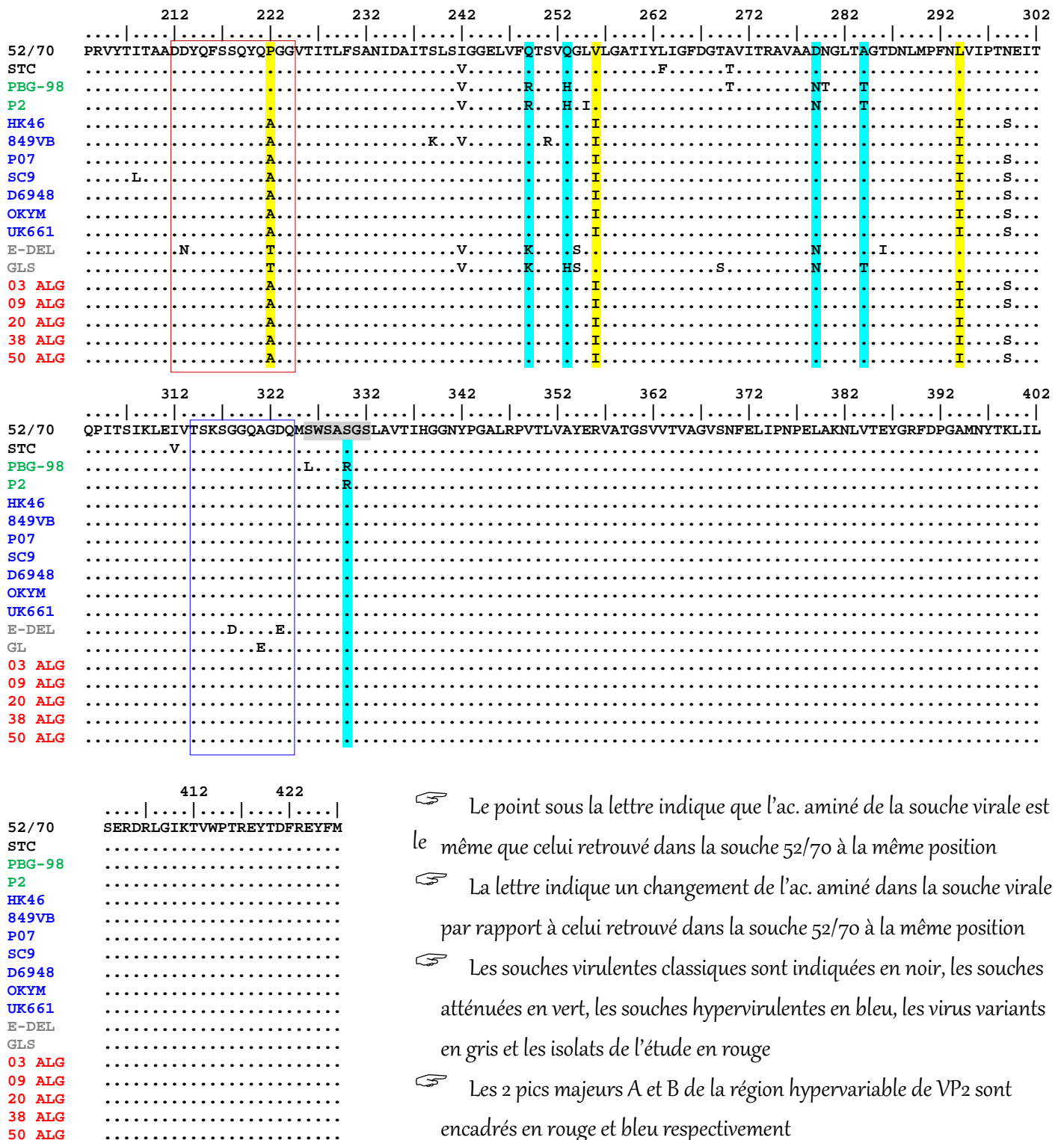


Figure n°27: Alignement multiple des séquences d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques.

Les positions 222, 256 et 294 (surlignées en jaune) permettent de différencier les souches hypervirulentes des autres pathotypes. Les positions 249, 253, 279, 284 et 330 (surlignées en vert) ainsi que l'heptapeptide surligné en gris distinguent les souches virulentes des souches atténuées.

La figure n°27 permet de noter la présence, chez les 5 souches de l'étude, des résidus 222(A), 256(I) et 294(I), considérés comme caractéristiques du pathotype hypervirulent. Le résidu 299(S), présent chez la plupart des virus hypervirulents, l'est également chez les souches de l'étude, exception faite pour la souche 20 ALG (c'est le cas aussi de la souche hypervirulente Belge 849VB)

On note par ailleurs l'absence, chez les 5 isolats de l'étude, du résidu 249(R) présent exclusivement chez les virus atténués. Au contraire, l'heptapeptide "SWSASGS", adjacent au 2^{ème} pic hydrophile de la région hypervariable de VP2 et caractéristique des virus virulents est bien présent chez les 5 souches de l'étude.

Enfin, les 5 isolats partagent avec les virus virulents (classiques et hypervirulents) les résidus Q, D, A et S en position 253, 279, 284 et 330 respectivement, ce qui les démarque des souches atténuées.

Les principales substitutions de résidus sont résumées dans le tableau n°13.

Tableau n°13: Les substitutions de résidus que partagent les souches de l'étude avec les virus virulents (classiques et hypervirulents)

Pathotype	Positions des Acides aminés (selon la numérotation de <i>Bayliss et al., 1990</i>)								
	222	249	253	256	279	284	294	299	330
Souches Virulentes Classiques (52/70, STC)	P	Q	Q	V	D	A	L	N	S
Souches Atténuées (PBG-98, P2)	P	R	H	V	N	T	L	N	R
Virus Variants (E/DEL, GLS)	T	K	H ¹	V	N	T ²	L	N	S
Souches Hypervirulentes (HK46, 849VB, P07, SC9, D6948, OKYM, UK661)	A	Q	Q	I	D	A	I	S ³	S
Isolats de l'étude (03 ALG, 09 ALG, 20 ALG, 38 ALG, 50 ALG)	A	Q	Q	I	D	A	I	S ⁴	S

¹ "Q" au lieu de "H" pour la souche E/DEL

² "A" au lieu de "T" pour la souche E/DEL

³ "N" au lieu de "S" pour la souche 849VB

⁴ "N" au lieu de "S" pour la souche 20 ALG

Par ailleurs, l'identité phénotypique des 5 isolats de l'étude, révélée grâce à la déduction des séquences d'acides aminés, a été comparée à celle des virus de référence. Les résultats confirment ceux obtenus pour l'identité génétique. Ainsi, la similitude entre séquences amino-acidiques a été la plus faible avec la souche de sérotype 2 (seulement 79.1%) et la plus élevée avec les virus hypervirulents (jusqu'à 100% d'identité et un minimum de 98.2%)

Entre elles, les souches de l'étude ont montré entre 99.6 et 100% d'identité phénotypique (Tab. n°14)

La matrice complète du pourcentage de similitude entre souches virales deux à deux peut être consultée en "Annexe F"

Tableau n°14 : Similitude entre séquences d'acides aminés des 5 souches de l'étude avec les souches des différents pathotypes (comparaison des identités phénotypiques)

Pathotype	Souche	Similitude entre séquences d'acides aminés (%)				
		03 ALG	09 ALG	20 ALG	38 ALG	50 ALG
V. Classiques	52/70	98,2	98,2	98,7	98,2	98,2
	Edgar	97,3	97,3	97,8	97,3	97,3
	Irwin M	98,2	98,2	98,7	98,2	98,2
	STC	96,4	96,4	96,9	96,4	96,4
V. Atténués	PBG-98	94,2	94,2	94,7	94,2	94,2
	Cu-1 M	94,7	94,7	95,1	94,7	94,7
	P2	95,1	95,1	95,6	95,1	95,1
Virus Hypervirulents	HK46	100	100	99,6	100	100
	849VB	98,2	98,2	98,7	98,2	98,2
	P07	100	100	99,6	100	100
	KK1	99,1	99,1	98,7	99,1	99,1
	SC9	99,6	99,6	99,1	99,6	99,6
	D6948	100	100	99,6	100	100
	OKYM	100	100	99,6	100	100
	TASIK 94	99,1	99,1	98,7	99,1	99,1
UK661	100	100	99,6	100	100	
Virus Variants	E/DEL	94,7	94,7	95,1	94,7	94,7
	GLS	94,7	94,7	95,1	94,7	94,7
Sérotype 2	OH	79,1	79,1	78,7	79,1	79,1
Isolats de l'étude	03 ALG					
	09 ALG	100,00				
	20 ALG	100,00	99,60			
	38 ALG	100,00	100,00	99,60		
	50 ALG	100,00	100,00	99,60	100,00	

4- Construction et analyse des cartes de restriction

Les séquences nucléotidiques des 5 souches, alignées avec celles des virus de référence, ont été soumises au logiciel Geneious pour l'établissement de cartes de restriction spécifiques des enzymes BstNI, MboI, SspI et BspMI.

Les figures n°28-31 permettent, pour chaque enzyme, de comparer le nombre et les positions des sites de restriction au sein des séquences des 5 souches virales par rapport aux séquences des souches de référence.

Pour l'enzyme BstNI, toutes les souches sans exception possèdent les 3 sites de restriction en position 1159, 1278 et 1306. Le site de clivage en position 1089, semble être l'exclusivité des 5 souches de l'étude. Seule la souche classique STC possède le même site à la même position. Enfin, les 2 sites en position 796 et 950 sont présents seulement chez les virus classiques.

Pour l'enzyme MboI, le site en position 1015 semble être l'apanage des 5 souches de l'étude. En plus, la souche n°09 (09 ALG) est la seule à posséder le site en position 838. Inversement, les souches de l'étude sont les seules à ne pas être dotées du site de clivage en position 1249 (c'est aussi le cas de la souche classique 52/70). Le site en position 1097 est absent seulement chez les virus variants. Enfin les sites de restriction en position 1138 et 1209 sont présents chez tous les pathotypes à l'exception de quelques souches virales.

Pour l'enzyme SspI, un seul site de restriction est exclusivement présent chez les souches de l'étude et les souches hypervirulentes mais en 2 positions différentes : 830 pour les premières et 1010 pour les secondes.

Enfin, pour l'enzyme BspMI, les souches de l'étude partagent de façon exclusive avec les virus hypervirulents le site de clivage en position 786.

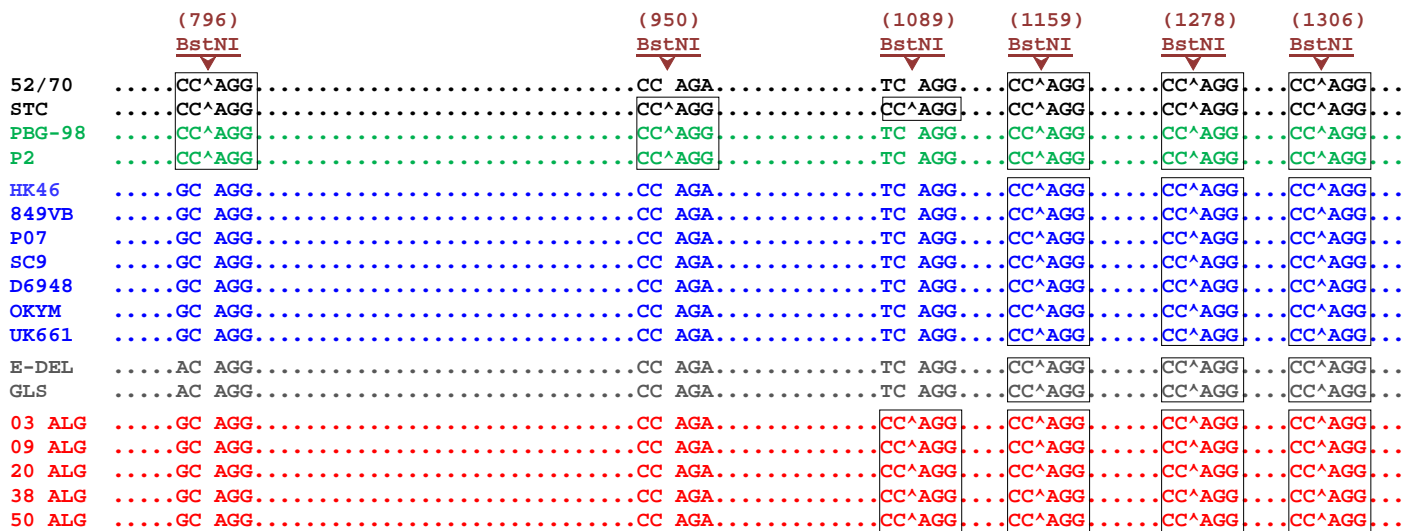


Figure n°28: Carte de restriction "BstNI" du fragment amplifié des souches classiques (en noir), vaccinales (en vert), hypervirulentes (en bleu) et des virus variants (en gris). Les souches de l'étude sont désignées en rouge. Le chapeau et le chiffre entre parenthèse indiquent la position de clivage de l'enzyme. Le site de restriction de l'enzyme est encadré en noir.

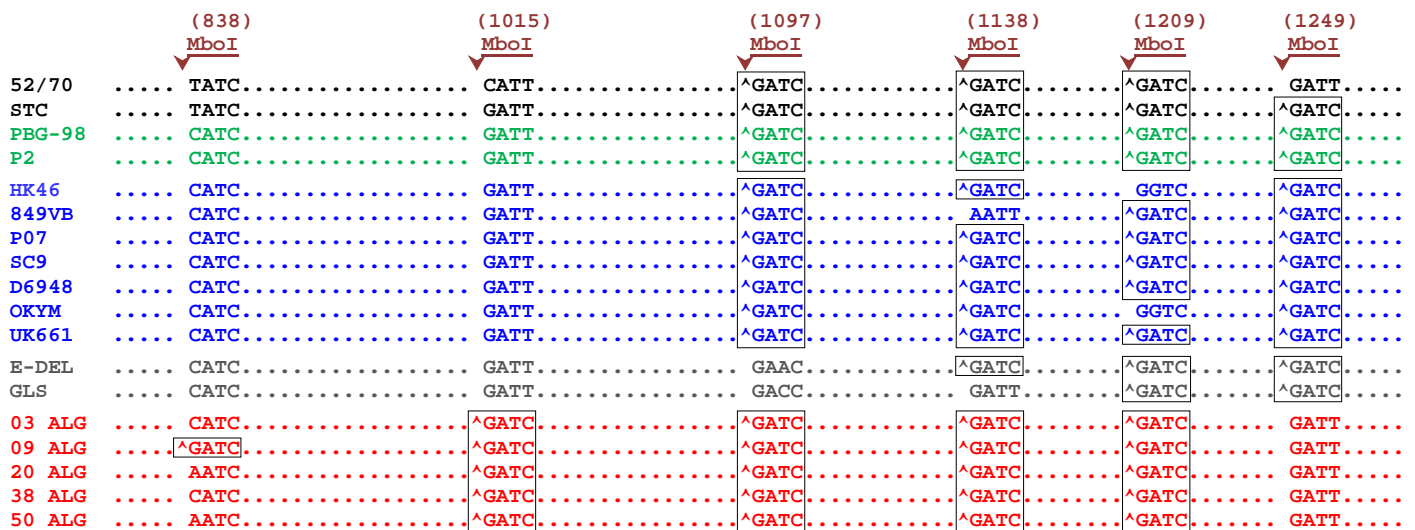


Figure n°29: Carte de restriction "MboI" du fragment amplifié des souches classiques (en noir), vaccinales (en vert), hypervirulentes (en bleu) et des virus variants (en gris). Les souches de l'étude sont désignées en rouge. Le chapeau et le chiffre entre parenthèse indiquent la position de clivage de l'enzyme. Le site de restriction de l'enzyme est encadré en noir.

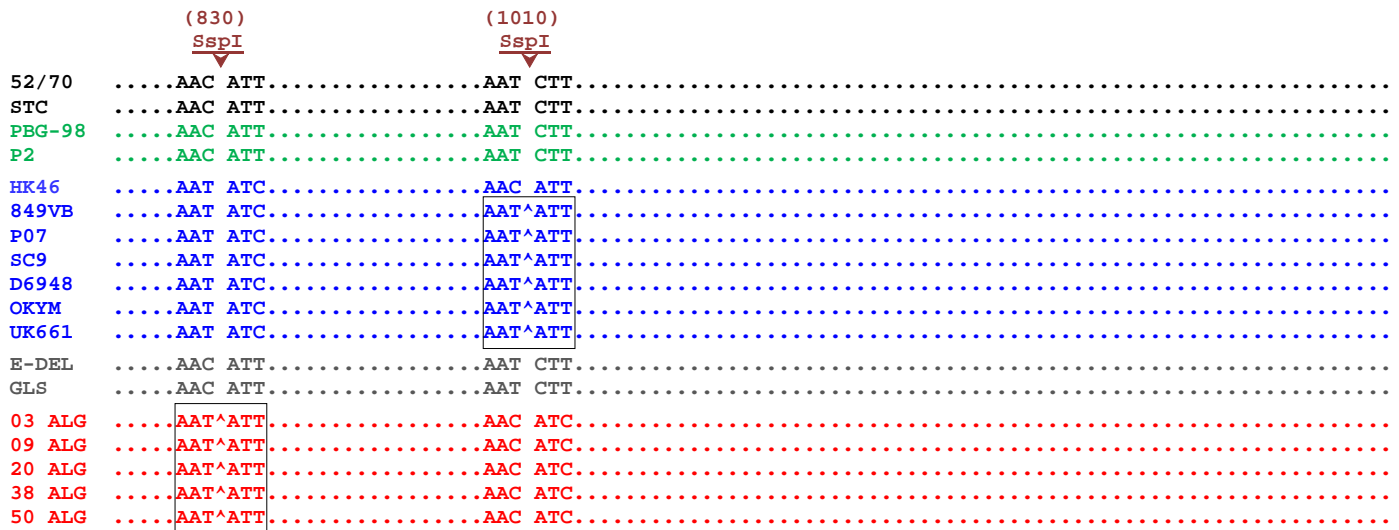


Figure n°30: Carte de restriction "SspI" du fragment amplifié des souches classiques (en noir), vaccinales (en vert), hypervirulentes (en bleu) et des virus variants (en gris). Les souches de l'étude sont désignées en rouge. Le chapeau et le chiffre entre parenthèse indiquent la position de clivage de l'enzyme. Le site de restriction de l'enzyme est encadré en noir.

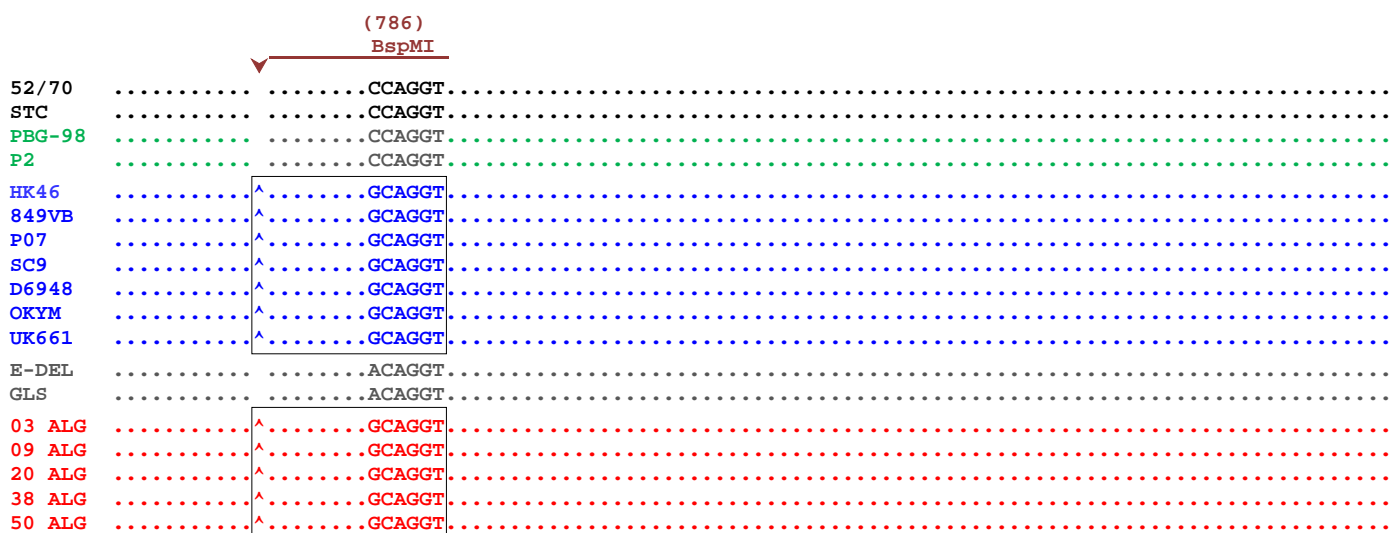


Figure n°31: Carte de restriction "BspMI" du fragment amplifié des souches classiques (en noir), vaccinales (en vert), hypervirulentes (en bleu) et des virus variants (en gris). Les souches de l'étude sont désignées en rouge. Le chapeau et le chiffre entre parenthèse indiquent la position de clivage de l'enzyme. Le site de restriction de l'enzyme est encadré en noir.

En sus des cartes de restriction, les séquences nucléotidiques des souches de l'étude ont été soumises au logiciel Geneious dans le but de générer des profils électrophorétiques après restriction virtuelle par les 2 enzymes BstNI et MboI. Le polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism) pour chacune des 2 enzymes est exposé ci-après :

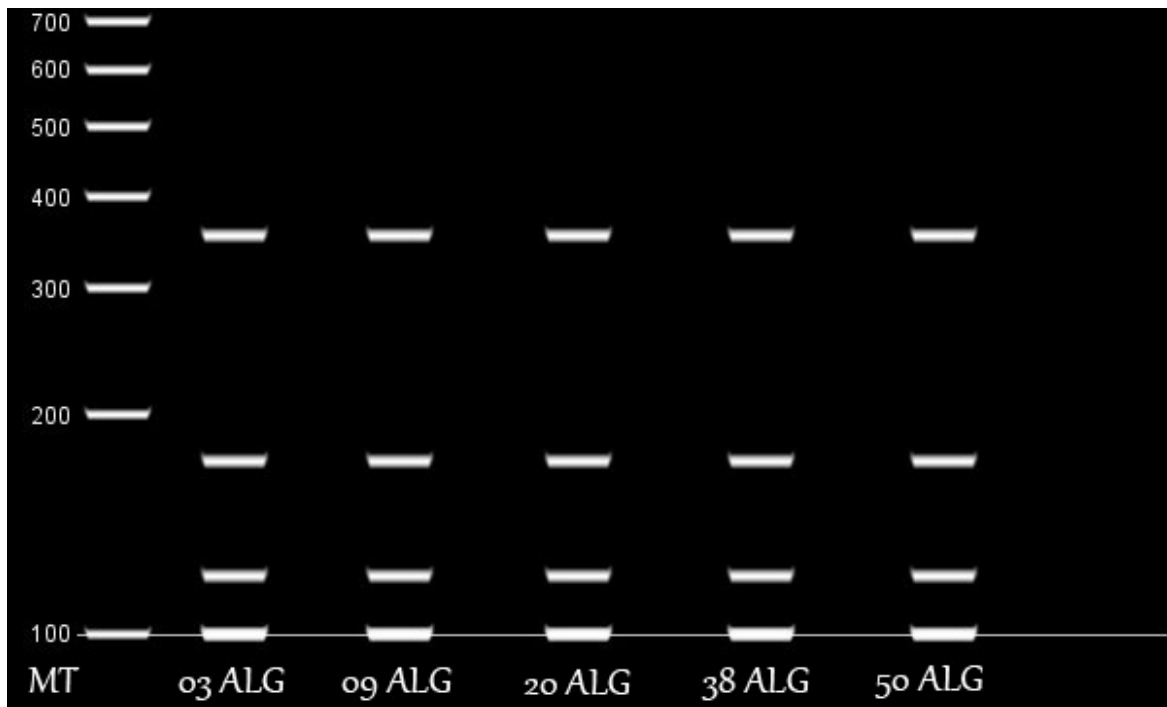


Figure n°32 : Nombre et tailles des fragments de restriction par l'enzyme BstNI sur les 5 souches de l'étude. Le profil électrophorétique est identique pour les 5 souches. (Les bandes de moins de 100 pb ne sont pas visible sur le gel virtuel)

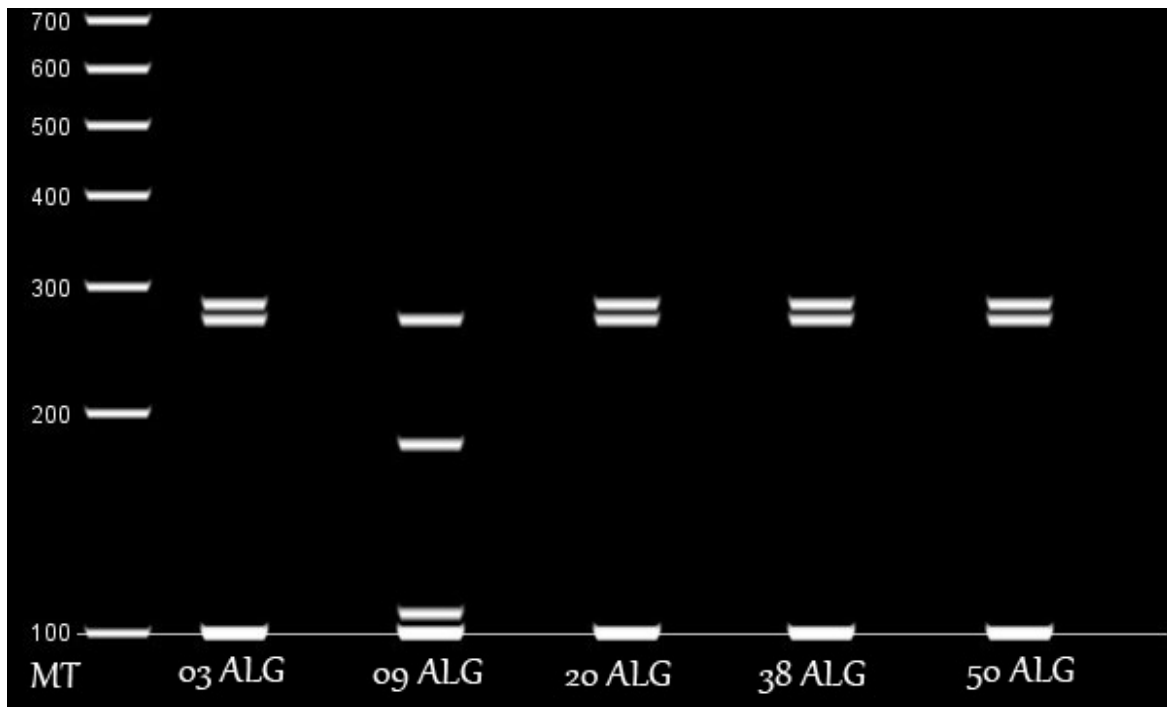


Figure n°33 : Nombre et tailles des fragments de restriction par l'enzyme MboI sur les 5 souches de l'étude. Le profil électrophorétique de la souche 09 ALG est différent, comparé à celui des 4 autres souches. (Les bandes de moins de 100 pb ne sont pas visible sur le gel virtuel)

Le RFLP de chacune des 5 souches de l'étude a été confronté à celui des 6 groupes moléculaires connus du virus de la maladie de Gumboro. Les résultats sont exposés dans le tableau suivant :

Tableau n°15 : Comparaison des RFLP des 5 souches de l'étude avec celui des 6 groupes moléculaires de *Jackwood et Sommer (1999)*

(Les fragments de moins de 100 pb n'ont pas été représentés sur le tableau)

	Taille des fragments de restriction par BstNI (pb)							Taille des fragments de restriction par MboI (pb)								Groupes moléculaires	
	424	350	209	172	154	139	119	480	403	362	283	270	234	229	181		106
03 ALG		x ^(a)		x ^(b)			x ^(c)				x	x					RFLP unique
09 ALG		x ^(a)		x ^(b)			x ^(c)					x			x	x	RFLP unique
20 ALG		x ^(a)		x ^(b)			x ^(c)				x	x					RFLP unique
38 ALG		x ^(a)		x ^(b)			x ^(c)				x	x					RFLP unique
50 ALG		x ^(a)		x ^(b)			x ^(c)				x	x					RFLP unique
Les 6 Groupes moléculaires définis par <i>Jackwood et Sommer (1999)</i>	x			x			x						x	x			Gpe. Mol 1
	x			x			x		x					x			Gpe. Mol 2
				x	x	x	x			x				x			Gpe. Mol 3
			x	x	x		x			x				x			Gpe. Mol 4
	x			x			x	x						x			Gpe. Mol 5
	x			x			x			x				x			Gpe. Mol 6

^(a) 354 pb au lieu de 350 pb^(b) 173 pb au lieu de 172 pb^(c) 120 pb au lieu de 119 pb

La restriction par l'enzyme BstNI a généré un RFLP unique pour les 5 souches, alors que l'enzyme MboI a généré 2 RFLP différents, dont un a concerné la souche 09 ALG seule.

Comparés aux 6 groupes moléculaires de *Jackwood et sommer (1999)*, les 5 souches de l'étude semblent exhiber un RFLP distinct.

6- Analyse phylogénétique

Le but de l'analyse était de préciser les liens de parenté que pourraient avoir les 5 souches de l'étude avec les virus de référence appartenant aux différents pathotypes de diverses origines géographiques (voir tab. n°7).

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 ou d'acides aminés.

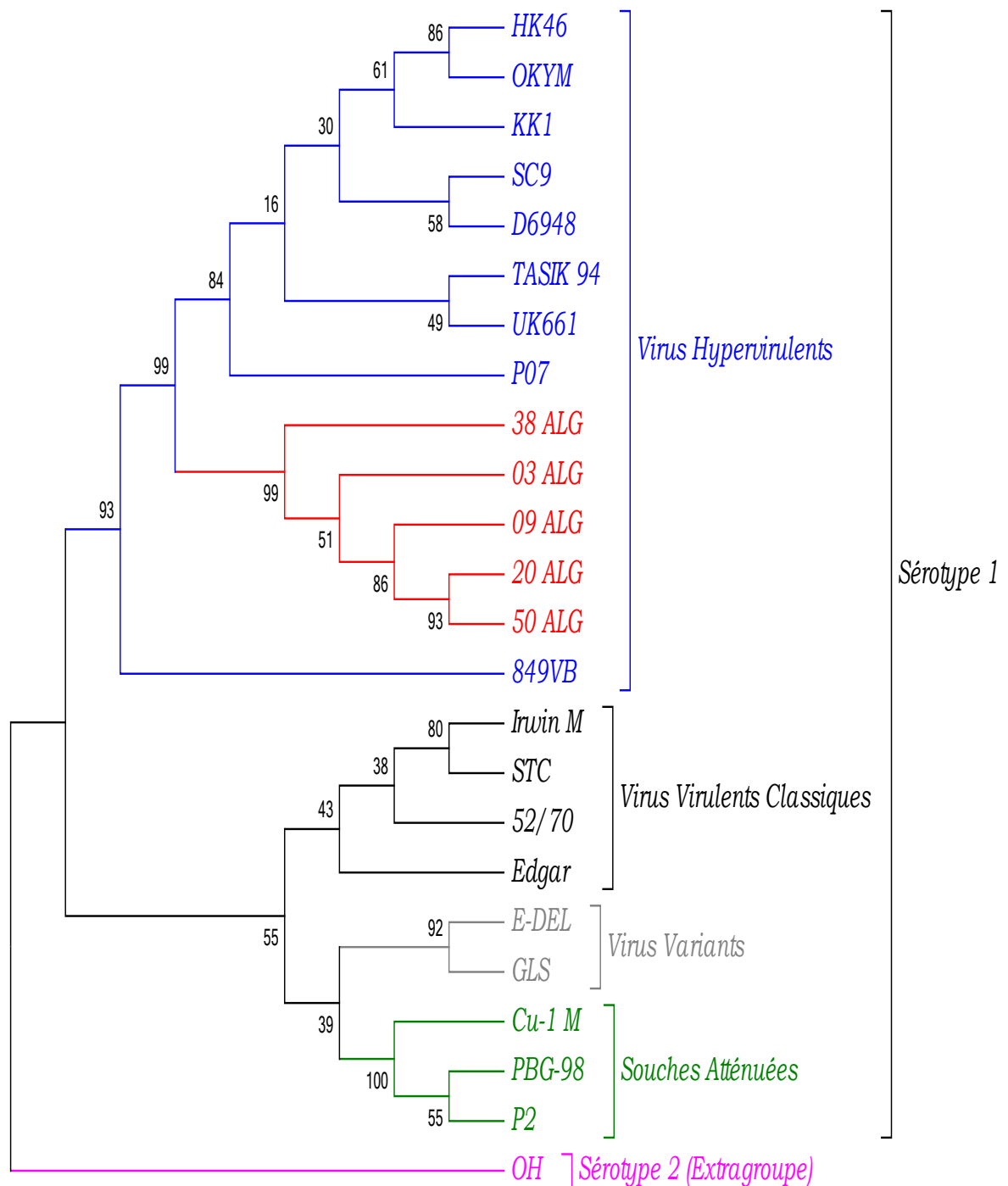


Figure n°34 : Arbre phylogénétique consensus, construit à partir de l'alignement de séquences nucléotidiques (analyse génétique). Les chiffres à l'endroit des nœuds de l'arbre représentent la valeur du bootstrap. La souche OH de sérotipe 2 a été utilisée comme extra-groupe pour enraciner l'arbre.

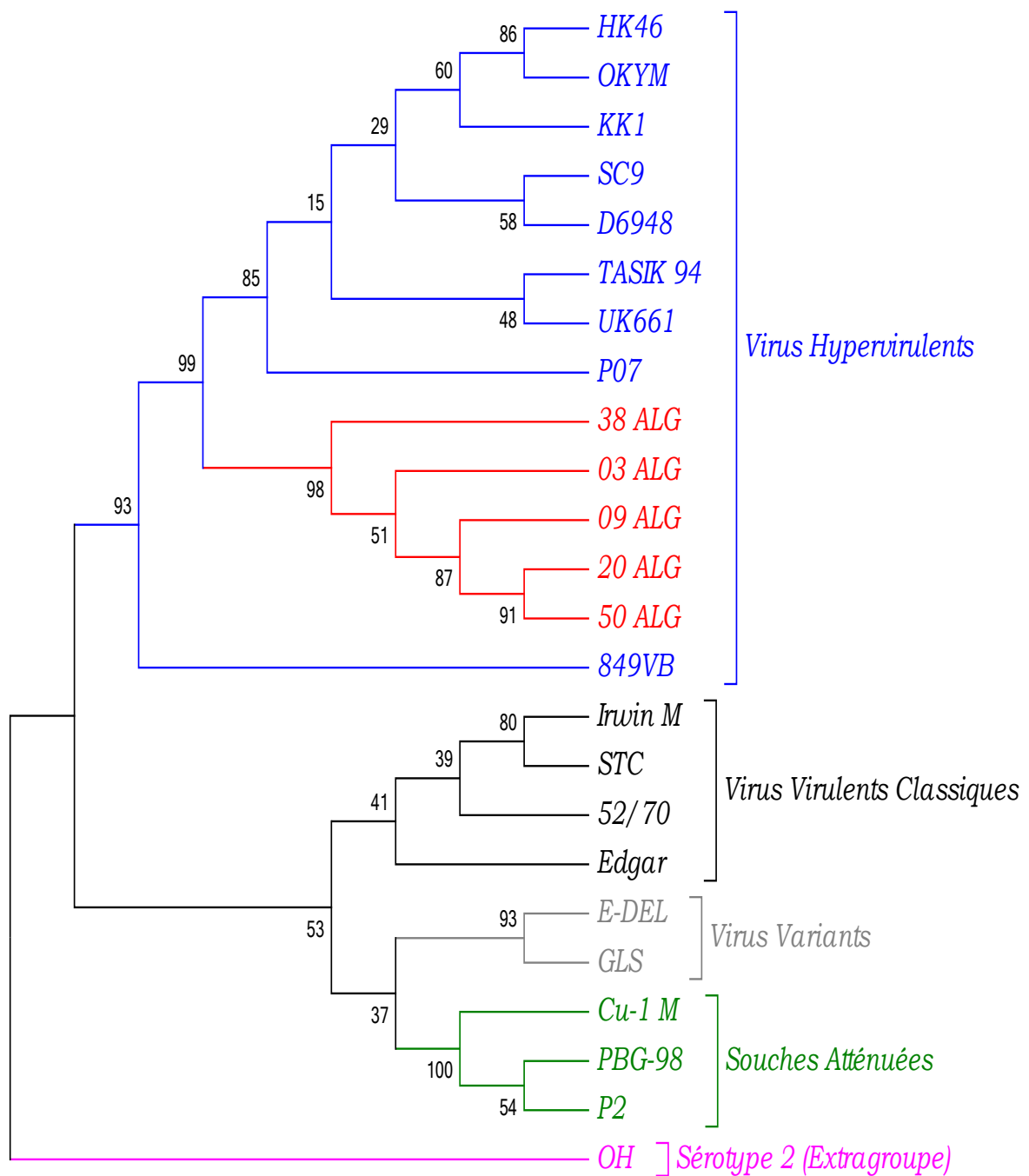


Figure n°35: Arbre phylogénétique consensus, construit à partir de l'alignement de séquences d'acides aminés (analyse phénotypique). Les chiffres à l'endroit des nœuds de l'arbre représentent la valeur du bootstrap. La souche OH de sérotipe 2 a été utilisée comme extra-groupe pour enraciner l'arbre.

III- DISCUSSION/

Dans le cadre d'une enquête épidémiologique, des isolats sauvages de la maladie de Gumboro ont été caractérisés moyennant des techniques moléculaires. Tous les prélèvements ont été réalisés sur des volailles suspectes d'atteintes cliniques, donc présentant à l'autopsie, des bourses de Fabricius (BF) hypertrophiées et/ou hémorragiques. La maladie subclinique, associée à une atrophie des BF n'a pas été un motif de prélèvement pour aucun des foyers concernés par l'étude. Rappelons enfin, que la zone géographique de l'enquête (W. de Sétif et Oum El-Bouaghi) n'a pas été un choix délibéré mais dicté par la zone d'activité des vétérinaires praticiens qui ont daigné coopérer.

La quantité d'ARN extrait à partir des BF a été relativement élevée (>1000 µg/ml) pour 19 échantillons sur 50 testés. La faible concentration de l'ARN chez le reste des échantillons s'explique probablement par une charge virale faible au niveau des BF. Si la dose virale infectante et la pathogénicité du virus influencent directement la charge virale et donc la quantité de l'ARN extrait, celle-ci peut également varier selon le moment du prélèvement par rapport aux stades d'évolution de la maladie.

Concernant la pureté des extraits d'ARN, jugée à travers les ratios de densité optique, elle était très bonne pour ce qui est de la contamination par les protéines, mais assez mauvaise s'agissant de la contamination par les sels chaotropiques (utilisés pour l'extraction). Ces résultats, sont similaires à ceux d'autres travaux (*Pagneux, 2011*)

Sur les 13 échantillons ayant subi la rt-PCR, 6 (46%) se sont révélés positifs. Un taux de positivité bien supérieur à celui obtenu par *Jackwood et Nielson (1997)* et *Abdel-Alim et al. (2003)*, mais reste faible comparé à celui rapporté par *Ikuta et al. (2001)*, *Banda et al. (2003)*, *Sareyytipoglu et Akan (2006)* et *Mital et al. (2006)*

Parmi les résultats positifs, seuls 2 échantillons (n°9 et n°20) présentaient un ARN total à la fois pur et très concentré. Les 4 autres échantillons (le n°3, 21, 38 et 50) avaient un extrait d'ARN plus ou moins contaminé par les sels chaotropiques, ce qui a été sans effet sur la rétrotranscription de l'ARN viral. Ceci confirme les résultats des travaux d'*Imbeaud et al. (2005)* qui ont démontré que la présence de résidus de sels et solvant d'extraction dans les échantillons, n'a pas d'effet inhibiteur sur la synthèse de l'ADNc (ADN complémentaire).

Parmi les 7 résultats qui se sont révélés négatifs, 3 échantillons (le n°5, 14 et 15) étaient pourtant suffisamment concentrés en ARN, qui plus est, était dépourvu de contaminants (DO_{260}/DO_{280} et $DO_{260}/DO_{230} > 1.80$). Ces 3 échantillons étaient très probablement de faux négatifs. Ce type de résultat serait lié à un défaut d'intégrité de l'ARN extrait. En effet, un ARN pur mais dégradé est non exploitable. Rappelons que dans la présente étude, seules la concentration et la pureté des extraits d'ARN ont été évaluées, l'intégrité de l'ARN n'a pas été explorée. L'évaluation de l'intégrité de l'ARN passe par la détermination du RIN (RNA Integrity Number) via électrophorèse sur puce miniature (*Schroeder et al., 2006*), une technique à laquelle on a pas eu accès. L'échantillon n°38, testé par erreur, s'est révélé positif malgré sa faible concentration en ARN (918 µg/ml) et son fort taux de contamination ($DO_{260}/DO_{230} = 0.71$). L'ARN extrait dans l'échantillon n°38, quoique faiblement concentré, présentait très probablement une bonne intégrité.

Grâce à un alignement multiple, les séquences nucléotidiques et amino-acidiques de la région hypervariable de VP2 des 5 souches de l'étude, ont pu être comparées avec celles des autres pathotypes. Les isolats de l'étude ont montré un minimum d'identité génétique avec la souche apathogène de sérotype 2 (pas plus de 78% d'identité), ce qui confirme leur appartenance aux sérotype 1. Le maximum d'identité a été obtenu avec les souches hypervirulentes (jusqu'à 98.53% d'identité entre la souche n°03 et la souche Hollandaise D6948).

Quant à l'identité phénotypique, les souches de l'étude ont montré jusqu'à 100% d'identité amino-acidique avec les virus hypervirulents. Comparées aux autres virus de sérotype 1, les isolats de l'étude, ont montré un minimum d'identité avec les souches atténuées (vaccins) et les variants Américains (au tour de 94%).

Entre elles, les 5 souches de l'étude ont partagé jusqu'à 99.56% de nucléotides et 100% d'acides aminés. Cette faible diversité parmi les 5 souches étudiées s'explique essentiellement par la courte période (9 mois environ) et la zone géographique restreinte des prélèvements.

A l'échelle du génome viral, les 5 souches de l'étude et les virus hypervirulents de référence se distinguent des virus classiques par une douzaine de mutations synonymes (silencieuses) situées entre le nucléotide 827 et 1370 du gène codant la région hypervariable de VP2.

Par ailleurs, Les souches hypervirulentes partagent avec les souches de l'étude plusieurs substitutions de nucléotides, dont 6 non synonymes. Parmi ces 6 substitutions, 4 sont partagées de façon exclusive et ont engendré des changements critiques d'acides aminés dans la protéine VP2. Il s'agit des substitutions 222 (P→A), 256 (V→I), 294 (L→I) et 299 (N→S), lesquelles sont considérées comme spécifiques des virus hypervirulents (*Brown et Skinner, 1996; Cao et al., 1998; Chen et al., 1998*). La souche Ivoirienne 88180 fait cependant exception (*Etteradossi et al., 1999*). Les résidus 256(I) et 294(I) seraient critiques pour la fixation de l'anticorps monoclonal (ACM) CRAb 88, lequel réagit exclusivement avec les souches hypervirulentes (*Sapats et al., 2006*). En position 299, la souche n°20 (20 ALG) a été la seule parmi les 5 isolats de l'étude à avoir exhibé un résidu différent par rapport au pathotype hypervirulent (299(N) au lieu de 299(S)). Cette exception est aussi retrouvée chez la souche hypervirulente Belge 849VB. Des études antérieures avaient signalé des virus hypervirulents exhibant le résidu 299(N) (*Etteradossi et al., 1999*) alors que d'autres ont mis en évidence des virus classiques dotés du résidu 299(S) (*Rudd et al., 2002*)

Les 2 autres substitutions non synonymes de nucléotides que partagent les 5 souches de l'étude avec les virus hypervirulents, sont aussi présentes chez les virus virulents classiques. Seuls les virus atténués et variants en sont dépourvus (le variant E/Del fait exception). Il s'agit des

substitutions de nucléotides en position 966 et 981 ayant entraîné respectivement les substitutions d'acides aminés 279 (N→D) et 284 (T→A). L'acide aminé 330(S) que partagent tous les virus à l'exception des souches atténuées, est présent aussi chez les 5 souches de l'étude malgré la substitution, chez ces dernières, du nucléotide 1121 (T→C). La dite substitution étant silencieuse (les codons AGC et AGT codent tous les deux pour le même acide aminé: Sérine). Par ailleurs, la substitution de l'acide aminé 253 (Q→H), observée seulement chez les souches atténuées (mais aussi le variant GLS) est absente chez les 5 souches de l'étude. Enfin l'héptapeptide riche en sérine "SWSASGS", caractéristique du phénotype virulent (Heine et al., 1991; Brown et al., 1996; Mundt, 1999) est présent chez les 5 isolats de l'étude.

Tous les acides aminés caractéristiques des souches atténuées, en l'occurrence, 253(H) (van loon et al., 2002), 279(N), 284(T) et 330(R) (Lim et al., 1999; van loon et al., 2002) sont absents chez les 5 souches de l'étude. Ces dernières ne sont donc pas des souches vaccinales, ce qui aurait pu être le cas, vu que les prélèvements ont été réalisés sur des poulets vaccinés.

Jackwood et al., ont signalé, pour la première fois en 2006 l'existence dans le sud de l'Europe, de variants antigéniques jusque-là cantonnés dans le continent Américain. Leur distribution au Nord de l'Afrique est donc tout à fait prévisible. L'absence, chez les 5 souches étudiées, des acides aminés 222(T) et 254(S), caractéristiques des virus variants (Heine et al., 1991) exclue toute dérive antigénique (antigenic drift) parmi les 5 souches de la présente étude. De plus, comme mentionné plus haut, aucune des souches virales étudiées n'était incriminée dans la maladie subclinique, laquelle est généralement associée à une contamination par des virus variants entraînant une atrophie sévère de la BF et des contreperformances des volailles.

La caractérisation des souches virales a consisté également en la recherche des sites de restriction des enzymes BstNI, MboI, SspI et BspMI.

Les sites de clivage BspMI en position 786 et SspI en position 1010 dans la séquence du gène codant la région hypervariable de VP2 ont été rapportés comme caractéristiques des souches hypervirulentes (Zierenberg et al., 2001). Le site SspI correspond à la mutation

294 (L→I), alors que le site de restriction BspMI, correspond à la substitution 222 (P→A) considérée comme responsable de la perte de neutralisation des virus hypervirulents par les ACM 3 et 4, ce qui les distingue des virus classiques (Etteradossi et al., 1998). Les 2 sites de restriction sont bien présents chez les 5 souches de l'étude, ce qui confirme leur caractère hypervirulent. La position du site SspI chez les souches étudiées est toutefois différente de celle retrouvée chez les virus hautement pathogènes (830 au lieu de 1010). La présence du site de restriction SspI en des positions différentes de celle signalée chez les virus hypervirulents a déjà été rapportée. C'est le cas de la souche Australienne N1/99 (Sapats et Ignjatovic, 2002). L'absence du site SspI en position 1010 chez les 5 souches de l'étude est liée aux 2 substitutions silencieuses des nucléotides 1010 (T→C) et 1013 (T→C) (voir fig. n°26). Ces 2 mutations ont transformé la séquence "AATATT" (qui n'est autre que le site de restriction SspI) en "AACATC", sans pour autant apporter un changement d'acides aminés au sein de la protéine virale en position 293 et 294 (voir fig. n°27). Les 2 séquences "AATATT" et "AACATC" étant synonymes : codent toute les deux pour l'asparagine (N) et l'isoleucine (I) (voir liste des lettres et symboles)

Il est intéressant de remarquer que parmi les souches hypervirulentes de référence, seule la souche HK46 (Hong Kong) ne possède pas le site de restriction SspI en position 1010 et ce pour la même raison évoquée pour les 5 souches de la présente étude (substitution silencieuse du nucléotide 1010 (T→C)).

Pour sa part, la souche Espagnole VG-276, ayant pourtant le site SspI en position 1010, avait une identité génétique très proche de celle des virus classiques (Majo et al., 2002). Le même constat a été fait par Banda et al. (2001) sur la souche 9109, ce qui les a amenés à suggérer que la présence du site SspI seul ne doit pas être considérée comme un marqueur moléculaire pour l'identification des virus hypervirulents. Inversement, l'absence du site SspI ne doit pas non plus être un motif pour ne pas admettre le caractère hypervirulent des virus. En effet, la souche Espagnole VG-313, s'est révélée génétiquement très proche des virus hypervirulents sans pour autant posséder le site

SspI (Majo *et al.*, 2002). Enfin, la souche Argentine 1241A33, a exhibé simultanément le site SacI caractéristique des virus classiques et le site SspI typique des virus hypervirulents (Remorin *et al.*, 2006). Il est donc recommandé d'interpréter prudemment les cartes de restriction dans toute étude de caractérisation des virus. La présence ou l'absence des sites de clivages des enzymes dans les séquences nucléotidiques peuvent en effet être la conséquence de simples mutations génétiques silencieuses, n'ayant aucune répercussion sur le phénotype viral.

Une restriction virtuelle par les enzymes BstNI et MboI a permis, en fonction du polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP), de faire appartenir les souches de l'étude aux 6 groupes moléculaires établis par Jackwood *et Sommer* (1999). L'enzyme BstNI n'a généré qu'un seul profil pour les 5 souches, alors que l'enzyme MboI a généré 2 profils différents. Ce résultat corrobore ceux d'autres travaux (Sapats *et Ignjatovic*, 2002 ; Jackwood *et al.*, 2006) et s'explique par le fait que l'enzyme BstNI soit moins efficace dans la discrimination entre les souches virales que l'enzyme MboI, puisqu'elle reconnaît une séquence de 6 bases dans les produits PCR, contre 4 bases seulement pour MboI (Jackwood *et Sommer*, 1998)

Le couple d'enzymes a généré chez les 5 souches de l'étude 2 profils différents, dont un a concerné la souche n°20 (20 ALG) seule. Les 2 RFLP sont uniques et ne cadrent avec aucun des 6 profils connus. Des résultats similaires ont été obtenus par Dergham *et al.*, (2012) sur des souches sauvages isolées en Jordanie, lesquelles ont montré 2 nouveaux profils dont un a concerné des virus hypervirulents. De nouveaux profils sont sans cesse mis en évidence par différents travaux (Ikuta *et al.*, 2001 ; Meir *et al.*, 2001 ; Sapats *et Ignjatovic*, 2002 ; Sareyytipoglu *et Akan*, 2006), ce qui dénote de l'évolution et la diversité génétique parmi les virus sauvages de la maladie de Gumboro.

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques des souches étudiées et des souches de référence a généré un arbre où les virus se sont regroupés indépendamment de leur origine géographique. Il est intéressant de constater qu'à l'intérieur des virus de sérotype 1, les 5 souches de l'étude étaient monophylétiques avec les virus hypervirulents qui plus est, formaient un groupe

robuste avec un bootstrap de 93% (le groupe est retrouvé dans 93% des 1000 répliques d'arbres générés par le bootstrap). Cela signifie que les 5 souches étudiées partagent avec les souches hypervirulentes une origine évolutive commune. A l'intérieur de ce groupe on peut noter 2 ramifications, celle tout d'abord des 5 isolats de l'étude qui semblent former un sous-groupe séparé, génétiquement très apparenté (bootstrap de 99%), ensuite celle la souche Belge 849VB. La position de la souche hypervirulente 849VB dans l'arbre était prévisible vue qu'elle était la souche qui a montré le plus de divergence (faible identité) vis-à-vis des autres virus du pathotype hypervirulent (voir tableau "Annexe F"). Les autres groupes de virus sont ceux des souches atténuées (bootstrap de 100%), des virus variants Américains (bootstrap de 92%) et enfin celui des virus classiques (bootstrap de 43%)

L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'acides aminés, confirme l'appartenance des 5 souches de l'étude au pathotype hypervirulent, avec un bootstrap de 93%.

IV- CONCLUSION/

Les échecs de vaccination vis-à-vis de la maladie de Gumboro sur des cheptels aviaires correctement vaccinés, ont longtemps justifié la suspicion d'une circulation de virus hypervirulents en Algérie. Aucune enquête épidémiologique n'est venue conforter cette suspicion.

Grâce à une analyse de séquences du gène codant la région hypervariable de la protéine VP2, la présente étude a révélé le caractère hypervirulent de 5 isolats sauvages de la maladie de Gumboro. Ces derniers ont en effet :

- Présenté une plus forte identité génétique avec les virus hypervirulents de référence (jusqu'à 98,53%)
- Exhibé toutes les mutations observées chez les souches hypervirulentes.

- Montré un fort lien de parenté avec les virus hautement pathogènes (forment un groupe monophylétique)

- Comporté tous les marqueurs moléculaires de virulence caractéristiques du pathotype hypervirulent. Seule la position du site de restriction SspI distingue les 5 souches étudiées des virus hypervirulents. Cette différence était liée à 2 mutations silencieuses qui n'ont pas eu de conséquence sur le phénotype viral. Ceci attire l'attention sur le rôle critique de l'analyse des séquences du gène viral dans l'interprétation des résultats, parfois incongrus, obtenus par les études des cartes de restriction enzymatiques.

En démontrant le caractère hautement pathogène des virus circulants, la présente étude explique en grande partie la fréquence de plus en plus élevée de l'échec vaccinal malgré le renforcement des programmes de vaccination et le recours à des virus vaccinaux faiblement atténués, dont on a démontré l'effet immunodépresseur grâce au travail entrepris dans le cadre du Magister.

IV- RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVE

Les résultats de la présente étude ne font que confirmer les constatations du terrain qui font état d'un taux de mortalité plus élevé, d'un tableau lésionnel plus sévère et surtout d'une baisse de l'âge de susceptibilité des poussins à la maladie de Gumboro. Ce dernier constat a obligé les éleveurs à vacciner à des âges de plus en plus précoces, augmentant par la même occasion le risque d'un échec de la vaccination par suite de neutralisation du virus vaccinal par les anticorps d'origine maternelle.

Dans ces conditions, un monitoring des anticorps sériques Gumboro chez les parentaux et la descendance est fortement recommandé pour pouvoir vacciner à une date optimale qui minimise la période du creux immunitaire et évite la neutralisation du vaccin.

Parallèlement, le suivi régulier de l'évolution génétique des virus Gumboro circulants est le plus à même de détecter les nouvelles mutations virales. Ceci permettra de réagir en temps réel aux bouleversements épidémiologiques, surtout qu'une dérive génétique (genetic drift) voire antigénique parmi les virus sauvages reste tout à fait possible. Auquel cas, le changement des souches vaccinales et/ou l'élargissement du spectre de la vaccination sera plus que nécessaire pour la bonne protection de nos cheptels aviaires.

Pour un suivi efficace de l'évolution des virus circulants, de nouvelles techniques sont aujourd'hui offertes. Ainsi, une détection plus rapide et moins coûteuse des mutations ponctuelles au niveau du génome des virus sauvages incriminés dans l'échec vaccinal, est désormais possible grâce à l'analyse des courbes de fusion à haute résolution (High resolution melt) des produits PCR en temps réel. De la même façon, des sondes spécifiques ont été récemment proposées pour une identification plus rapide et relativement fiables des variants antigéniques et pathotypiques dans une réaction rt-PCR quantitative.

REFERENCES /

1. Abdel-Alim G. A., Awaad M. H. H. et Saif Y. M. (2003). «Characterization of Egyptian Field Strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 47(4): 1452-1457
2. Abdel-Alim G.A. et Saif Y.M. (2001). «Detection and persistence of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free and commercial broiler chickens.» *Avian Dis* 45:646-54.
3. Abdel-Alim G.A. et Saif Y.M. (2002). «Pathogenicity of embryo-adapted serotype 2 OH strain of infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 46:1001-6.
4. Alam J., Rahman M.M., Sil B.K., Khan M.S.R., Giasuddin et Sarker M.S.K. (2002). «Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro) with live vaccine in broiler». *International Journal of Science* 1:98-101.
5. Aliev A.S., Omarov I.D., Mirnyi V.P. et Aleiv T.S. (1991). «Propagation of the virus of infectious bursal disease of poultry and interferon production.» *Veterinariya* 12: 21-23.
6. Allamigeon M-F et Comte S. (2001). «Identification de virus hypervirulents de la maladie de Gumboro au Maghreb.» *Afrique agriculture* (292):82,83.
7. Al-Natour M. Q., Ward L. A., Saif Y. M., Stewart-Brown B., et KeckL D. (2004). «Effect of Different Levels of Maternally Derived Antibodies on Protection Against Infectious Bursal Disease Virus.» *Avian Diseases* 48(1): 177–182.
8. Azad A.A., Barrett S.A. et Fahey K.J. (1985). «The characterization and molecular cloning of double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus.» *Virology* 143:35-44.
9. Azad A.A., Jagadish M.N., Brown M.A. et Hudson P.J. (1987). «Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of birnavirus.» *Virology* 161:145-152.
10. Banda A., Villegas P., El Attrache J. et Estevez C. (2001). «Molecular Characterization of Seven Field Isolates of Infectious Bursal Disease Virus Obtained from Commercial Broiler Chickens». *Avian Dis.* 45:620-630.
11. Banda A., Villegas P. et El Attrache J. (2003). «Molecular characterization of infectious bursal disease virus from commercial poultry in the United States and Latin America». *Avian Dis* 47:87-95.
12. Barman N.N., Roychoudhury P. et Dutta T.C. (2003). «Double antibody sandwich ELISA for detection of infectious bursal disease virus». *Indian Vet. J.* 80: 1209-1211.
13. Baxendale W. et Lutticken D. (1981). «The results of field trials with an inactivated Gumboro vaccine». *Dev Biol Stand* 51:211-219.

14. Baxendale W.(1976). «The development of an apathogenic infections bursal vaccine : field trial results». Proceedings of the 25th Western Poultry Disease Conference, Davis, California, pp. 42-45.
15. Bayliss C.D., Peters R.W., Cook J.K.A., Reece R.L., Howes K. Binns M.M., Bournnell M.E.G. (1991). «A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of Infectious burdal disease vieus induces protection against mortality caused by the virus.» Arch Virol 120:193-205.
16. Bayliss C.D., Spies U., Shaw K., Peters R.W., Papageorgiou A., Muller H. et Bournnell M.E. (1990). «A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2.» J Gen Virol 71:1303-12.
17. Bayyari G., Story J., Beasley J. et Skeeles J. (1996). «Antigenic characterization of an Arkansas isolate of infectious bursal disease virus». Avian Dis 40:588-99.
18. Becht H. (1980). «Infectious bursal disease virus.» Curr Top Microbiol Immunol 90:107-21.
19. Becht H., Muller H. et Muller H.K. (1988). «Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus.» J Gen Virol 69(3):631-640.
20. Benton W.J., Cover M.S., Rosenberger J.K. et Lake R.S. (1967).» Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). Avian Dis 11:438-445.
21. Birghan C., Mundt E. et Grobalenya A.E. (2000). «A non-canonical Lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyade to exercise broad control over the life cycle of double-stranded RNA virus.» EMBO Journal 4:114-23.
22. Block H., Meyer-Block K., Rebeski D. E., Scharr H., de Wit S. (2007). «A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies». Avian Pathology 36(5):401-409
23. Boot H.J. et Pritz-Verschuren S.B. (2004). «Modifications of the 3'-UTR stem-loop of infectious bursal disease virus are allowed without influencing replication or virulence.» Nucleic Acids Res 32:211-22.
24. Boot H.J., Hoekman A.J. et Gielkens A.L. (2004). «The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment.» Arch Virol 150:137-44.
25. Boot H.J., ter Huurne A.A., Hoekman A.J. Peeters B.P. et Gielkens A.L. (2000a). «Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of very virulent phenotype.» J Virol 74:6701-6711.
26. Boot H.J., ter Huurne A.A., Peeters B.P. et Gielkens A.L. (1999). «Efficient rescue of infectious bursal disease virus from cloned cDNA: Evidence of involvement of the 3'-terminal sequence in genome replication. » Virology 265:330-41.

27. Boot H.J., ter Huurne A.H. et Peeters B.P. (2000b). «Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA of infectious bursal disease virus.» *J Virol Methods* 84:49-58.
28. Bottcher B., Kiselev N.A., Stel'Mashchuk V.Y., Perevozchikova N.A., Borisov A.V. et Crowther R.A. (1997). «Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy.» *J Virol* 71(1):325-330.
29. Box P. (1989). «High maternal antibodies help chickens beat virulent virus.» *World Poult Sci* 53:17-19.
30. Boya P., Roques B. et Kroemer G. (2001). «Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level.» *Embo J* 20:4325-4331.
31. Brambell F.W.R. (1970). «Transmission of immunity in birds. Pages 20–41 in *Transmission of Passive Immunity from Mother to Young*». Vol. 18. A. Neuberger and E. L. Tatum, ed. Elsevier, New York, NY.
32. Brandt M., Yao K., Liu M., Heckert R.A., et Vakharia V.N. (2001). «The molecular determinants of virulence, pathogenesis and cell tropism of infectious bursal disease virus.» *Journal of Virology* 75(24):11974-82.
33. Brinkman F.S., et Leipe D.D. (2001). «Phylogenetic analysis. In: *Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins*». A. D. Baxevanis and B. F.F. Ouellette, eds. Wiley-Liss, Inc., New York. p: 323-358.
34. Brown J., Resurreccion R.S., Dickson T.G. et Horne, A. (1989). «The Relationship of Egg Yolk and Serum Antibody». 1. Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis*, 33, 654-656.
35. Brown M.B., Stoll M.L. et Butcher G.D. (1991). «Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in egg yolk versus serum samples». *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 2901-2903.
36. Brown M.D. et Skinner M.A. (1996). «Coding sequences of both genome segments of European very virulent infectious bursal disease virus.» *Virus Res* 40(1):1-15.
37. Brown M.D., Green P. et Skinner M.A. (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):675-80.
38. Burkhardt E. et Müller H. (1989). «Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV).» *Arch Virol* 94:297-303.
39. Cao Y.C., Yeung W.S., Law M., Bi Y.Z., Leung F.C. et Lim B.L. (1998). «Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains.» *Avian Dis* 42:340-51.

40. Caston J.R., Martinez-Torrecuadrada J.L., Maraver A., Lombardo E., Rodriguez J.F., Casal J.I. et Carrascosa J.L. (2001). «C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly.» *Journal of Virology* 75:10815-10828.
41. Caston J.R., Trus B.L., Booy F., Wickner R.B., Wall J.S. et Steven A.C. (1997). «Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA.» *J Cell Biol* 138:975-85.
42. Chen H.Y., Zhou Q., Zhang M.F. et Giambone J.J. (1998). «Sequence analysis of the VP2 hypervariable region of nine infectious bursal disease virus isolates from mainland China.» *Avian Dis* 42:762-9.
43. Cheng R.H., Caston J.R., Wang G.J., Gu F., Smith T.J., Baker T.S., Bozarth R.F., Trus B.L., Cheng N. et Wickner R.B. (1994). «Fungal viral capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of assymetric gag dimers.» *J Mol Biol* 244:255-8.
44. Chettle N.J., Eddy R.K. et Wyeth P.J. (1985). «The isolation of infectious bursal disease virus from turkeys in England.» *Br Vet J* 141(2):141-145.
45. Chevalier C., Lepault J., Da Costa B. et Delmas B. (2004). «The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus.» *J Virol* 78(7): 3296-303.
46. Chevalier C., Lepault J., Erk I., Da Costa B. et Delmas B. (2002). «The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids.» *Journal of Virology* 76: 2384-2392.
47. Cho Y. et Edgar S.A. (1969). «Characterization of infectious bursal disease agent». *Poultry Science* 48:2102-09.
48. Cloud S.S., Rosenberg J.K. et Lillehoj H.S. (1992). «Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. II. Alteration of in vitro lymphoproliferation and in vivo immune response.» *Vet Immunol Immunopathol* 34:353-366.
49. Coulibaly F., Chevalier C., Gutsche I., Pous J., Navaza J., Bressanelli S., Delmas B. et Rey F.A. (2005). «The Birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses.» *Cell* 120:761-72.
50. Cowen B.S. et Braune M.O. (1988). «The propagation of avian viruses in continuous cell-line (QT-35) of Japanese quail origin.» *Avian Dis* 32:282-97.
51. Cummings T., Broussard C., Page R., Thayer S. et Luckert P. (1986). «Infectious bursal disease virus in turkeys.» *Vet Bull* 56:757-61.
52. Czifra G. et Janson D.S. (1999). «Infectious bursal disease in Sweden.» Dans *Cost 839, Ploufragan vol WG1*.

53. Da Costa B., Chevalier C., Henry C., huet J.C., Petit S., Lepault J., Boot H. et Delmas B. (2002). «The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2.» *J Virol* 76:2393-2402.
54. Darteil R., bublot M., Laplace E., Bouquet J.F., Audonnet J.C. et Rivierre M. (1995). «Herpesvirus of Turkey viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV challenge in chickens. » *Virology* 211:481-490.
55. Dash B.B., Verma K.C. et Kataria J.M. (1991). «Comparison of some serological tests for detection of IBD virus infection in chicken». *Indian J. Poult. Sci.* 26: 160-165.
56. de Herdt P., Jagt E., Paul G., van Colan S., Renard R., Destrooper C. et van den Bosch G. (2005). «Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) and the estimation of the optimal age for IBDV vaccination in broilers». *Avian Pathology* 34(6):501-504.
57. de Wit J.J. Heijmans J.F., Mekkes D.R. et van Loon A. A W.M. (2001). «Validation of five commercially available ELISAs for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (serotype 1)». *Avian Pathology* 30:543-549.
58. de Wit, J.J. (2001). «Gumboro Disease: Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula». *Proceedings of the 3rd meeting of working group 3 of COST action 839: passive protection and vaccination (current and future possibilities) in the presence of maternally derived antibody, Pulawy, pp: 21-28.*
59. Dean G.A., Himathongkham S. et Sparger E.E. (1999). «Differential cell tropism of feline immunodeficiency virus molecular clones in vivo.» *J Virol* 73(4):2596-2603.
60. Delmas B. et Rey F. (2006). «Le virus de la bursite infectieuse radiographié sous tous ses angles» *Inra Mensuel* n°127.
61. Dergham A.R., Al-Saleh W., Khaweldeh G.Y. et Totanji W.S. (2012). «Characterization of infectious bursal disease virus field strains in Jordan using molecular techniques». *Veterinarski Arch* 82 (1):115-124
62. Di Fabio J., Castro A.G.D., Gardin A.Y., Rossini L.I., Toquin L.I.D. et Eterradosi N. (1999a). «Very virulent IBD spreads to South America.» *World Poultry* 15:2079-87.
63. Di Fabio J., Rossini L.I., Eterradosi N., Toquin M.D. et Gardin Y. (1999b). «European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil.» *Vet Rec* 145:203-4.
64. Dobos P. (1995). «Protein-primed RNA synthesis in-vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus.» *Virology* 208:19-25.

65. Dobos P., Hill B., Hallett R., Kells D., Becht H. et Teninges D. (1979). «Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double stranded RNA genomes.» *J Virol* 32(2):593-605.
66. Dohms J.E. et Jaeger J.S. (1988). «The effect of infectious bursal disease virus infection on local and systemic antibody responses following infection of 3-week-old broiler chickens.» *Avian Dis* 32:632-40.
67. Domanska K., Matoz T., Rivallan G., Smietanka K., Minta Z., de Boisseson C., Toquin D., Lomniczi B., Palya V., et Etteradossi N. (2004). «Antigenic and genetic diversity of early European isolates of Infectious bursal disease virus prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of Infectious bursal disease virus revisited?» *Arch Virol* 149:465–80.
68. Domingo E. et Holland J.J. (1997). «RNA virus mutations and fitness for survival.» *Annu. Rev. Microbiol.* 51:151-178.
69. Dormitorio T.V, Giombrone J.J. et Duck LW. (1997). «Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates.» *Avian Dis* 41:36-44.
70. Duncan R., Mason C.L., Nagy E., Leong J.A. et Dobos P. (1991). «Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis genome segment B and its encoded VP1 protein: A putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif.» *Virology* 181(2):541-552.
71. Dybing J.K. et Jackwood D.J. (1996). «Restriction analysis of the MD infectious bursal disease virus strain.» *Avian Dis* 40:931-37.
72. EL-Ebiary E.A., Madhy S.S. et Khodier M.H. (1997). «Trials of using cell cultures for evaluation of IBDV vaccines in Egypt». *Assiut Veterinary Medical Journal.* 36:105-123.
73. Eloit M. (1998). «Vaccins traditionnels et vaccins recombinants». *Rev. INRA Prod Anim* 11:5-13.
74. Etteradossi N., Arnould C., Tekaiia F., Toquin D., Le Coq H., Rivallan G., guittet M., Domenech J., van den Berg T.P. et Skinner M.A. (1999). «Antigenic and genetic relationship between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West Africa isolate.» *Avian Pathol* 28:36-46.
75. Etteradossi N., Arnould C., Toquin D. et Rivallan G. (1998). «Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch Virol* 143:1627-36.
76. Etteradossi N., Gauthier C., Reda I., Comte S., Rivallan G., Toquin D., de Boisséson C., Lamandé J., Jestin V., Morin Y., Cazaban C. et Borne P-M. (2004). «Extensive antigenic changes in an atypical isolate of very virulent infectious bursal disease virus and experimental clinical control of this virus with an antigenically classical live vaccine.» *Avian Pathol* 33(4):423-31.

77. Fadly A.M. et Nazerian K. (1983). «Pathogenesis of infectious bursal disease virus in chicken infected with virus at various ages.» *Avian Dis* 27:714-23.
78. Fahey K.j., Erny K. et Crooks J. (1989). «A conformational immunogen on VP₂ of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens.» *J Gen Virol* 70(6):1473-1481.
79. Fahey K.J., O'Donnell I.J. et Bagust T.J. (1985). «Antibody to the 32K structural protein of infectious bursal disease virus neutralizes viral infectivity in vitro and confers protection on young chickens. » *J Gen Virol* 66:2693-702.
80. Fahey KJ, McWaters P, Brown MA, Erny K, Murphy VJ, Hewish DR. (1991). «Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens». *Avian Dis.* 35(2):365-73.
81. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J. Desselberger U. et Ball L.A. (2005). «Virus taxonomy» 3rd Edition. Elsevier Academic Press, p564.
82. Fernandez-Arias A., Martinez S. et Rodriguez J.F. (1997). «The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP₂, is an apoptotic inducer.» *J Virol* 71(10):8014-8018
83. Fodor E., Pritlov D.C., et Brownlee G.G. (1994). «The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription.» *J Virol* 68:4092-4096.
84. Gagic M., St Hill C.A. et Sharma J.M. (1999). «In ovo vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents». *Avian Dis* 43:293-301.
85. Gardin, Y. (1991). «Monitoring Infectious Bursal Disease Vaccination using ELISA Serology.» *Zoot int:* 68-77.
86. Garriga D., Querol-Audi J., Abaitua F., Saugar I., Pous J., Verdaguer N., Caston J.R. et Rodriguez J.F. (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* 80:6895-6905.
87. Goutebroze S., Curet M., Jay M.L., Roux C. et Le Gros F.X. (2003). «Efficacy of recombinant vaccine HVT-VP₂ against Gumboro disease in the presence of maternal antibodies». *Br Poult Sci.* 44(5):824-5.
88. Granzow H., Birghan C., Mettenleitr T.C., Beyer J., Kollner B. et Mundt E. (1997). «A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP₄.» *J Virol* 71:8879-8885.
89. Grindstaff J.L. (2008). «Maternal antibodies reduce costs of an immune response during development.» *J Ex Biol* 211:654-660.
90. Hair-Bejo M., Ng M.K. et Ng H.Y. (2004). «Day Old Vaccination Against Infectious Bursal Disease in Broiler Chickens». *International Journal of Poultry Science* 3(2):124-128.

91. Harkness J.W., Alexander D.J., Pattison M. et Scott A.C. (1975). «Infectious bursal disease agent: morphology by negative stain electron microscopy.» *Arch Virol* 48:63-73.
92. Hassan M.K., Al-Natour M.Q., Ward L.A. et Saif Y.M. (1996). « Pathogenicity, attenuation and immunogenicity of infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 40:567-71.
93. Hay S. et Kannourakis G. (2002). «A time to kill: Viral manipulation of the cell death program.» *J Gen Virol* 83:1547-1564.
94. He J., Hoffman S.L. et Hayes C.G. (1997). «DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice.» *Vaccine* 15:357-62.
95. Heine H.G. et Boyle D.B. (1993). «Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens.» *Arch Virol* 131:277-292.
96. Heine H.G., Haritou M. Failla P., Fahey K et Azad A.A. (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 1 strains.» *J Gen Virol* 72:1835-1843.
97. Hiraga M., Nunoya T., Otaki Y., Tajima M., Saito T. et Nakamura T. (1994). «Pathogenesis of highly virulent infectious bursal disease virus infection in intact and bursectomised chickens.» *J Vet Med Sci* 56:1057-63.
98. Hirai K. et Calnek B.W. (1979). «In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B-lymphocytes.» *Infection and Immunity* 25:964-70.
99. Hirai K. et Shimakura S. (1974). «Structure of infectious bursal disease virus.» *J Virol* 14:957-64.
100. Hirai K., Kato N., Fujiura A. et Shimakura S. (1979). «Further morphological characterization and structural proteins of infectious bursal disease virus.» *J Virol* 32 :323-28.
101. Hirpurkar S.D. (1995). «Isolation of infectious bursal disease virus (IBDV), its comparison with vaccine strains and efficacy of different vaccination regimens in passively immune chicks». These Ph.D. s, Gujarat Agricultural University, India.
102. Hitchner S.B. (1970). «Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs.» *Poult Sci* 49:511-516.
103. Hon C-C. Lam T-K., Drummond A., Rambaut A., Lee Y-F., Yip C-W., Zeng F., Lam P-Y., Ng P.T.W et Leung F.C.C. (2006). «Phylogenetic Analysis Reveals a Correlation between the Expansion of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus and Reassortment of Its Genome Segment B.» *Journal of Virology* 80(17):8503-09.
104. Hudson P.J., Mckern N.M., Power B.E. et Azad A.A. (1986). «Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus.» *Nucleic Acids Res* 14(12):5001-5002.

105. Ikuta N, El-Attrache J., Villegas P., Garcia M., Lunge V.R., Fonseca A.S.K., Oliveira C., et Marques E.K. (2001). «Moleccular Characterization of Brazilian Infectious Bursal Disease Viruses. » *Avian Dis* 45:297-306.
106. Imbeaud S., Graudens E., Boulanger V., Barlet X., Zaborski P., Eveno E., Mueller O., Schroeder A., et Auffray C. (2005). «Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces». *Nucleic Acids Res.* 33:56
107. Inoue M., Yamamoto H., Matuo K. et Hihara H. (1992). «Susceptibility of chicken monocytic cell line to infectious bursal disease virus.» *J Vet Med Sci* 54:575-77.
108. Islam M.R., Zierenberg K. et Müller H. (2001). «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* 146:2481-92.
109. Ismail N . M. et Saif Y. M. (1991). «Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens». *Avian Dis.* 35:460-469.
110. Ivanyi J. et Morris R. (1976). «Immunodeficiency in the chicken. An immunological study of infectious bursal disease.» *Clinic Exp Immunol* 23:154-65.
111. Jackwood D.J. et Jackwood R.J. (1997). «Molecular identification of infectious bursal disease virus strains.» *Avian Dis* 41:97-104.
112. Jackwood D.J. (2013). «Molecular Evolution of Infectious Bursal Disease Viruses: Corollaries for Changes in Antigenicity and Pathogenicity». XVIII WVPA Congress, Nantes, France.
113. Jackwood D.J. et Jackwood R.J. (1994). «Infectious bursal disease viruses: Molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype I viruses. » *Avian Dis* 38:531-37.
114. Jackwood D.J. et Nielsen C.K. (1997). «Detection of infectious bursal disease viruses in commercially reared chickens using the reverse transcriptase/polymerase chain reaction-restriction endonuclease assay. *Avian Dis* 41:137-43.
115. Jackwood D.J. et Saif Y.M. (1987). «Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses.» *Avian Dis* 31:766-70.
116. Jackwood D.J. et Sommer S.E. (1997). «Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses.» *Avian Dis* 41:627-37.
117. Jackwood D.J., Saif Y.M. et Hudhes J.H. (1982). «characteristics and serological studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Dis* 26:871-882.
118. Jackwood D.J., Saif Y.M. et Moorhead P.D. (1985). «Immunogenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens.» *Avian Dis* 29:1184-94.

119. Jackwood D.J., Sommer S.E. (1998). «Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens». *Avian Dis*, 42:321–39.
120. Jagadish M.N. et Azad A.A (1991). «Localization of VP3 epitope of infectious bursal disease virus.» *Virology* 184:805-7.
121. Jagadish M.N. Staton V.J., Hudson P.J. et Azad A.A. (1988). «Birnavirus precursor polyprotein is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide.» *J Virol* 62(3):1084-1087.
122. Jeong O.M., Kim M.C., Kang H.M., Ha G.W., Oh J.S., Yoo J.E., Park C.H., Kwon J.S., Pack M.R., Kim H.R., Kim Y.J., Kwon J.H. et Lee, Y.J. (2010). «Validation of egg yolk antibody based C-ELISA for avian influenza surveillance in breeder duck». *Veterinary Microbiology*, 144, 287-292
123. Jeurissen S.H., Janse E.M., Lehrbach P.R., Haddad E.E., Avakian A. et Whitfill C.E. (1998). «The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease». *Immunology*, 95(3): 494–500.
124. Jung A. (2006). «Pathogenesis studie of intermediate virulent Gumboro disease virus in specific pathogen free (SPF) chicken and commercial Broiler». Doctoral Thesis, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany.
125. Jungbäck C. et Finkler H. (1996). «Replacement of challenge procedures in the evaluation of poultry vaccines». *Development in Biological Standardization*, 86: 157-164.
126. Jungman A., Nieper H. et Müller H. (2001). «Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as in antigen-negative cells in their vicinity.» *J Gen Virol* 82:1107-1115.
127. Käufer I. et Weiss E. (1976). «Electron-microscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the the causal virus.» *Avian Dis* 20:483-95.
128. Käufer I. et Weiss E. (1980). «Significance of bursa Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens». *Infection and Immunity* 27:364-367.
129. Keck L.D., Skeeles J.K. et McNew R.W. (1993). «Antibody detection in matched chicken sera and egg-yolk samples by commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus, infectious bursal disease virus, and avian reovirus». *Avian Dis*; 37(3):825-8.
130. Kibenge F.S. et Qian B. (1994). «Sequence conservation in the RNA polymerase gene of infectious bursal disease viruses.» *Arch Virol* 134:441-49.
131. Kibenge F.S., Dhillon A.S. et Russell R.G. (1988a). «Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus.» *J Gen Virol* 69(8):1757-1775.

132. Kibenge F.S., Dhillon A.S. et Russell R.G. (1988b). «Identification of serotype II infectious bursal disease virus proteins.» *Avian Pathol* 17:679-87.
133. Kibenge F.S., Mckenna P.K. et Dybing J.K. (1991). «Genomic cloning and analysis of the larger segment (segment A) of naturally avirulent serotype 2 of infectious bursal disease virus.» *Virology* 184:437-40.
134. Kibenge F.S., Nagarajan M.N., et Qian B. (1996). «Determination of the 5' and 3' terminal noncoding sequences of the avibirnavirus infectious bursal disease virus.» *Arch Virol* 141:2401-19.
135. Kibenge F.S., Qian B., Nagy E., Cleghorn J.R. et Wadowska D. (1999). «Formation of virus-like particles when the polyprotéine gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells.» *Can J Vet Res* 63:49-55.
136. Kibenge F.S.B. et Mckenna P.K. (1991). «Isolation and propagation of infectious bursal disease virus using the ovine kidney continuous cell line.» *Avian Dis* 36:256-261.
137. Kibenge F.S.B., Dhillon A.S. et Russel R.G. (1988). «Growth of serotype I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells.» *Avian Dis* 32:298-303.
138. Kim I.J, Karaca K., Pertile T.L., Ericson S.A. et Sharma J.M. (1998). «Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens.» *Vet Immunol immunopathol* 61:331-341.
139. Kim I-J, Gagic M. et Sharma J.M. (1999). «Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 43:401-413.
140. Knezevic N., Sekler M., Veljovic L.J., Kozlina B. et Rodic J. (1999). «First experiences with poulvac R Bursine-2 vaccine against Gumboro disease.» In: *Proceedings of the 8^o Yugoslav Symposium on Poultry Production*, Sokobanja, Yugoslavia.
141. Knoblich H.V., Sommer SE et Jackwood D.J. (2000). «Antibody titers of infectious bursal disease virus in broiler chicks after vaccination at one day with infectious bursal disease virus and Marek's disease virus.» *Avian Dis.* 44(4):874-84.
142. Kong L.L., Omar A.R., Hair-Bejo M., Aini I. et Seow H.F. (2004). «Sequence analysis of both genome segments of two very virulent infectious bursal disease virus field isolates with distinct pathogenicity.» *Arch Virol* 149:425-34.
143. Koonin E.V. (1992). «Evolution of double-stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive-stranded RNA viruses.» *Seminars in Virology*, 15,327-339. Thèse 3018444.

144. Kowalczyk K., Daiss J., Halpern J., et Roth T.F. (1985). «Quantitation of maternal–fetal IgG transport in the chicken». *Immunology* 54:755–762.
145. Kramer T.T. et Cho H.C. (1970). «Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hens egg». *Immunology* 19:157–167.
146. Kuklin N., Daheshia M., Karem K., Manickan E. et Rouse B.T. (1997). «Inoculation of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization.» *J Virol* 71:3138-45.
147. Kwon H.M. et Kim S.J. (2004). «Sequence Analysis of the Variable VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses Passaged in Vero Cells». *Virus Genes* 28(3):285-91.
148. Lam K.M. (1997). «Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal virus.» *J Comp Pathol* 116:367-377.
149. Lana D.P, Beisel C.E. et Silva R.F. (1992). «Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus: Analysis of naturally occurring variant virus.» *Virus Genes* 6, 247-259.
150. Le Nouën C., Rivallan G., Toquin D., Darlu P., Morin Y., Beven V., de Boisseson C., Cazaban C., Comte S., Gardin Y. et Eterradossi N. (2006). «Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate.» *J Gen Virol* 87:209-16.
151. Lejal N., Da Costa B., Huet J.C. et Delmas B. (2000). «Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites.» *J Gen Virol* 81(4):983-992.
152. Leslie G.A., et Clem W.L. (1969). «Phylogeny of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken». *J. Exp. Med.* 130:1337–1352.
153. Letzel T., Coulibaly F., Rey F.A., Delamas B., Jagt E., van Loon A.A. et Mundt E. (2007). «Molecular and Structural Bases for the Antigenicity of VP2 of Infectious Bursal Disease Virus.» *J Virol* 81(23):12827–835.
154. Lim B.L., Cao Y., Yu T. et Mo C.W. (1999). «Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J virol* 73(4):2854-2862.
155. Liu H.J., Giombrone J.J. et Dormitorio T. (1994). «Detection of genetic variations in serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis.» *J Virology Leth* 48:281-91.
156. Liu M. et Vakharia V.N. (2004). «VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo.» *Virology* 330:62-73.

157. Liu M. et Vakharia V.N. (2006). «Nonstructural Protein of Infectious Bursal Disease Virus Inhibits apoptosis at the early stage of Virus infection.» *J Virol* 80(7):3369-77.
158. Loeken M.R. et Roth T.F. (1983). «Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte». *Immunology* 49:21-28.
159. Lombardo E., Maraver A., Cast n J.R. Rivera J., Fernandez-Arias A., Serrano A., Carrascosa J.L. et Rodriguez J.F. (1999). «VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particules. » *J Virol* 73:6973-83.
160. Lombardo E., Maraver A., Espinosa I., Fernandez-Arias A. et Rodriguez J.F. (2000). «VP5, the non structural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis.» *Virology* 277:345-357.
161. Lukert P.D. et Davis R.B. (1974). «Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures.» *Avian Diseases* 18:243-250.
162. Lukert P.D. et Saif Y.M. (2003). «Infectious Bursal Disease». In: *Diseases of Poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes., A. M. Fadly., J. R. Glisson., L. R. McDougald., et D. E. Swayne., eds. Iowa State Press, Ames, Iowa. pp. 161-179.
163. Macreadie IG, Vaughan PR, Chapman AJ, McKern NM, Jagadish MN, Heine HG, Ward CW, Fahey KJ, Azad AA. (1990). «Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast». *Vaccine* 8(6):549-52.
164. Magyr G. et Dobos P. (1994). «Evidence for the detection of infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus.» *Virology* 204:580-589.
165. Majo N., El-Attrache J., Banda A., Villegas P., Ramis A., Pages A., et Ikuta N. (2002). «Molecular Characterization of Spanish Infectious Bursal Disease Virus Field Isolates.» *Avian Dis* 46:859-868
166. Manchester K.L. (1996). «Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations» *Biotechniques* 20:968-970
167. Martinez-Torrecuadrada J.L., Lazaro B., Rodriguez J.F. et Casal, J.I. (2000). «Antigenic properties and diagnostic potential of baculovirus-expressed infectious bursal disease virus proteins VPX and VP3.» *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7:645-651.
168. Martinez-Torrecuadrada J.L., Saubi N., Pagès-Manté A., Castón J.R., Espuña E. et Casal J.I. (2003). «Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines». *Vaccine* 21: 1952-1960

169. Mathur S., Kapoor S. et Kalra S.K. (1999). «Adaptation of K2 strain of IBD virus in CEF cell cultures». *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 20: 68-69.
170. McCarty J.E., Brown T.P. et Giambone J.J. (2005). «Delay of infectious bursal disease virus infection by in ovo vaccination of antibody positive chicken eggs». *Journal of Applied Poultry Research*, 14, 136-140.
171. McFerran J.B., McNulty M.S., McKillop E.R., Conner T.J. McCracken R.M., Collins D.S. et Allan G.M. (1980). «Isolation and serologic studies with infectious bursal disease virus from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype.» *Avian Pathol* 9:395-404.
172. McLroy, S.G., Goodall, D.W., Bruce, D.W., McCracken, R.M. et McNulty, M.S. (1992). «The cost benefit of vaccinating broiler flocks against subclinical infectious bursal disease. » *Avian Pathology*, 21, 65-76.
173. Meihong L. et Vakharia V.N. (2004). «VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo.» *Virology* 330(1):62-73.
174. Meir R., Jackwood D.J. et Weisman, Y. (2001). «Molecular typing of infectious bursal disease virus of Israeli field and vaccine strains by the reverse transcriptase/polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay». *Avian Dis* 45: 223– 228.
175. Mengel-Whereat S.A. (1995). «Development of a monoclonal antibody for the detection of highly virulent classic infectious bursal disease virus.» *Animal Sciences*. College Park, MD, University of Maryland, College Park:97.
176. Mittal D., Jindal N., Shiv L.G., Ranjit S. K, Singh K. et Ashok K.T. (2006). «Molecular characterization of Indian isolates of infectious bursal disease virus from broiler chickens» *DNA Sequence* 17(6): 431–439
177. Mohammed H.O., Yamamoto R. Carpenter T.E. et Ortmayer H.B. (1986). «Comparison of egg yolk and serum for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay». *Avian Dis.* 30:398–408.
178. Morgan M.M., Macreadie I.G., Harley V.R., Hudson P.G. et Azad A.A. (1988). «Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product.» *Virology* 163(1):240-242.
179. Muhammad W.M., Najma A. et Irfan Z. Q. (2006). «Passive immunization using purified IgY against infectious disease of chickens in Pakistan.» *J Vet Sci* 7(1):43–46.
180. Müller H. (1986). «Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells.» *Arch Virol* 87:191-203.

181. Müller H. et Becht H. (1982). «Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements of infectious virus and incomplete particles.» *J Virol* 44:384-92.
182. Müller H. et Nitschke R. (1987). «The two segments of infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein.» *Virology* 159:174-177..
183. Müller H., Islam M.R. et Raue R. (2003). «Research on infectious bursal disease: The past, the present and the future.» *Vet Microbiol* 97:153-65.
184. Müller R., Kaufner I., reinacher M. et Weiss E. (1979). «Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectiou bursal disease virus (IBDV). » *Zentralbl Veterinarmed [B]* 26:345-352.
185. Mumford J.A. (2007). «Vaccines and viral antigenic diversity.» *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 26(1):69-90.
186. 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.
187. Mundt E. et Müller H. (1995). «Complete nucleotide sequences of 5' and 3' non coding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus.» *Virology* 209:10-18.
188. Mundt E., Beyer J. et Muller H. (1995). «Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells.» *J Gen Virol* 76(2):437-443.
189. Mundt E., Kollner B. et Kretzscmar D. (1997). «VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture.» *V Virol* 71:5647-5651.
190. Nagarajan M.M. et Kibenge F.S.B. (1997). «Infectious bursal disease virus: A review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Can J Vet Res* 61:81-88.
191. Nakamura T., Otaki Y., Lin Z., Ninuya T., Hoshi S. et Kato A. (1994). «Direct correlation between the titer of infectieous bursal disease virus VP2-specific antibody and protection». *Avian Dis* 38:251-5.
192. Naqi SA, Marquez B, Sahin N. (1983). «Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunization». *Avian Dis*, 27(3):623-31
193. Nick H., Cursiefen D. et Becht H. (1976). «Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus.» *J Virol* 18:227-34.
194. Nieper H. et Müller H. (1996). «Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence specific binding sites.» *J Gen* 77(6):1229-1237.
195. Nieper H., Teifke J.P., Jungman A., Lohr C.V. et Muller H. (1999). «Infected and apoptotic cells in the IBDV infected bursa of Fabricius, studies by double labeling techniques.» *Avian Pathol* 28:279-285.

196. Ogawa M., Yamaguchi T., Setiyono A., Ho T., Matsuda H., Furusawa S., Fukushi H. et Hirai K. (1998). «Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry.» *Arch Virol* 143(12):2327-2341.
197. Ojeda F., Skardova I., Guarda M.I., Ulloa J. et Folch H. (1997). «Proliferation and apoptosis in infection with infectious bursal disease virus: A flow cytometric study.» *Avian Dis* 41:312- ?
198. Ojkic D., Martin E., Swinton J., Binnington B., et Brash M. (2007). «Genotyping of Canadian field strains of infectious bursal disease virus» . *Avian Pathol* 36(5):427-433
199. Okoye J. et Uzoukwu M. (1990). «Pathogenesis of infectious bursal disease in embryonally bursectomised chickens. » *Avian Path* 19:555-69.
200. Okoye J.O.A. et Uzoukwu M. (1981). «An outbreak of infectious bursal disease among chickens between 16 and 20 weeks old.» *Avian Dis* 25:1034-38.
201. Oppling V., Muller H. et Becht H. (1991). «The structural polypeptide VP3 of infectious bursal disease virus carries group- and serotype-specific epitopes.» *J Gen Virol* 72:2275-8.
202. Owoade A. A., Mulders M.N., Kohnen J., Ammerlaan W. et Muller C.P. (2004). «High sequence diversity in infectious bursal disease virus serotype 1 in poultry and turkey suggests West-African origin of very virulent strains.» *Arch Virol* 149:653-72.
203. Pagneux C.F. (2011). «Effets de l'injection répétée d'hormone de croissance sur l'expression des gènes dans le muscle et les leucocytes circulant chez des juments de race poney-welsh» Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire. Faculté de Médecine de Créteil
204. Piela T.H., Gulka C.M. et Chang P.W. (1984). «Use of egg yolk in serological tests (ELISA and HI) to detect antibody to Newcastle Disease, infectious bronchitis and *Mycoplasma gallisepticum*.» *Avian Diseases*, 28 , 877 -883.
205. Pina E. et Gardin Y. (2003). «vIBDV also widely spread in Venezuela.» *World Poultry* 19(3):p36.
206. Pitcovski J., Levi B.Z., Maray T., Di-Castro D., Safadi A., Krispl S., Azriel A., Gutter B. et Michael A. (1999). «failure of viral protein 3 of infectious bursal disease virus produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems to protect chickens against the disease. »*Avian Dis* 43:8-15.
207. Proffitt J.M., Bastin D.A. et Lehrbach P.R. (1999). «Sequence analysis of Australian infectious bursal disease viruses.» *Australian Veterinary Journal* 77:186–188.
208. Rauber R.H., Flôres M.L., Pereira C.E. et Grigulo, M. (2004). «Elisa evaluation of the levels of antibodies against Infectious Bronchitis Virus in laying hens using egg yolk as substrate». *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 6, 117-119.

209. Rautenschlein S., Yeh H.Y., Njenga M.K. et Sharma J.M. (2002). «Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery». *Arch. Virol.* 147:285-304.
210. Rautenschlein, S., Kraemer, C., Vanmarcke, J. et Montiel, E. (2005). «Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers». *Avian Diseases*, 49, 231-237.
211. Reddy S.K., Silim A. et Ratcliffe M.J. (1992). «Biological roles of the major capsid proteins and relationships between the two existing serotypes of infectious bursal disease virus. » *Arch Virol* 127:209-22.
212. Remorin P., Calderon M.G., Aguirre S., Periolo O., La Torre, J. et Mattion N. (2006). «Characterization of Infectious Bursal Disease Viruses from Argentina». *Avian Dis* 50:245-251
213. Repp H., Nieper H., Draheim J., Koschinski A., Müller H. et Dreyer F. (1998). «Infectious bursal disease virus changes the potassium current properties of chicken embryo fibroblasts. » *Virology* 246:362-9.
214. Rodenberg J., Sharma J.M., W. Belzer S., Nordgren R.M. et Naqi S. (1994). «Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 38:16-21.
215. Rodriguez L.L., Owens J.H., Peters C.J. et Nichol S.T. (1998). «Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome.» *Virology* 242:99-106.
216. Rodriguez-Chavez I-R., Rosenberger J-K. Cloud S.S. et (2002b). «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). III. Pathogenicity.» *Avian Pathol* 31 :485-92.
217. Rodriguez-Chavez I-R., Rosenberger J-K. et Cloud S.S. (2002a). «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). I. Antigenicity and immunogenicity.» *Avian Pathol* 31 : 463-71
218. Rosenberger J.K. et Cloud S.S. (1985). «Isolation and characterization of variant infectious bursal disease virus.» *J Am Vet Med Assoc* 189:357 (résumé).
219. Rudd M.F., Heine H.G., Sapats S.I., Parede L., Ignjatovic J. (2002). «Characterization of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus». *Arch. Virol.* 147: 1303-1322.
220. Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T.(1989). «Molecular Cloning: A Laboratory Manual» 2nd edn NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- [221.](#) Sanchez A.B. et Rodriguez J.F. (1999). «Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: Identification of polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis.» *Virology* 262(1):190-199.
- [222.](#) Sapats S. I. et Ignjatovic J. (2002). "Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strains of infectious bursal disease virus". *Avian Pathology* 31 :559– 566
- [223.](#) Sapats S.I. et Ignjatovic J. (2000). «Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia.» *Arch Virol* 145:773–85.
- [224.](#) Sapats S.I., Trinidad L., Gould G., Heine H.G., van den Berg T.P., Eterradossi N., Jackwood D., Parede L., Toquin D. et Ignjatovic J. (2006). «Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus». *Arch Virol* 151: 1551–1566.
- [225.](#) Sareytipoglu B. et Akan M. (2006). «Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of Infectious Bursal Disease Virus Field Strains in Turkey». *Avian Dis* 50:545-549
- [226.](#) Schat K.A., Lucio B. et Carlisle J.C. (1981). «Pathogenesis of infectious bursal disease in embryonally bursectomised chickens.» *Avian Dis* 25:996-1004.
- [227.](#) Schnitzler D., Bernstein F., Muller H. et Becht H. (1993). «The genetic basis of the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus.» *J Gen Virol* 74:7563-71.
- [228.](#) Schroder A., Van loon A.A., Goovaerts D. et Mundt E. (2000). «Chimeras in non coding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens.» *J Gen Virol* 81:533-540.
- [229.](#) Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., et Ragg T. (2006). «The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements». *BMC Mol. Biol.* 7:3.
- [230.](#) Setiyono A., Hayashi A., Yamaguchi T., Fukushi H. et Hirai K. (2001). «Detection of cell membrane proteins that interact with virulent infectious bursal disease virus. » *J Vet Med Sci* 63:219-221.
- [231.](#) Shane S.M. (2001). «Global advances in poultry disease research.» *World Poultry* 17(7):27.
- [232.](#) Sharma J.M., Dohms J., Walser M. et Snyder D.B. (1993). «Presence of lesions without virus replication in the thymus of chickens exposed to infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 37:741-748.
- [233.](#) Sharma J.M., Dohms J.E. et Metz A.L. (1989). «Comparative pathogenesis of serotype I and variant serotype I isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific pathogen free chickens.» *Avian Dis* 33:112-124.
- [234.](#) Sharma J.M., Kim I-J., Rautenschlein S. et Yeh H. (2000). «Infectious bursal disease virus of chickens: Pathogenesis and immunosuppression.» *Dev Comp Immunol* 24:223-235.

235. Sharma JM, Fredericksen TL. (1987). «Mechanism of T cell immunosuppression by infectious bursal disease virus of chickens.» *Prog Clin Biol Res* 238:283-94.
236. Silim A. et Venne D. (1989). «Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired field samples.» *Avian Dis.* 33(4):643-648.
237. Singh, K.C.P. et Dhawedkar, R.G. (1992). Growth of different strains of IBD virus in cell
238. Skeeles J.K., Luckert P.D., De Buysscher E., Fletcher O. et Brown J. (1979). «Infectious bursal disease viral infection: The relationship of age, complement levels, virus neutralizing antibody, clotting and lesions.» *Avian Dis* 23:107-17.
239. Skeeles J.K., Lukert P.D. De Buysscher E.V., Fletcher O.J. et Brown J. (1979). «Infectious bursal disease virus infection: Complement and virus-neutralizing antibody response following infection of susceptible chickens.» *Avian dis* 23:95-106.
240. Skehel J.J. et Joklik W.K. (1969). «Studies on the in vitro transcription of reovirus RNA catalyzed by reovirus cores.» *Virology* 39(4):822-831.
241. Skeles J.K., Slavik M., Beasley J.N. Brown A.H., Meinecke C.F. et Maruca S. (1980). «An age related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus.» *Am J Vet Res* 41:1458-1461.
242. Snyder D.B. (1990). «Changes in the field status of infectious bursal disease virus.» *Avian Pathol* 19:419-423.
243. Snyder D.B., Lana D.P., Cho B.R. et Marquardt W.W. (1988a). «Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. » *Avian Dis* 32:527-34.
244. Snyder D.B., Lutticken D., Savage P.K., Yancey F.S., van Dermarel P., Mengel S.A., Russek-Cohen E. et Marquardt W. (1988b). «Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) directly from infected tissues: Isolation and geographic distribution of a novel antigenic variant of IBDV.» *Proceedings of the 23rd National meeting on Poultry Health and Condemnations. Maryland.* 119-28.
245. Snyder D.B., Vakharia V.N. et Savage P.K. (1992). «Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease virus in the United States.» *Arch Virol* 127(1-4):89-101.
246. Spies U., Muller H. et Becht H. (1987). «Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products.» *Virus Res* 8(2):127-140.
247. Spies U., Muller H. et Becht H. (1989). «Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames.» *Nucleic Acids Res* 17(19):7982.

248. Sun J.H., Lu P., Yan Y.X., Hua X.G., Jiang J. et Zhao Y. (2003). «Sequence and analysis of genomic segment A and B of very virulent infectious bursal disease virus isolated from China.» *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50:148–54.
249. Tacken M.G., Peeters B.P., Thomas A.A., Rottier P.J. et Boot, H.J. (2002). «Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA.» *J Virol* 76:11301-311.
250. Tacken M.G.J., Rottier P.J.M., Gielkens A.L.J. et Peeters B.P.H. (2000). «Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1.» *Journal of General Virology* 81:209–18.
251. Tanimura N. et Sharma J.M. (1997). «Appearance of T cells in the bursa of Fabricius and ceecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens.» *Avian Dis* 41:638-645.
252. Tanimura N. et Sharma J.M. (1998). «In-situ apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus.» *J Comp Pathol* 118:15-27.
253. Tanimura N., Tsukamoto K., Nakamura K., Narita M. et Maeda M. (1995). «Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunocytochemistry.» *Avian Dis* 39:9-20.
254. Thompson G., Mohammed H., Bauman B., et Naqi S. (1997). «Systemic and local antibody responses to infectious bronchitis virus in chickens inoculated with infectious bursal disease virus and control chickens.» *Avian Dis* 41:519-27.
255. Todd D. et McNulty M.S. (1979). «Biochemical studies with infectious bursal disease virus: Comparison of some of its properties with infectious pancreatic necrosis virus.» *Arch Virol* 60:265-77.
256. Tsukamoto K., Matsumura T., Mase M. et Imai K. (1995b). «A highly sensitive broad-spectrum infectivity assay for infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 39:575-86.
257. Tsukamoto K., Tanimura N., Mase M. et Imai K. (1995a). «Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease strains.» *Avian Dis* 39(4):844-52.
258. Tsukamoto K., Kojima C., Komori Y., Tanimura N., Mase M. et Yamaguchi S. (1999). «Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expression IBDV VP2.» *Virology* 257:352-62.
259. Ture O., Tsai H.J. et Saif Y.M. (1993). «Studies on antigenic relatedness of classic and variant strains of infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 37:647-54.

260. Vakharia V.N. (1997). «Development of recombinant vaccines against infectious bursal disease.» *Biotechnology Annual Review* 3(1):151-168.
261. Vakharia V.N., AHAMED B., HE J. (1992). «Use of polymerase chain reaction for efficient cloning of dsRNA segments of infectious bursal disease virus.» *Avian Dis* 1992 36:736-42.
262. Vakharia V.N., He H., Ahamed B. et Snyder D.B. (1994a). «Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus.» *Virus Res* 31(2):265-273.
263. Vakharia V.N., Snyder D.B., Lutticken D., Mengel-Whereat S.A., Savage P.K., Edwards G.H. et Goodwin M.A. (1994b). «Active and passive protection against variant and classic infectious bursal disease virus strains induced by baculovirus expressed structural proteins.» *Vaccine* 12:452-6.
264. van den Berg T.P. (2000). «Acute infectious bursal disease virus in poultry: A review.» *Avian Pathol* 29:175-94.
265. van den Berg T.P. et Meulemans G. (1991). «Acute infectious bursal disease in poultry: Protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination.» *Avian Pathology*, 20(3):409-421
266. van den Berg T.P., Eterradossi N., Toquin D. et Meulemans G. (2000). «Infectious bursal disease (Gumboro disease).» *Rev Sci Tech* 19:509-43.
267. van den Berg T.P., Gonze M. et Meulemans G. (1991). «Acute infectious bursal disease virus in poultry: Isolation and characterization of highly virulent strain.» *Avian pathol* 20:133-143.
268. van Loon A.A., de Haas N., Zeyda I. et Mundt E. (2002). «Alteration of amino acids in VP2 of very virulent of infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens.» *J Gen Virol* 83:121-129.
269. Vasconcelos A.C. et Lam K.M. (1994). «Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. » *J Gen Virol* 75:1803-1806.
270. Verma, K.C.; Panisup, A.S.; Mohanty, G.C. et Reddy, B.R. (1981). «Infectious bursal disease (Gumboro disease) and associated conditions in poultry flocks of Andhra Pradesh». *Indian J. Poult. Sci.* 16: 385-392.
271. Voeten A.C., Lütticken D., Van Dijk P.M., Bergs G.H.H. et Orthel F.W. (1985). «The use in practice of inactivated oil emulsion vaccine against infectious bursal disease in broiler breeder and its influence on the progeny: a comparative field trial». *The Veterinary Quarterly*, 7, 91-111
272. von Einem, U.I., Gorbalenya A.E., Schirrneier H., Behrens S. E., Letzel T., et Mundt E. (2004). «VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase.» *J. Gen Virol* 85:2221-29.

273. Wang X-N., Zhang G-P., Zhou J-Y., Feng C-H., Yang Y-Y., Li Q-M., Guo J-Q, Qiao H-X., Xi J., Zhao D., Xing G.X., Wang Z-L., Wang S-H., Xiao Z-J., Li X-W. et Deng R.G. (2005). «Identification of Neutralizing Epitopes on the VP2 Protein of Infectious Bursal Disease Virus by Phage-Displayed Heptapeptide Library Screening and Synthetic Peptide Mapping.» *Viral Immunology* 18(3):549–57.
274. Weiss E. et Kaufer-Weiss I. (1994). «Pathology and pathogenesis of infectious bursal disease.» Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia. »Rauischholzhausen, germany, 21-24 June.
275. Whetzel P.L. et Jackwood D.J. (1995). «Comparison of neutralizing epitopes among infectious bursal disease viruses using radioimmunoprecipitation. »*Avian Dis* 39:499-506.
276. Whitfill C.E., Haddad E.E., Ricks C.A., Skeeles J.K., Newberry L.A., Beasley J.N., Andrews P.D., Thoma J.A. et Wakenell P.S. (1995). «Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV». *Avian Dis* 39(4):687-99.
277. Wyeth P.J. (1975). «Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *S. typhimurium* and *E. coli* infection.» *Vet. Rec.* 96:238-243.
278. Yamaguchi T., Iwata K., Kobayashi M., Ogawa M, Fukushi H. et Hirai K. (1996a). «Epitope mapping of capsid proteins VP2 and VP3 of infectious bursal disease virus.» *Arch Virol* 141:1493-507.
279. Yamaguchi T., Ogawa M., Inoshima Y., Miyoshi M., Fukushi H. et Hirai K. (1996b). «Identification of sequence changes responsible for attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus.» *Virology* 223(1):219-223.
280. Yamaguchi T.M., Ogawa M. Miyoshi M., Inoshima Y., Fukushi H. et Hirai K. (1997). «Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus.» *Arch Virol* 142:1441-1458.
281. Yao K. (1998). «Functional analysis of infectious bursal disease virus 17-kDa nonstructural protein in viral replication and pathogenesis.» *Avian and Animal Sciences*. College Park, University of Maryland, College Park:162.
282. Yao K. et Vakharia V.N. (2001). « Induction apoptosis in vitro by the 17-KDa non structural protein of infectious bursal disease virus : possible role in viral pathogenesis.» *Virology* 285:50-8.
283. Yao K., Goodwin M.A. et Vakharia V.N. (1998). «Generation of mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions.» *J Virol* 72:2647-2654.
284. Yeh H-Y., Rautenschlein S. et Sharma J.M. (2002). « Protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens in the absence of virus-specific antibodies.» *Veterinary Immunology and Immunopathology* 89(3-4):149-58.

285. Zaheer A. et Saeed A. (2003). «Role of Maternal Antibodies in Protection Against Infectious Bursal Disease in Commercial Broilers». *International Journal of Poultry Science* 2(4):251-255.
286. Zierenberg K., Raue R. et Muller H. (2001). «Rapid identification of "very virulent" strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis». *Avian Pathol.* 30:55-62.
287. Zouelfakar S., Mona M.A., Afifi M., Hassan M.K. et Saad F. (1997). «Evaluation of two vaccination programs to control IBD in commercial broilers». *Veterinary Medical. Journal Giza.* 45(4): 531–540.

RÉSUMÉ

Les épisodes cliniques de la maladie de Gumboro continuent à sévir sur des bandes de poulets correctement vaccinés. Ces échecs de vaccination sont probablement en rapport avec une hausse sensible de la pathogénicité des virus circulants. Cinq isolats sauvages, prélevés dans des foyers de la maladie dans le Nord-Est Algérien, ont été caractérisés. Grâce à un couple d'amorces, choisi dans une région bien conservée du génome viral, un fragment d'ADNc de 743 pb du gène codant la région hypervariable de VP2, a été obtenu et amplifié en une seule étape dans une réaction rt-PCR, puis séquencé, avant de subir une analyse phylogénétique incluant des séquences de souches de référence disponibles dans GenBank.

Les résidus 253(H), 279(N), 284(T) et 330(R), caractéristiques des souches atténuées, étaient absents chez les cinq isolats de l'étude. Au contraire, les résidus 222(A), 256(I) et 294(I), considérés comme spécifiques du pathotype hypervirulent, étaient présents chez les cinq isolats qui ont également exhibé le site de restriction SspI, mais à une position différente de celle exclusivement observée chez les virus hypervirulents. Les isolats Algériens et les virus hypervirulents étaient monophylétiques et se sont partagés jusqu'à 98.53% de nucléotides et 100% d'acide aminés. A l'intérieur du cluster des virus hautement pathogènes, les souches Algériennes se sont regroupées dans une branche séparée et ont montré pas plus de 0.4% de divergence d'acide aminés. Cette faible diversité parmi les 5 isolats caractérisés était prévisible vu la courte période et la zone géographique trop circonscrite des prélèvements.

La présente étude est la première à avoir révélé le caractère hypervirulent des virus Gumboro circulant en Algérie. Des enquêtes futures seront nécessaires pour suivre l'évolution de ces virus.

Mots clés : Maladie de Gumboro, échec vaccinal, rt-PCR, virus hypervirulents, Nord-Est Algérien.

ملخص:

لا تزال الحالات السريرية لمرض الجمبورو تظهر بين قطعان الدجاج حتى تلك الملقحة بصفة جيدة. يُرجح ان يكون لفشل عمليات التلقيح علاقة مباشرة بزيادة فوعة الفيروس الحقلي.

سمحت هذه الدراسة بتحديد الخصائص الجزيئية لخمس فيروسات حقلية تم جمعها من داخل بؤر المرض في مناطق عدّة من شمال شرق الجزائر.

باستعمال زوج من الممهدات (primers)، أُختيرت في منطقة جُدُ محفوظة من مجين الفيروس، تم بطريقة النسخ العكسي، الحصول على قطعة من 743 زوج قاعدي للحمض النووي المكمل cDNA ثم تضخيم هذا الأخير بتقنية PCR .

بعد الحصول على التسلسل الجيني لقطعة cDNA ، تم دراستها بالمقارنة مع التسلسلات الجينية لفيروسات مرجعية متوفرة في بنك الجينات GenBank

غابت لدى الفيروسات الخمس المدروسة ، الأحماض الأمينية (284(T), 279(N), 253(H) و330(R) , التي تميّز عادةً العترات المضعّفة . في المقابل حازت الفيروسات الخمس على موقع إنشطار الأنزيم SspI والأحماض الأمينية (294(I), 256(I), 222(A) التي تميز حصريا الفيروسات شديدة الضراوة، مع اختلاف في موضع إنقسام الأنزيم على التسلسل الجيني.

بينت دراسة النشوء و التطور (Phylogenic Analysis) قوة رابط الإنتماء بين مجموعة الفيروسات المدروسة و مجموعة الفيروسات المرجعية ذات الفوعة العالية. أظهرت كلتا المجموعتين توافق جيني وصل إلى 98,53%. فيما بينها، تقاسمت العترات الخمس نسبة تصل إلى 65,99% من النيكلوتيدات و 100% من الأحماض الأمينية. كان هذا التنوع الضعيف بين العترات منتظرا بالنظر الى قصر المدة و صغر المنطقة الجغرافية المخصصتين لجمع العينات

أثبتت هذه الدراسة و لأول مرة شدة ضراوة الفيروسات المنتشرة في الجزائر لكن من الضروري إجراء تحريات مستقبلية لتتبع تطور هذه الفيروسات .

الكلمات المفتاحية : مرض الجمبورو، فشل التلقيح، فيروسات شديدة الضراوة، rt-PCR، شمال شرق الجزائر

ABSTRACT

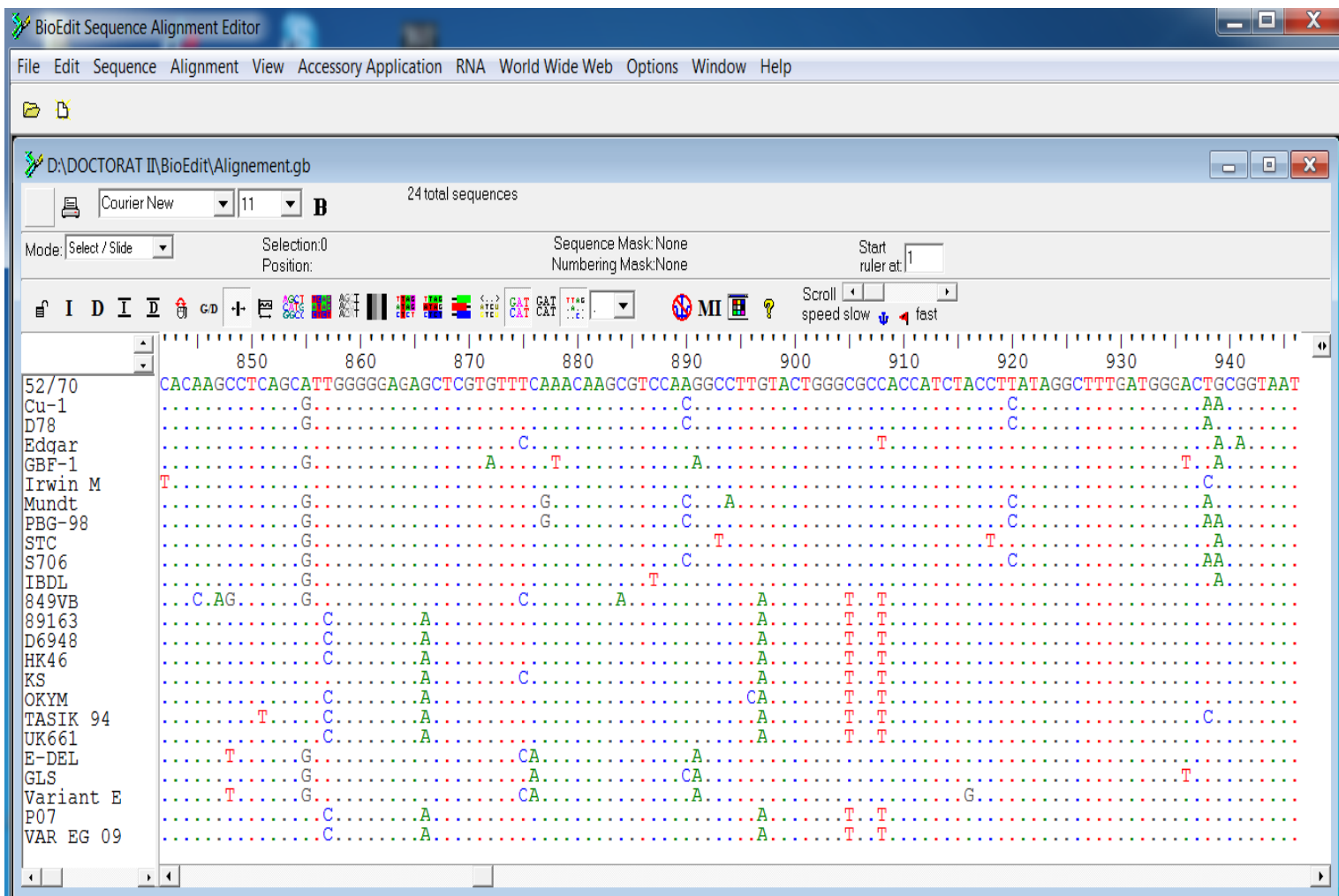
Clinical outbreaks of Infectious Bursal Disease (IBD) continue to be reported in correctly vaccinated flocks. These vaccination failures are probably related to a significant increase in virus virulence. Five wild Infectious Bursal Disease viruses (IBDV), originating from outbreaks recorded in North-East of Algeria, were characterized. Using a pair of primers selected from a well-conserved region in a viral genome encoding the hypervariable region of VP₂, one cDNA fragment of 743 bp was reverse-transcribed and amplified in one step rt-PCR. The five fragments were subjected to sequence and phylogenetic analysis including some reference strains available in GenBank.

The four residues 253(H), 279(N), 284(T) and 330(R), characteristic of attenuated strains, were absent in all studied isolates. On the contrary, the residues 222(A), 256(I) and 294(I), which indicate the genetic fingerprint of the very virulent pathotype, were present in the five studied viruses, which also exhibited the SspI restriction site but at a different position from that exclusively observed in very virulent Infectious bursal disease viruses (vvIBDV). The Algerian strains shared with the vvIBDV up to 98.5% of nucleotides and up to 100% of amino acids and clustered with them in the phylogenetic consensus tree. Inside the vvIBDV clade, the five Algerian strains grouped in a separate branch and showed between themselves no more than 0.4% of amino acid divergence. This poor antigenic diversity was expected given the short period and the circumscribed region of sampling. This was the first report of vvIBDV in Algeria. Further investigations are needed in the future to track the evolution of these viruses.

Key words: Gumboro Disease, failure vaccination, vvIBDV, rt-PCR, North-East of Algeria.

Annexe A

Interface du logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.5 (Alignement multiple de séquences)



Annexe B

Interface Web de l'outil primer-BLAST

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

• [NCBI Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template \(using Primer3 and BLAST\)](#). [More...](#) [Tips for finding specific primers](#)

PCR Template [Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#)

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

Range
 Forward primer From To [Clear](#)
 Reverse primer From To [Clear](#)

Or, upload FASTA file [Parcourir...](#) Aucun fichier sélectionné.

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand) [Clear](#)
 Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size Min 70 Max 1000
 # of primers to return 5
 Primer melting temperatures (T_m) Min 57.0 Opt 60.0 Max 63.0 Max T_m difference 3 [Clear](#)

Exon/intron selection A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section [Clear](#)

Exon junction span No preference [Clear](#)
 Exon junction match Exon at 5' side 7 Exon at 3' side 4
 Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction [Clear](#)
 Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA [Clear](#)
 Intron length range Min 1000 Max 1000000 [Clear](#)

Primer Pair Specificity Checking Parameters [Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow](#)

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template [Clear](#)

Database [Clear](#) **non-redondant (non redondant)**

Organism [Clear](#)
 Infectious bursal disease virus (taxid:10995)
 Newcastle disease virus NDV (taxid:11176) **limiter le BLAST à la base de données suivante**
 avian influenza virus (taxid:11309)
 Avian infectious bronchitis virus (taxid:11120)
 Chicken anemia virus (taxid:12618)
 Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type. [Clear](#)
[Add more organisms](#)

Exclusion (optional) Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences [Clear](#)

Entrez query (optional) [Clear](#)

Primer specificity stringency Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end. [Clear](#)
 [Clear](#) **Ignorer les résultats montrant 4 mésappariements et plus**

Misprimed product size deviation [Clear](#)

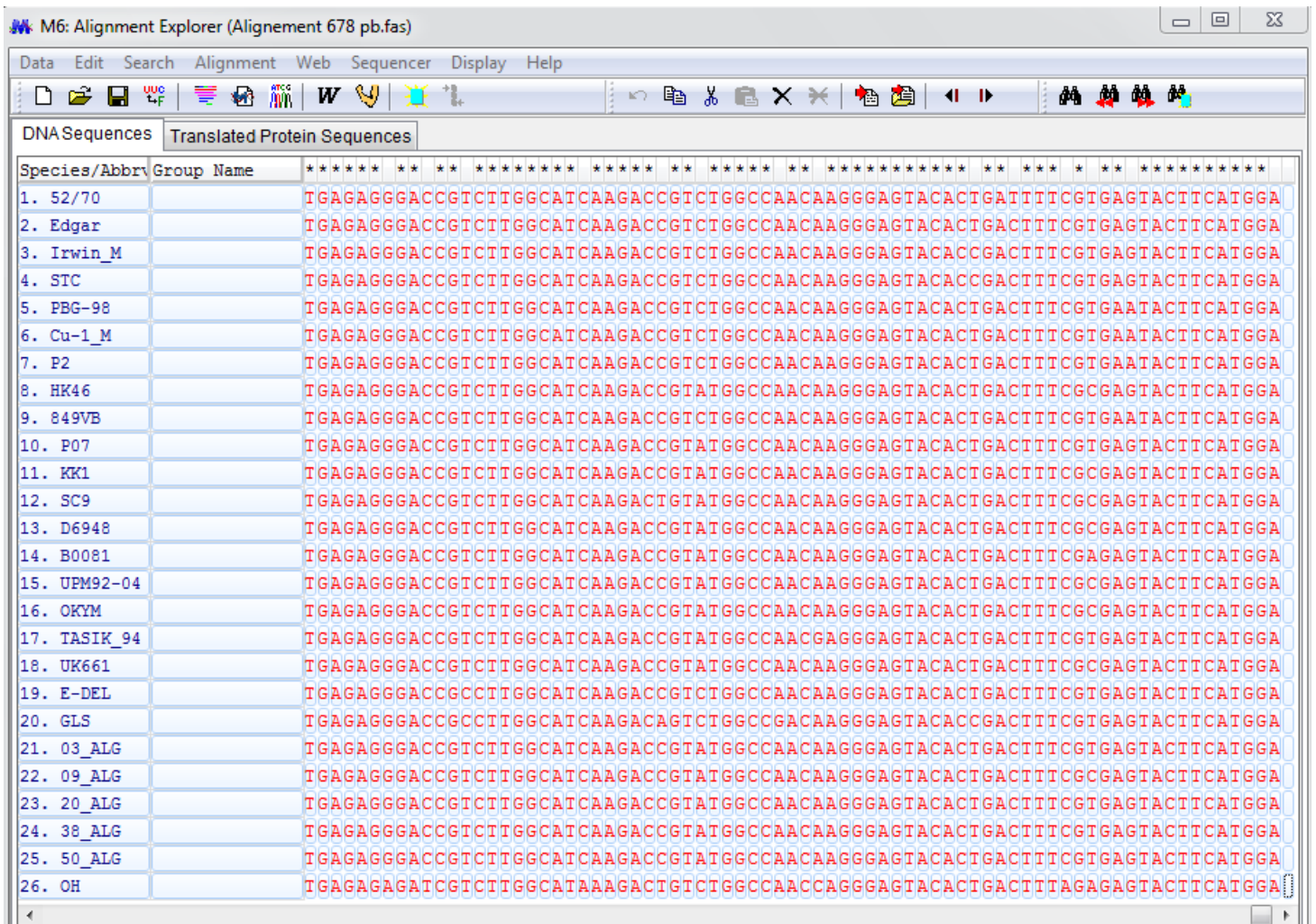
Splice variant handling Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) [Clear](#)

Get Primers Show results in a new window Use new graphic view [Clear](#)

[Advanced parameters](#) [Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow](#)

Annexe C

Interface du logiciel Mega 6.0.5
(Dédution des séquences d'acides aminés)



Annexe D

Interface du logiciel Geneious R7.1

The screenshot displays the Geneious R7.1 interface. At the top, the title bar reads "Geneious Trial 7.1.7 - 5 days 1 hour left". Below it is a menu bar (File, Edit, View, Tools, Sequence, Annotate & Predict, Help) and a toolbar with icons for navigation and analysis. A "Sources" panel on the left shows a tree view of local and shared databases. The main window is divided into two sections: a table of sequence alignments and a sequence viewer.

Name	Description	Organism	Sequence Le...	# Sequences	% Pairwise I...	% Identical ...	Max Sequen...	Min Sequenc...	Topology	Path
03	ALG	-	743	-	-	-	-	-	linear	C:\Use...
09	ALG	-	743	-	-	-	-	-	linear	C:\Use...
20	ALG	-	743	-	-	-	-	-	linear	C:\Use...
38	ALG	-	743	-	-	-	-	-	linear	C:\Use...
50	ALG	-	743	-	-	-	-	-	linear	C:\Use...
Alignment Nucleotides	Alignment of 18 sequences	-	678	18	96.2%	85.8%	678	678	linear	D:\DO...
Direction of 03 hv RefMT	-	-	-	5	-	-	354	39	-	-

The sequence viewer shows a DNA sequence with positions 1 to 743. The sequence is:

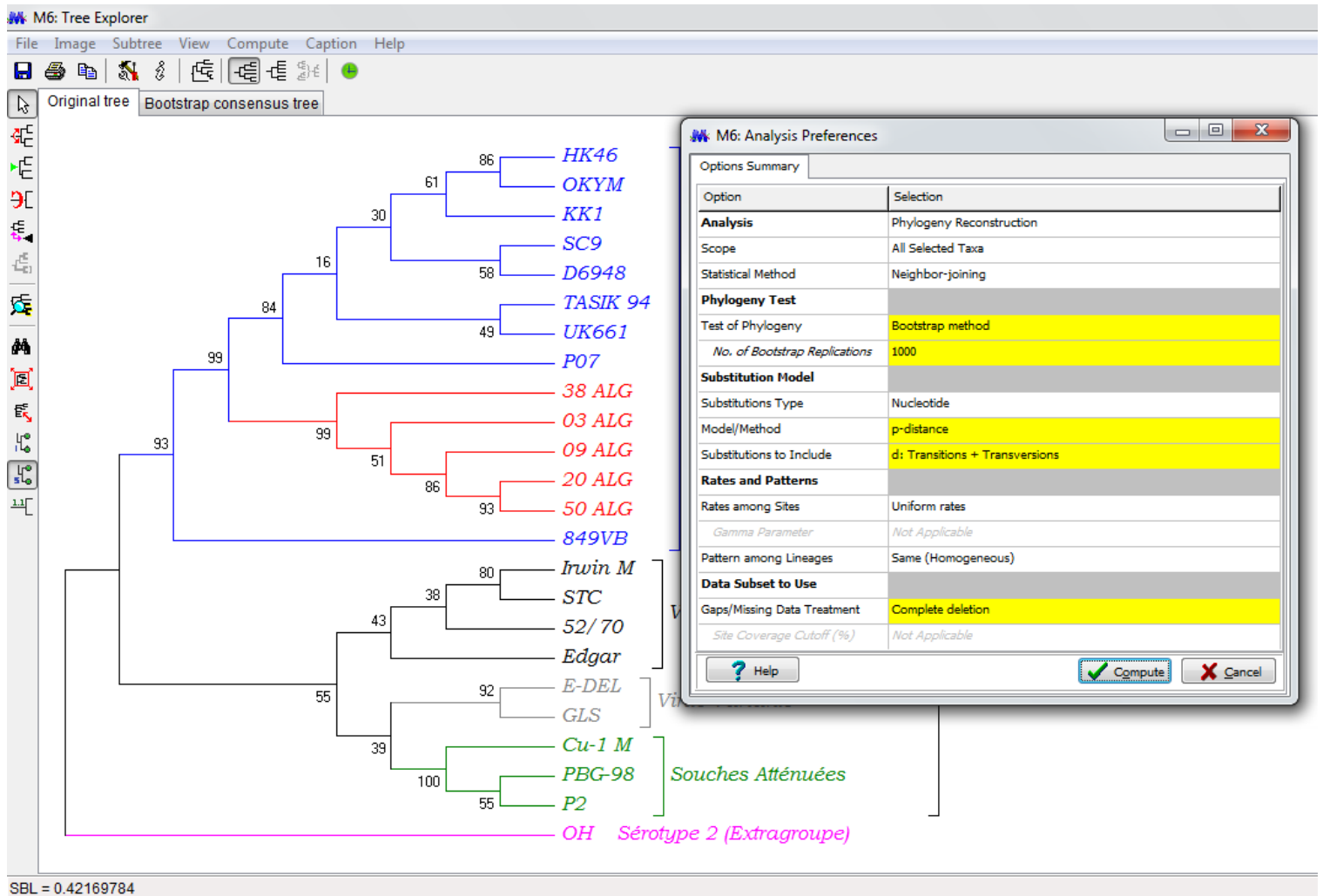

```

    1  GCCCAGAGTCTACACCAATAAATGTCAGCCGATGATTACCAATTTCATCACAGTACCAAGCAGGTGGGGTAAACAA
    80  TCACACGTGTTCTCAGCTAAATATTGATGCAATCACAAAGCCTCAGCATGGGGGAGAACTCGTGTTCAAACAAGC
    150  GTCCAAGGCCTTATACTGGGTGCTACCATCTACCTTATAGGCTTTGATGGGACTGCGGTAATCACCAGAGCTGT
    230  GGCCGCAGACAAATGGGC TAACGGCCGGCAC TGACAACCTTATGCCATTCAACATCGTGA TCCCAACCAGCGAGA
    300  TAACCCAGCCAA TAACATCCATCAAAC TGGAGA TAGTGACCTC TAAAAGTGGTGGCCAGGCAGGGGATCAGATG
    380  TCATGGTCAGCAAGCGGGAGCCTAGCAGTGACGATCCACGGTGGCAACTATCCAGGGGCCCTCCGTCCCCTCAC
    450  ACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGATCTGTCTGTTACGGTCCGCTGGGGTGAGCAACTTCGAGCTGATTC
    520  CAAAATCCTGAAC TAGCCAAGAACC TGGTCACAGAATACGGCCGATTTGACCAGGAGCCATGAAC TACACCAAA
    600  TTGATAC TGAGTGAGAGGGACCGTCTTGGCATCAAGACCGTATGGCCAAACAAGGGAGTACACTGACTTTCGTGA
    670  GTACTTCATGGAGGTGGCCGACCTCAACTCTCCCTGAAGATTCAGGAGCATTTGGCTTCAAAGACATAATCC
    743  GGG
    
```

On the right side, the "Restriction Analysis" panel is active, showing "Find Restriction Sites" with a list of 620 enzymes selected. The panel includes options for candidate enzymes, matching criteria, and cut frequency.

Annexe E

Interface du logiciel Mega 6.0.5
(Analyse phylogénétique)



Pourcentage de similitude entre souches virales des différents pathotypes

(Les % au-dessus et au-dessous de la diagonale représentent respectivement,

l'identité génétique (nucléotidique) et phénotypique (amino-acidique) que partagent les souches entre elles)

	52/70	Edgar	Irwin	STC	PBG98	Cu-1	P2	HK'46	849VB	P07	KKI	SC9	D6948	OKYM	TASIK	UK661	E-DEL	GLS	03	09	20	38	50	OH
52/70		97.3	98.4	97.8	96.5	96.5	96.8	95.0	95.4	95.6	95.0	95.3	95.7	95.1	95.0	95.6	96.6	96.2	95.7	95.1	95.4	95.3	95.3	78.3
Edgar	99,1		97.5	97.2	95.9	95.9	95.9	94.7	95.4	95.3	94.4	95.0	95.4	94.8	94.7	95.3	95.9	95.6	94.8	94.2	94.2	94.4	94.4	78.3
Irwin	100,0	99,1		98.8	97.1	97.1	97.3	95.1	95.6	95.7	95.1	95.4	95.9	95.3	95.4	95.7	96.5	96.6	95.9	95.3	95.3	95.4	95.4	78.8
STC	98,2	98,2	98,2		96.9	96.9	96.9	94.8	95.3	95.4	94.8	95.1	95.6	95.0	94.8	95.4	96.2	96.3	95.6	95.0	95.0	95.1	95.1	78.9
PBG-98	96,0	96,0	96,0	96,0		99.1	99.4	93.8	95.4	94.4	93.8	94.1	94.5	94.0	94.0	94.4	95.7	95.9	94.4	93.7	93.7	94.0	93.8	78.9
Cu-1	96,4	96,4	96,4	96,4	97,8		99.1	93.8	95.4	94.4	93.8	94.1	94.5	94.0	94.0	94.4	95.7	95.9	94.4	93.7	93.7	94.0	93.8	78.9
P2	96,9	96,0	96,9	96,0	98,2	97,78		94.1	95.7	94.7	94.1	94.4	94.8	94.2	94.2	94.7	96.0	96.2	94.7	94.0	94.0	94.2	94.1	79.4
HK46	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1		96.0	98.7	98.7	98.8	99.3	99.6	98.1	98.8	93.8	93.7	98.1	97.6	97.1	97.9	97.2	77.3
849VB	97,3	96,4	97,3	96,4	94,2	94,67	95,1	98,2		96.6	96.0	96.3	96.8	96.2	95.9	96.3	95.0	94.4	96.2	95.4	95.4	95.7	95.3	77.6
P07	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2		98.4	99.0	99.4	98.8	98.5	99.0	94.2	94.1	98.2	97.5	97.2	97.8	97.3	77.6
KKI	97,3	96,4	97,3	95,6	93,3	93,78	94,2	99,1	97,3	99,1		98.5	99.0	98.7	97.8	98.5	93.8	93.7	97.8	97.3	96.8	97.6	96.9	77.3
SC9	97,8	96,9	97,8	96,0	93,8	94,22	94,7	99,6	97,8	99,6	98,7		99.6	99.0	98.4	99.1	94.1	94.1	98.1	97.6	97.1	97.6	97.2	77.9
D6948	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2	100,0	99,1	99,6		99.4	98.8	99.6	94.5	94.4	98.5	98.1	97.5	98.1	97.6	77.7
OKYM	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2	100,0	99,1	99,6	100,0		98.2	99.0	94.0	93.8	97.9	97.5	96.9	97.8	97.1	77.1
TASIK	97,8	96,9	97,8	96,0	93,8	94,22	94,7	99,1	97,3	99,1	98,2	98,7	99,1	99,1		98.7	93.8	93.7	97.6	96.9	96.6	97.5	96.8	77.1
UK661	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2	100,0	99,1	99,6	100,0	100,0	99,1		94.4	94.2	98.1	97.6	97.1	97.9	97.2	77.7
E-DEL	96,0	95,1	96,0	95,1	94,2	94,22	95,1	94,7	94,7	94,7	93,8	94,2	94,7	94,7	94,2	94,7		96.8	94.2	93.7	94.0	93.8	93.8	77.6
GLS	96,0	95,1	96,0	95,1	96,0	96,00	96,9	94,7	94,7	94,7	93,8	94,2	94,7	94,7	94,2	94,7	96,4		94.1	93.4	93.4	93.7	93.5	77.3
03	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2	100,0	99,1	99,6	100,0	100,0	99,1	100,0	94,7	94,7		99.3	99.0	99.6	99.1	77.7
09	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2	100,0	99,1	99,6	100,0	100,0	99,1	100,0	94,7	94,7	100,0		99.0	98.8	99.1	77.6
20	98,7	97,8	98,7	96,9	94,7	95,11	95,6	99,6	98,7	99,6	98,7	99,1	99,6	99,6	98,7	99,6	95,1	95,1	99,6	99,6		98.5	99.3	77.7
38	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2	100,0	99,1	99,6	100,0	100,0	99,1	100,0	94,7	94,7	100,0	100,0	99,6		98.7	77.3
50	98,2	97,3	98,2	96,4	94,2	94,67	95,1	100,0	98,2	100,0	99,1	99,6	100,0	100,0	99,1	100,0	94,7	94,7	100,0	100,0	99,6	100,0		78.0
OH	79,6	79,6	79,6	80,9	79,1	79,11	80,0	79,1	78,7	79,1	79,1	79,1	79,1	79,1	78,7	79,1	77,8	79,1	79,1	79,1	78,7	79,1	79,1	