

SOMMAIRE

Table des illustrations	p. 18
Introduction	p. 20
Première partie : introduction bibliographique	p. 21
A - Étude bibliographique de la bronchite infectieuse aviaire	p. 22
1. Histoire	p. 22
2. Distribution et incidence	p. 22
3. Etiologie	p. 23
a. Classification	p. 23
b. Structure	p. 23
c. Réplication virale	p. 25
d. Diversité antigénique	p. 26
e. Propriétés physiques et chimiques	p. 27
f. Isolement et culture	p. 28
4. Pathogénèse	p. 30
a. Tropisme tissulaire	p. 30
b. Déterminants du pouvoir pathogène	p. 31
5. Épidémiologie	p. 32
a. Sources du virus	p. 32
b. Susceptibilité	p. 32
c. Transmission	p. 33
6. Pathogénicité	p. 33
a. Signes cliniques	p. 33
b. Réponse immunitaire	p. 35

i. Immunité active	p. 35
ii. Immunité passive	p. 36
c. Lésions	p. 36
i. Lésions macroscopiques	p. 36
ii. Lésions microscopiques	p. 36
7. Diagnostic	p. 37
a. Diagnostic clinique	p. 37
b. Isolement de l'agent	p. 37
i. Isolement du virus	p. 38
ii. Détection de l'IBV par immunomarquage, à l'aide d'anticorps spécifiques	p. 39
iii. Détection du génome viral	p. 39
c. Sérologie	p. 39
d. Diagnostic différentiel	p. 40
8. Traitement	p. 41
9. Prévention et contrôle	p. 41
a. Prophylaxie sanitaire	p. 41
b. Vaccination	p. 42
i. Importance de la vaccination	p. 42
ii. Les différents types de vaccins	p. 43
iii. Méthodes d'application des vaccins	p. 44
iv. Limites de la vaccination	p. 45
B - La souche Qu_MV au Québec	p. 47
1. Historique	p. 47
2. Facteurs viraux et facteurs de risques	p. 48
3. Sérotypie	p. 50

4. Gestion actuelle des variants émergents au Québec	p. 52
Deuxième partie : étude expérimentale	p. 53
A - Évaluation de la pathogénicité des souches virales Qu16 et Qu_MV	p. 54
1. Matériel et méthodes	p. 54
a. Protocole expérimental	p. 54
b. Virus challenge	p. 55
i. Culture virale	p. 55
ii. Titrage des solutions virales	p. 55
iii. Infections expérimentales	p. 56
c. Pathogénicité	p. 56
i. Signes cliniques	p. 56
ii. Lésions macroscopiques	p. 56
iii. Histologie	p. 57
d. Sérologie	p. 60
e. Analyses statistiques	p. 60
2. Résultats	p. 60
a. Signes cliniques	p. 60
b. Lésions macroscopiques	p. 60
c. Histologie	p. 60
d. Sérologie	p. 62
3. Discussion	p. 62
B - Évaluation de l'efficacité de vaccins commerciaux	p. 65
1. Matériel et méthodes	p. 65
a. Protocole expérimental	p. 65

b. Virus challenge	p. 66
i. Culture et titre de la solution virale	p. 66
ii. Infections expérimentales	p. 67
c. Vaccins	p. 67
i. Vaccins Mass/Conn	p. 67
ii. Vaccins Ark	p. 68
iii. Protocole de vaccination	p. 68
d. Pathogénicité	p. 69
i. Signes cliniques	p. 69
ii. Lésions macroscopiques	p. 69
iii. Histologie	p. 69
e. Sérologie	p. 69
f. Analyses statistiques	p. 70
2. Résultats	p. 70
a. Signes cliniques	p. 70
b. Lésions macroscopiques	p. 71
c. Histologie	p. 71
i. Protocole variants Mass/Conn	p. 71
ii. Protocole variant Ark	p. 73
d. Sérologie	p. 75
i. Protocole variants Mass/Conn	p. 75
ii. Protocole variant Ark	p. 78
3. Discussion	p. 81
C - Discussion finale	p. 86
Conclusion	p. 89

Références bibliographiques

p. 93

Liste des annexes

p. 99

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 :	Morphologie du virus du SARS	p. 24
Figure 2 :	Organisation génomique de l'IBV	p. 25
Figure 3 :	Analyses phylogénétiques des souches de BI à partir d'un séquençage du gène S1	p. 27
Figure 4 :	Lésions d'IBV sur des embryons de 17 jours 7 jours post-inoculation	p. 29
Figure 5 :	Prévalence de différents virus, déterminée par sérologie, au sein des élevages de poulets de chair	p. 49
Figure 6 :	Prévalence des différentes souches de bronchites au sein des élevages atteints	p. 49
Figure 7 :	Analyses phylogénétiques des souches de BI à partir d'un séquençage du gène S1	p. 51
Figure 8 :	Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau sain (score 0)	p. 58
Figure 9 :	Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau infecté (score 1)	p. 58
Figure 10 :	Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau infecté (score 2)	p. 59
Figure 11 :	Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau infecté (score 3)	p. 59
Figure 12 :	Evolution des titres moyens en anticorps, pour chaque groupe, après infection (protocole vaccination variants Mass/Conn)	p. 77
Figure 13 :	Evolution des titres moyens en anticorps, pour chaque groupe, après infection (protocole vaccination variant Ark)	p. 80
Tableau 1 :	Exemple de protocole de vaccination BI sur des poulettes futures pondeuses	p. 45
Tableau 2 :	Protections croisées observées chez des poulets Leghorn SPF vaccinés par une goutte intraoculaire à 2 et 3 semaines d'âge avec un vaccin vivant atténué d'IBV, puis infectés 4 semaines plus tard avec des souches homologues et hétérologues	p. 45
Tableau 3 :	Protocole expérimental, évaluation de la pathogénicité des souches virales Qu16 et Qu_MV	p. 54
Tableau 4 :	Scores lésionnels histologiques, évaluation de la pathogénicité des souches Qu16 et Qu_MV	p. 61
Tableau 5 :	Protocole expérimental, essai de vaccination variants Mass/Conn	p. 66
Tableau 6 :	Protocole expérimental, essai de vaccination variant Ark	p. 66
Tableau 7 :	Scores lésionnels à J4, J6 et J14 post-infection, protocole de vaccination variants Mass/Conn	p. 72
Tableau 8 :	Scores lésionnels à J4, J6 et J14 post-infection, protocole de vaccination variant Ark	p. 74
Tableau 9 :	Principales valeurs statistiques descriptives des titres en anticorps des oiseaux, protocole de vaccination variants Mass/Conn	p. 76

Tableau 10 :	Moyennes des titres en anticorps pour chaque groupe, protocole de vaccination variants Mass/Conn	p. 77
Tableau 11:	Principales valeurs statistiques descriptives des titres en anticorps des oiseaux, protocole de vaccination variant Ark	p. 79
Tableau 12 :	Moyennes des titres en anticorps pour chaque groupe, protocole de vaccination variant Ark	p. 80

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION

La production de poulet de chair est la plus importante production mondiale de volailles destinées à la consommation alimentaire. L'élevage industrialisé se pratique à travers le monde, pour une production mondiale annuelle de 86,2 millions de tonnes-équivalent-carcasse (tec) en 2007 (Office de l'élevage, 2008). Les Etats-Unis, la Chine, l'Union Européenne et le Brésil assurent à eux seuls les deux tiers de ces volumes. La production canadienne de poulet équivaut à environ 974 000 tec, alors que la production du Québec représente environ 265 000 tec en 2006 soit plus d'un quart de la production canadienne (Les Eleveurs de Volailles du Québec, 2008). Cette production animale intensive est assujettie à de nombreuses contraintes zootechniques et sanitaires, face auxquelles les vétérinaires avicoles se doivent d'être particulièrement vigilants.

C'est dans ce contexte que la bronchite infectieuse aviaire, maladie identifiée depuis longtemps en production de volailles, ré-émerge régulièrement en élevage, malgré des programmes de contrôles sanitaires et médicaux stricts. Ainsi, depuis 2002, de nouveaux variants de bronchite infectieuse aviaire ont été identifiés dans les élevages de poulets de chair au Québec. Jusque-là, aucune donnée sur l'efficacité de vaccins commerciaux contre ces variants de la maladie n'était disponible. Le but du travail qui fait l'objet de cette thèse était donc d'évaluer la protection vaccinale de divers vaccins commerciaux contre une épreuve avec ces variants québécois de bronchite infectieuse.

Dans un premier temps, une revue de la littérature présentera la bronchite infectieuse aviaire en élevage avicole, ainsi que sa maîtrise sanitaire et médicale. Par la suite sera détaillée l'importance des variants émergents de bronchite infectieuse au Québec, depuis leur découverte récente jusqu'aux modalités de gestion pratique en élevage.

Dans le cadre du travail expérimental, deux études se succèderont. Une première étude rapportera la pathogénicité des variants utilisés en infection expérimentale, à partir de données cliniques, histologiques et sérologiques recueillies. Une seconde partie traitera de la protection conférée par divers protocoles vaccinaux à des animaux soumis à une épreuve infectieuse, en se basant sur des recueils de données cliniques, histologiques, et sérologiques. Enfin, une dernière discussion synthétisera les résultats de notre étude afin d'en tirer les conclusions pratiques pour la gestion de ces variants de bronchite infectieuse au Québec.

Première Partie :
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

**La souche Qu_MV et son incidence en production avicole
au Québec**

A - Étude bibliographique de la bronchite infectieuse aviaire

1. Histoire

La bronchite infectieuse aviaire a pour la première fois été observée dans le Nord Dakota (Etats-Unis) en 1930. Initialement, cette maladie était décrite comme une atteinte respiratoire des jeunes poulets, d'où son nom. Ce n'est que plus tard qu'elle fut décrite sur des animaux âgés, notamment des poules pondeuses (Cavanagh, 1997). D'autres manifestations cliniques de la bronchite infectieuse furent décrites ultérieurement, telles que les chutes de pontes (années 40) ou des lésions rénales (années 60).

D'autres étapes importantes dans la découverte de la bronchite infectieuse ont eu lieu quelques années après la description de cette maladie. Ainsi l'étiologie virale a été décrite en 1936 (Beach et Schalm), les premières cultures sur œufs embryonnés ont été réussies en 1937 (Beaudette et Hudson). L'absence de protection croisée entre les souches pathogènes Massachusetts (découverte en 1941) et Connecticut (découverte en 1951) a été montrée en 1956 par Jungherr et ses collègues ; c'est la découverte de l'existence de plusieurs sérotypes du virus de la bronchite infectieuse.

2. Distribution et incidence

La bronchite infectieuse est une maladie à distribution mondiale. Aux Etats-Unis, plusieurs sérotypes, depuis l'historique Massachusetts (Mass) découvert en 1941, ont été identifiés depuis le début des années 50. Des souches du sérotype Mass ont été identifiées en Europe depuis les années 40. Bien d'autres sérotypes, différents de ceux découverts en Amérique du Nord, ont été isolés depuis en Afrique, Asie (Chine, Japon, Inde et Corée), Europe et Australie (Cavanagh, 1997).

Des émergences de bronchite infectieuse apparaissent régulièrement à travers le monde, même parmi des troupeaux vaccinés. Les souches virales isolées pour l'occasion sont le plus souvent, mais pas toujours, d'un sérotype distinct de celui du virus vaccinal.

Les conséquences désastreuses de la bronchite infectieuse sont de nature économique, non par pertes directes en élevage (mortalité), mais le plus souvent par pertes indirectes (diminution de la production d'œufs chez les poules pondeuses, retard de croissance ou saisies à l'abattoir chez les poulets de chair).

La bronchite infectieuse est une des maladies aviaires les plus problématiques en élevage, face à laquelle vétérinaires et éleveurs sont constamment vigilants.

3. Etiologie

a. Classification

Le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) appartient à la famille des *Coronaviridae* (virus à ARN). Cette famille est divisée en deux genres : le genre *Torovirus* et le genre *Coronavirus*.

Les coronavirus affectent de nombreuses espèces mammifères (virus de la Péritonite Infectieuse Féline, Virus du Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu « SARS » de l'Homme, virus de l'entérite transmissible du porc), et aviaires (Coronavirus de la dinde, du pigeon).

Ce genre est divisé en trois groupes, selon des critères historiquement antigéniques. Depuis, le séquençage du génome a confirmé cette classification. Ainsi, IBV appartient au Groupe 3, qui ne comprend que des coronavirus aviaires (Cavanagh, 2007).

b. Structure

L'IBV, comme tous les coronavirus, est un virus enveloppé, d'un diamètre d'environ 120 nm. Il comporte à sa surface de nombreux spicules (glycoprotéines S) de taille approchant les 20 nm. Cette structure en couronne a ainsi donné son nom au genre des coronavirus. Les particules virales (virions) se forment par bourgeonnement interne à la cellule à partir de membranes cellulaires, non pas par bourgeonnement externe.

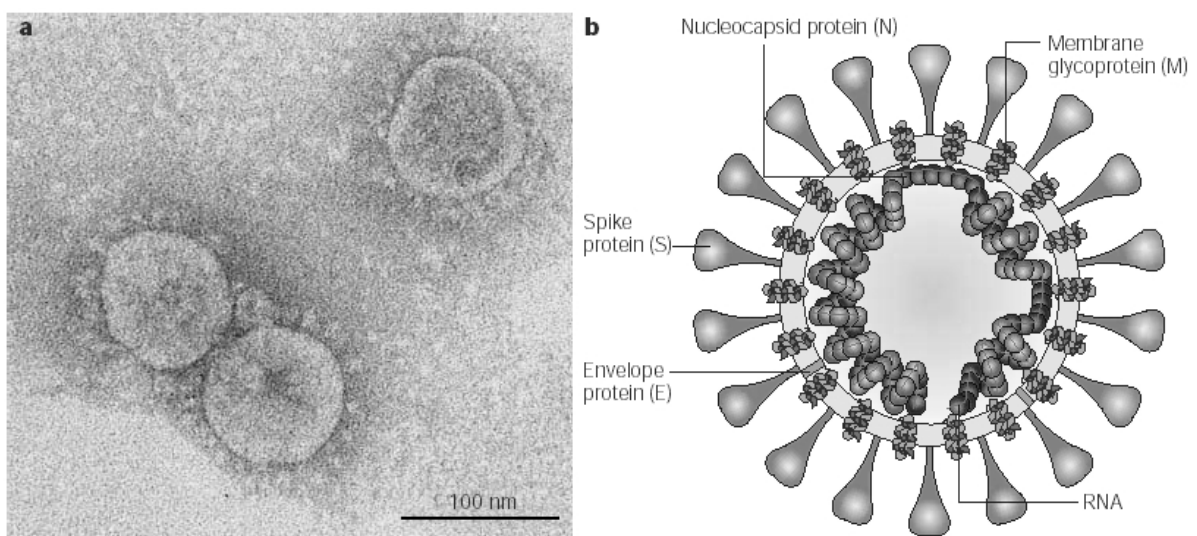
La protéine S est un dimère (parfois trimère) dont les sous-unités S1 (partie bulbair, environ 500 acides aminés) et S2 (ancrage dans la membrane du virion, environ 600 acides aminés) ont respectivement les fonctions d'attachement à la cellule cible, et de fusion des membranes lors de l'infection par le virus. La sous-unité S1 est responsable de l'induction de la réponse immunitaire de l'hôte ; synthèse d'anticorps neutralisant le virus et inhibant l'hémagglutination (Cavanagh, 2007).

Les coronavirus possèdent aussi un grand nombre de petites glycoprotéines intégrées à la membrane du virion (glycoprotéine M, environ 230 acides aminés), ainsi qu'un faible nombre de protéines non glycosylées de petites tailles et intégrées à l'enveloppe (protéine E, environ 100 acides aminés). Toutes ces protéines sont indispensables à la formation des particules virales lors d'une infection cellulaire. De plus, une protéine de nucléocapside (protéine N, environ 420 acides aminés), est étroitement liée à la molécule ARN du génome (Cavanagh, 2007).

Figure 1 : Morphologie du virus du SARS (d'après Stadler et al., 2003)

Image a : image par microscopie électronique du virus cultivé sur cellules Vero (image du Dr L. Kolesnikova, institut de Virology, Marburg, Allemagne)

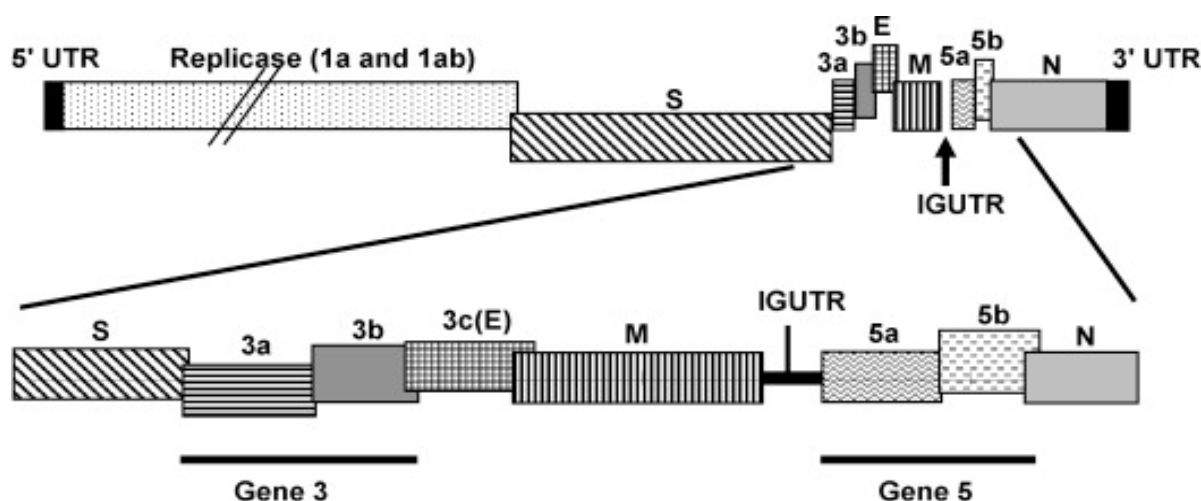
Image b : Représentation schématique du virus. La bicouche lipidique comprend les spicules protéiques (S). Les glycoprotéines membranaires (M) ainsi que les protéines d'enveloppe (E) protègent la nucléocapside protéique (N). Dans le cas des coronavirus, la membrane lipidique est dérivée de membranes intracellulaires.



Le génome des coronavirus est constitué d'une molécule d'ARN positif simple brin de 27000 à 30000 nucléotides (27,6 kb dans le cas de l'IBV), attribuant à ce virus de grandes capacités d'évolution, par mutation ou recombinaison (création de nouveaux sérotypes) (Kottier et al., 1995). L'organisation générale du génome des coronavirus est commune à tous les membres du genre, incluant le gène polymérase (ou gène 1) servant à la réplication, des gènes codant pour les protéines structurales (S,E,M et N), ainsi que quelques gènes (2 dans le cas d'IBV) codant pour des protéines non essentielles à la réplication mais probablement essentielles à l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (gènes 3 et 5). Deux régions UTR (*untranslated regions*) ne sont pas traduites lors de l'infection virale, et se situent en début et fin du génome (Cavanagh, 2007).

Figure 2 : Organisation génomique de l'IBV (d'après Cavanagh, 2007)

La partie supérieure du diagramme montre l'organisation générale du génome au sein duquel le gène polymérase représente environ deux tiers du génome. La partie inférieure du diagramme est un agrandissement. Le gène 3 code pour 3 protéines ; 3a, 3b de fonctions inconnues, et 3c (E) qui est une protéine structurale. Le gène 5 encode deux protéines ; 5a et 5b, de fonctions inconnues.



c. Réplication virale

Le virus de la bronchite infectieuse se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées. A chaque transcription du génome viral, de nouveaux ARN messagers sont produits. Les particules virales (virions) se forment par bourgeonnement de la membrane de l'endothélium réticulaire, et non à la surface cellulaire. Les virions s'accumulent dans de lisses vésicules avant d'être relargués hors de la cellule. Les nouveaux virions apparaissent environ 3 à 4 heures après le début de l'infection (Cavanagh, 1997).

d. Diversité antigénique

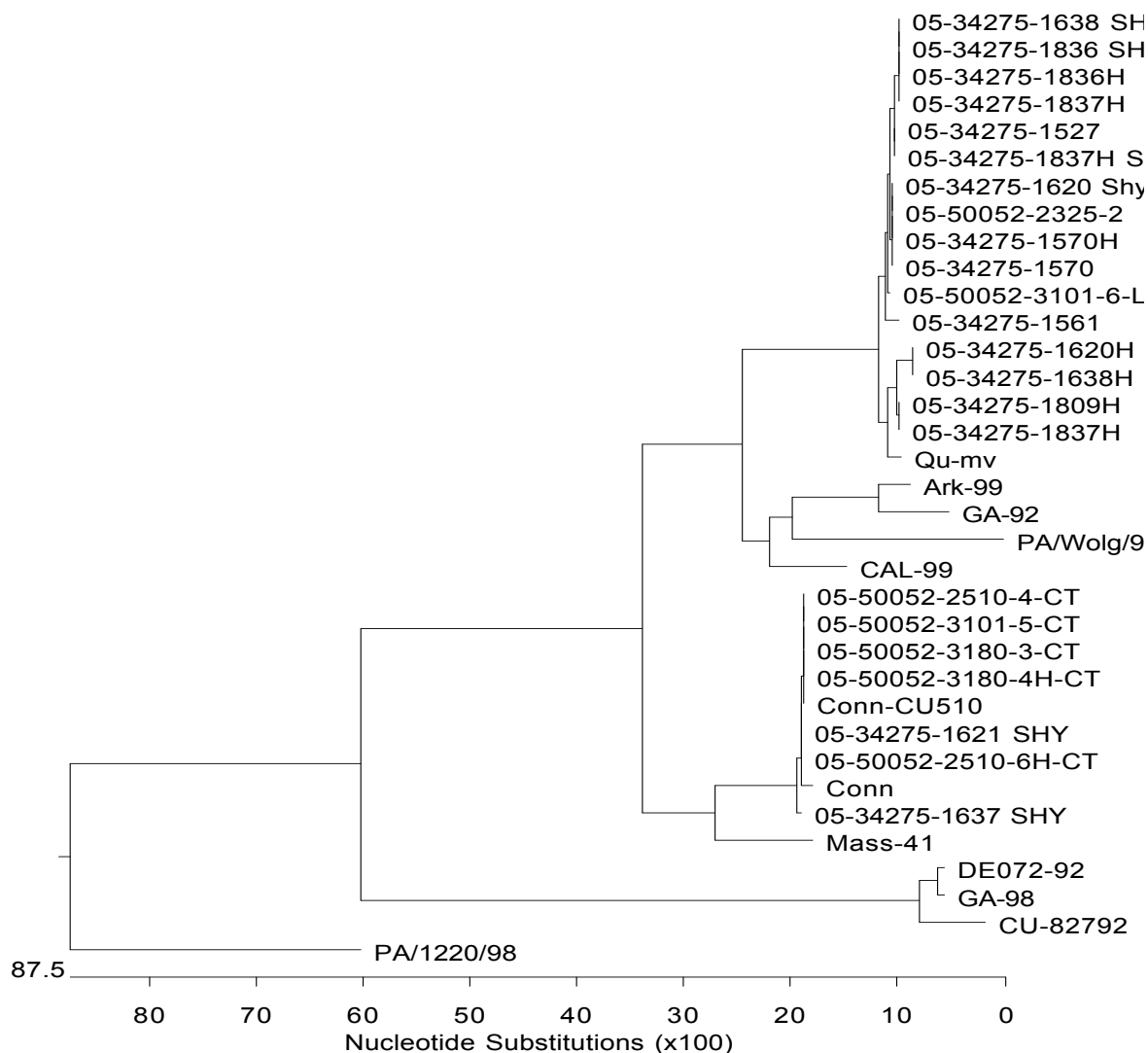
La création de nouveaux sérotypes peut s'opérer par mutation (mutations ponctuelles, délétions) ou par recombinaison sur le génome viral (si une cellule est infectée par deux souches différentes d'un même virus).

Actuellement, plus d'une douzaine de sérotypes de l'IBV sont reconnus (notamment par variations antigéniques de la protéine S). Les sérotypes les plus connus sont le sérotype historique Massachusetts, ainsi que les sérotypes Connecticut ou encore Arkansas. Toutefois, au sein d'un même sérotype, on observe l'existence de différentes souches, apparues par mutations ponctuelles sur le génome de l'IBV. Ainsi, par exemple, au sein du sérotype Massachusetts, on retrouve les souches H120 et Beaudette, fréquemment utilisées lors de vaccination.

Les outils modernes d'analyses moléculaires (RT-PCR suivie d'un séquençage) ont permis de confirmer la classification sérotypique basée sur l'antigénicité due à la protéine S. En effet, le séquençage du gène de la sous-unité S1 permet de caractériser un variant, et de le rapprocher phylogénétiquement des autres variants.

Figure 3 : Analyses phylogénétiques des souches de BI à partir d'un séquençage du gène S1 (d'après Smati et al., 2002)

Cette analyse montre les relations partielles entre les souches isolées au Québec (Qu_MV), et les souches de référence Massachusetts, Arkansas, Connecticut et DE072-92



e. Propriétés physiques et chimiques

La thermostabilité du virus est variable selon les sérotypes. L'IBV est en général inactivé en 15 min à 56°C, ou après 90 min à 45°C. Il est stable à 4°C après lyophilisation, ou à -30°C. Le virus n'est plus stable à des pH supérieurs à 8 ou inférieurs à 6, bien qu'une grande stabilité de certaines souches à pH 3 ait été mise en évidence. Enfin, celui-ci est sensible au traitement par l'éther, les désinfectants comme les solutions de crésyl, à 1% d'alcool à 70° et de formol à 1% pendant 3 min (Bruder, 1991).

Il a été rapporté que le virus était résistant dans l'environnement en moyenne pendant 56 jours en hiver, et 12 jours au printemps (Cavanagh, 1997). En pratique, on peut donc estimer que le virus sera résistant environ un mois dans un environnement de poulailler, permettant ainsi une large dissémination aux individus qui l'occupent. Le virus ne sera jamais totalement éliminé lors d'un protocole de désinfection classique en élevage, mais la charge virale d'un bâtiment en sera fortement diminuée. C'est pourquoi à la prophylaxie sanitaire (nettoyage et désinfection des bâtiments d'élevage) sera toujours idéalement pratiquée une prophylaxie médicale (vaccination des poulets), afin de prévenir au mieux une infection par IBV.

f. Isolement et culture

Le virus de la bronchite infectieuse aviaire se révèle difficile à cultiver. Il sera généralement isolé à partir d'échantillons de trachées, de poumons, de reins, ou encore de tonsilles caecales (amygdales caecales).

La culture sur œufs embryonnés SPF est le plus souvent utilisée, par inoculation d'un homogénat de tissus infectés dans le liquide allantoïdien à 10 jours d'âge. Lors des premiers passages, certains embryons infectés présentent des retards de croissance et une position recroquevillée au 19^{ème} jour, mais peu de mortalité. On peut aussi voir une diminution du volume du sac vitellin dont la membrane est affinée. A l'autopsie des embryons, on observe très souvent des dépôts d'urates sur les reins. Plus le nombre de passages sur œufs embryonnés augmente, plus le taux d'embryons mal formés et la mortalité augmentent. On obtient généralement 80% de mortalité au 20^{ème} jour d'incubation après 10 passages (Cavanagh, 1997).

Figure 4 : Lésions d'IBV sur des embryons de 17 jours 7 jours post-inoculation (d'après archives personnelles)

Comparaison entre un embryon normal (droite) et 2 embryons infectés (gauche). Les embryons infectés présentent un retard de croissance important.



La culture cellulaire de l'IBV est difficile à réaliser en pratique, et se déroule généralement sur des cellules rénales ou hépatiques d'embryons de poulets. Le temps minimal de production de virions est de 3 à 4h, mais les titres maximaux en virions sont atteints vers 14 à 36h (temps variable selon la souche d'IBV et la dose infectante). Toutefois ce titre viral est généralement 10 à 100 fois moins élevé que ceux susceptibles d'être obtenus par culture sur œufs embryonnés (Lukert, 1965). Les cellules rénales infectées commencent à former des syncytia dès 6h post-inoculation. Après 18 à 24h, les syncytia contiennent 20 à 40 noyaux et deviennent vacuolisés. Les noyaux sont pycnotiques.

4. Pathogénèse

a. Tropisme tissulaire

Le virus de la bronchite infectieuse aviaire infecte initialement les cellules ciliées et mucosales de l'appareil respiratoire supérieur. Le virus est majoritairement ré-isolé dans le système respiratoire supérieur (cavités nasales, trachées), à un titre maximum pendant 2 à 5 jours post infection (Ambali et Jones, 1990 ; Cavanagh, 2003). La persistance virale dans la trachée est variable selon les souches virales, et IBV peut être détecté jusqu'à 14 jours post infection (Ambali et Jones, 1990). L'IBV peut de plus être retrouvé dans les poumons et les sacs aériens (à de mêmes titres viraux). Ainsi l'IBV est responsable de la perte des cils des cellules de l'appareil respiratoire, voire de pneumonies peu sévères, secondairement suivies par des surinfections bactériennes, responsables directes du tableau pathologique.

L'IBV possède aussi un tropisme pour d'autres tissus non respiratoires : le rein, l'oviducte, le testicule, ainsi que certaines portions du tube digestif (œsophage, proventricule, duodénum, jéjunum, rectum, cloaque). Le virus peut être isolé dans les organes lymphoïdes : organes lymphoïdes primaires (bourse de Fabricius) et secondaires (glande de Harder, tonsilles caecales).

L'infection virale du tube digestif n'entraîne normalement pas de manifestation clinique. Les néphrites occasionnées par l'infection rénale de certains sérotypes d'IBV sont dues au tropisme pour les cellules épithéliales du bas de l'appareil rénal (tube contourné distal, tubules collecteurs, tubes collecteurs). L'infection de l'oviducte par l'IBV est responsable d'une diminution de la ponte.

Les titres en virus retrouvés dans chaque organe ne correspondent pas forcément avec la pathogénicité engendrée. Ainsi, une même souche répliquée à de mêmes titres dans la trachée et le rein peut n'entraîner qu'une trachéite sans néphrite (Ambali et Jones, 1990).

L'aptitude de l'IBV à se répliquer dans des cellules épithéliales de tissus respiratoires, entériques, rénales ou ovariens pourrait, entre autres, être due au fait que l'attachement de l'IBV à la cellule hôte est dépendant de la présence d'acide N-acétylneuraminique (acide sialique) à la surface de cette dernière (Cavanagh, 2007). De plus, si ce récepteur (ose à 10 atomes de carbone fréquemment rencontré dans les membranes cellulaires) présente une liaison $\alpha 2,3$ entre la fonction acide et le corps de l'oligo-saccharide, le tropisme de l'IBV pour la cellule est plus important (Winter et al., 2006).

b. Déterminants du pouvoir pathogène

Le déterminisme du pouvoir pathogène de l'IBV n'est pas encore clairement élucidé.

La protéine S semble être indispensable dans le déterminisme de celui-ci, probablement par reconnaissance spécifique de récepteurs de la cellule cible. Balesteros a montré qu'une différence d'un ou deux acides aminés dans la composition de la protéine S du coronavirus de l'entérite transmissible du porc, déterminait si celui-ci était ou non pathogène (Balesteros et al., 1997). De même Haijema a montré que l'inversion du gène de la protéine S du virus de l'hépatite de la souris (MHV) avec celui du coronavirus du chat, a permis de créer un virus capable de se répliquer dans les cellules de chats (Haijema et al., 2003). Toutefois, le rôle déterminant du pouvoir pathogène de la protéine S n'est pas encore totalement élucidé, et le fait de posséder une protéine S d'une souche pathogène ne semble pas être une condition suffisante pour exprimer un pouvoir pathogène.

Le rôle des protéines non structurales (3a, 3b, 5a, 5b) est encore non élucidé, mais il est possible que celles-ci soient, entre autre, responsables d'un contournement de l'immunité de l'hôte, et donc du pouvoir pathogène d'IBV. Cette hypothèse n'est encore qu'une pure conjecture (Cavanagh, 2007).

Enfin, la présence d'acide N-acétylneuraminique sur la membrane des cellules réceptrices semble être une condition favorable au tropisme du virion (*cf supra*).

5. Épidémiologie

a. Sources du virus

Les réservoirs du virus sont majoritairement les animaux infectés (malades ou porteurs sains), qui excrètent ce dernier par aérosols (jetage, toux) et par les fientes. L'excrétion virale par le jetage dure environ deux semaines, avec un taux maximal d'excrétion pour les oiseaux infectés à 2 semaines d'âge (Animas et al., 1994). L'excrétion fécale peut par contre durer jusqu'à 20 semaines. Le stress peut favoriser l'excrétion.

Etant donné que plusieurs variants peuvent circuler au sein d'une population, un oiseau peut-être contaminé plusieurs fois (en cas d'absence de protection vaccinale croisée), même durant une courte période d'élevage, multipliant alors les quantités de virus excrété dans l'environnement.

De plus, le virus étant résistant environ un mois dans un environnement de poulailler, le matériel d'élevage ainsi que la litière ou l'aliment peuvent devenir à leur tour des sources potentielles de virus.

b. Susceptibilité

Seul le genre *Gallus* est réceptif à l'IBV (Cavanagh, 2005). Les oiseaux de tous âges sont réceptifs, mais la sensibilité est plus grande chez les oiseaux jeunes (moins de 6 semaines), souvent en faveur d'un stress ou d'une immuno-dépression.

La morbidité est proche de 100%, la mortalité variable (faible pour les souches à tropisme respiratoire, plus forte pour les souches à tropisme rénal). Le stress peut favoriser la sensibilité, les oiseaux pouvant rester porteurs asymptomatiques. De nombreux autres facteurs (virulence de la souche d'IBV, statut immunitaire des oiseaux, présence d'immunité maternelle ou active, âge, surinfections bactériennes) influent sur la mortalité en élevage.

Il semble de plus que la susceptibilité à l'IBV varie selon la souche de poulets (Cook et al., 1990). Ces différences d'expression clinique de la bronchite, et de virémie induite par l'IBV, s'expliqueraient vraisemblablement par des variations de l'expression du CMH et

donc des réponses immunitaires, variables selon les souches de poulets (Bacon et al., 2004 ; Joiner et al., 2007).

c. Transmission

La transmission de l'IBV est extrêmement rapide au sein d'un troupeau (on considère qu'un bâtiment entier sera contaminé en 48h) et entre les bâtiments d'un même élevage.

La transmission horizontale directe par voie respiratoire est la transmission la plus importante. Une transmission horizontale indirecte est possible par une eau, une alimentation ou du matériel d'élevage contaminés.

Il n'y a pas de transmission verticale rapportée. Bien que certains faits aient montré la présence d'IBV dans des œufs pondus jusqu'à 43 jours après la guérison clinique des reproducteurs, l'incubation d'œufs issus de reproducteurs infectés permet d'obtenir des poussins viables et indemnes d'IBV (Cavanagh, 1997).

La transmission vectorielle de la bronchite infectieuse n'a jamais été démontrée.

6. Pathogénicité

a. Signes cliniques

La période moyenne d'incubation de la bronchite infectieuse est de 18 à 36h, variant selon la dose infectante, la voie d'inoculation, la souche, et l'état général de l'animal.

Les signes cliniques dépendent du variant viral de IBV et de son tropisme. Souvent, il y a peu de signes cliniques et les animaux guérissent spontanément. Les signes sont les plus sévères chez les jeunes, avec une mortalité d'origine primaire. Chez les adultes, la mortalité est souvent due à des infections secondaires.

Les signes cliniques généraux sont peu spécifiques de la bronchite infectieuse ; prostration, frilosité, léthargie, retard de croissance, oiseaux ébouriffés, yeux humides (conjonctivite séreuse).

Les signes respiratoires sont généralement de la toux, des râles trachéaux, des éternuements, des écoulements nasaux séro-muqueux jamais hémorragiques, parfois des sinus enflés.

Les signes d'une atteinte de l'appareil reproducteur (souvent chez les pondeuses et les reproductrices) sont une chute de ponte (10 à 50%) et une altération des œufs (déformation de la coquille, minceur de la coquille, liquéfaction de l'albumen). Chez les futures reproductrices ou futures pondeuses (de moins de 2 semaines d'âge), le passage de l'IBV bloque définitivement le développement anatomique de la grappe ovarienne, créant ainsi de « fausses pondeuses ». Le passage de BI en début de ponte provoque une légère chute de ponte qui retourne à la normale en quelques semaines. La maladie en fin de ponte entraîne un arrêt irréversible de celle-ci.

De plus, de récents travaux (Villarreal et al., 2007) ont montré la possibilité du virus de l'IBV de se répliquer aussi dans les cellules ciliées des voies séminifères (*rete testis*, épидидyme) des testicules de coqs. Cette atteinte serait ainsi à l'origine d'une formation de calculs dans l'épididyme, causant une réduction de fertilité chez ces coqs.

En cas d'atteinte rénale, une insuffisance rénale (avec dépression, mortalité, soif intense, fécès humides) se met en place. La mortalité est plus importante lors d'une atteinte rénale.

Enfin, l'IBV est un des virus suspectés (avec le virus de la bursite infectieuse, des adénovirus ou des réovirus) d'être responsable de proventriculite chez le poulet de chair. IBV a été détecté par PCR dans des broyats de proventricule issus d'animaux d'élevage présentant des signes cliniques, et l'inoculation expérimentale (par gavage) de ces broyats, à des poulets SPF, a recréé une proventriculite chez les oiseaux (Pantin-Jackwood et al., 2005). Dans ce cas, les oiseaux présentent un proventricule distendu, épaissi et atonique. Ce phénomène est responsable, entre autre, de ruptures accidentelles du proventricule lors de l'éviscération des oiseaux à l'abattoir, causant la condamnation de la carcasse.

b. Réponse immunitaire

i. Immunité active

La réponse immunitaire active lors d'atteinte d'animaux par l'IBV est de type humoral, par synthèse d'anticorps IgM (locaux) puis IgG (systémiques). On observe aussi l'intervention de lymphocytes T cytotoxiques (LTC) et d'interférons.

Des oiseaux ayant été naturellement infectés par l'IBV et ayant guéri deviennent résistants à une infection par le même virus (protection homologue), mais la protection vis à vis d'autres variants viraux d'IBV varie et est peu prévisible (protection hétérologue).

La réponse humorale est la plus étudiée lors d'une infection par IBV, de par son utilité lors de la mesure du taux d'anticorps pour contrôler l'efficacité d'une vaccination (cinétique sérologique) ou pour le diagnostic de la maladie. Les taux d'anticorps, le plus souvent sériques mais aussi locaux, sont évalués par ELISA, neutralisation virale (VN) ou inhibition de l'hémagglutination. Toutefois le taux d'anticorps sériques ne correspond pas à un niveau de protection (d'où l'importance d'une cinétique sérologique) (Cavanagh, 1997). Lors d'une primo-vaccination par un virus vivant atténué, un pic d'IgM est d'abord observé (Martins et al., 1991), suivi d'un pic d'IgG puis un déclin des deux réponses. Lors d'une vaccination de rappel, ou lors d'une infection, les deux taux d'anticorps s'élèvent en même temps, mais les taux d'IgG persistent plus longtemps, apportant à l'animal une protection vaccinale durable.

La réponse à médiation cellulaire implique majoritairement l'intervention de LTC. L'apparition de cette réponse corrèle généralement avec la réduction de l'infection et des signes cliniques (Collisson et al., 2000). La lyse des cellules infectées est majoritairement induite par des LTC CD₈⁺ et CD₄⁺.

Enfin, des interférons sont aussi détectés lors d'une infection par IBV. Ces interférons sont majoritairement détectés dans la trachée et les poumons et, à de plus faibles niveaux, dans le plasma, le foie, les reins ou la rate (Otsuki et al., 1987). *In vitro*, les interférons réduisent la réplication de l'IBV sur des cultures de cellules de reins de poulets. *In vivo*, l'injection intraveineuse d'interférons retarde l'apparition et la sévérité des signes cliniques de poulets infectés (Cavanagh, 2007).

ii. Immunité passive

Les anticorps d'origine maternels (AOM) peuvent réduire à la fois la sévérité d'une réaction vaccinale et l'efficacité d'un vaccin si le vaccin est le même que celui utilisé chez les reproducteurs (Klieve et Cumming, 1988). En dépit de cela, la vaccination à un jour des poussins issus de troupeaux reproducteurs vaccinés est pratiquée, pour permettre de protéger les poussins quand ce taux d'AOM aura chuté. En effet, lors de la vaccination à un jour des poussins, le virus vaccinal atténué est généralement distribué par aérosol, stimulant ainsi l'immunité locale (bronches, narines, yeux) et la synthèse d'IgM qui n'interfèrent pas avec les anticorps d'origine maternels (IgG) systémiques.

c. Lésions

i. Lésions macroscopiques

Les poulets infectés présentent des exsudats séreux, catarrhaux ou caséux dans la trachée. Les sacs aériens peuvent apparaître troubles ou contenir un exsudat caséux jaune (fibrine) en cas de surinfection bactérienne. De petites zones de pneumonie peuvent être observées autour des bronches larges. Des souches néphropathogènes d'IBV induisent des reins hypertrophiés et décolorés, les tubules et les uretères étant souvent distendus par des cristaux d'urates. Des poules atteintes dans leur jeune âge par une souche à tropisme génital peuvent présenter une absence de développement de l'oviducte, invisible cliniquement en pré-ponte. Elles deviendront des « fausses pondeuses ».

ii. Lésions microscopiques

La trachée d'un animal atteint de la bronchite infectieuse présente une muqueuse œdémateuse. On observe une stase des cils de l'épithélium de la muqueuse, parfois une desquamation de celui-ci, ainsi qu'une infiltration hétérophilique et lymphocytaire de cette dernière dès 18h post infection (Cavanagh, 1997). La régénération de l'épithélium se met en place dès 48h, et l'hyperplasie induite est suivie d'infiltrations massives de la lamina propria par des cellules lymphoïdes (Riddell, 2001).

Si les sacs aériens sont touchés, on observe de l'œdème, une desquamation des cellules épithéliales, et un exsudat fibrineux dès 24h. On peut aussi observer un nombre important d'hétérophiles, ainsi qu'une prolifération de fibroblastes et une régénération de l'épithélium par des cellules cuboïdales (Riddell, 2001).

Les lésions rénales de l'IBV sont principalement celles d'une néphrite interstitielle. Le virus cause une dégénérescence granulaire, une vacuolisation et une desquamation de l'épithélium tubulaire. Une infiltration massive par des hétérophiles dans les espaces interstitiels est observée lors de la phase aiguë de la maladie. En cas d'urolithiase, les uretères sont distendus et contiennent le plus souvent des cristaux d'urate (Riddell, 2001).

Une infection de l'oviducte par l'IBV engendre une décilitation des cellules épithéliales et une dilatation des glandes tubulaires. On observe une infiltration de la muqueuse par des lymphocytes et des hétérophiles, ainsi qu'un œdème et une fibroplasie de celle-ci, sur toute la longueur de l'oviducte.

7. Diagnostic

a. Diagnostic clinique

Les signes cliniques généraux ne sont pas spécifiques de la bronchite infectieuse. De même, les signes locaux (respiratoires, urinaires ou génitaux) sont évocateurs mais jamais suffisants pour affirmer le diagnostic. Le contexte épidémiologique (réalisation de la vaccination, prévalence de la maladie sur le terrain, âge des animaux) devra aider à suspecter la bronchite infectieuse.

b. Isolement de l'agent

Lors de la recherche de l'agent infectieux, il faudra toujours prendre en compte le temps écoulé entre le moment potentiel de l'infection et/ou de la vaccination et la récolte de l'échantillon, de même que le statut immunitaire des oiseaux au moment de l'infection et de l'échantillonnage.

i. Isolement du virus

La trachée est la première cible de l'IBV et, par conséquent, le site d'échantillonnage par excellence, surtout pendant la première semaine d'infection. Les échantillons peuvent être des écouvillons trachéaux ou des prélèvements *post-mortem*. Lors d'une infection individuelle, le titre infectieux en IBV est maximal dans la trachée au 5^{ème} jour post infection, date après laquelle il diminue rapidement. Des échantillons cloacaux, ou des prélèvements de tonsilles caecales peuvent être toutefois utiles dans les cas où l'infection remonterait à plus d'une semaine. De plus, il est montré que le virus persiste dans des tissus non respiratoires, dont le rein. Ainsi des prélèvements de poumons, reins et oviductes peuvent se montrer utiles selon l'historique de l'infection.

La conservation des prélèvements réalisés sur les animaux se fait en milieu réfrigéré (3 à 7°C), ou idéalement congelé, enrichi en pénicilline (10.000 UI/ml) et streptomycine (10 mg/ml) (Gough et Alexander, 2005). De nouveaux milieux de transports adaptés à la conservation du liquide allantoïdien ont été développés (FTA[®] cards, papiers filtres) permettant de conserver le génome viral (tout en inactivant le virus, ce qui garantit la biosécurité) jusqu'à 15 jours à 41°C, favorisant ainsi les envois de longue distance pour des diagnostics de laboratoire (Moscoso et al., 2005).

Les échantillons sont inoculés dans des œufs embryonnés ou sur des cultures cellulaires de trachée. Les fluides récoltés sont repassés plusieurs fois en culture. L'observation d'une mortalité, de lésions embryonnaires, ou de ciliostase sur les cultures trachéales sont signes de présence d'IBV. Toutefois ces observations ne sont pas suffisantes et devront toujours être complétées par la clinique, l'épidémiologie, ainsi que par d'autres techniques de laboratoire.

ii. Détection de l'IBV par immunomarquage, à l'aide d'anticorps spécifiques

La détection de l'IBV peut être réalisée par immunofluorescence directe au moyen d'anticorps monoclonaux. Les prélèvements sont alors des coupes de trachées d'oiseaux infectés. Il est à noter que cette méthode est peu spécifique, et que ses résultats sont à interpréter avec précaution. Toutefois, l'intérêt de cette méthode est qu'elle peut permettre l'identification de certains sérotypes d'IBV au moyen d'anticorps spécifiques (Ignjatovic et Ashton, 1996).

iii. Détection du génome viral

La détection du génome viral peut être réalisée par amplification de segments de ce dernier, au moyen de la RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction). Cette technique est effectuée à partir de prélèvements trachéaux, rénaux ou cloacaux. La sensibilité de cette technique permet de détecter le virus dès 4 jours post-infection. Les segments amplifiés sont généralement des fragments du gène de la protéine N ou de la protéine S. La sensibilité de cette technique peut être augmentée par culture préalable du virus sur œufs embryonnés. De même, la PCR nichée permet d'augmenter la sensibilité du test, mais est rarement réalisée en pratique pour des raisons de coût.

c. Sérologie

La multiplicité des sérotypes d'IBV et les variations antigéniques de celui-ci compliquent la sélection de techniques sérologiques appropriées, et leur interprétation. Tous les sérotypes d'IBV possèdent des épitopes communs, ce qui est essentiellement expliqué par la conservation antigénique des protéines N, M, ou de la fraction S2 de la protéine S. Mais il existe aussi des anticorps spécifiques à un sérotype d'IBV, déterminés par les épitopes de la protéine S1.

Toutefois, les tests ELISA classiques, les tests d'immunofluorescence ou encore d'immunodiffusion lient un anticorps à des antigènes généralement non spécifiques d'une souche virale. Il existe des réactions croisées entre ces souches virales, ce qui fait qu'il est généralement difficile de les distinguer par sérologie.

De plus, une méthode de diagnostic sérologique par hémagglutination a récemment été mise au point (Ruano et al., 2000). Initialement, l'IBV ne possède pas des propriétés hémagglutinantes, mais, après un traitement du virus à la neuraminidase, ce dernier devient apte à se lier aux érythrocytes. Cette méthode permet de titrer le virus par dilution de l'échantillon à tester, sans pour autant estimer la pathogénicité de celui-ci (*cf infra*).

C'est pourquoi la sérologie sera majoritairement réalisée pour effectuer un suivi de vaccination au sein d'un troupeau, pour effectuer un dépistage de bronchite infectieuse, mais ne sera pas assez précise pour typer le variant circulant d'IBV. Les tests commerciaux ELISA peuvent détecter un passage viral dès une semaine post-infection. En général, deux sérologies sont effectuées ; une lors des premiers signes d'infection et la seconde 10 à 14 jours plus tard. Le faible coût, la simplicité et la rapidité des tests sérologiques en font qu'ils sont largement utilisés comme diagnostic de routine.

d. Diagnostic différentiel

Les symptômes respiratoires de la bronchite infectieuse peuvent ressembler à ceux d'autres maladies respiratoires aiguës, telles que la maladie de Newcastle (ND), la laryngotrachéite (LTI) ou le coryza infectieux (*Avibacterium paragallinarum*). Cependant, des signes nerveux sont souvent observés lors du passage d'une souche virulente de ND et, chez les poules pondeuses, la chute de ponte observée est généralement plus importante que celle observée lors d'une bronchite infectieuse. La LTI tend en général à se propager plus lentement au sein d'un troupeau (herpèsvirus), et les signes respiratoires peuvent être aussi importants, voire plus sévères (trachéite hémorragique), que lors d'une bronchite infectieuse. Le coryza infectieux, devenu très rare dans les pays développés, peut être différencié par la présence d'un gonflement de la tête (par gonflement des sinus infra-orbitaires), ce qui arrive rarement lors d'une bronchite infectieuse.

Enfin, la chute de ponte et les déformations de coquille induites par la BI sont généralement comparables à celles induites par le passage du syndrome chute de ponte EDS 76 (adénovirus), mais on peut noter que la qualité de l'intérieur de l'œuf (albumen) est généralement peu altérée lors d'EDS 76.

8. Traitement

Comme pour beaucoup de maladies virales, il n'existe pas de traitement spécifique à la bronchite infectieuse. Des mesures non spécifiques permettent d'améliorer le confort des oiseaux ; réchauffer les animaux, diminuer la densité d'élevage, stimuler la prise alimentaire, si nécessaire améliorer la ventilation.

Un traitement antibiotique permet de prévenir les surinfections bactériennes (notamment l'aérosacculite). Des compléments en électrolytes distribués dans l'eau de boisson sont recommandés pour compenser les pertes sodiques et potassiques engendrées par des souches néphropathogènes d'IBV.

Après un passage d'IBV dans un élevage, il sera recommandé à l'éleveur d'effectuer un protocole de nettoyage/désinfection rigoureux du bâtiment et du matériel d'élevage, qui permettra, à défaut d'éliminer le virus de l'élevage, d'en diminuer la prévalence.

Il faudra dans la mesure du possible essayer d'expliquer les raisons de l'émergence de la bronchite infectieuse dans cet élevage ; déficience des pratiques de biosécurité, protocoles de vaccinations, statut sanitaire des poussins, ou émergence d'un nouveau variant.

9. Prévention et contrôle

a. Prophylaxie sanitaire

Le virus de la bronchite infectieuse étant très contagieux, de par sa résistance dans l'environnement et la susceptibilité des oiseaux, les mesures de biosécurité dans l'élevage sont à appliquer avec rigueur. Il sera toujours utile de contrôler, lors de la visite d'un élevage, l'application de ces pratiques par l'éleveur ; protection de l'accès au site, tenues vestimentaires (incluant la gestion des bottes entre les bâtiments), désinfection des bâtiments, conduite en bandes d'âge unique...

Ces mesures de biosécurité ne sont évidemment pas spécifiques à la bronchite infectieuse, et pourront prévenir les surinfections bactériennes à craindre lors d'un tel passage viral.

b. Vaccination

i. Importance de la vaccination

La gestion sanitaire idéale d'un élevage de volailles impliquerait, pour prévenir une infection virale contagieuse, un fonctionnement en bande unique, des mesures de confinement drastiques, une même origine des animaux et des protocoles de désinfection des bâtiments rigoureux. Toutefois, ces pratiques idéales étant illusoires, seule la vaccination a permis le contrôle de la bronchite infectieuse dans les élevages intensifs de poulets de chair, de pondeuses, ou de reproducteurs.

Les intérêts de l'utilisation de vaccins sont multiples. En effet, les vaccins induisent une réaction immunitaire de l'hôte et donc, par conséquent, réduisent sa sensibilité à un agent infectieux (si la souche de celui-ci est identique ou proche du variant vaccinal). En conséquence, la vaccination diminue directement les effets pathogéniques du virus de l'IBV, et minimise la susceptibilité de l'oiseau à des surinfections secondaires possibles. De plus, les vaccins permettent de diminuer la réplication d'un virus infectieux chez un animal infecté, et de réduire significativement l'excrétion fécale et respiratoire d'un virus infectieux (De Wit et al., 1998).

Toutefois, si l'utilisation de vaccins permet de réduire l'expression de la maladie, ils n'empêchent pas l'infection. Ceci signifie donc qu'une circulation d'IBV sera possible au sein d'un troupeau vacciné, sans expression de signes cliniques.

La protection de l'appareil respiratoire est usuellement étudiée après une infection par la bronchite aviaire, lors de l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin (*cf infra*). Les méthodes d'infection sont entre autre trachéale, intranasale, ou par une goutte dans l'œil (Cavanagh, 1997). L'impossibilité de réisoler l'IBV depuis la trachée 4 à 5 jours post infection a été utilisée comme un critère d'immunité (Hofstad, 1981 ; Gelb et al., 2005). Des évaluations plus poussées de la protection vaccinales peuvent inclure l'impossibilité de réisoler le virus depuis le rein (Khuan-Yu et al., 2005 ; Liu et al., 2007) ou l'oviducte, l'absence de signes cliniques de bronchite (Jackwood et al., 2007), l'absence de lésions trachéales (Martin et al., 2007 ; Jackwood et al., 2007), la présence d'une activité ciliaire trachéale normale (Barnes, 2008, communication personnelle).

Une approche alternative de l'évaluation de la protection de poulets vaccinés est le challenge d'animaux avec un mélange d'IBV et d'*E. coli*. Cette méthode a montré une plus grande protection croisée que les autres études se basant uniquement sur l'immunité trachéale (Cook et al., 1986).

ii. Les différents types de vaccins

Le contrôle vaccinal de la bronchite infectieuse aviaire implique à la fois l'usage de vaccins vivants atténués et de vaccins inactivés. Les vaccins vivants sont employés pour les poulets de chair et pour les primo-vaccinations des animaux à vie longue (reproducteurs, pondeuses). Les vaccins inactivés, à adjuvants huileux, sont utilisés chez les reproducteurs et les pondeuses avant l'entrée en ponte. Les vaccins atténués permettent une mise en place rapide de l'immunité (d'abord locale puis systémique), mais qui décline dès 9 semaines après la vaccination (Cavanagh, 2007), alors que les vaccins inactivés procurent une immunité durable (et une synthèse d'anticorps systémiques que la poule reproductrice pourra transmettre au poussin).

Les souches virales utilisées pour les vaccins vivants sont fréquemment atténuées par plusieurs passages sur œufs embryonnés (Bilenga et al., 2004). Toutefois, un trop grand nombre de passage peut diminuer l'immunogénicité, voire en augmenter la pathogénicité. On peut ainsi aisément comprendre le potentiel d'augmentation de la virulence d'une souche vaccinale atténuée circulant dans un troupeau.

Les variants employés pour une vaccination dépendent majoritairement des variants circulant dans l'environnement de l'élevage. Le sérotype Massachusetts est communément utilisé à travers le monde, au moyen de souches telles que H120 ou M41 notamment, de même que le sérotype Connecticut. Aux Etats-Unis, la souche Arkansas est largement utilisée, alors qu'en Europe, les sérotypes 4/91 ou D274 sont plus fréquemment employés.

De récentes théories (Nix et al., 2000) suggèrent que des variants du sérotype Ark ont pu faire apparition aux Etats-Unis dans des régions (Delaware, Maryland et Virginia) où la vaccination Ark ne serait pas effectuée dans tous les élevages. Cette sélection aurait fait émerger au sein d'élevages de poulets, des populations mineures de variants virulents apparues à partir de vaccins vivants atténués. Les auteurs préconisent que les vaccins Ark devraient être utilisés par tous les éleveurs et toute l'année, et non occasionnellement, afin d'éviter que des sous-populations de souches virulentes apparaissent.

iii. Méthodes d'application des vaccins

Les vaccins vivants atténués sont administrés expérimentalement par dépôt d'une goutte de solution vaccinale par voie intranasale, intraoculaire ou intratrachéale. Une méthode d'injection dans des embryons a été testée expérimentalement. En pratique, les poulets sont vaccinés par nébulisation d'une solution en aérosol, ou par l'eau de boisson. L'administration par aérosol est largement répandue pour les poulets de un jour au couvoir. Il est à noter que la vaccination n'est pas toujours uniforme sur l'ensemble du lot, et que les méthodes par aérosols peuvent causer quelques réactions respiratoires sévères chez les poussins quelques jours après vaccination. L'administration via l'eau de boisson est pratiquée en élevage. Les vaccins sont parfois dans ces cas susceptibles d'être détruits par les agents désinfectants chimiques utilisés dans l'eau (ions chlorures). Il est alors nécessaire à l'éleveur d'arrêter l'utilisation de ces désinfectants pendant la vaccination, voire parfois de rajouter de la poudre de lait ou du thiosulfate de sodium à l'eau de boisson pour stabiliser la suspension vaccinale.

Les vaccins inactivés requièrent d'être injectés individuellement (par voie intramusculaire). Cette vaccination est généralement réalisée quelques semaines avant l'entrée en ponte, en rappel d'un programme vaccinal basé sur les vaccins atténués.

Usuellement, tous les animaux sont vaccinés par nébulisation (vaccin vivant) à un jour d'âge au couvoir (le plus souvent avec la souche H120). Compte tenu de l'hétérogénéité de la réponse immunitaire des animaux (hétérogénéité de taille, anticorps d'origine maternelle), une seconde vaccination avec un vaccin vivant (par nébulisation ou dans l'eau de boisson en élevage) sera nécessaire vers 2-3 semaines d'âge, avec le même vaccin, ou avec un sérotype différent si la prévalence est forte (ex : H120 et/ou 4/91).

Pour les animaux à durée de vie longue, une troisième vaccination avec un vaccin vivant est effectuée vers 7-8 semaines, suivie enfin d'une injection de vaccin inactivé au moins 8 semaines après la dernière vaccination, contenant des souches du sérotype Massachusetts (ex : M41) et d'autres sérotypes variants. Par la suite, les poules pondeuses sont vaccinées en général toutes les 8 à 10 semaines au moyen d'un vaccin atténué.

Tableau 1 : Exemple de protocole de vaccination BI sur des poulettes futures pondeuses (d'après données personnelles)

Age des animaux	Vaccin	Mode d'administration
J1	Atténué H120	Nébulisation
J20	Atténué 4/91	Nébulisation
J40	Atténué H120	Nébulisation
J70	Atténué 4/91	Eau de boisson
J120	Inactivé M41	Injection IM

iv. Limites de la vaccination

Outre la possibilité de faire émerger des variants mutants issus de vaccins atténués au sein d'une population vaccinée, la limite principale de la vaccination est le manque de réactions croisées entre sérotypes (Tableau 2).

Tableau 2 : Protections croisées observées chez des poulets Leghorn SPF vaccinés par une goutte intraoculaire à 2 et 3 semaines d'âge avec un vaccin vivant atténué d'IBV, puis infectés 4 semaines plus tard avec des souches homologues et hétérologues (d'après Gelb, 1990)

Les chiffres indiquent le pourcentage de protection, c'est-à-dire le pourcentage d'oiseaux chez lesquels on ne retrouve pas de virus à partir d'écouvillons trachéaux collectés 5 jours après infection.

		Vaccins				
		Mass (Holland)	Mass (L-1) + Conn	Mass (Holland) + Ark	Mass (L-1) + Ark	Mass (Connaught) + Ark
Challenge	Mass 41	84	93	87	86	100
	Ark DPI	47	27	87	100	93
	Conn	57	100	100	87	100
	JMK	80	86	73	93	93
	Holte	70	33	79	40	93
	Florida	77	80	84	78	93

Ainsi, une vaccination adaptée devra toujours tenir compte des variants circulants dans la région de l'élevage, ainsi que de leurs relations antigéniques, afin d'anticiper si une vaccination apportera une protection croisée envers plusieurs sérotypes. Sinon, il faudra toujours associer plusieurs variants pour apporter une couverture maximale des animaux. C'est généralement lors d'apparition de cas de bronchite sur le terrain que l'on découvre l'émergence de nouveaux variants échappant à la vaccination classique.

De plus, la réponse immunitaire des oiseaux vaccinés n'est jamais uniforme au sein d'un troupeau. En situation expérimentale, il a été montré que 10% des poulets vaccinés ne présentaient pas une réponse immunitaire protectrice contre une infection par une souche virulente homologue (Cavanagh, 2007). Cette hétérogénéité de réponse des poussins vaccinés s'explique notamment par la souche des oiseaux, mais aussi par la variabilité génétique propre à chaque animal.

B - La souche Qu MV au Québec

1. Historique

Durant l'automne et l'été 2004, une prévalence anormalement élevée de saisies de poulets de chair pour cause d'aérosacculite a été observée dans des abattoirs au Québec. Des analyses statistiques des données issues des abattoirs sur les années 2003 et 2004, effectuées à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal à St Hyacinthe, ont révélé que ces taux de saisies pour aérosacculite étaient plus élevés en mai et juin de ces années, en comparaison aux années précédentes. Trois différentes régions de productions étaient particulièrement affectées (Montérégie, Lanaudière et Mauricie). Les mâles présentaient aussi de plus grands risques de développer de l'aérosacculite que les femelles. Aucun effet couvoir ni aliment (aliment complet *versus* aliment végétal) n'avait été mis en évidence par ces analyses statistiques. L'examen de résultats de laboratoires (sérologies) fournis par des vétérinaires avicoles a révélé la présence de bronchite infectieuse et de maladie de Gumboro (bursite infectieuse) dans les troupeaux affectés (Ankouche, 2008).

Parallèlement, une étude de 2002 menée par l'équipe d'Amer Silim (Laboratoire de Virologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal à St Hyacinthe), a identifié deux nouveaux variants d'IBV circulant depuis 1996 au Québec (Smati et al., 2002). Ces variants de bronchite ont été dénommés Qu16 (du nombre de passages sur œufs embryonnés initialement nécessaire pour l'isoler) et Qu_MV (du nom de l'élevage au sein duquel la souche avait été isolée). Toutefois, la prévalence en élevage, ainsi que le pouvoir pathogène de ces variants n'ont pas été étudiés. De même, l'importance relative de ces variants dans le développement d'aérosacculites responsables de saisies à l'abattoir n'a pas été étudiée.

Il est rapporté depuis quelques années que ces variants Qu16 et Qu_MV sont désormais isolés dans des élevages de poulets de chair d'autres provinces canadiennes, notamment le Nouveau-Brunswick et l'Ontario (Ankouche, 2008).

2. Facteurs viraux et facteurs de risques

Deux études parallèles, menées par Ankouche et coll. (Faculté de Médecine Vétérinaire de Montréal à St Hyacinthe) ont été entreprises en 2005 et 2006 pour identifier les souches virales et les facteurs de risques associés à l'aérosacculite à l'abattoir au Québec. Cette étude comparait un groupe de 29 élevages « cas » (à prévalence élevée en aérosacculite à l'abattoir) à un groupe de 29 élevages « témoins » (à prévalence faible). Les élevages « cas » et les élevages « témoins » étaient comparables deux à deux (emplacement géographique, âges des troupeaux, taille des troupeaux, origine de l'aliment). Des visites de ces élevages, des questionnaires de régie, ainsi que des analyses virologiques et sérologiques ont été effectués (Ankouche, 2008).

Les résultats sérologiques issus des élevages indiquent que de nombreux virus sont présents au sein des troupeaux de poulets de chair au Québec. L'adénovirus est le virus plus prévalent sur les groupes « cas » et les groupes « témoins », mais sans qu'une signification pathologique y soit significativement associée. La présence d'IBV (détectée par sérologie), caractérisée par séquençage comme étant la souche Qu_MV, est significativement plus prévalente au sein des groupes « cas ». L'IBV étant reconnu comme agent primaire probable d'aérosacculite, il pourrait prédisposer les sujets à des surinfections bactériennes (à *Escherichia coli* notamment). Il est à noter toutefois que quelques élevages « témoins » étaient positifs au variant Qu_MV, sans être atteints de forts taux d'aérosacculite à l'abattoir. Enfin, la présence d'IBDV, virus immunosuppresseur de la maladie de Gumboro (bursite infectieuse) est sensiblement reliée ($p = 0.061$) à la présence d'aérosacculite. Les troupeaux immunodéprimés ont alors tendance à être moins immunisés contre une infection virale et à être plus sensibles aux infections secondaires (Ankouche, 2008).

Figure 5 : Prévalence de différents virus, déterminée par sérologie, au sein des élevages de poulets de chair (d'après Ankouche, 2008)

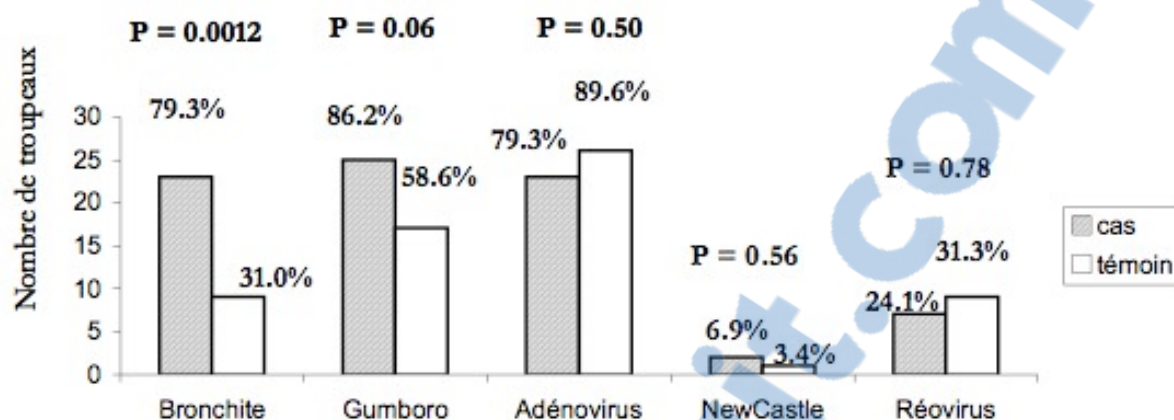
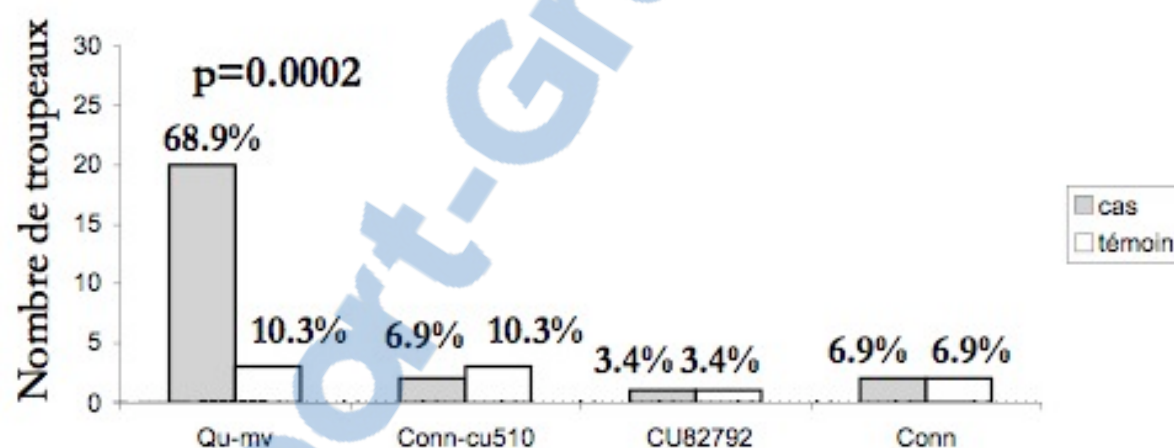


Figure 6 : Prévalence des différentes souches de bronchites au sein des élevages atteints (d'après Ankouche, 2008)



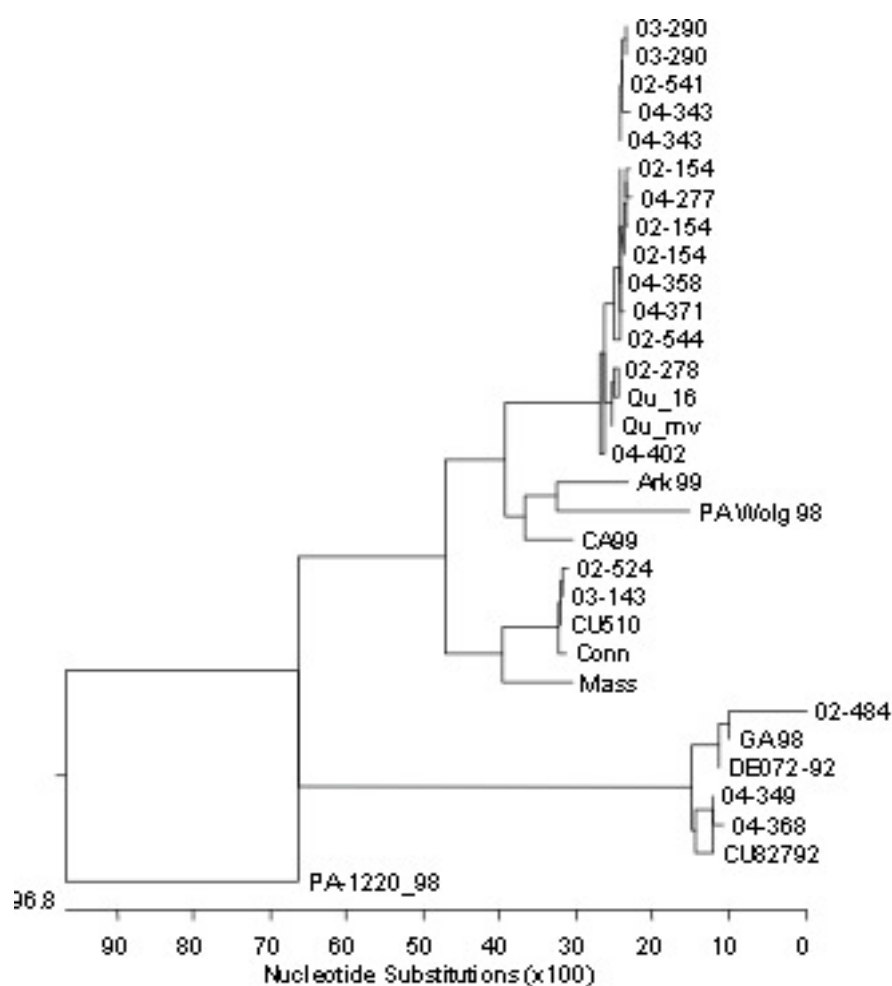
Les résultats de l'analyse des facteurs de risques (Ankouche, 2008) associés à l'aérosacculite lors de l'abattage montrent l'importance de deux facteurs non-infectieux ; le contrôle de la présence de ténébrions dans l'élevage, et le port de sur-bottes spécifiques à chaque bâtiment. Ces facteurs sont à considérer comme des facteurs favorisant la présence d'aérosacculite à l'abattage, et sont à intégrer à de nombreux autres programmes de biosécurité (lavage des mains, tenue vestimentaire, accès à l'élevage) ainsi qu'à de nombreux facteurs favorisant l'expression clinique d'un passage viral (humidité ambiante, taux d'ammoniac, poussière, ventilation...).

3. Sérotypie

Les études d'analyses moléculaires des variants québécois (Qu16 et Qu_MV) d'IBV, retrouvés depuis 1996, ont été menées par l'équipe de Smati et Silim (Smati et al., 2002). Ces variants représentent un nouveau groupe phylogénique, qui pourrait ne pas être affecté par une immunité induite par les vaccins usuels (Mass/Conn), d'où leurs pathogénicité potentielle. La séquence nucléotidique du gène S1 de ces variants comprend des zones homologues à celles des sérotypes Mass et Ark. Une hypothèse suggère que ce nouveau groupe phylogénique résulte d'une recombinaison entre les deux sérotypes Mass et Ark. De plus, les différents variants au sein du groupe Québec pourraient être apparus par mutations successives sur le génome ARN. Les conséquences de ces variations pourraient avoir affecté la structure de la glycoprotéine S1 de l'IBV. En conséquence il peut être postulé que le site S1 de liaison de l'antigène serait altéré, favorisant ainsi l'échappement du virus à la réponse immunitaire (Smati et al., 2002).

Figure 7 : Analyses phylogénétiques des souches de BI à partir d'un séquençage du gène S1 (d'après Smati et al., 2002)

On remarque la proximité phylogénétique des souches Qu16, Qu_MV, et du variant Ark99.



Les conclusions de cette étude suggèrent l'utilisation de vaccins Ark ou de combinés Ark/Mass pour évaluer la protection des animaux, sans en apporter de démonstration expérimentale. Toutefois, le gouvernement fédéral canadien n'autorise pas jusqu'alors l'utilisation de variants Ark dans les élevages du pays.

4. Gestion actuelle des variants émergents au Québec

Depuis la découverte des variants Qu16 et Qu_MV au Québec, et depuis les précédentes études statistiques sur la prévalence de ces variants en élevage, les vétérinaires avicoles québécois sont conscients de l'importance de la gestion de la bronchite infectieuse sur le terrain.

Jusqu'alors, aucune étude n'a démontré l'importance clinique des infections à Qu16 et Qu_MV en milieu contrôlé. De même, aucune étude n'a tenté d'évaluer l'efficacité de vaccins commerciaux contre ces variants.

Les vaccins bronchite infectieuse couramment utilisés au Québec appartiennent uniquement aux sérotypes Mass et Conn. Les protocoles de vaccination varient sensiblement selon les pratiques des vétérinaires, des couvoirs et des éleveurs. De plus, bien que l'analyse sérotypique des variants Qu16 et Qu_MV montre une proximité phylogénétique avec le variant Ark, ce vaccin est pour l'instant interdit au Canada. La gestion actuelle des épisodes de bronchite infectieuse en élevage se maîtrise alors par des protocoles de vaccination classique avec les variants Mass et Conn.

Toutefois, devant l'importance de l'émergence de ces variants, les Eleveurs de Volailles du Québec a demandé une étude d'essai de protocoles vaccinaux commerciaux. C'est dans ce contexte sanitaire, et grâce aux financements des producteurs de volailles du Québec, que l'étude présentée ici a été réalisée à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal à St Hyacinthe, pendant l'année 2008, sous la direction du Docteur Jean-Pierre Vaillancourt, professeur en médecine avicole et médecine de population à la Faculté.

Deuxième partie :
ÉTUDE EXPERIMENTALE

**Évaluation de la protection vaccinale à l'égard de la
souche virale Qu_MV**

A - Évaluation de la pathogénicité des souches virales Qu16 et Qu MV

1. Matériel et méthodes

a. Protocole expérimental

Des poussins non sexés SPF (*Specific Pathogens Free*) de souche Leghorn, âgés d'un jour, ont été élevés dans des isolateurs (unités Horsfall) à pression positive, au Centre de Recherche Avicole (centre de biosécurité niveau 2) de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal à St Hyacinthe (Québec). Tous les isolateurs se trouvaient dans une même pièce. Le programme lumineux et thermique était le même pour tous les oiseaux. L'eau et l'alimentation étaient fournies à volonté. Les 46 oiseaux, individuellement identifiés, étaient répartis aléatoirement en trois groupes dans trois isolateurs : 10 oiseaux constituaient le groupe témoin, 18 oiseaux constituaient le groupe infecté par la souche virale Qu_MV, 18 oiseaux constituaient le groupe infecté par la souche virale Qu16. Les oiseaux ont été infectés à 14 jours d'âge, puis ont été abattus (par injection intraveineuse d'une solution de pentobarbital) à 3 jours (15 animaux), 5 jours (15 animaux) et 7 jours (16 animaux) post infection. À chaque jour d'abattage, les oiseaux étaient choisis aléatoirement (Tableau 3).

Tableau 3 : Protocole expérimental, évaluation de la pathogénicité des souches virales Qu16 et Qu MV

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Nombre total d'oiseaux	18	18	10
Infection virale à 14 jours d'âge	Souche Qu_MV	Souche Qu16	Pas d'infection
Abattage à 3J post infection	6 oiseaux	6 oiseaux	3 oiseaux
Abattage à 5J post infection	6 oiseaux	6 oiseaux	3 oiseaux
Abattage à 7J post infection	6 oiseaux	6 oiseaux	4 oiseaux

b. Virus challenge

i. Culture virale

Deux souches virales d'IBV ont été utilisées ; une souche Qu_MV, isolée et séquencée en 1999 par l'équipe d'Amer Silim (Faculté Vétérinaire) à partir d'échantillons provenant de fermes infectées, et une souche Qu16 isolée et séquencée en 1996.

Les deux souches virales ont été amplifiées par passages successifs sur œufs embryonnés SPF âgés de 9 jours, selon un protocole standard (Gelb et Jackwood, 1998), et récoltées 4 jours plus tard dans le liquide allantoïdien des œufs. Plusieurs passages ont été effectués pour chaque souche (4 passages au total), afin d'amplifier leur pouvoir pathogène.

ii. Titration des solutions virales

Le passage des virus sur cellules rénales d'embryons de poulets (REP) ne provoquait, dans aucun des cas, d'effet cytopathogénique attendu, au bout de 3 et 4 jours. De plus, l'inoculation de ces souches sur des œufs embryonnés de 9 jours, et incubés pendant 6 à 10 jours, n'a jamais provoqué les effets néfastes attendus (*cf supra*) sur les embryons (retards de croissance, embryons recroquevillés...). Il a donc été par conséquent impossible de titrer ces virus par dose létale sur embryon (selon la formule de Reed and Muench), ou par effet cytopathogène.

Le titrage des souches a donc été effectué par hémagglutination, après traitement des cultures virales par la neuraminidase, selon le protocole publié (Ruano et al., 2000). La solution virale, diluée de deux en deux, était mise en contact sur une lame avec une solution d'érythrocytes de poulets et l'hémagglutination était observée par le manipulateur. Les titres ainsi obtenus ont été de 1/8 pour la souche Qu16 et 1/16 pour la souche Qu_MV.

iii. Infections expérimentales

Les oiseaux ont été infectés à l'âge de 14 jours, par instillation de la solution virale dans les narines et les yeux de chaque animal. Les animaux du groupe témoins ont reçu une instillation d'eau stérilisée afin de leur faire subir le même stress que les animaux infectés. Chaque animal recevait 50 µl de solution dans chaque œil et dans chaque narine, soit un total de 0,2 ml de solution virale par animal.

c. Pathogénicité

i. Signes cliniques

Les oiseaux ont été observés dès le premier jour de l'infection, à raison de 2 fois par jour (toutes les 12h) par le même observateur, jusqu'à leur abattage. Les signes cliniques non spécifiques (animaux blottis ou ébouriffés, dépression) et respiratoires (toux, jetage, éternuements, dyspnée, conjonctivite) de bronchite infectieuse étaient recherchés. Un score clinique de 0 à 3 pour les signes cliniques spécifiques et non spécifiques était attribué à chaque observation pour chaque groupe.

ii. Lésions macroscopiques

Après l'abattage de chaque animal, une autopsie de ce dernier était réalisée pour identifier d'éventuelles lésions macroscopiques, et effectuer des prélèvements histologiques. L'observation des lésions macroscopiques était réalisée par un manipulateur sans savoir le statut infectieux de chaque animal (fonctionnement en aveugle). Les lésions macroscopiques recherchées étaient des lésions d'aérosacculite (exsudat fibrineux, parois des sacs aériens épaissies). Un score lésionnel de 0 à 3 était attribué à chaque animal (0 = pas de lésions, 1 = un sac aérien ou plus avec exsudat fibrineux modéré et aspect légèrement trouble, 2 = un sac aérien avec exsudat important et paroi légèrement épaissie, 3 = plusieurs sacs aériens avec exsudat fibrineux important et parois légèrement épaissies) selon une méthode décrite dans la littérature (Martin et al., 2007).

iii. Histologie

Des prélèvements de trachée ont été effectués sur chaque animal en vue d'une étude histologique. Pour chaque animal, 4 sections de trachée étaient effectuées, fixées au formol tamponné à 10%, étalées sur lame et colorées au HPS (Hemalun-Phloxine-Safran). Les observations histologiques étaient réalisées par un seul et même observateur (Dr Mona Morin, DMV, Laboratoire Vétérinaire du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries, et de l'Alimentation du Québec à St Hyacinthe), sans connaître le statut infectieux des oiseaux. Les lésions histologiques attendues étaient de type déciliation, cuboïdisation des cellules épithéliales, hyperplasie épithéliale et inflammation. Un score lésionnel de 0 à 3 (avec une précision de 0,5) était attribué à chaque animal (0 = pas de lésions, 1 = lésions focales, 2 = lésions multifocales, 3 = lésions diffuses).

Figure 8 : Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau sain (score 0)
Observation au microscope optique, coloration HPS, X 100

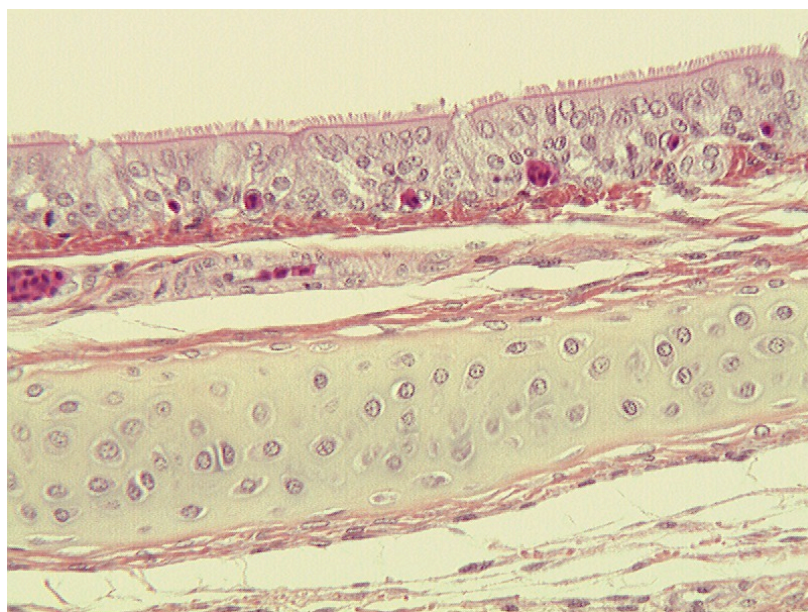


Figure 9 : Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau infecté (score 1)
Observation au microscope optique, coloration HPS, X 100

On observe une déciliation focale de la muqueuse trachéale.

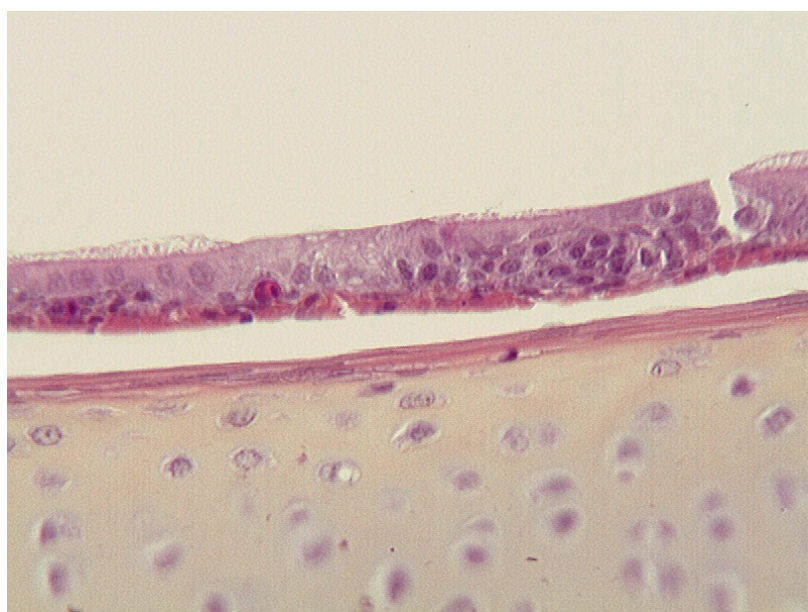


Figure 10 : Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau infecté (score 2)
Observation au microscope optique, coloration HPS, X 100

On observe une déciliation multifocale de la muqueuse, une hyperplasie modérée, ainsi que des infiltrats inflammatoires apparents.

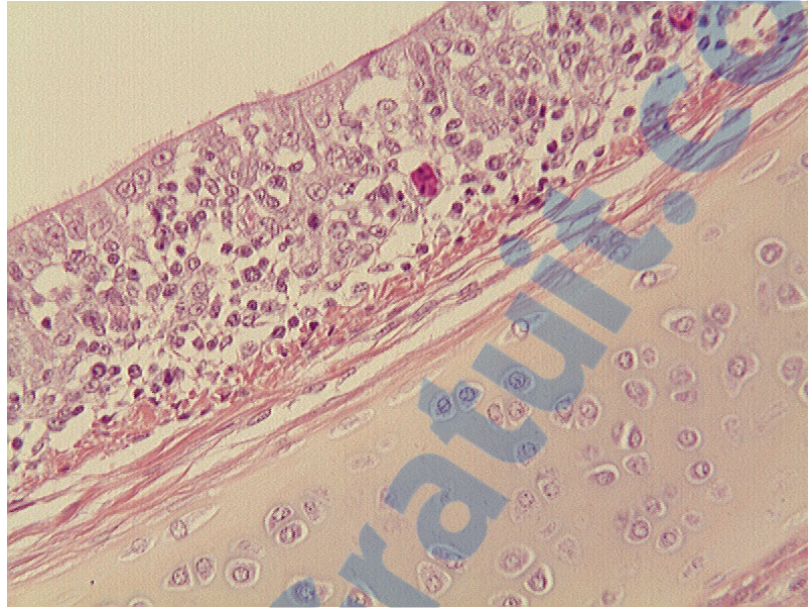
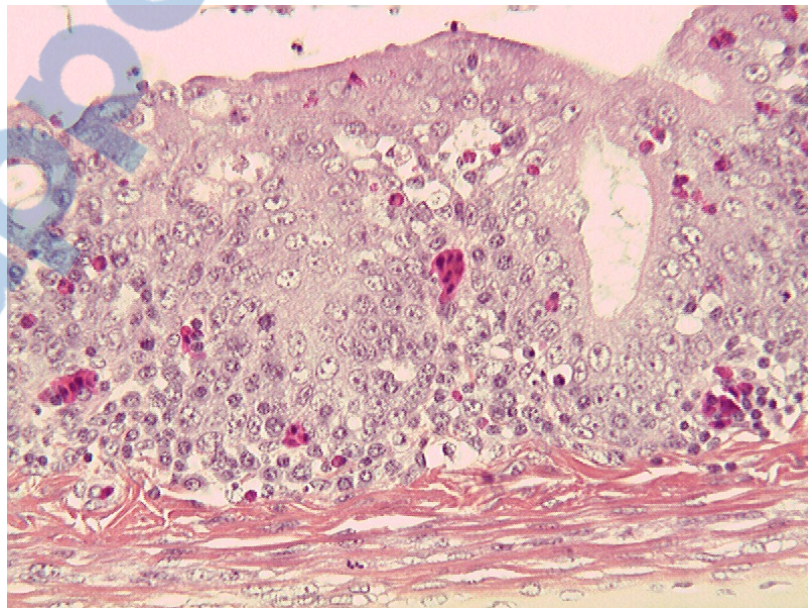


Figure 11 : Aspect histologique d'une coupe transversale de trachée, oiseau infecté (score 3)
Observation au microscope optique, coloration HPS, X 100

On observe une déciliation diffuse de la muqueuse, une hyperplasie importante, ainsi que des infiltrats inflammatoires importants.



d. Sérologie

Un prélèvement sanguin était effectué pour chaque animal lors de l'abattage. Les échantillons des 46 oiseaux ont été envoyés au laboratoire de la Faculté de Médecine Vétérinaire pour une analyse sérologique par méthode ELISA. De plus, une sérologie sur des poussins SPF de 1 jour provenant du même élevage a aussi été effectuée, afin de s'assurer du statut négatif en anticorps anti-IBV des poussins utilisés. Cette sérologie est alors revenue négative en anticorps anti-IBV à 1 jour d'âge.

e. Analyses statistiques

Pour l'analyse des résultats histologiques, un test de Cochran-Mantel-Haenszel, applicable ici car la variable score est de type ordinale, a été effectué. Ce test permet de distinguer les trois groupes au niveau du score moyen des individus, pour chaque jour d'abattage. Un $p \leq 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

2. Résultats

a. Signes cliniques

Aucun oiseau n'a présenté de signes cliniques respiratoires ou non spécifiques durant la période d'observation (scores cliniques de 0 pour chaque groupe et chaque observation).

b. Lésions macroscopiques

Aucun oiseau n'a présenté de lésions macroscopiques des sacs aériens, ni d'aucun autre organe (respiratoire ou non).

c. Histologie

Les résultats histologiques ont permis de détecter des lésions sur les trachées des oiseaux abattus, et d'attribuer un score lésionnel pour chaque animal. Les scores lésionnels sont détaillés ci dessous (Tableau 4).

Tableau 4 : Scores lésionnels histologiques, évaluation de la pathogénicité des souches Qu16 et Qu_MV

Jour d'abattage post infection	Souche virale		
	Témoins	Qu_MV	Qu16
J3	0	1	1,5
J3	0	1	1
J3	0	2	1
J3		1	1
J3		1,5	2
J3		3	2
J5	0	2,5	2,5
J5	0	3	2,5
J5	0	3	1,5
J5		2,5	1,5
J5		3	1,5
J5		1,5	3
J7	0	2	2
J7	0	2,5	2
J7	0	2,5	1
J7		1,5	2
J7		3	3
J7		1,5	0,5

On remarque que les oiseaux du groupe témoin ne présentent jamais de lésions trachéales à chaque jour d'abattage (score lésionnel de 0 pour chaque lame). Seuls les animaux infectés par Qu16 ou Qu_MV présentent des lésions trachéales.

Au jour 3 post infection, le test de Cochran-Mantel-Haenszel, applicable ici car la variable score est de type ordinal, indique une hétérogénéité significative entre les trois groupes au niveau du score moyen ($p = 0.02$). Les comparaisons a posteriori avec la correction séquentielle de Bonferonni indiquent que le score moyen était significativement plus élevé dans le groupe Qu16 que dans le groupe témoin, et plus élevé dans le groupe Qu_MV que dans le groupe témoin. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes Qu16 et Qu_MV.

Au jour 5 post infection, l'analyse indique une hétérogénéité significative entre les trois groupes au niveau du score moyen ($p = 0.004$). Les comparaisons indiquent que le score moyen était significativement plus élevé dans le groupe Qu16 que dans le groupe témoin, et plus élevé dans le groupe Qu_MV que dans le groupe témoin. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes Qu16 et Qu_MV.

Au jour 7 post infection, l'analyse indique une hétérogénéité significative entre les trois groupes au niveau du score moyen ($p = 0.006$). Les comparaisons indiquent que le score moyen était significativement plus élevé dans le groupe Qu16 que dans le groupe témoin, et plus élevé dans le groupe Qu_MV que dans le groupe témoin. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes Qu16 et Qu_MV.

d. Sérologie

Aucun des prélèvements sanguins analysés ne comportait d'anticorps anti-IBV détectable au laboratoire par la technique ELISA.

3. Discussion

Dans cette première étude expérimentale, l'évaluation de la pathogénicité des souches virales Qu16 et Qu_MV était réalisée après challenge d'animaux SPF âgés de 14 jours. Des analyses issues d'observation cliniques et nécropsiques, ainsi que des analyses sérologiques et histologiques permettaient de comparer les pathogénies des souches virales face à un groupe témoin non infecté.

Les observations de signes cliniques éventuels sur les animaux infectés se sont toujours révélées négatives pour chaque groupe à chaque jour. Ceci permet de soulever trois hypothèses majeures :

- Soit les virus employés pour les infections n'étaient pas suffisamment pathogènes (un défaut de stockage de ces prélèvements effectués en 1996 et 1999 ayant pu endommager ces derniers). Cette hypothèse expliquerait en outre l'impossibilité d'observer des effets cytopathogènes sur REP lors des cultures virales, ainsi que l'absence de symptômes observables sur les fœtus des œufs inoculés expérimentalement.

- Soit les titres viraux n'étaient pas suffisamment élevés dans les solutions infectieuses, pour permettre des signes cliniques. Cette hypothèse rejoint alors la précédente pour expliquer l'impossibilité de titrer en laboratoire les virus autrement que par hémagglutination.
- Soit les conditions d'élevage des oiseaux, de statut SPF et élevés en isolateurs à pression positive, donc dans des conditions dénuées de facteurs de risques liés à l'ambiance (poussière, ammoniac) ont empêché des complications cliniques majeures du passage viral (surinfections secondaires). Les oiseaux n'ont ainsi pas exprimé de manifestation clinique du passage des virus, malgré leur pathogénicité.

Les observations à l'autopsie de lésions macroscopiques sur les sacs aériens se sont toujours révélées négatives. Cette absence de lésions macroscopiques est plausible malgré un effet pathogénique d'un passage viral, surtout dans des conditions d'élevage non favorables aux surinfections secondaires. En ce sens, l'absence de lésions macroscopiques s'explique alors par les mêmes hypothèses que l'absence de signes cliniques.

Les résultats sérologiques sur des poussins SPF âgés d'un jour, ainsi que sur les oiseaux infectés et prélevés le jour de l'abattage sont tous revenus négatifs. Ces sérologies nous ont permis de vérifier que les oiseaux SPF avaient bien un statut négatif en anticorps anti-IBV. De plus il est normal que des anticorps anti-IBV ne soient pas détectés à J3, J5 ou J7 post infection, puisque la durée généralement admise pour la séroconversion chez des poulets est d'au moins une semaine.

L'appui de l'histologie a permis de montrer clairement l'effet pathogène des souches virales Qu16 et Qu_MV, malgré une absence de signes cliniques et de lésions macroscopiques chez les animaux infectés. Les tests statistiques indiquent à chaque jour d'abattage que le score moyen des lésions était significativement plus élevé dans le groupe Qu16 que dans le groupe témoin, et plus élevé dans le groupe Qu_MV que dans le groupe témoin. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les groupes Qu16 et Qu_MV, mais la tendance globale semble montrer des scores lésionnels plus élevés pour le groupe Qu_MV que pour le groupe Qu16.

Les résultats de cette première étude permettent premièrement de conclure que les souches virales Qu16 et Qu_MV, isolées en 1996 et 1999, avaient gardé un pouvoir pathogène lors de leur congélation par -70°C, mais que ces dernières ne montrent pas d'effets cytopathogènes sur REP, ni d'effets pathogènes sur embryons de poulets. L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette impossibilité de titrage est que le virus était présent en trop faible quantité dans nos échantillons initiaux.

Secondement, l'absence de signes cliniques chez les animaux infectés, malgré une présence de lésions histologiques, démontre l'importance des facteurs environnementaux dans l'expression clinique de la bronchite infectieuse due aux variants Qu16 et Qu_MV. Des résultats similaires (absence de signes cliniques) avaient déjà été observés lors de précédentes études du pouvoir pathogène de diverses souches d'IBV, pour lesquelles les conditions d'étude (milieu contrôlé) étaient identiques à notre étude. Ainsi il a été démontré que le variant californien CA557/03 ne provoquait pas de signes cliniques sur des oiseaux infectés (Jackwood et al., 2007) de même que le variant CA99 (Martin et al., 2007). Des animaux élevés dans des conditions idéales (peu de poussières, faible taux d'ammoniac) évitent ainsi des complications par surinfections secondaires et l'expression de signes cliniques. Ainsi, cette explication confirme l'étude préliminaire (*cf supra*) de facteurs de risques viraux (Ankouche, 2008), dans laquelle des élevages indemnes d'aérosacculite à l'abattoir avaient été décelés positifs en IBV Qu_MV. Dans cette hypothèse, on peut considérer que les éleveurs ont alors suffisamment bien maîtrisé les facteurs d'ambiance (ventilation, humidité) et sanitaires, et que les animaux, malgré une infection par IBV, n'ont pas montré de signes cliniques ou lésionnels de bronchite.

Enfin, il ne semble pas y avoir de différence statistiquement significative entre les effets pathogènes des souches Qu16 et Qu_MV, mais une tendance globale en faveur de lésions plus importantes avec la souche Qu_MV semble évidente. Cette étude préliminaire à un essai de protocoles vaccinaux n'a donc pas permis de décider avec précision la souche ultérieurement utilisable.

B - Évaluation de l'efficacité de vaccins commerciaux

1. Matériel et méthodes

a. Protocole expérimental

Deux études ont été menées successivement (de mars à juin 2008) pour évaluer l'efficacité de deux protocoles vaccinaux. La première étude concernait l'utilisation de vaccins commerciaux des sérotypes Massachusetts/Connecticut (Mass/Conn). La seconde concernait l'utilisation d'un vaccin commercial du sérotype Arkansas (Ark). Ce vaccin, non homologué au Canada, avait été importé par dérogation fédérale. Les protocoles expérimentaux des deux études étaient rigoureusement identiques.

Des poussins non sexés SPF de souche Leghorn, âgés de un jour, ont été élevés dans des isolateurs (unités Horsfall) à pression positive, au Centre de Recherche Avicole de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal à St-Hyacinthe (Québec). Tous les isolateurs se trouvaient dans une même pièce. Le programme lumineux et thermique était le même pour tous les oiseaux. L'eau et l'alimentation étaient fournies à volonté. Pour chaque étude, les oiseaux, individuellement identifiés, étaient répartis aléatoirement en quatre groupes dans quatre isolateurs (Tableaux 5 et 6). Les animaux des groupes vaccinés ont été vaccinés à 1 et 14 jours d'âge ; les animaux infectés l'ont été à 31 jours d'âge. Les abattages (par injection intraveineuse d'une solution de pentobarbital) suivis des autopsies, ont eu lieu à 4, 6 et 14 jours post infection. À chaque jour d'abattage, les oiseaux étaient choisis aléatoirement.

Tableau 5 : Protocole expérimental, essai de vaccination variants Mass/Conn

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Nombre total d'oiseaux	21	19	19	22
Vaccination	Mass J1 Mass/Conn J14	Non	Non	Mass J1 Mass/Conn J14
Infection virale à 31 jours	Non	Non	Oui	Oui
Abattage à 4 jours post infection	8 oiseaux	8 oiseaux	8 oiseaux	8 oiseaux
Abattage à 6 jours post infection	8 oiseaux	8 oiseaux	8 oiseaux	8 oiseaux
Abattage à 14 jours post infection	5 oiseaux	3 oiseaux	3 oiseaux	6 oiseaux

Tableau 6 : Protocole expérimental, essai de vaccination variant Ark

	Groupe 5	Groupe 6	Groupe 7	Groupe 8
Nombre total d'oiseaux	23	18	23	24
Vaccination	Ark J1 et J14	Non	Non	Ark J1 et J14
Infection virale à 31 jours	Non	Non	Oui	Oui
Abattage à 4 jours post infection	8 oiseaux	6 oiseaux	8 oiseaux	8 oiseaux
Abattage à 6 jours post infection	8 oiseaux	6 oiseaux	8 oiseaux	8 oiseaux
Abattage à 14 jours post infection	7 oiseaux	6 oiseaux	7 oiseaux	8 oiseaux

b. Virus challenge

i. Culture et titre de la solution virale

Compte tenu de la difficulté à cultiver et titrer les virus Qu16 et Qu_MV lors de l'essai précédent (*cf paragraphe B-*), nous avons choisi pour la suite de l'étude d'utiliser un variant Qu_MV plus récemment isolé sur le terrain.

Les souches de virus Qu_MV dès lors utilisées pour les essais de protocoles vaccinaux ont donc été fournies par l'unité de virologie de l'Université de Guelph (Animal Health Laboratory, Ontario, Canada) du Docteur Ojkic.

Le titre des solutions virales a été obtenu lors de leurs amplifications, à Guelph, par séries de passages sur œufs embryonnés. Les titres étaient de $10^{6,25}$ EID₅₀ par 0,2ml (= $1,78 \times 10^6/0,2\text{ml}$) pour le virus utilisé pour le protocole Mass/Conn, et de 10^5 EID₅₀ par 0,2ml pour le virus utilisé pour le protocole Ark.

ii. Infections expérimentales

Les oiseaux ont été infectés à l'âge de 31 jours, par instillation de la solution virale dans les narines et les yeux de chaque animal. Les animaux du groupe témoin ont reçu une instillation d'eau stérilisée afin de leur faire subir le même stress que les animaux infectés.

Pour le protocole Mass/Conn, afin que chaque animal infecté reçoive une dose virale titrant à 10^6 EID₅₀, il a été calculé qu'une quantité de 112µl ($=^{0,2}/_{1,78}$) serait nécessaire pour l'infection de chaque animal. Ainsi, chaque animal infecté s'est vu administrer 28µl de solution virale dans chaque narine et chaque œil.

Pour le protocole Ark, chaque animal a aussi reçu 112µl de solution virale, soit une quantité de $0,56 \times 10^5$ EID₅₀ par animal ($^{112}/_{200} = 0,56$).

c. Vaccins

i. Vaccins Mass/Conn

Le protocole Mass/Conn employé a compris l'utilisation d'un vaccin commercial Mass à un jour d'âge, puis d'un vaccin Mass/Conn à 14 jours d'âge. Le vaccin à valence Mass, commercialisé par la société Merial, se présente sous la forme d'un vaccin lyophilisé. Reconstitué selon les recommandations du fabricant, il s'administre à un jour d'âge par nébulisation (réalisé au couvoir généralement). Le vaccin à valence Mass/Conn, commercialisé par la société Wyeth, se présente aussi sous forme lyophilisée. A 14 jours d'âge, il s'utilise par distribution dans l'eau de boisson en élevage.

ii. Vaccins Ark

Le protocole Ark employé a compris l'utilisation d'un vaccin commercial à variant Ark commercialisé par la société Merial, non homologué au Canada. Le vaccin a été importé par dérogation spéciale fédérale. Présenté sous forme lyophilisée, et reconstitué selon les recommandations du fabricant, il s'administre à un jour par nébulisation (au couvoir) et à 14 jours d'âge par distribution dans l'eau de boisson en élevage.

iii. Protocole de vaccination

Afin de correspondre au mieux aux pratiques d'élevage, les oiseaux ont été vaccinés à 1 jour d'âge et à 14 jours d'âge.

Les vaccins lyophilisés administrés à 1 jour d'âge ont été réhydratés dans une solution de PBS stérile (150 ml de PBS pour 5000 doses de vaccin Mass, 350 ml de PBS pour 5000 doses de vaccin Ark). La vaccination à 1 jour a été effectuée par instillation d'une goutte de solution vaccinale (0,1 ml/animal) dans les yeux et les narines, afin de mimer au mieux la nébulisation effectuée au couvoir.

La vaccination par eau de boisson à 14 jours d'âge a été effectuée selon les pratiques usuelles, après assoiffement des oiseaux pendant 4 heures. Les vaccins lyophilisés ont été réhydratés dans des solutions d'eau distillée complétée en poudre de lait (8 L d'eau distillée + 30 g de poudre de lait pour 1000 doses de vaccin Mass/Conn, 60 L d'eau distillée + 450 g de poudre de lait pour 5000 doses de vaccin Ark). Une quantité de 250 ml de la solution vaccinale finale a été distribuée pour chaque groupe vacciné (environ 20 oiseaux). La solution vaccinale était intégralement consommée par les oiseaux en 3 heures.

d. Pathogénicité

i. Signes cliniques

À l'instar de la première expérience, les signes cliniques respiratoires et les signes non spécifiques étaient observés à raison de 2 observations par jour dès l'infection des animaux, et jusqu'au jour d'abattage. Le même système de notation des signes cliniques (scores cliniques de 0 à 3) était employé.

ii. Lésions macroscopiques

Les lésions macroscopiques d'aérosacculite, visibles lors des autopsies, étaient rapportées pour chaque animal par un score lésionnel macroscopique identique à la première expérience (score de 0 à 3).

iii. Histologie

Des prélèvements de trachées étaient effectués sur chaque animal abattu, afin de réaliser des lames histologiques. Les mêmes observations microscopiques et les mêmes scores lésionnels (0 à 3) étaient appliqués en aveugle pour chaque prélèvement, conformément à la première expérience.

e. Sérologie

Un suivi sérologique, effectué pour chaque animal à partir d'échantillons sanguins prélevés lors de l'abattage, permettait de titrer les anticorps sériques anti-IBV par ELISA. Cette sérologie permettait de vérifier le statut immunitaire des oiseaux, afin de contrôler notamment la prise vaccinale et la séroconversion des animaux infectés.

f. Analyses statistiques

Pour l'analyse des résultats histologiques, un test de Cochran-Mantel-Haenszel, applicable ici car la variable score est de type ordinal, a été effectué. Ce test permet de distinguer les quatre groupes au niveau du score moyen des individus, pour chaque jour d'abattage. Un $p \leq 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

Pour l'analyse des titres en anticorps, les données ont été transformées avec le logarithme base10 + 1 pour normaliser les distributions. Une modélisation linéaire, avec le groupe et le temps comme facteurs fixes, indiquerait un effet significatif ou non du groupe tous temps confondus et du temps tous groupes confondus. Les contrastes deux à deux entre les groupes à chacun des temps, avec la correction de Bonferroni pour prendre en ligne de compte le grand nombre de comparaisons, indiqueraient des différences entre chaque groupe.

Enfin, l'analyse de la relation entre les scores lésionnels histologiques au sein du groupe « vacciné challengé » et les titres ELISA des individus de ce groupe permettrait de mettre en relation le niveau en anticorps et le niveau de protection. Pour ce faire, une corrélation non-paramétrique de Spearman, basée sur le rang des valeurs pour les deux variables (titre et score lésionnel), a été effectuée. Un $p \leq 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif.

2. Résultats

a. Signes cliniques

Au cours du protocole vaccination Mass/Conn, aucun oiseau n'a présenté de signes cliniques respiratoires ou de signes non spécifiques (score clinique de 0 à chaque observation).

De même, au cours du protocole vaccination Ark, aucun oiseau n'a présenté de signes cliniques.

b. Lésions macroscopiques

La nécropsie des animaux, au cours de l'expérience vaccination Mass/Conn ainsi qu'au cours de l'expérience vaccination Ark, n'a jamais révélé de lésions macroscopiques, pour aucun des animaux.

c. Histologie

i. Protocole variants Mass/Conn

Des lésions histologiques ont été observées et notées (scores de 0 à 3) sur les trachées des animaux faisant partie de l'essai de vaccination variants Mass/Conn. Les scores lésionnels sont rapportés en annexe. Les tableaux ci-dessous indiquent le nombre d'oiseaux pour chaque score lésionnel, pour chaque groupe, à chaque jour d'abattage post infection.

Tableau 7 : Scores lésionnels à J4, J6 et J14 post-infection, protocole de vaccination variants Mass/Conn

Chaque donnée indique le nombre d'oiseaux, au sein de chaque groupe, auquel est attribué chaque score lésionnel. Groupe 1 (VNInf) = oiseaux vaccinés, non infectés (21 oiseaux), Groupe 2 (NVNInf) = oiseaux non vaccinés, non infectés (19 oiseaux), Groupe 3 (NVInf) = oiseaux non vaccinés, infectés (19 oiseaux), Groupe 4 (VInf) = oiseaux vaccinés, infectés (22 oiseaux)

J4		Groupe 1 (VNInf)	Groupe 2 (NVNInf)	Groupe 3 (NVInf)	Groupe 4 (VInf)
Nombre total d'oiseaux		8	8	8	8
	0	8	8	2	4
	0,5	0	0	0	0
	1	0	0	1	1
Scores histologiques	1,5	0	0	0	1
	2	0	0	3	1
	2,5	0	0	0	1
	3	0	0	2	0
Moyenne		0	0	1,63	0,88

J6		Groupe 1 (VNInf)	Groupe 2 (NVNInf)	Groupe 3 (NVInf)	Groupe 4 (VInf)
Nombre total d'oiseaux		8	8	8	8
	0	8	8	0	3
	0,5	0	0	0	0
	1	0	0	0	4
Scores histologiques	1,5	0	0	0	0
	2	0	0	4	1
	2,5	0	0	3	0
	3	0	0	1	0
Moyenne		0	0	2,31	0,75

J14		Groupe 1 (VNInf)	Groupe 2 (NVNInf)	Groupe 3 (NVInf)	Groupe 4 (VInf)
Nombre total d'oiseaux		5	3	3	6
	0	5	3	0	4
	0,5	0	0	3	2
	1	0	0	0	0
Scores histologiques	1,5	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
Moyenne		0	0	0,5	0,17

On remarque que, à chaque jour d'abattage, les oiseaux du groupe 1 (VNInf) ainsi que les oiseaux du groupe 2 (NVNInf) ne présentent jamais de lésions trachéales (score de 0 pour tous les sujets). Seuls les animaux infectés (groupes 3 et 4) présentent des lésions trachéales.

Le test de Cochran-Mantel-Haenszel n'indique aucune différence au niveau du score moyen des lésions au jour 4 entre les groupes ($p = 0.19$). Au jour 6, le test indique que le score moyen est significativement plus élevé dans le groupe 3 (NVInf) que dans le groupe 4 (VInf) ($p = 0.001$). Enfin, au jour 14, le test indique que le score moyen était marginalement mais non significativement plus élevé dans le groupe 3 que dans le groupe 4 ($p = 0.07$). Ici la petite taille d'échantillon réduit la puissance par rapport aux autres jours.

De plus, la moyenne des scores histologiques pour le groupe 4 (VInf) est de 0,88 à J4, de 0,75 à J6, et de 0,17 à J14. Ces moyennes seront à comparer avec les moyennes obtenues dans le groupe similaire du protocole variant Ark.

ii. Protocole variant Ark

Des lésions histologiques ont été observées et notées (scores de 0 à 3) sur les trachées des animaux faisant partie de l'essai de vaccination variant Ark. Les scores lésionnels sont rapportés en annexe. Les tableaux ci-dessous indiquent le nombre d'oiseaux pour chaque score lésionnel, pour chaque groupe, à chaque jour d'abattage post infection.

Tableau 8 : Scores lésionnels à J4, J6 et J14 post-infection, protocole de vaccination variant Ark

Chaque donnée indique le nombre d'oiseaux, au sein de chaque groupe, auquel est attribué chaque score lésionnel. Groupe 5 (VNInf) = oiseaux vaccinés, non infectés (23 oiseaux), Groupe 6 (NVNInf) = oiseaux non vaccinés, non infectés (18 oiseaux), Groupe 7 (NVInf) = oiseaux non vaccinés, infectés (23 oiseaux), Groupe 8 (VInf) = oiseaux vaccinés, infectés (24 oiseaux)

J4		Groupe 5 (VNInf)	Groupe 6 (NVNInf)	Groupe 7 (NVInf)	Groupe 8 (VInf)
Nombre total d'oiseaux		8	6	8	8
	0	7	6	1	7
	0,5	0	0	0	0
	1	1	0	0	1
Scores histologiques	1,5	0	0	1	0
	2	0	0	3	0
	2,5	0	0	3	0
	3	0	0	0	0
Moyenne		0,13	0	1,875	0,13

J6		Groupe 5 (VNInf)	Groupe 6 (NVNInf)	Groupe 7 (NVInf)	Groupe 8 (VInf)
Nombre total d'oiseaux		8	6	8	8
	0	8	6	0	5
	0,5	0	0	0	1
	1	0	0	4	1
Scores histologiques	1,5	0	0	1	1
	2	0	0	1	0
	2,5	0	0	1	0
	3	0	0	1	0
Moyenne		0	0	1,63	0,38

J14		Groupe 5 (VNInf)	Groupe 6 (NVNInf)	Groupe 7 (NVInf)	Groupe 8 (VInf)
Nombre total d'oiseaux		7	6	7	8
	0	5	5	1	7
	0,5	1	1	4	1
	1	1	0	2	0
Scores histologiques	1,5	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	2,5	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
Moyenne		0,21	0,08	0,57	0,06

On remarque que, à chaque jour d'abattage, pratiquement tous les oiseaux du groupe 5 (VNInf) ainsi que les oiseaux du groupe 6 (NVNInf) ne présentent jamais de lésions trachéales (score de 0 pour tous les sujets). Seuls 1 animal du groupe 5 à J4, 2 animaux du groupe 5 à J14, et 1 animal du groupe 6 à J14 présentent des lésions trachéales, alors qu'ils ne sont pas infectés. Les oiseaux infectés (groupes 7 et 8) présentent des lésions trachéales diversement importantes selon le jour d'abattage post-infection.

Le test de Cochran-Mantel-Haenszel indique qu'au jour 4, le score lésionnel moyen était significativement plus élevé dans le groupe 7 (NVInf) que dans le groupe 8 (VInf) ($p = 0.001$). Au jour 6, le test indique que le score moyen est significativement plus élevé dans le groupe 7 que dans le groupe 8 ($p = 0.007$). Enfin, au jour 14, le test indique que le score moyen était significativement plus élevé dans le groupe 7 que dans le groupe 8 ($p = 0.008$).

De plus, la moyenne des scores histologiques pour le groupe 8 (VInf) est de 0,13 à J4 (contre 0,88 pour le groupe 4), de 0,38 à J6 (contre 0,75), et de 0,06 à J14 (contre 0,17).

d. Sérologie

i. Protocole variants Mass/Conn

Les prélèvements sanguins, récoltés pour chaque oiseau le jour de l'abattage, ont été analysés par la technique ELISA en vue d'une recherche anticorps anti-IBV. Ces titres sont reportés en annexe et des statistiques descriptives sont répertoriées ci-dessous (Tableau 9).

Tableau 9 : Principales valeurs statistiques descriptives des titres en anticorps des oiseaux, protocole de vaccination variants Mass/Conn

Groupe	Jour d'abattage (post infection)	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart type
Groupe 1 = VNInf (21 oiseaux)	J4	1502	0	8120	2598,12
	J6	2402,88	611	5823	1468,85
	J14	3462,4	367	9760	3317,39
Groupe 2 = NVNInf (19 oiseaux)	J4	0	0	0	0
	J6	0	0	0	0
	J14	0	0	0	0
Groupe 3 = NVInf (19 oiseaux)	J4	0	0	0	0
	J6	0	0	0	0
	J14	637,33	0	1562	669,27
Groupe 4 = VInf (22 oiseaux)	J4	1171,62	0	3903	1167,74
	J6	3593,5	0	9418	2919,18
	J14	6467	1226	15930	5972,12

Il est à noter que :

- Pratiquement tous les animaux des groupes vaccinés (groupe 1 et groupe 4) ont des titres détectables en anticorps anti-IBV à chaque jour d'abattage. Des disparités de titres pour chaque oiseau sont en évidence (allant jusqu'à un facteur x20) au sein de ces groupes. Les écarts type deviennent alors très importants (souvent égaux, parfois supérieurs à la moyenne de chaque groupe), confirmant l'hétérogénéité de réponse en anticorps à la vaccination, au sein d'un groupe d'oiseaux.
- 3 individus du groupe 1 (VNInf) et 2 individus du groupe 4 (VInf) ne présentent pas de titres détectables en anticorps, alors qu'ils ont été individuellement vaccinés.
- Aucun des individus du groupe 2 (NVNInf) ne possède d'anticorps anti-IBV détectables.
- Au sein des animaux du groupe 3 (NVInf) abattus à J14 post infection, 2 oiseaux sur 3 possèdent des titres en anticorps détectables..

Pour l'analyse statistique, les données ont été transformées avec le logarithme base10 + 1 pour normaliser les distributions. Les moyennes des titres transformés de chaque groupe, à chaque jour, sont exprimées dans le tableau et le graphique ci-dessous.

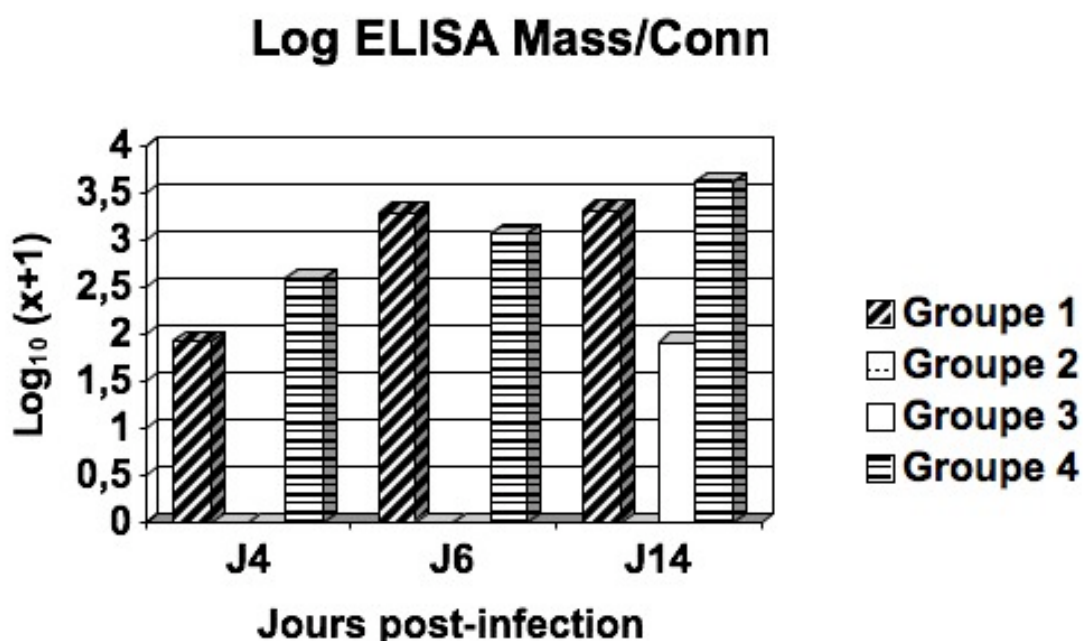
Tableau 10 : Moyennes des titres en anticorps pour chaque groupe, protocole de vaccination variants Mass/Conn

Les moyennes sont transformées avec le $\text{Log}_{10} (x+1)$ pour normaliser les distributions. Groupe 1 = oiseaux vaccinés, non infectés (21 oiseaux), Groupe 2 = oiseaux non vaccinés, non infectés (19 oiseaux), Groupe 3 = oiseaux non vaccinés, infectés (19 oiseaux), Groupe 4 = oiseaux vaccinés, infectés (22 oiseaux)

Jour d'abattage post-infection	Groupe 1 (VNInf)	Groupe 2 (NVNInf)	Groupe 3 (NVInf)	Groupe 4 (VInf)
J4	1,928	0	0	2,601
J6	3,299	0	0	3,069
J14	3,321	0	1,913	3,626

Figure 12 : Evolution des titres moyens en anticorps, pour chaque groupe, après infection (protocole vaccination variants Mass/Conn)

Les moyennes sont transformées avec le $\text{Log}_{10} (x+1)$ pour normaliser les distributions. Groupe 1 = oiseaux vaccinés, non infectés (21 oiseaux), Groupe 2 = oiseaux non vaccinés, non infectés (19 oiseaux), Groupe 3 = oiseaux non vaccinés, infectés (19 oiseaux), Groupe 4 = oiseaux vaccinés, infectés (22 oiseaux)



Le modèle linéaire, avec le groupe et le temps comme facteurs fixes, indique un effet significatif du groupe tous temps confondus ($p < 0.0001$) et du temps tous groupes confondus ($p = 0.0003$). Les contrastes deux à deux entre les groupes à chacun des temps, avec la correction de Bonferroni, permettent de prendre en ligne de compte le grand nombre de comparaisons.

Il est à noter que :

- Au jour 4 il n'y avait pas de différence entre les groupes 2 (NVNinf) et 3 (NVInf) et entre les groupes 1 (VNInf) et 4 (VInf). Par contre, il y avait des différences significatives au niveau des autres groupes ($4 > 3$, $4 > 2$, $1 > 3$ et $1 > 2$).
- Au jour 6, il n'y avait pas de différence entre les groupes 2 (NVNinf) et 3 (NVInf) et entre les groupes 1 (VNInf) et 4 (VInf). Par contre, il y avait des différences significatives au niveau des autres groupes.
- Au jour 14, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes 2 (NVNinf) et 3 (NVInf) (différence marginale qui n'est pas significative avec la correction), de même qu'entre les groupes 4 (VInf) et 3 (NVInf), entre les groupes 1 (VNInf) et 3 (NVInf) et entre les groupes 1 (VNInf) et 4 (VInf). Par contre, il y avait des différences significatives au niveau des autres groupes.

Enfin, l'analyse de la relation entre les scores de lésion (histologie) dans le groupe 4 (VInf) et les titres ELISA, indique une relation négative marginalement non significative, entre les deux variables ($r = -0.40$, $0.1 > p > 0.05$).

ii. Protocole variant Ark

Les prélèvements sanguins, récoltés pour chaque oiseau le jour de l'abattage, ont été analysés par la technique ELISA en vue d'une recherche anticorps anti-IBV. Ces titres sont reportés en annexe et des statistiques descriptives sont répertoriées ci-dessous (Tableau 11).

Tableau 11 : Principales valeurs statistiques descriptives des titres en anticorps des oiseaux, protocole de vaccination variant Ark

Groupe	Jour d'abattage (post infection)	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart type
Groupe 5 = VNInf (23 oiseaux)	J4	148,5	0	654	258,95
	J6	1996,25	0	8318	3162,30
	J14	664,86	0	1480	523,82
Groupe 6 = NVNInf (18 oiseaux)	J4	0	0	0	0
	J6	0	0	0	0
	J14	0	0	0	0
Groupe 7 = NVInf (23 oiseaux)	J4	0	0	0	0
	J6	0	0	0	0
	J14	420,63	0	1351	434,86
Groupe 8 = VInf (24 oiseaux)	J4	1446	0	4632	1829,08
	J6	2431,75	0	9207	2826,82
	J14	3705,38	0	10130	3126,55

Il est à noter que :

- La majorité des animaux des groupes vaccinés (groupe 5 et groupe 8) ont des titres détectables en anticorps anti-IBV, à chaque jour d'abattage. Comme pour l'expérience précédente, des disparités de titres pour chaque oiseau sont en évidence (allant jusqu'à un facteur x30). De même, les écarts types deviennent alors très importants (souvent égaux, parfois supérieurs à la moyenne de chaque groupe), confirmant l'hétérogénéité de réponse en anticorps à la vaccination, au sein d'un groupe d'oiseaux.
- Au sein du groupe 5 (VNInf), 6 oiseaux à J4, 2 à J6, et 1 à J14 ne présentent pas de titres détectables en anticorps, alors qu'ils sont supposés correctement vaccinés. De même, au sein du groupe 8 (VInf) 1 oiseau à chaque jour d'abattage ne présente pas de titre détectable en anticorps, alors qu'il est supposé correctement vacciné.
- Aucun des individus du groupe 6 (NVNInf) ne possède d'anticorps anti-IBV détectables.
- Au sein des animaux du groupe 7 (NVInf) abattus à J14 post infection, 6 oiseaux sur 7 possèdent des titres en anticorps détectables.

Pour l'analyse statistique, les données ont été transformées avec le logarithme base10 + 1 pour normaliser les distributions. Les moyennes des titres transformés de chaque groupe, à chaque jour, sont exprimées dans le tableau et le graphique ci-dessous.

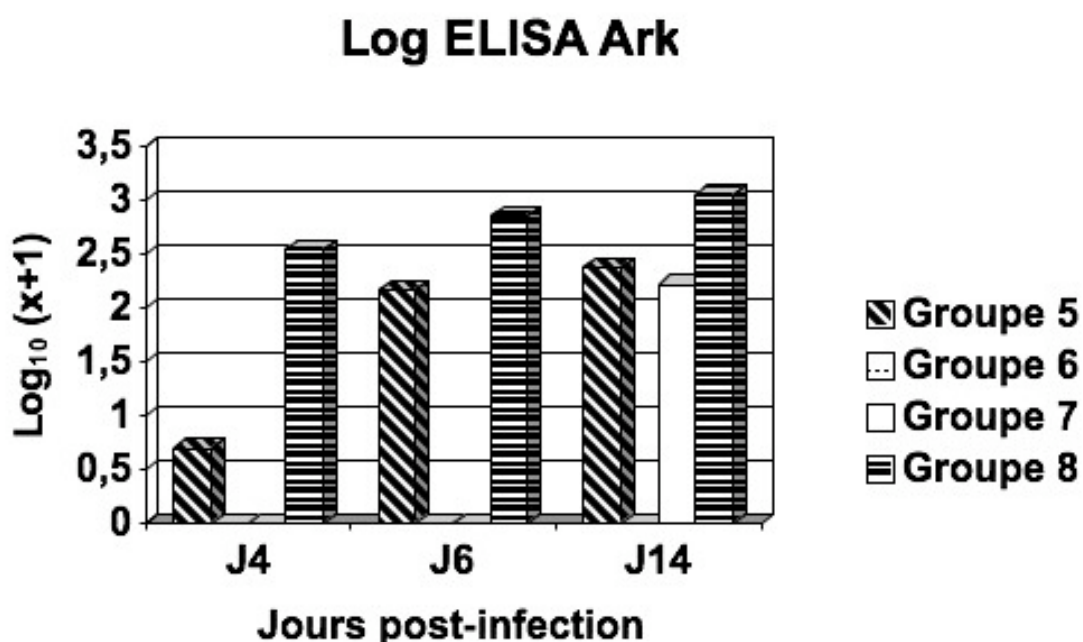
Tableau 12 : Moyennes des titres en anticorps pour chaque groupe, protocole de vaccination variant Ark

Les moyennes sont transformées avec le $\text{Log}_{10} (x+1)$ pour normaliser les distributions. Groupe 5 = oiseaux vaccinés, non infectés (23 oiseaux), Groupe 6 = oiseaux non vaccinés, non infectés (18 oiseaux), Groupe 7 = oiseaux non vaccinés, infectés (23 oiseaux), Groupe 8 = oiseaux vaccinés, infectés (24 oiseaux)

Jour d'abattage post-infection	Groupe 5 (VNInf)	Groupe 6 (NVNInf)	Groupe 7 (NVInf)	Groupe 8 (VInf)
J4	0,693	0	0	2,545
J6	2,173	0	0	2,861
J14	2,383	0	2,222	3,053

Figure 13 : Evolution des titres moyens en anticorps, pour chaque groupe, après infection (protocole vaccination variant Ark)

Les moyennes sont transformées avec le $\text{Log}_{10} (x+1)$ pour normaliser les distributions. Groupe 5 = oiseaux vaccinés, non infectés (23 oiseaux), Groupe 6 = oiseaux non vaccinés, non infectés (18 oiseaux), Groupe 7 = oiseaux non vaccinés, infectés (23 oiseaux), Groupe 8 = oiseaux vaccinés, infectés (24 oiseaux)



Le modèle linéaire, avec le groupe et le temps comme facteurs fixes, indique un effet significatif du groupe tous temps confondus ($p < 0.0001$) et du temps tous groupes confondus ($p = 0.0002$). Les contrastes deux à deux entre les groupes à chacun des temps, avec la correction de Bonferroni, permettent de prendre en ligne de compte le grand nombre de comparaisons.

Il est à noter que :

- Au jour 4 il n'y avait pas de différence entre les groupes 6 (NVNInf) et 7 (NVInf), entre les groupes 5 (VNInf) et 7 (NVInf) et entre les groupes 5 (VNInf) et 6 (NVNInf). Par contre, il y avait des différences significatives au niveau des autres groupes ($8 > 7$, $8 > 6$ et $8 > 5$).
- Au jour 6, il n'y avait pas de différence entre les groupes 6 (NVNInf) et 7 (NVInf) et entre les groupes 5 (VNInf) et 8 (VInf). Par contre, il y avait des différences significatives au niveau des autres groupes ($8 > 7$, $8 > 6$, $5 > 7$, $5 > 6$).
- Au jour 14, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes 7 (NVInf) et 8 (VInf), entre les groupes 5 (VNInf) et 7 (NVInf) et entre les groupes 5 (VNInf) et 8 (VInf). Par contre, il y avait des différences significatives au niveau des autres groupes ($7 > 6$, $8 > 6$, $5 > 6$).

Enfin, l'analyse de la relation entre les scores de lésion (histologie) dans le groupe 8 (VInf) et les titres ELISA, indique une relation positive marginalement non significative, entre les deux variables ($r = 0.40$, $0.1 > p > 0.05$).

3. Discussion

Dans cette seconde étude, une évaluation de l'efficacité de diverses souches vaccinales, contre une infection expérimentale avec le variant Qu_MV était réalisée, après challenge à 31 jours d'âge d'animaux SPF préalablement vaccinés selon divers protocoles. Des analyses issues d'observation cliniques et nécropsiques, ainsi que des analyses sérologiques et histologiques permettaient de comparer l'efficacité de chaque protocole vaccinal.

La majorité des études d'infections expérimentales en vue d'une évaluation de la protection vaccinale utilise des doses infectieuses allant de 10^4 (Gelb et al., 2005) à 10^6 (Martin et al., 2007) EID₅₀ par animal. Dans notre présente étude, la dose infectieuse, bien que différente pour chaque expérience, est donc supposée suffisante pour recréer une infection expérimentale.

Les observations de signes cliniques et de lésions macroscopiques éventuels sur les animaux infectés se sont toujours révélées négatives pour chaque groupe et à chaque jour. Cette observation confirme l'absence de signes cliniques et de lésions macroscopiques lors de la première étude (*cf. supra*). Ainsi, malgré l'utilisation d'une souche Qu_MV d'une autre origine (Animal Health Laboratory - Université de Guelph, Ontario, Canada), et dont les effets pathogènes sur embryons étaient avérés, il est désormais admis que les signes cliniques et les lésions macroscopiques d'aérosacculite sur des oiseaux Leghorn SPF infectés par le variant Qu_MV, et en conditions d'élevage contrôlées, sont généralement absents, ce qui est également rapporté dans la littérature (Jackwood et al., 2007 ; Martin et al., 2007). Les raisons les plus probables en sont la faible densité d'animaux (19 à 24 animaux pour 2 m², contre 20 à 25 par m² en élevage standard), la petite taille et le faible gain moyen quotidien (facteur de stress) des oiseaux (souches Leghorn - environ 450g à 40 jours *versus* souches poulets standard - 1,8kg à 40 jours), le statut SPF des oiseaux, ainsi que les conditions d'élevage rigoureusement contrôlées (ventilation, poussière...). Ces hypothèses suggèrent une faible diffusion du virus entre les animaux, mais aussi une absence de surinfections bactériennes, qui seraient à ce moment responsables de signes cliniques et des lésions d'aérosacculites, tels qu'observés en élevage au Québec et ailleurs dans le monde.

Il est donc désormais possible de reconsidérer le réel pouvoir pathogène des souches Qu_MV de bronchite infectieuse en élevage de poulets, puisque la pathogénie primaire stricte de ces variants n'est pas avérée. Cette étude en milieu contrôlé confirme ainsi les résultats préliminaires obtenus par l'étude épidémiologique des facteurs de risques viraux d'aérosacculite au Québec pour laquelle certains élevages positifs à Qu_MV présentaient un faible taux d'aérosacculite à l'abattoir (Ankouche, 2008). Ainsi, l'importance de la régie d'élevage, et notamment des facteurs de biosécurité est à nouveau mise en avant dans le contrôle pratique du variant Qu_MV en élevage au Québec.

L'appui de l'histologie a permis de montrer clairement des effets pathogènes de la souche Qu_MV, malgré une absence de signes cliniques et de lésions macroscopiques chez les animaux infectés. Ainsi, la grande majorité des oiseaux infectés présentaient des lésions trachéales microscopiques, plus ou moins intenses selon leur niveau de protection vaccinale. Nous constatons dans cette étude une protection apparente de la trachée après un protocole vaccinale, puisque les scores lésionnels des oiseaux vaccinés puis infectés sont, le plus souvent (à J6 et J14 post-infection pour le protocole Mass/Conn, à chaque jour pour le protocole Ark), moins élevés que ceux des oiseaux non vaccinés et infectés. Il est notable qu'avec le protocole de vaccination par le variant Ark, les différences de lésions trachéales sont statistiquement significatives à chaque jour d'abattage, à l'inverse du protocole Mass/Conn (pour lequel les différences de lésions ne sont pas statistiquement significatives à J4 post-infection). De plus, la comparaison deux à deux des moyennes des scores lésionnels de chaque groupe vacciné et infecté, à chaque jour, montre des scores lésionnels moins élevés pour les oiseaux ayant été vaccinés par le protocole Ark.

Ceci suggère donc qu'une protection vaccinale peut être apportée à des oiseaux, en vue d'une prévention par une infection à Qu_MV. Cette protection semble, à vue des résultats histologiques, plus efficace dans le cadre d'un protocole de vaccination au moyen de variants Ark qu'au moyen de variants Mass/Conn. Toutefois, ces résultats ayant été obtenus en milieu contrôlé, la suggestion d'utilisation de vaccin de variant Ark doit être analysée avec prudence, car l'importance de la régie d'élevage, notamment via les mesures de biosécurité, représente un facteur primordial dans la gestion pratique des variants Qu_MV de bronchite en élevage au Québec.

De plus, la possibilité d'importation commerciale de vaccins vivants atténués Ark doit être étudiée en tenant compte non seulement de ces résultats histopathologiques, mais aussi du risque inhérent à l'introduction d'un nouveau variant viral atténué dans une zone géographique.

Les résultats sérologiques obtenus lors de cette étude indiquent tout d'abord une hétérogénéité d'immunisation des animaux au sein d'un même groupe (évaluée par mesure des niveaux individuels en anticorps), malgré une vaccination réalisée avec soin et attention, et ceci quel que soit le variant vaccinal employé. Des titres ELISA en anticorps allant jusqu'à un facteur 30 (et des écarts types très importants) sont observés au sein de groupes vaccinés, et certains animaux montrent même une absence d'anticorps anti-IBV après vaccination.

Cette observation rejoint des théories d'hétérogénéité de vaccination déjà décrites en milieu expérimental (Cavanagh, 2007). Ces résultats confirment donc à la fois la difficulté de réalisation des bonnes pratiques de la vaccination, et aussi l'importance de la circulation du virus vaccinal atténué au sein d'une population d'oiseaux vaccinés. Ici, en milieu à faible densité d'animaux, et dans des conditions d'élevage optimales (ventilation notamment), il est tout à fait possible que des animaux n'ayant pas été initialement vaccinés, n'aient pas été à nouveau atteints par le virus vaccinal circulant au sein du troupeau d'oiseaux. Toutefois ces animaux, bien que vaccinés mais non immunisés, ont toujours été pris en compte dans les analyses statistiques de notre étude, afin de tenir compte de ces « aléas » de vaccination, courants en élevage.

De plus, les résultats sérologiques, analysés cette fois-ci à l'échelle de chaque groupe, nous ont permis, au cours de cette étude, de vérifier que le protocole se déroulait convenablement, notamment en détectant d'éventuelles contaminations accidentelles (qui auraient alors engendré une séroconversion), ainsi que le suivi de la bonne vaccination de chaque groupe. Ces résultats indiquent un effet significatif de la vaccination sur le taux d'anticorps sériques (groupe vacciné et infecté *versus* groupe non vacciné et infecté) dès J4 post-infection. Cet effet significatif disparaît à J14 post-infection, avec l'apparition d'anticorps en réaction à l'infection chez les sujets non vaccinés (temps de séroconversion). Ainsi, les animaux vaccinés, préalablement immunisés, réagissent plus rapidement à une infection expérimentale, en synthétisant des anticorps sériques, que les animaux infectés non vaccinés.

Enfin, la relation entre les taux d'anticorps sériques et le niveau de protection (via les scores lésionnels), étudiée lors de chaque protocole, ne permet pas de démontrer statistiquement une corrélation (positive ou négative) entre ces variables, chez des animaux vaccinés et infectés. Ceci confirme les données existantes (Cavanagh, 1997) indiquant qu'il n'y a pas de lien entre le taux d'anticorps sériques et le niveau de protection.

Dans cette étude, les protocoles vaccinaux étudiés impliquaient des vaccinations (par instillation oculo-nasale et par voie orale) à 1 et 14 jours d'âge. Les animaux étant infectés à 31 jours d'âge, puis abattus au moins 4 jours après, les lésions histopathologiques trachéales observables étaient dues à l'infection virale récente. Toutefois, il peut être stipulé que certains variants vaccinaux atténués (notamment le variant Ark) peuvent eux aussi causer des lésions, minimes, de la trachée des oiseaux infectés (bronchite vaccinale). En prévision de ces cas hypothétiques, certains éleveurs ou vétérinaires ne pratiquent ainsi qu'un programme de vaccination « allégé » (au moyen d'une seule vaccination à 1 jour d'âge par exemple). Dans le cas de protocole vaccinal ici proposé (à 1 et 14 jours d'âge), un risque de bronchite vaccinale doit alors être pris en compte, avec la possibilité de surinfections secondaires. Ces notions doivent demeurer à l'esprit lors de l'élaboration et de l'application d'un programme de vaccination.

Enfin, cette étude de protection vaccinale, basée ici exclusivement sur des paramètres cliniques, histologiques et sérologique, ne comporte pas de données virologiques. En effet, il est souvent admis que l'absence de réisolement viral à 4 ou 5 jours post infection, est un signe de protection clinique (Hofstad, 1981 ; Gelb et al., 2005). Dans notre étude, des écouvillons trachéaux avaient été effectués stérilement sur chaque animal, le jour de son abattage, en vue d'une recherche et d'une caractérisation d'un virus IBV variant, éventuellement présent (variant vaccinal ou variant infectieux). Malheureusement, des aléas techniques n'ont pas permis la réalisation de ces analyses, qui auraient alors apporté un complément non négligeable à l'étude de la protection vaccinale. Il est possible que ces analyses soient effectuées courant 2009, ou qu'une autre étude complémentaire soit réalisée, afin de compléter la présente étude.

C - Discussion finale

Dans cette étude expérimentale, réalisée de janvier à juin 2008 au centre de recherche avicole de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal à St Hyacinthe (Québec), des essais de protocoles vaccinaux contre le variant Qu_MV de bronchite infectieuse ont été effectués. Cette étude était commanditée et financée par les Eleveurs de Volailles du Québec, en réponse à une pression croissante de ce variant infectieux en élevage.

La première partie de cette étude, comparant différents variants (Qu16 et Qu_MV) de bronchite infectieuse, isolés au Québec ces dernières années, a permis de montrer que le pouvoir pathogène réel de ces variants dépend considérablement des conditions d'élevage des oiseaux. Ainsi, cette étude en milieu contrôlé confirme des résultats épidémiologiques déjà obtenus précédemment lors d'une enquête sur les facteurs de risque d'aérosacculite à l'abattoir (Ankouche, 2008), montrant que certains élevages pouvaient être atteints par ces variants de bronchite, sans présenter de signes cliniques ni lésionnels.

La seconde partie de cette étude a permis de comparer deux protocoles de vaccination différents face à une infection par ces variants infectieux isolés au Québec. L'un de ces protocoles de vaccination, employant les variants Massachusetts et Connecticut, est fréquemment utilisé en pratique par les vétérinaires au Québec. L'autre protocole impliquait l'utilisation d'un variant interdit à la commercialisation au Canada (variant Arkansas), et testé expérimentalement ici. La protection vaccinale était majoritairement évaluée par l'histologie, et le suivi de la vaccination et de l'infection était réalisé par des analyses sérologiques notamment. En conclusion, les deux protocoles semblent apporter une protection partielle mais non totale aux oiseaux infectés. Le protocole variant Ark semble apporter une protection significativement supérieure au protocole variants Mass/Conn. Enfin, cette partie expérimentale a permis de confirmer la possibilité d'échec de vaccination et d'hétérogénéité de réponse à la vaccination de celle-ci au sein d'un élevage (notion déjà documentée par Cavanagh, 2007).

Enfin, il est suggéré que des données virologiques pourraient appuyer les données cliniques et histologiques fournies ici, afin de compléter au mieux l'étude.

En bilan, une protection vaccinale contre une infection par le variant québécois Qu_MV de bronchite infectieuse, peut être apportée par l'utilisation d'un protocole de vaccination Mass/Conn, ou possiblement mieux encore, par l'utilisation d'un protocole variant Arkansas. Toutefois, et face à l'impossibilité légale d'utiliser le variant Arkansas au Canada, la régie d'élevage semble être un facteur déterminant dans l'expression et la gestion pratique de ces variants infectieux au Québec.

CONCLUSION

L'étude expérimentale qui fait l'objet de cette thèse a été réalisée en réponse à une demande des Eleveurs de Volailles du Québec, suite à une pression croissante de variants émergents de bronchite infectieuse aviaire. Ces variants viraux constituent une problématique d'actualité pour les vétérinaires avicoles du Québec, et leur gestion implique appui médical et rigueur sanitaire.

L'émergence fréquente de nouveaux variants infectieux de bronchite aviaire dans le monde, le plus souvent détectée par l'échappement à la vaccination des oiseaux d'élevage, constitue une des actualités courantes de la médecine vétérinaire avicole. La gestion pratique et la prévention des cas de bronchite aviaire passent largement par l'emploi de la vaccination au moyen de souches vaccinales issues de variants viraux. La bronchite infectieuse aviaire, à répartition mondiale, est ainsi en constante évolution, via l'apparition régulière de variants viraux, et l'adaptation des protocoles vaccinaux des oiseaux d'élevage est alors une problématique récurrente pour les vétérinaires praticiens.

L'étude réalisée ici a permis non seulement de clarifier les pouvoirs pathogènes stricts de ces nouveaux variants infectieux, mais aussi d'en proposer des solutions de prévention, *via* la vaccination. Les résultats obtenus permettent d'affirmer que des protocoles de vaccination classiques (variants Mass/Conn) permettent de diminuer les effets lésionnels de ces souches de bronchite, et qu'un protocole impliquant le variant vaccinal Arkansas, jusque-là interdit au Canada, pourrait améliorer encore cette protection. Toutefois, la réelle répercussion clinique de ces variants infectieux de bronchite étant largement dépendante des conditions d'élevage des oiseaux (densité d'élevage, humidité, poussière...), la gestion technique et sanitaire (biosécurité) des élevages à risques demeure fondamentale.

De ce fait, la médecine vétérinaire avicole, se développant en parallèle avec une filière agro-alimentaire en plein essor mondial, est alors en constant équilibre entre gestion technique et médicale des maladies des volailles. La problématique de biosécurité en vue de la gestion des risques infectieux en élevage est d'importance primordiale, et fait encore l'objet de vigilance constante et accrue (influenza aviaire, maladie de Newcastle, salmonelloses aviaires...). Parallèlement, le développement des outils médicaux de gestion des risques infectieux, au sein desquels la vaccination est un élément majeur de la prévention, est lui aussi en plein essor, notamment en matière de recherche et de développement. Ainsi, l'avenir de la médecine avicole et de la recherche encadrant cette dernière semblent avoir une perspective durable, tant que le marché et la filière avicole mondiale se tiendront parmi les productions animales les plus dynamiques.

|

|

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMBALI A.G., JONES R.CC

Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus

Avian Diseases, 1990, 34:809-817

ANIMAS S.B., OTSUKI K., HANAYAMA M., SANEKATA T., TSUBOKURA M.

Experimental infection with avian infectious bronchitis virus (Kagoshima-34 strain) in chicks at different ages

J. Vet. Med. Sci., 1994, 56(3):443-7

ANKOUCHE R.

Facteurs de risque associés à la prévalence d'aérosacculite à l'abattoir chez le poulet de chair
M.Sc. : Montreal, UdeM, Med. Vet. St Hyacinthe, 2008

BACON L.D., HUNTER D.B., ZHANG H.M., BRAND K., ETCHES R.

Retrospective evidence that the MHC (B haplotype) of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens

Avian Pathol, 2004, 33(6):605-9

BALESTEROS M.L., SANCHEZ C.M., ENJUANES L.

Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism

Virology, 1997, 227:378-388

BILENGA G., COOK J., GELB J., DE WIT J.

Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine : a review

Avian Pathology, 2004, 33(6), 550-557

BRUDER, M.

Le diagnostic sérologique de la bronchite infectieuse aviaire par la méthode d'inhibition de l'hémagglutination. Quelques exemples dans six élevages de poules pondeuses.

Th. : Med. vet. : Lyon, 1991. 74

CAVANAGH, D.

Coronavirus avian infectious bronchitis virus

Vet. Res., 2007, 38:281-297

CAVANAGH, D.

Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus

Avian Pathology, 2003, 32(6), 567-582

CAVANAGH, D.

Susceptibility of domestic and other birds to coronaviruses

In : 14th World Veterinary Poultry Congress, Istanbul, Turkey, 22-26 august 2005

Final program & abstract book, 74-81

CAVANAGH D., CASAIS R., ARMESTO M., HODGSON T., IZADKHAHI S., DAVIES M., LIN F., TARPEY I., BRITTON P.

Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins

Vaccine, 2007, 25:5558-5562

CAVANAGH D., NAQI S.A.

Infectious bronchitis

In : CALNEK B.W., BARNES H. J., BEARD C. W., *et al.*

Diseases of poultry, Tenth edition, 1997, 511-526

COLLISSON E. W., PEI J., DZIELAWA J., SEO S.H.

Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry

Dev. Comp. Immunol., 2000, 24:187-200

COOK J., SMITH H.W., HUGGINS M.B.

Infectious bronchitis immunity: its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*

J. Gen. Virol., 1986, 67:1427-1433

COOK J., OTSUKI K., HUGGINS M., BUMSTEAD N.

Investigations into resistance of chicken lines to infection with infectious bronchitis virus

Adv Exp Med Biol., 1990, 276:491-6

DE WIT J.J., DE JONG M. C. M., PIJPERS A., VERHEIJDEN JH.

Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens

Avian Pathology, 1998, 27:464-471

GELB Jr J., JACKWOOD M. W.

Infectious Bronchitis

In : SWAYNE D.E., GLISSON J.R., JACKWOOD M. W., PEARSON J. E. and REED M. W., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, PA.

A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th edition, 1998, 169-174

GELB Jr J., WEISMANN Y., LADMAN B.S., MEIR R.

S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000)

Avian Pathology, 2005, 34(3), 194-203

GOUGH R., ALEXANDER D.J.

Bronchite infectieuse aviaire (chapitre 2.7.6)

In : Office International des Epizooties

Manuel Terrestre de l'OIE, 2005, 969-981

HAIJEMA B.J., VOLDERS H., ROTTIER P.J.M.

Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome

J. Virol., 2003, 77:4528-4538

HOFSTAD M.S.

Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus
Avian Diseases, 1981, 25:650-654

IGNJATOVIC J., ASHTON F.

Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using a monoclonal antibody-based ELISA
Avian Pathology, 1996, 25:721-736

JACKWOOD M.W., HILT D.A., WILLIAMS S.M., WOOLCOCK P., CARDONA C., O'CONNOR R.

Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California
Avian diseases, 2007, 51:527-533

JOINER K.S., HOERR F.J., EWALD S.J., VAN SANTEN V.L., WRIGHT J.C., VAN GINKEL F.W., TORO H.

Pathogenesis of infectious bronchitis virus in vaccinated chickens of two different major histocompatibility B complex genotypes
Avian diseases, 2007, 51:758-763

KHUAN-YU L., HUI-CHUNG W., CHING-HO W.

Protective effect of vaccination in chicks with local infectious bronchitis viruses against field virus challenge
J Microbiol Immunol Infect, 2005, 38:25-30

KLIEVE A.V., CUMMING R.B.

Infectious bronchitis: safety and protection in chickens with maternal antibody
Aust. Vet., 1988, 65:396-397

KOTTIER S., CAVANAGH D., BRITTON P.

Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus
Virology, 1995, 213, 569-580

LES ELEVEURS DE VOLAILLES DU QUEBEC

L'industrie avicole en chiffres (page consultée le 26 juin 2008)

Adresse URL: http://www.volaillesduquebec.qc.ca/6_3.htm

LIU S, ZHANG X., WANG Y., LI C., LIU Q., HAN Z., ZHANG Q., KONG X., TONG G.

Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus
The Veterinary Journal, 2007

LUKERT P.D.

Comparative sensitivities of embryonnating chicken's eggs and primary chicken embryo kidney and liver cell cultures to infectious bronchitis virus
Avian diseases, 1965, 9:308-316

MARTIN M.P., WAKENELL P.S., WOOLCOCK P., O'CONNOR B.

Evaluation of the effectiveness of two infectious bronchitis virus vaccine programs for preventing disease caused by a California IBV field isolate
Avian Diseases, 2007, 51:584-589

- MARTINS N.R., MOCKETT A.P., BARRETT A.D., COOK J.K.
IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines
Avian Diseases, 1991, 35:470-475
- MOSCOSO H., RAYBON E.O., THAYER S.G., HOFACRE C.L.
Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA[®] Filter Paper
Avian Diseases, 2005, 49:24-29
- NIX W.A., TROEBER D.S., KINGHAM B.F., KEELER C.L. JR, GELB J JR.
Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens
Avian diseases, 2000, 44:568-581
- OFFICE DE L'ELEVAGE
Le marché des produits avicoles dans le monde (page consultée le 26 juin 2008)
Adresse URL: <http://www.office-elevage.fr/publications/marche2007/Volaille/Vol-monde.pdf>
- OTSUKI K., NAKAMURA T., KUBOTA N., KAWAOKA Y., TSUBOKURA M.
Comparison of two strains of avian infectious bronchitis virus for their interferon induction viral growth and development of virus-neutralising antibody in experimentally-infected chickens
Vet. Microbiol., 1987, 15:31-40
- PANTIN-JACKWOOD M. J., BROWN T. P., HUFF G. R.
Reproduction of proventriculitis in commercial and specific-pathogen-free broiler chickens
Avian Diseases, 2005, 49:352-360
- RIDDELL C.
Infectious Bronchitis
In : RIDDELL C.
Avian histopathology, Second Edition (2001)
American Association of Avian Pathology
- RUANO M., EL-ATTRACHE J., VILLEGAS P.
A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus
Avian Diseases, 2000, 44:99-104
- SMATI R., SILIM A., GUERTIN C., HENRICHON M., MARANDI M., ARELLA M., MERZOUKI A.
Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated in Quebec
Virus Genes, 2002, 25:1, 85-93
- STADLER K., MASIGNANI V., EICKMANN M., BECKER S., ABRIGNANI S., KLENK H.D., RAPPUOLI R.
SARS - Beginning to understand a new virus
Nature Reviews Microbiology, 2003, 209-218

VILLARREAL L. Y.B., BRANDÃO P.E., CHACÓN J.L., ASSAYAG M.S., MAIORKA P.C., RAFFI P., SAIDENBERG A.B., JONES R.C., FERREIRA A.J.

Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections

Avian Diseases, 2007, 51:900-904

WINTER C., SCHEGMANN-WESSELS C., CAVANAGH D., NEUMAN U., HERRLER G.

Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian infectious bronchitis virus

J. Gen. Virol., 2006, 87:1209-1216

|

|

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Scores lésionnels macroscopiques, histologiques, et titres ELISA
Protocole de vaccination variants Mass/Conn
- Annexe 2 : Scores lésionnels macroscopiques, histologiques, et titres ELISA
Protocole de vaccination variant Ark

○ Annexe 1 : Scores lésionnels macroscopiques, histologiques, et titres ELISA
 Protocole de vaccination variants Mass/Conn

VNInf = Groupe Vacciné, Non Infecté ; *NVNInf* = Groupe Non Vacciné, Non Infecté ;
NVInf = Groupe Non Vacciné, Infecté ; *VInf* = Groupe Vacciné, Infecté

Groupe	Jour d'abattage (post-infection)	ID poulet	ID lame	Titre ELISA	Log10(x+1)	Moyennes log	Lésion score macro	Lésion score histo
Groupe 1 = vaccinés, non infectés (21 oiseaux)	J4	74	48	718	2,856	1,928	0	0
		78	80	0	0		0	0
		95	62	8120	3,909		0	0
		102	67	0	0		0	0
		104	107	2279	3,357		0	0
		114	103	481	2,683		0	0
		143	86	0	0		0	0
		144	87	418	2,622		0	0
	J6	68	66	2426	3,385	3,299	0	0
		79	73	5823	3,765		0	0
		83	52	611	2,786		0	0
		97	76	2578	3,411		0	0
		100	47	1849	3,26		0	0
		106	56	2398	3,380		0	0
		109	81	991	2,99		0	0
		133	110	2547	3,406		0	0
	J14	64	119	2018	3,305	3,321	0	0
		107	126	367	2,565		0	0
		130	121	1546	3,189		0	0
		137	115	3621	3,558		0	0
		142	117	9760	3,989		0	0

Groupe 2 = non vaccinés, non infectés (19 oiseaux)	J4	62	90	0	0	0	0	0
		67	84	0	0		0	0
		76	69	0	0		0	0
		88	64	0	0		0	0
		94	93	0	0		0	0
		103	49	0	0		0	0
		118	51	0	0		0	0
		119	77	0	0		0	0
	J6	73	102	0	0	0	0	0
		77	50	0	0		0	0
		80	98	0	0		0	0
		90	92	0	0		0	0
		96	65	0	0		0	0
		101	55	0	0		0	0
		126	100	0	0		0	0
		141	53	0	0		0	0
	J14	86	118	0	0	0	0	0
		105	111	0	0		0	0
		128	112	0	0		0	0
Groupe 3 = non vaccinés, infectés (19 oiseaux)	J4	72	60	0	0	0	0	3
		81	108	0	0		0	0
		85	89	0	0		0	2
		91	104	0	0		0	3
		93	57	0	0		0	0
		117	72	0	0		0	1
		120	99	0	0		0	2
		147	61	0	0		0	2
	J6	66	70	0	0	0	0	2
		70	88	0	0		0	2,5
		71	54	0	0		0	2
		84	106	0	0		0	2,5
		110	59	0	0		0	2,5
		112	74	0	0		0	2
		124	68	0	0		0	2
		138	101	0	0		0	3
	J14	63	125	1562	3,193	1,913	0	0,5
		65	114	350	2,545		1	0,5
		69	123	0	0		0	0,5

Groupe 4 = vaccinés, infectés (22 oiseaux)	J4	60	83	547	2,738	2,601	0	0
		75	109	255	2,408		0	2,5
		89	94	3903	3,591		0	0
		98	63	1700	3,230		0	2
		115	82	0	0		0	1,5
		122	71	432	2,636		0	1
		125	96	1250	3,097		0	0
		136	91	1286	3,109		0	0
	J6	87	95	3835	3,583	3,069	0	1
		99	78	5280	3,722		0	1
		111	79	0	0		0	1
		113	105	3680	3,565		0	0
		123	75	9418	3,974		0	0
		129	85	2860	3,456		0	2
		135	58	3102	3,491		0	0
		139	97	573	2,758		0	1
	J14	82	120	5501	3,740	3,626	0	0
		108	127	15930	4,202		0	0,5
		127	113	3267	3,514		0	0
		131	124	1432	3,156		0	0,5
		132	122	1226	3,088		0	0
		145	116	11446	4,058		0	0

○ Annexe 2 : Scores lésionnels macroscopiques, histologiques, et titres ELISA
 Protocole de vaccination variant Ark

VNInf = Groupe Vacciné, Non Infecté ; *NVNInf* = Groupe Non Vacciné, Non Infecté ;
NVInf = Groupe Non Vacciné, Infecté ; *VInf* = Groupe Vacciné, Infecté

Groupe	Jour d'abattage (post-infection)	ID poulet	ID lame	Titre ELISA	Log10(x+1)	Moyenne log	Lésion score macro	Lésion score histo
Groupe 5 = vaccinés, non infectés (23 oiseaux)	J4	287	137	0	0	0,693	0	0
		249	139	0	0		0	0
		296	142	0	0		0	1
		284	150	654	2,816		0	0
		252	151	0	0		0	0
		281	157	0	0		0	0
		253	160	534	2,728		0	0
		248	172	0	0		0	0
	J6	293	152	6502	3,813	2,173	0	0
		268	175	198	2,298		0	0
		303	177	539	2,732		0	0
		259	178	180	2,257		0	0
		256	180	233	2,369		0	0
		275	182	0	0		0	0
		264	186	8318	3,920		0	0
		272	187	0	0		0	0
	J14	282	188	0	0	2,383	0	0
		314	194	318	2,503		0	0
		298	197	1227	3,08		0	0
		310	202	180	2,257		0	0
		277	210	1480	3,170		0	0
		312	211	464	2,667		0	1
		302	215	985	2,993		0	0,5
Groupe 6 = non vaccinés, non infectés (18 oiseaux)	J4	211	132	0	0	0	0	0
		221	133	0	0		0	0
		230	134	0	0		0	0
		213	144	0	0		0	0
		210	145	0	0		0	0
		201	173	0	0		0	0
		208	138	0	0	0	0	0
	J6	220	148	0	0		0	0
		238	167	0	0		0	0
		214	176	0	0		0	0
		223	179	0	0		0	0
		205	185	0	0		0	0
	J14	234	189	0	0	0	0	0
		226	196	0	0		0	0
		239	203	0	0		0	0,5
		202	207	0	0		0	0
		217	212	0	0		0	0
		227	213	0	0		0	0

Groupe 7 = non vaccinés, infectés (23 oiseaux)	J4	242	129	0	0	0	0	2
		237	130	0	0		0	1,5
		209	135	0	0		0	0
		231	136	0	0		0	2,5
		243	159	0	0		0	2,5
		229	161	0	0		0	2
		206	162	0	0		0	2,5
		240	183	0	0		0	2
	J6	218	143	0	0	0	0	1
		228	146	0	0		0	1
		235	154	0	0		0	2
		244	156	0	0		0	1
		233	164	0	0		0	1,5
		219	168	0	0		0	3
		236	169	0	0		0	1
		212	184	0	0		0	2,5
	J14	245	190	173	2,240	2,222	0	0,5
		207	195	0	0		0	0,5
		203	198	253	2,404		0	0
		216	206	803	2,905		0	1
		225	208	374	2,57		0	0,5
		215	209	198	2,298		0	1
		232	214	1351	3,130		0	0,5
	J4	269	128	213	2,330	2,545	0	0
		265	131	696	2,843		0	0
		308	140	4632	3,665		0	1
		304	141	0	0		0	0
		280	149	423	2,627		0	0
		315	158	198	2,298		0	0
		309	165	4530	3,656		0	0
		255	171	876	2,942		0	0
Groupe 8 = vaccinés, infectés (24 oiseaux)	J6	263	147	1211	3,083	2,861	0	0
		291	153	1631	3,2127		0	0
		250	155	9207	3,964		0	1,5
		294	163	869	2,939		0	0,5
		273	166	4379	3,641		0	1
		257	170	876	2,942		0	0
		311	174	0	0		0	0
		261	181	1281	3,107		0	0
	J14	283	191	4155	3,618	3,053	0	0
		258	191	0	0		0	0
		289	193	556	2,745		0	0
		297	199	10130	4,005		0	0
		262	200	6240	3,795		0	0
		295	201	2032	3,308		0	0,5
		313	204	1949	3,290		0	0
		299	205	4581	3,661		0	0

Toulouse, 2008

NOM : CORRAND

Prénom : Lény

TITRE : Evaluation de l'efficacité de souches vaccinales contre un variant de la bronchite infectieuse aviaire isolé au Québec

RESUME : La bronchite infectieuse aviaire est une maladie contagieuse spécifique du poulet (*Gallus gallus*), à répartition mondiale et dont les répercussions cliniques et économiques peuvent être très importantes en élevage avicole. La maladie est causée par le virus de la bronchite infectieuse (IBV), membre du genre *Coronavirus*. Ce virus comporte plusieurs sérotypes, à répartitions géographiques distinctes. Depuis quelques années, de nouveaux virus variants, nommés Qu16 et Qu_MV, sont apparus dans les élevages québécois de poulets de chair, en lien avec des prévalences anormalement élevées d'aérosacculite à l'abattoir. Depuis peu, ces virus ont également été isolés dans d'autres provinces canadiennes. Pourtant, l'efficacité des vaccins commerciaux n'a pas encore été démontrée contre ces nouveaux variants. Le but de ce travail de thèse est d'évaluer la protection conférée par différents vaccins commerciaux (souches Mass, Conn, et Ark) contre une épreuve avec ces variants québécois de virus de la bronchite infectieuse.

MOTS-CLES : Bronchite infectieuse aviaire, poulet, aérosacculite, coronavirus, vaccin, Qu16, Qu_MV, Mass, Conn, Ark

ENGLISH TITLE : Evaluation of the effectiveness of infectious bronchitis vaccine strains against a variant of the disease isolated in Quebec

ABSTRACT : Avian infectious bronchitis is a worldwide distributed highly contagious disease specific to chickens (*Gallus gallus*). Its clinical and economical impact can be substantial in commercial poultry production. The disease is caused by the infectious bronchitis virus (IBV), a member of the genus *Coronavirus*. This virus has several serotypes with distinct geographical distributions. Over the past few years, two new viral strains - Qu16 and Qu_MV - have appeared in Quebec broiler farms in conjunction with an abnormally high prevalence of airsacculitis in slaughter plants. Recently, these viruses have also been isolated in other Canadian provinces. Nonetheless, the efficacy of commercial vaccines has yet to be determined against these new variants. The goal of this thesis is to evaluate the protection conferred by different commercial vaccines (Mass, Conn and Ark strains) against a challenge using Quebec variants of the infectious bronchitis virus.

KEYWORDS : Avian infectious bronchitis, chicken, airsacculitis, coronavirus, vaccine, Qu16, Qu_MV, Mass, Conn, Ark