

Université de Montréal

**FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉPONSE IMMUNITAIRE
HUMORALE SUITE À LA VACCINATION AVEC UN VACCIN
VIVANT CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO CHEZ LE
POULET DE CHAIR**

Par

Rondro Mamitiana RAMAHEFARISOA

Département de pathologie et microbiologie vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Juillet 2011

© Rondro Mamitiana RAMAHEFARISOA

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé :

**Facteurs influençant la réponse immunitaire humorale suite à la
vaccination avec un vaccin vivant contre la maladie de Gumboro chez
le poulet de chair**

Présenté par :

Rondro Mamitiana RAMAHEFARISOA

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Francis BEAUDRY, président-rapporteur

Amer SILIM, directeur de recherche

Younès CHORFI, co-directeur

Carl GAGNON, membre du jury

Résumé

Au Québec, l'abattage des poulets se fait entre 33 et 40 jours. Pour permettre cet abattage, les poulets devront être vaccinés en présence d'anticorps maternels puisque la période d'attente après la vaccination est de 21 jours. L'objectif de cette étude a été de déterminer l'efficacité d'une forte dose de vaccin et de vitamine E à contourner les anticorps maternels et à vacciner par contact les poulets non vaccinés. Des vaccins à dose normale de $10^{4,35}$ TCID₅₀/ml/oiseau et à forte dose de $10^{5,35}$ TCID₅₀/ml/oiseau ont été utilisées sur 1200 poulets repartis en 4 groupes; (1) FD100%, groupe dans lequel tous les oiseaux ont été vaccinés, (2) FD10%, groupe dans lequel 10% des oiseaux ont été vacciné à forte dose, (3) DN100%, groupe dans lequel tous les oiseaux ont été vacciné à dose normale et (4) Contrôle, groupe dans lequel aucun oiseau n'a été vacciné. Chaque groupe a été divisé en 2 sous-groupes ; un a été supplémenté en vitamine E de 50 à 100UI/kg d'aliment et l'autre de 20 à 27 UI/kg. Les résultats de la présente étude ont montré que le virus vaccinal est capable de surmonter les anticorps maternels, qui ont persisté jusqu'à 20 jours d'âge, et à provoquer une réponse immunitaire humorale. Cette étude a aussi montré que le virus est capable de se transmettre par contact direct dans un même parquet et par contact indirect d'un parquet à l'autre. Aucun retour à la virulence ni une mutation du nucléotide VP2 n'a été observé au niveau des oiseaux vaccinés par contact. Cette étude a aussi montré qu'une amélioration de l'apport de vitamine E augmente la réponse humorale après vaccination avec un vaccin vivant contre la maladie de Gumboro.

Mots clés : Maladie de Gumboro, dose, vaccin, vitamine E, anticorps maternels

Abstract

In Quebec, Canada, broilers chickens are slaughtered from 33 to 40 days of age depending on the targeted market. Considering the withdrawal period of 21 days following vaccination, chickens would have to be vaccinated in the presence of maternally derived antibodies (MDA). The purpose of this study was to determine the effectiveness of high dose of vaccine and high dietary concentration of vitamin E in circumventing the MDA. A normal dose vaccine containing $10^{4.35}$ TCID₅₀/ml/bird and a higher dose containing $10^{5.35}$ TCID₅₀/ml/bird were used on 1200 chickens, which were divided into 4 groups housed in 8 pens: a high dose of vaccine in which all chickens were given $10^{5.35}$ TCID₅₀/ml (HD100%), a high dose in which 10% of the birds were vaccinated (HD10%), a normal dose as prescribed by the manufacturer in which all birds received $10^{4.35}$ TCID₅₀/ml (ND100%), and unvaccinated control groups. Each group was divided into 2 sub-groups; one was supplemented with 50 to 100 IU/kg of vitamin E and the other was supplemented with 20 to 27 IU/kg. The result of this study showed that the vaccine virus was able to circumvent the MDA, which persisted until 20 days of age, and to initiate a high antibody response. The study also showed that the vaccine virus was able to spread by direct and indirect contact within the pen and to the next pens. No reversion to the virulence or mutation of VP2 nucleotide was detected from the contact vaccinated birds. Vitamin E at the concentration of 50 to 100 IU/kg of the diet induced significantly elevated antibody response against IBDV.

Key words: IBD, high vaccine dose, vitamin E, maternal antibodies.

Tables des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Tables des matières	iii
Liste des figures	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
Remerciements	xi
1. Introduction	1
2. Recension des écrits	4
2.1 La Maladie de Gumboro ou bursite infectieuse	4
2.1.1 Historique	4
2.1.2 Etiologie	4
2.1.3 Symptomatologie	10
2.1.4 Diagnostic	11
2.1.4.1 Diagnostic clinique	11
2.1.4.2 Diagnostic de laboratoire	12
2.1.5 Épidémiologie	14
2.1.6 Impact économique	16
2.1.7 Prophylaxie contre IBD	17
2.1.7.1 Les anticorps maternels chez les oiseaux	18
2.1.7.2 La vaccination contre l'IBD	20
2.2 La vitamine E	23
3. Hypothèses et objectifs	26
4. Manuscript	27
4.1 SUMMARY	29
4.3 MATERIALS AND METHODS	32
4.3.1 Experimental design	32
4.3.2 Vaccine	32
4.3.3 Vitamin E (α -tocopherol) in the diet	33
4.3.4 ELISA and serum neutralization test	33
4.3.5 Serum Vitamin E measurement	33
4.3.6 Vaccine virus re-isolation and identification	34
4.3.7 Sequence analysis of IBDV RNA	35
4.3.8 Statistical analysis	35
4.4 RESULTS	36
4.4.1 Antibody evolution	36
4.4.2 Virus isolation	36
4.4.3 Evaluation of bursal atrophy	36
4.4.4 Effect of vitamin E (α -tocopherol) on humoral immune response	37
4.5 DISCUSSION	38
4.6 REFERENCES	40
4.7 ACKNOWLEDGEMENTS	42
4.8 FIGURE CAPTION	43
5. Discussion générale	59
6. Conclusion et perspectives	66
7. Références	68
8. Annexe	xiii

Liste des figures

Recension des écrits

Figure 1. Le génome de l'IBDV	6
Figure 2. Situation anatomique des organes lymphoïdes du poulet	8
Figure 3. Coupe histologique de la bourse de Fabricius et d'un follicule bursique.....	9
Figure 4. La bourse de Fabricius infectée par IBDV à 1 semaine d'âge	10
Figure 5. Principe de la RT-PCR pour la détection de l'ARN de IBDV	14
Figure 6. Principe de l'ELISA pour la détection de l'anticorps anti-IBDV.....	15
Figure 7. Distribution mondiale de la maladie de Gumboro	17
Figure 8. Principe du vaccin recombinant anti-IBDV et anti-NDV	23
Figure 9. Les formes naturelles de la vitamine E.....	24

Manuscript

Figure 1. Real disposition of pens and repartition of vaccination and dietary vitamin E in each pen	51
Figure 2. Evolution of ELISA antibody titers to IBDV according to age and groups; normal vaccine dose for all birds (ND100%), high vaccine dose for 10% of the birds (HD10%) and high vaccine dose for all birds (HD100%)	52
Figure 3. Correlation between anti-IBDV antibody titer measured by ELISA and seroneutralization	53
Figure 4. Virus prevalence in the chickens according to age and groups; normal vaccine dose for all birds (ND100%), high vaccine dose for 10% of the birds (HD10%) and high vaccine dose for all birds (HD100%)	54
Figure 5. Comparison between ELISA antibody titer and virus prevalence at 28 days of age.....	55
Figure 6. VP2 nucleotide sequences of vaccine virus Clonevac D78, virus retrieved from bursae of groups vaccinated with high dose 100% (HD100%) at 20 days and from unvaccinated control groups at 28 days	56

Figure 7. Bursa body weight (B/BW) indices for the evaluation of bursal atrophy according to groups; normal vaccine dose for all birds (ND100%), high vaccine dose for 10% of the birds (HD10%) and high vaccine dose for all birds (HD100%)57

Figure 8. Effect of vitamin E on ELISA antibody titers at 28 and 49 days of age58

Liste des tableaux

Tableau 1. Symptômes et lésions liés à IBDV selon la souche virale	12
--	----

Liste des abréviations

°C	: Degré Celsius
\$ CAN	: Dollar canadien
ACDI	: Agence canadienne de développement international
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
B/BW	: Bursa to body weight ratio (rapport entre le poids de la bourse et le poids corporel)
BF	: Bourse de Fabricius
CEF	: Chicken embryo fibroblast (fibroblaste d'embryon de poulet)
CPE	: Cytophatic effect (effet cytopathique)
DN	: Dose normale
DO	: Densité optique
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent Assay
FBS	: Fetal bovine serum (serum fœtal de bovin)
FD	: Forte de dose
FUNDP	: Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix
HCl	: Acide chlorhydrique
HD	: High dose
HPLC	: High performance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
IBD	: Infectious bursal disease (bursite infectieuse)

IBDV	: Infectious bursal disease virus (virus de la bursite infectieuse)
IBV	: Infectious bronchitis virus (virus de la bronchite infectieuse)
IgA	: Immunoglobuline A
IgM	: Immunoglobuline M
IgY	: Immunoglobuline Y
IL-2	: Interleukine 2
ITA	: Institut de technologie agricole
IU	: International unit (unité international)
KDa	: Kilodalton
LOD	: Limit of detection (limite de détection)
LOQ	: Limit of quantification (limite de quantification)
MDA	: Maternally derived antibodies (anticorps maternels)
ND	: Normal dose
NDV	: Newcastle disease virus
NRC	: National research Council
OPD	: Orthophenyldiamine
ORF	: Open reading frame (cadre de lecture ouverte)
PBS	: Phosphate buffered solution (Solution tamponnée à la phosphate)
PGE ₂	: Prostaglandine E 2
Rs	: Roupie pakistanaise
RT-PCR	: Reverse-transcription-polymerase chain reaction (transcription inverse et réaction de polymérase en chaîne)
Sp ratio	: Sample to positive ratio (rapport entre un échantillon et le témoin positif)

SPF : Specific pathogen free

TCID : Tissue culture infective dose (dose infectieuse en culture tissulaire)

UI : Unité internationale

USA : United States of America (États-Unis d'Amérique)

vvIBDV : very virulent infectious bursal disease virus (virus de la bursite infectieuse hypervirulent)

Dédicaces

À Menja, mon mari, pour son soutien, son encouragement, sa présence ainsi que son amour.

À ma mère, pour tous ce qu'elle a fait pour que je sois comme les autres.

À mon père, pour m'avoir transmis sa passion pour le savoir.

À mes frères et sœurs ; Andry, Haingo, Rija, Sitraka et Miora, pour leur soutien.

À mes neveux; Kevin, Orlando et Ryan, pour qu'ils surpassent ce que j'ai accompli.

À mes ami(e)s et à toute la famille.

Remerciements

Premièrement je tiens à remercier le Dr Amer Silim d'avoir accepté d'être mon directeur de mémoire. Je le remercie pour les conseils qu'il a su me donner, pour sa patience ainsi que pour son aide dans les difficultés auxquelles je me suis confrontée.

Dans ce sens, je remercie le Dr Younès Chorfi d'avoir accepté d'être mon co-directeur. Je le remercie aussi pour les conseils qu'il m'a donnés.

Je remercie aussi le Dr Daniel Venne pour sa grande et précieuse collaboration, pour ses conseils ainsi que pour sa disponibilité malgré son emploi du temps chargé.

Je tiens à remercier aussi Diane Frenette pour ses précieuses aides et sa patience dans l'enseignement des diverses techniques de laboratoire. Je la remercie aussi pour sa grande gentillesse et sa sympathie qui m'ont fait passer une très belle année dans le laboratoire qu'elle occupe.

Je remercie aussi Guy Beauchamp qui m'a largement aidé dans la difficile tâche de traitements de données et d'analyses statistiques.

Ensuite, je remercie le Dr Normand Larivière de m'avoir permis de continuer mes études grâce au projet « la santé animale pour la santé populationnelle » et qui est financé par l'Agence canadienne de développement international (ACDI).

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Pour vous tous je vous dis merci car sans vous ce mémoire n'aurait pas vu le jour

1. Introduction

L'élevage aviaire industriel nécessite l'utilisation de poulets de race à croissance rapide. Ces poulets sont élevés en grand nombre et en promiscuité dans un espace restreint. Avec ce type d'élevage, les poulets deviennent susceptibles à différents agents infectieux et à diverses maladies qui diminuent leur immunocompétence et de la promiscuité qui dégrade leur hygiène environnementale (Friedman, 1998; Singh et al., 2006). Il est primordial de trouver un moyen pour améliorer la réponse immunitaire des poulets en jouant sur les apports alimentaires. A cause de l'effet bénéfique de la vitamine E sur la réponse immunitaire, cette vitamine est couramment utilisée dans l'élevage aviaire industriel (Leshchinsky et al., 2001).

La bursite infectieuse encore connue sous l'appellation de « Maladie de Gumboro » est l'une des maladies qui menace perpétuellement l'industrie aviaire (Muller et al., 2003) car son agent causal qui est un virus appartenant à la famille *Birnaviridae*, au genre *avibirnavirus*; infecte les lymphocytes B de la bourse de Fabricius (BF) entraînant une immunodépression des jeunes poulets de 3 à 6 semaines d'âge (Hirai et al., 1979; Sharma et al., 2000). En absence d'anticorps maternels, le taux de morbidité causée par cette maladie est élevé et le taux de mortalité varie de faible à modéré dépendant de la virulence de la souche virale (Skeeles et al., 1978). Les poulets ayant survécu à la maladie après le passage du virus présenteront un système immunitaire déficient à vie et auront de la difficulté à répondre à d'autres vaccinations. Ceci facilite l'exposition à d'autres infections secondaires (Homer., 1992) et augmente les dépenses supplémentaires liées aux entretiens des oiseaux entraînant des pertes économiques considérables pour l'éleveur. Il est donc nécessaire de vacciner les reproductrices afin de conférer une immunité passive à la progéniture par transfert d'anticorps maternels. La persistance de ces anticorps dépend du gain de poids du poulet, du moment, de la dose et du type de vaccin utilisé chez les reproductrices et surtout de la demi-vie d'anticorps maternels qui varie de 3 à 5 jours. En moyenne, les anticorps maternels déclinent du 17^{ème} au 21^{ème} jours d'âge (Alam et al., 2002). Ainsi, les anticorps maternels ne peuvent assurer la protection des jeunes oiseaux que pendant un temps limité (Wyeth et Cullen, 1976). Pour pouvoir continuer à prévenir et à protéger les jeunes oiseaux contre la maladie de Gumboro, ces derniers doivent être vaccinés (Fussel, 1998). Or la vaccination des jeunes poulets en présence d'anticorps maternels compromet l'efficacité du vaccin (Al-Natour et al., 2004). Pour éviter l'échec vaccinal, il est recommandé de vacciner les poulets après la chute des anticorps maternels vers 21

jours d'âge (Kumar et al, 2000). En respectant le temps optimal de vaccination (vaccination après la chute des anticorps maternels) et la période de retrait du vaccin de 21 jours, les oiseaux devraient être abattus à 42 jours d'âge. Au Québec, l'abattage des poulets se fait entre 33 et 40 jours d'âge selon qu'ils soient destinés à la restauration ou au commerce. Par respect et pour la protection des consommateurs, les éleveurs ont le choix entre attendre jusqu'à 42 jours pour mettre les poulets à l'abattage ou vacciner les oiseaux avant la chute des anticorps maternels pour pouvoir mettre les oiseaux à l'abattage avant 42 jours. À cause des coûts entraînés par l'entretien des oiseaux, les éleveurs ne peuvent pas se permettre d'attendre 2 à 9 jours pour mettre les oiseaux à l'abattage. Mais si la vaccination serait faite en présence des anticorps maternels, il y aura un grand risque que le virus vaccinal soit neutralisé par ces anticorps et la vaccination serait inefficace. Il est donc nécessaire de trouver un moyen de vaccination capable de surmonter et de contourner les anticorps maternels afin de pouvoir abattre les oiseaux à l'âge de 35 jours. Dans la présente étude, afin d'éviter l'interférence des anticorps maternels avec le virus vaccinal et afin d'améliorer la réponse humorale des poulets, une dose élevée de vaccin et de vitamine E ont été utilisées. Cette utilisation d'une dose élevée de vaccin et de vitamine E permettrait aussi de déterminer la possibilité d'une vaccination par contact.

Pour atteindre ces objectifs, les oiseaux seront vaccinés à 14 jours d'âges avec un vaccin vivant de la souche D78: Clonevac D78 (Intervet Inc, Millsboro, DE, USA). Des prélèvements de sangs seront effectués avant la vaccination : à 1 jour et à 14 jours d'âge et après la vaccination : à 20; 28; 35; 42 et 49 jours d'âge. Les sera qui sont obtenus à partir de ces prélèvements vont être analysés à l'ELISA pour déterminer le titre en anticorps. Les plasmas obtenus à partir des prélèvements du 28 et 49 jours vont être analysés à l'aide d'une méthode l'HPLC pour la détermination de la concentration sérique en vitamine E. Des échantillons de BF d'une partie des oiseaux du 20 et du 28 jours vont être prélevés et pesés. Avant les prélèvements, ces oiseaux vont être pesés. Le ratio entre le poids de l'oiseau et le poids de la BF vont être calculés pour évaluer une éventuelle atrophie de la BF. Une partie des échantillons de BF vont être utilisée pour le ré-isolément du virus vaccinal sur culture cellulaire d'embryon de poulet de 9 jours. Le virus ré-isolé va être confirmé comme IBDV par immunofluorescence. L'autre partie des échantillons de BF et un échantillon du vaccin Clonevac D78 vont être analysés à la RT-PCR pour amplifier l'ADN transcrits de l'ARN de IBDV puis la région

hypervariable de VP2 va être séquencée à partir de l'amplicon pour s'assurer que le virus présent au niveau de la BF est vraiment la souche vaccinale et pour déterminer la présence ou l'absence d'une mutation responsable d'une réversion à la virulence au niveau de cette région.

2. Recension des écrits

2.1 La Maladie de Gumboro ou bursite infectieuse

2.1.1 Historique

Découverte pour la première fois par Cosgrove (1962) dans l'État de Delaware aux États-Unis, la maladie de Gumboro a été décrite comme le syndrome néphrite-néphrose jusqu'au moment où l'agent étiologique de cette dernière a été identifié comme étant le virus de la bronchite infectieuse (IBV) (Winterfield et Hitchner, 1962). La maladie a été par la suite nommée «bursite infectieuse» ou encore «Maladie de Gumboro» en analogie aux atteintes de la bourse de Fabricius (BF) et du district où la maladie a été découverte pour la première fois (Lasher et Davis, 1997).

2.1.2 Étiologie

La bursite infectieuse ou «infectious bursal disease» (IBD), encore connue sous l'appellation de «Maladie de Gumboro» est une maladie due au virus de l'IBD (IBDV). Basée sur sa structure, l'agent causal de la maladie a été classifié dans la famille *Diplornaviridae* (Harkness et al., 1975). Certains auteurs l'ont classé dans la famille *Reoviridae* à cause de sa propriété cythopathique en culture cellulaire (Lukert et Davis, 1974; Hirai et al., 1979). Finalement grâce à une caractérisation génomique (Müller et al., 1979) le virus a été identifié comme un virus appartenant à la famille *Birnaviridae* et au genre *birnavirus* (Dobos et al., 1979). Le genre *birnavirus* est proposé pour décrire les virus ayant 2 segments d'ARN double brin. L'IBDV a été par la suite classé dans le genre *avibirnavirus* (Pringle, 1999). Les autres virus qui sont classés dans la famille *Birnaviridae* sont le virus de la nécrose pancréatique du poisson, le virus des crabes et mollusques bivalves, oyster virus et tellina virus. Ces virus appartiennent au genre *aquabirnavirus*. Le genre *entomobirnavirus* quant à lui comporte le virus de la drosophile X. Enfin le genre *blosnavirus* comporte le virus du poisson-serpent Blotched (Carstens et Ball, 2009).

L'IBDV est classifié en 2 sérotypes : le sérotype 1 et 2. Le poulet est réceptif et sensible au sérotype 1. Comme la dinde, il est seulement réceptif mais n'est pas sensible au sérotype 2 (Ismail et al., 1988). Le sérotype 1 peut être divisé en 4 souches selon la virulence du virus ; une souche atténuée, une souche classique, une variante antigénique et une souche très virulente (vvIBDV) (Wei et al., 2006).

2.1.2.1 Génome

IBDV est un virus à ARN double brin bisegmenté (Müller et al., 1979 ; Hudson et al., 1986). C'est un virus non-enveloppé à capsid avec une symétrie icosaédrique possédant un diamètre de 58 à 60 nm (Dobos et al., 1979). Le génome de l'IBDV comporte 2 segments ; le segment A d'une taille de 3300 pb et le segment B d'une taille de 2900 pb (Kibenge et al., 1988). Sur le segment A, existe 2 cadres de lecture ouvertes ou ORFs (Open Reading Frames) d'une taille de 3039 pb et de 438 pb (Rudd et al., 2002). Le premier ORF code pour une protéine d'une taille de 17 KDa. Cette protéine s'appelle VP5 et elle est responsable de la pathogénicité du virus (Mundt et al., 1995 ; Mundt et al. 1997 ; Yao et al., 1998). L'autre ORF code pour une protéine d'une taille de 109 kDa. Cette protéine est par la suite clivée par autocatalyse de la protéase VP4 en VPX, VP3 et VP4. Par la suite VPX est clivée en VP2 (Dobos et al., 1979 ; Müller et Becht, 1982). Les protéines VP2 et VP3 forment les protéines structurales de la capsid de l'IBDV. L'une des régions de VP2 est aussi responsable de l'induction de la neutralisation du virus par les anticorps ainsi que de la spécificité des sérotypes, tandis que VP4 est responsable de la maturation protéolytique des polyprotéines (Hudson et al., 1986 ; Kibenge et al., 1988 ; Kibenge et al., 1997).

Le segment B quant à lui comporte un troisième ORF qui code pour la protéine VP1 d'une taille de 95 kDa. Cette protéine a une activité enzymatique dépendante de l'ARN polymérase. La protéine VP1 est responsable de la réplication du génome ainsi que de la synthèse de l'ARNm (Bruenn, 1991).

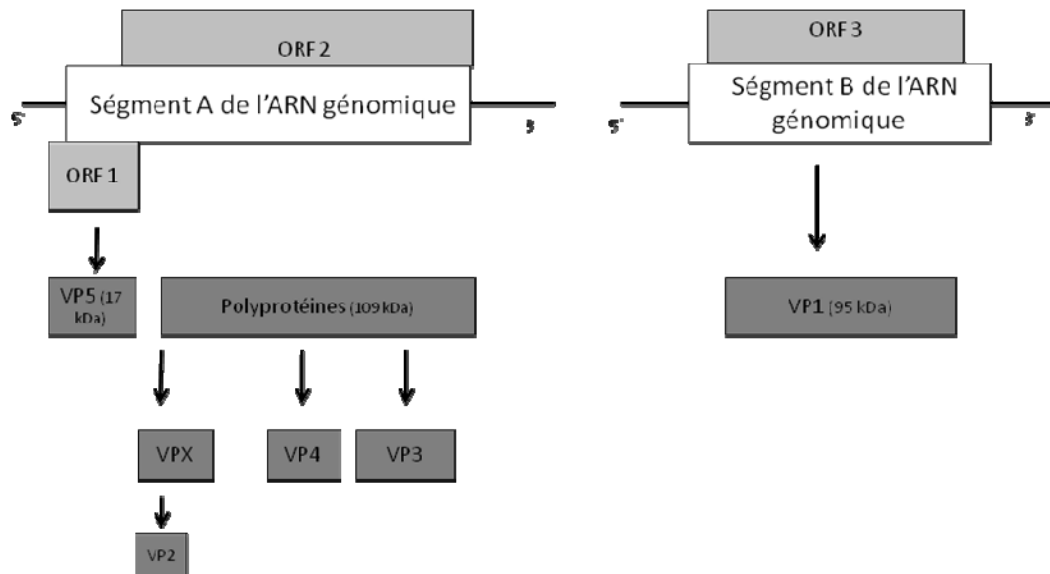


Figure 1. Structure de l'ARN génomique de l'IBDV

2.1.2.2 Distribution de l'IBDV

L'IBDV est détecté dans les macrophages et les cellules lymphoïdes caecales 4 à 5 heures après l'infection orale (Müller et al., 1979). Cinq heures après, le virus est phagocyté par les cellules de küpffer lors de son passage au niveau hépatique. Il est ensuite distribué via la voie sanguine et arrive au niveau de la BF 11 heures après l'infection où il effectue une réplication massive. Une virémie s'ensuit et le virus est distribué au niveau de différents organes tels que le thymus, le rein, la rate et l'intestin (Fadly et Nazerian, 1983). L'IBDV peut persister au niveau de la BF jusqu'à 10 jours après l'infection. La concentration virale au niveau de la BF atteint son maximum 2 à 3 jours après l'infection (Winterfield et al., 1971 ; Kauffer et Weiss, 1980). Durant la phase virémique, une faible concentration de virus est déterminée au niveau du thymus et de la rate car au niveau de ces organes le nombre de cellules susceptibles à l'IBDV n'est pas suffisant. A cause de l'affinité de l'IBDV pour les cellules lymphoïdes de la BF, cet organe est considéré comme l'organe cible du virus (Burkhardt et Müller, 1987).

2.1.2.3 Transmission et résistance de l'IBDV

L'IBD est une maladie fortement contagieuse parce que le virus est excrété dans les fientes pendant 2 à 14 jours et se propage facilement par contact direct, par voie orale, via ces fientes. Les matériels d'élevage contaminés par IBDV peuvent réintroduire le virus au niveau de l'élevage. Il a été aussi rapporté que différents animaux tels que les oiseaux sauvages, la souris, le rat, le chien et les insectes comme les moustiques peuvent être vecteurs de l'IBDV et transmettre la maladie (Okoye et Uche, 1985 ; Pagès-Manté et al., 2004 ; Gilchrist, 2005 ; Kasanga et al., 2008 ; Jeon et al., 2008 ; Park et al., 2010). L'environnement joue un grand rôle dans la dissémination de la maladie (Benton et al., 1967). En effet l'IBDV est très stable dans l'environnement car il survit pendant 4 mois dans les parquets et pendant 7 semaines dans la nourriture (Murphy et al., 1999). Il survit même après désinfection des locaux. En effet, du point de vue chimique, l'IBDV est stable en présence de 1% de phénol à 30°C pendant 1 heure. Il est résistant à certains désinfectants et microbicides, tels que l'éther, le chloroforme, l'hyamine 2389, le merthiolate à 0,025%, lorsqu'il est exposé à 30°C pendant 30 minutes (Benton et al., 1967). L'IBDV est aussi un virus thermorésistant parce qu'*in vitro*, il peut résister à une température de 37°C pendant 90 minutes et peut survivre après une exposition à une température avoisinant 56°C pendant 5 heures. Par

contre, l'IBDV est sensible à d'autres désinfectants et microbicides, notamment à la formaline 1% à 30°C pendant 30 minutes ainsi qu'au wescodyne. Le milieu acide est favorable au développement du virus quant au milieu basique, il l'inhibe. En effet, l'IBDV est inhibé par un pH = 12 alors qu'un pH = 2 n'a aucun effet sur lui (Benton et al., 1967).

2.1.2.4 Pathogénie et immunosuppression de l'IBDV

a. Anatomophysiologie de la bourse de Fabricius

La BF est un organe lymphoïde primaire chez les oiseaux. Elle est issue d'une excroissance des tissus lymphoïdes intestinaux (Ratcliffe et al., 2002) et elle se trouve au niveau cloacal. Elle joue un rôle important dans la constitution du système immunitaire lors de la phase embryonnaire jusqu'à l'entrée à la maturité sexuelle des oiseaux. Elle est tapissée par une muqueuse plissée, constituée d'un épithélium cylindrique simple. Elle comporte jusqu'à 15000 follicules lymphoïdes qui sont tapissées par 2 sortes de cellules épithéliales ; les cellules lympho-épithéliales qui sont des cellules folliculaires en contact avec l'épithélium et les cellules épithéliales interfolliculaire. Chaque follicule bursique comporte une zone médullaire (médulla) et une zone corticale (cortex) séparées par un épithélium cortico-médullaire et par une membrane basale. Les follicules bursiques comportent une population cellulaire hétérogène (Ciriaco et al., 2003). La population lymphocytaire de la bourse se compose essentiellement de lymphocytes B (85 à 90%), moins de 4% de cellules T et d'autres cellules (Kim et al., 2002). A l'âge de maturité sexuelle des oiseaux, vers la 8^{ème} semaine, la BF commence à subir une involution physiologique qui ne sera complète qu'à la 26^{ème} semaine et un vestige cicatriciel ne sera présent qu'à la 28^{ème} semaine (Ciriaco et al., 2003). Macroscopiquement, cette régression physiologique se manifeste par une perte du poids et une atrophie de la bourse, par une décoloration jaunâtre et une perte de la plicaturation de la muqueuse. Microscopiquement, elle se manifeste par une atrophie et exfoliation de l'épithélium, une nécrose liquéfiée des cellules médullaires suivie par celle des cellules corticales, une prolifération des tissus fibreux et une infiltration par les macrophages des zones nécrotiques. La cicatrisation survient alors pour laisser place à un vestige fibreux. (Bickford et al., 1985).



Figure 2. Situation anatomique des organes lymphoïdes du poulet

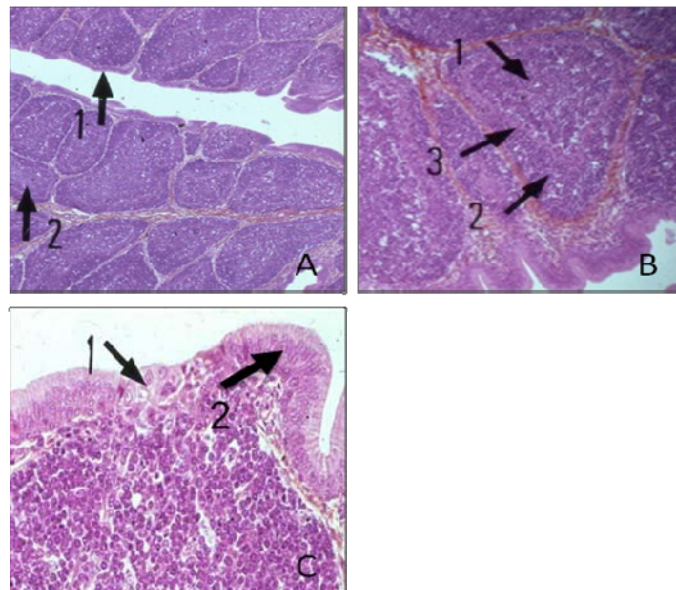


Figure 3. Coupe histologique de la bourse de Fabricius et du follicule bursique.

A- coupe histologique de la bourse de Fabricius : épithélium de surface (1) ; follicule bursique (2). B- coupe histologique d'un follicule bursique : zone médullaire (1) ; zone corticale (2) ; épithélium cortico-médullaire (3). C- coupe histologique de l'épithélium d'un follicule bursique: cellules lympho-épithéliales (1) ; épithélium interfolliculaire (2) (Source: Atlas d'histologie humaine et animale, FUNDP)

b. Pouvoir pathogène et immunosuppresseur de l'IBDV

La BF est l'organe cible de l'IBDV (Käuffer et Weiss, 1980). *In vitro*, l'IBDV se réplique dans les lymphocytes B (Hirai et Calnek, 1979). Il a été rapporté que l'IBDV

entraîne la nécrose des cellules infectées. A part cette nécrose, l'IBDV provoquerait une apoptose (Vansconcelos et Lam, 1994 ; Rodriguez-Lecompte et al., 2005). Le moment de l'infection déterminerait la cause de l'apoptose. Au début de l'infection, l'apoptose serait un mécanisme de défense de l'organisme pour se prévenir de la propagation du virus. Plus tard, l'apoptose cellulaire est l'effet de la réplication virale massive (Jungmann et al., 2001). La nécrose et l'apoptose vont contribuer à une régression rapide des follicules bursiques. Ces atteintes des cellules immunitaires de la BF amèneraient à une immunosuppression chez le poulet. Il a été aussi rapporté que dans les fibroblastes d'embryon de poulet, l'IBDV change la propriété du potassium (Repp et al., 1998). Ce changement pourrait induire la perte de la perméabilité de la membrane cellulaire qui affecterait l'homéostasie des ions intracellulaire et amènerait à la cytolysse et la mort des cellules infectées (Müller et al., 2003).

Chez les poulets ayant survécu à la maladie de Gumboro, les follicules infectés se repeuplent de lymphocytes B (Sharma et al., 2000). Les macrophages sont activés lors de l'infection à l'IBDV. Il a été rapporté que tout comme les lymphocytes B les macrophages sont des cellules susceptibles à l'IBDV. La maladie de Gumboro provoquerait la diminution du nombre de macrophages intra-bursique (Khatri et al., 2005). Les cellules T s'infiltrant dans la bourse infectée 7 jours après l'infection. Ces cellules vont limiter la réplication du virus et vont en même temps occasionner des dommages tissulaires sur la BF grâce aux effets cytotoxiques des cytotoxines qu'elles ont sécrétées. Ces effets cytotoxiques vont ralentir la régénération de la BF (Müller et al., 2003). Ainsi, les cellules à médiation humorale sont insuffisantes pour la remise en état de la BF. La présence des cellules T qui sont des cellules réfractaires et faiblement susceptibles à l'IBDV (Hirai et Calnek, 1979) est requise pour la repopulation de la BF.

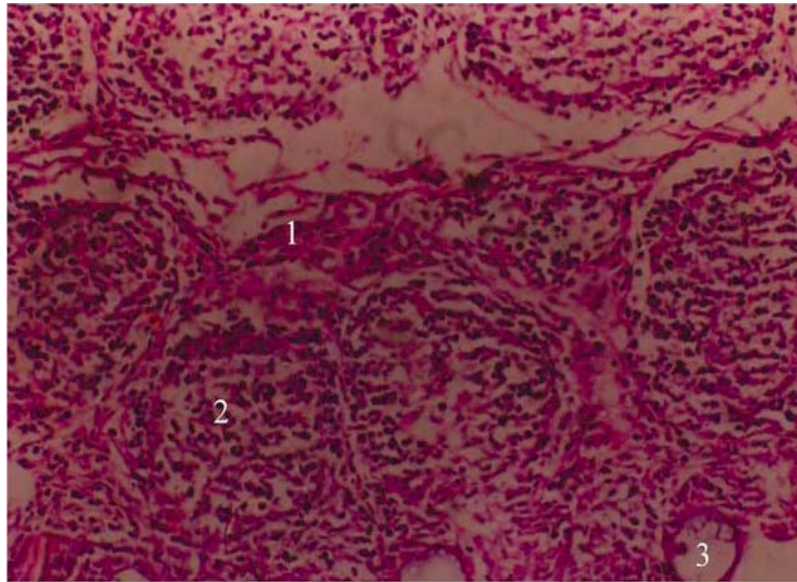


Figure 4. Bourse de Fabricius infectée par IBDV à 1 semaine d'âge. Nécrose de la BF (1); prolifération des lymphocytes T (2); formation de kyste dans l'épithélium (3)
(Source: Balamurugan et Kataria, 2006)

2.1.3 Symptomatologie

La maladie de Gumboro est une maladie fortement contagieuse qui s'exprime 2 à 3 jours après l'infection (Saïf, 1998). Dans un cheptel infecté, la morbidité est élevée et peut atteindre jusqu'à 100% (Saif, 1998). La mortalité et le tableau clinique varient selon la virulence de la souche d'IBDV. La souche vvIBDV peut occasionner une diarrhée liquide blanchâtre, des plumes ébouriffées, une anémie, une dépression sévère et un coma (Nunoya et al., 1991). La mort s'ensuit rapidement quelques heures après l'apparition des symptômes. La maladie due à cette souche induit un taux de mortalité variant de 60 à 100% (Etteradossi et al., 1992; Brandt et al., 2001). L'infection par cette souche entraîne des lésions hémorragiques et œdémateuses au niveau de la bourse. Les lésions hémorragiques peuvent être aussi observées au niveau du foie, des reins et des muscles (van den Berg, 2000). La particularité de cette souche est sa capacité d'infecter les oiseaux ayant un taux élevé d'anticorps maternels ainsi que les oiseaux immunisés (Zienenberg et al., 2001).

Les souches classiques induisent des lésions inflammatoires et hémorragiques sur la BF. Ces lésions sont accompagnées d'une déplétion de la quasi-totalité des follicules bursiques contenant les lymphocytes B. Avec ces souches, le pic de mortalité est atteint 3 jours après l'infection mais cette mortalité des oiseaux peut continuer jusqu'à 5 à 7

jours après l'infection. La mortalité totale suite à l'infection avec des souches classiques varie de 20 à 30% (Cao et al., 1997). L'infection avec ces souches entraîne une forte immunodépression à vie.

La variante antigénique est une souche isolée en Amérique du Nord. Cette souche n'occasionne pas d'inflammation ni d'hémorragie au niveau de la bourse. Cependant, elle entraîne une atrophie rapide de la BF (Brandt et al., 2001). L'infection avec cette souche est subclinique, n'entraîne pas de mortalité mais occasionne une sévère immunodépression qui va augmenter la susceptibilité des oiseaux à d'autres maladies (Lasher et Davis, 1997).

Tableau 1. Symptômes et lésions liés à IBDV selon la souche virale

Souche de l'IBDV	Symptômes	Lésions	Immunosuppression	Taux de mortalité (%)
vvIBDV	prostration, plumes ébouriffées, diarrhée blanchâtre, dépression sévère, coma, mort rapide	œdème et hémorragie de la BF, hémorragies musculaire, hépatique et rénale	immunosuppression des survivants	60 à 100%
Classique	prostration, plumes ébouriffées, diarrhée blanchâtre	Inflammation, hémorragie et atrophie de la BF	immunosuppression des survivants	20 à 30%
Variante antigénique	asymptomatique	atrophie de la BF	immunosuppression	absence de mortalité liée à IBDV lui-même

2.1.4 Diagnostic

2.1.4.1 Diagnostic clinique

Le diagnostic présomptif de la maladie de Gumboro peut être fait par la reconnaissance des signes de la forme aiguë de la maladie. Ces signes peuvent se résumer à la morbidité élevée et à la mort rapide des oiseaux susceptibles. Sur les animaux morts, la nécropsie révèle un changement au niveau cloacal. Une hypertrophie de la BF peut être détectée à 3 jours après l'infection suivie d'une atrophie vers 8 jours post-infection. Pour la forme subclinique, le diagnostic se fait surtout après la nécropsie révélant une bourse atrophiée.

2.1.4.2 Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic de laboratoire de l'IBD se fait par l'isolement du virus et son identification. L'isolement viral peut se faire par inoculation du virus sur œuf embryonné de 9 à 11 jours via la membrane chorioallantoïdienne ou sur culture cellulaire de fibroblaste, de rein ou de foie d'embryon de poulet (Cho et al., 1978). Pour l'isolement sur œuf embryonné, la mort de l'embryon survient 3 à 5 jours post-inoculation. Pour les cultures cellulaires, les effets cytopathogènes du virus sur les cellules peuvent être observés 5 jours après l'ensemencement et l'incubation du virus à 37°C. Toutefois, des passages répétés du virus sur les cultures cellulaires sont nécessaires pour son adaptation afin de pouvoir observer des effets cytopathogènes sur les cellules. La confirmation de l'isolement et l'identification du virus peuvent se faire par utilisation de la technique d'immunofluorescence ou par lecture sur microscope électronique (Rosales et al., 1989). Actuellement, l'identification de l'IBDV peut se faire avec des techniques de biologie moléculaire, telle que la RT-PCR (Jackwood et Jackwood, 1997). Cette technique consiste à copier une région de l'ADN délimitée par des amorces à l'aide d'une enzyme (polymérase). L'ADN utilisé est préalablement transcrits à partir de l'ARN de IBDV grâce à une autre enzyme ; la transcriptase inverse. La phase de dénaturation survient et les 2 brins d'ADN sont dénaturés. Les amorces s'hybrident au niveau de la partie de l'ADN qui leur est complémentaire lors de la phase d'hybridation. La réaction en chaîne se fait ensuite avec la présence d'une enzyme polymérase à la phase d'élongation. Chaque phase se fait en présence de différentes conditions de température. L'ensemble de ces 3 phases constitue un cycle. Cette technique peut comporter jusqu'à une trentaine à quarantaine de cycle et elle permet la détection et l'amplification de l'ARN de l'IBDV. Cette technique est la technique de référence pour le diagnostic de l'IBD car elle détecte IBDV au niveau génomique.

A part la détection par RT-PCR, le diagnostic de IBD peut se faire aussi avec des techniques immuno-enzymatiques. L'ELISA sandwich ou ELISA par capture d'antigène peut être utilisée sur une suspension de broyat de BF (Cardoso et al., 1998). Cette technique utilise 2 anticorps avec une conjugaison à la peroxydase pour le deuxième anticorps. Cette technique a comme principe de piéger l'antigène à détecter entre 2 anticorps. La plaque à utiliser va être sensibilisée avec le premier anticorps. Puis l'échantillon contenant l'antigène est ajouté dans les cupules. Après un temps d'incubation et 3 à 4 lavages successifs de la plaque, le deuxième anticorps conjugué à

l'enzyme est ajouté. A la fin, le substrat contenant du peroxyde, de l'orthophenyldiamine (OPD) est ajouté. En présence d'antigène, la peroxydase de ce deuxième anticorps va être activée et va dégrader le peroxyde contenu au niveau du substrat. Cette réaction de dégradation conduit au changement de couleur de la solution contenant l'échantillon. La réaction est ensuite arrêtée avec du HCl. La densité optique (DO) de la couleur va par la suite être mesurée par spectrophotométrie. Le seuil moyen de la DO des échantillons contrôles vont déterminer la positivité des échantillons à tester. Cependant la plus couramment utilisée est l'ELISA indirect ou ELISA par capture d'anticorps (Howie et Thorsen, 1981). Cette technique sert à détecter l'anticorps anti-IBDV au niveau du sérum et/ou du jaune d'œuf. Elle consiste à utiliser une plaque sensibilisée avec de l'IBDV. L'échantillon à tester est ajouté sur les cupules de la plaque. Puis un anticorps de chèvre ou de lapin anti-anticorps de poulet, conjugué avec de la peroxydase est ajouté suivi de l'ajout du substrat. La même réaction de dégradation du peroxyde se présente et la lecture de la DO se fera. Par la suite, cette DO sera convertie par un logiciel au niveau du lecteur de plaque pour donner le titre en anticorps équivalent.

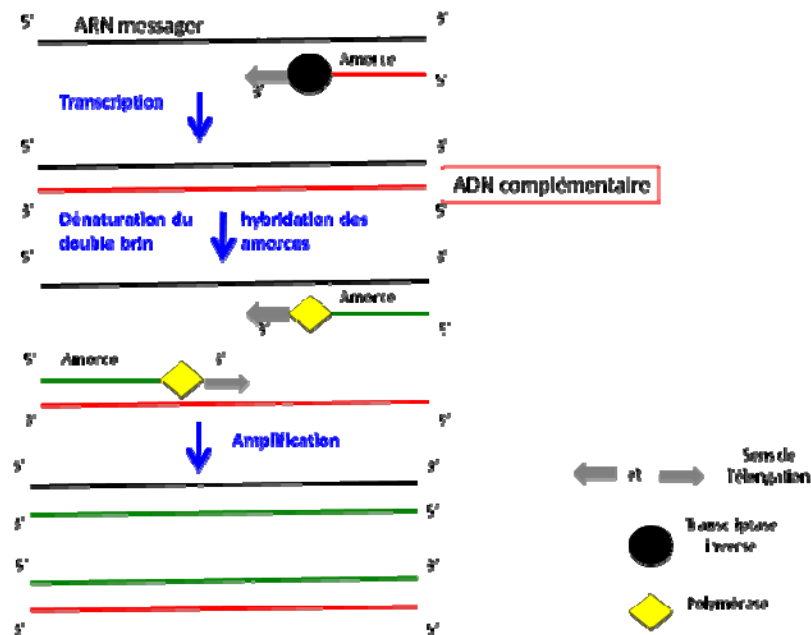


Figure 5. Principe de la RT-PCR pour la détection de l'ARN de IBDV

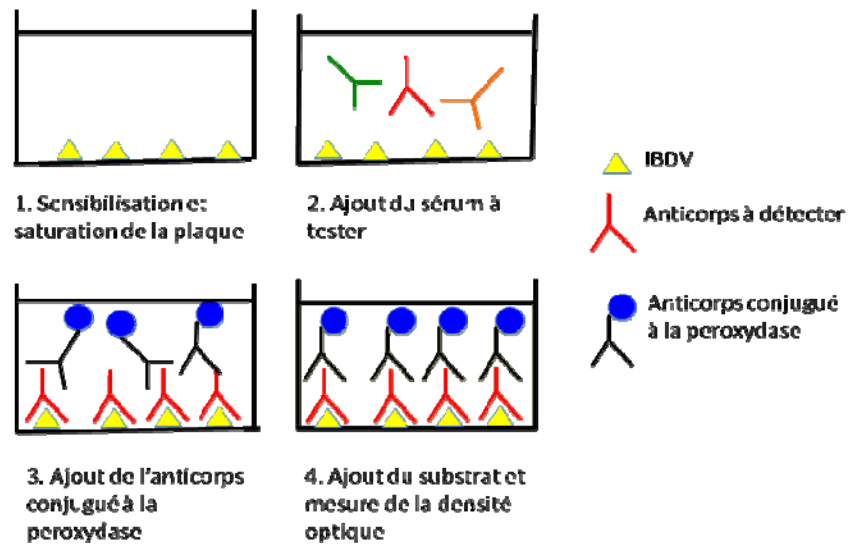


Figure 6. Principe de l'ELISA pour la détection de l'anticorps anti-IBDV

2.1.5 Épidémiologie

En Amériques du Nord, la maladie de Gumboro sévit et occasionne des infections subcliniques. Aux États-Unis, Snyder (1990) a rapporté qu'il existe 4 variantes antigéniques issues du sérotype 1. La classification de ces variantes a été faite sur base de présence ou absence d'épitopes de neutralisation sur l'IBDV. Antigéniquement, ces variantes sont étroitement liées à la souche classique. Selon la distribution géographique, la prévalence de ces variantes varie d'un État à l'autre. Celle-ci est due d'une part à l'isolement de certaines régions et d'autre part à la diversité du vaccin que chaque région utilise. (Snyder, 1990 ; Jackwood et Wagner, 2005). Au Canada, d'après une étude effectuée dans 7 provinces canadiennes : Ontario, Québec, Manitoba, Colombie Britannique, Nouvelle Écosse, Alberta, et Terre-Neuve et Labrador, la majorité des souches présentes sont des variantes américaines tels que la souche NC171 ; la souche 586, la souche Delaware E et la souche Del A . Cette étude a été effectuée sur 134 échantillons de BF issus des oiseaux ayant eu des antécédents de problème de production et/ou des symptômes de différentes maladies aviaires telles que l'aérosacculite, la trachéite, la pneumonie, l'hépatite à corps d'inclusion et la coccidiose. Ces échantillons ont été préparés et analysés par RT-PCR pour l'identification de l'ARN de l'IBDV. Les amplicons ont été par la suite séquencés et comparés avec les séquences disponibles dans GenBank. Presque la majorité des échantillons (n = 112) a une séquence identique à celle des variantes américaines : 44 échantillons présentent une séquence similaire à celle de la souche américaine NC171,

34 à celle de la souche américaine 586, 33 avec celle de la souche Delaware E, et un échantillon présente une séquence identique à celle de la souche Del A. Cinq (5) échantillons ont une séquence liée à celle des souches vaccinales, 16 avec celle de la souche sud-africaine 05SA8 qui elle-même a une proche similitude avec la souche américaine NC171. Enfin un échantillon a une séquence étroitement identique avec la séquence de la souche espagnole SP_04_02. Aucune séquence similaire à la souche vvIBDV n'a été identifiée. (Ojkic et al., 2007)

En Australie, cette maladie a été décrite pour la première fois en 1974. Dans le milieu des années 90, de nouvelles variantes antigéniques ont émergés. Ces variantes ne sont pas issues des souches classiques mais elles ont été introduites séparément et ont co-existées avec les souches classiques (Sapats et Ignjatovic, 2000).

En Europe, la maladie de Gumboro a été rapportée dans le milieu des années 60. Dans les années 80, des souches virulentes ont émergé provoquant une infection aigüe en Belgique et aux Pays-Bas (Hoque et al., 2001). La maladie de Gumboro à vvIBDV a été rapportée en Pologne et en Hongrie. Dans ces pays, IBD a été faiblement pathogène dans les années 80, par contre, au début des années 90 après l'introduction de la vaccination avec des vaccins vivant atténués, des souches virulentes ont émergé. Les hypothèses sur l'émergence de la souche virulente en Pologne et Hongrie sont nombreuses. Parmi lesquelles figure l'hypothèse selon laquelle ces souches dériveraient des souches classiques. Une autre hypothèse a été avancée selon laquelle les souches virulentes co-existaient avec les souches classiques (Domanska et al., 2004). Cette maladie a aussi été rapportée en Espagne (Majo et al., 2002), en France (Etteradossi et al., 1992) et en Allemagne (Zienberg et al., 2000).

En Asie la maladie a été rapportée dans les années 60. Au Japon, elle a été décrite pour la première fois en 1967 (Tsukamoto et al., 1992). En 1990, la maladie de Gumboro à vvIBDV a émergé dans l'ouest du Japon et depuis, elle s'est propagée dans tout le pays (Nakamura et al., 1992) et a été rapportée en Chine (Cao et al., 1997), en Malaisie, au Bangladesh (Tan et al., 2003 ; Hoque et al., 2001) et en Indonésie (Rudd et al., 2002).

En Afrique, la maladie de Gumboro à vvIBDV est apparue à la fin des années 80. Elle a été rapportée au Nigéria, en Afrique du Sud (Zienberg et al., 2000 ; Owoade et al., 2004), en Côte d'Ivoire (Etteradossi et al., 1999), en Égypte (Hassan, 2004) et en Tunisie (Mardassi et al., 2004).

En Amérique Latine, l'IBD aiguë est apparue dans les années 90. Elle a été rapportée au Brésil (Ikuta et al., 2001), au Mexique, en Colombie, en Bolivie et en Argentine (Jackwood et Wagner, 2007).

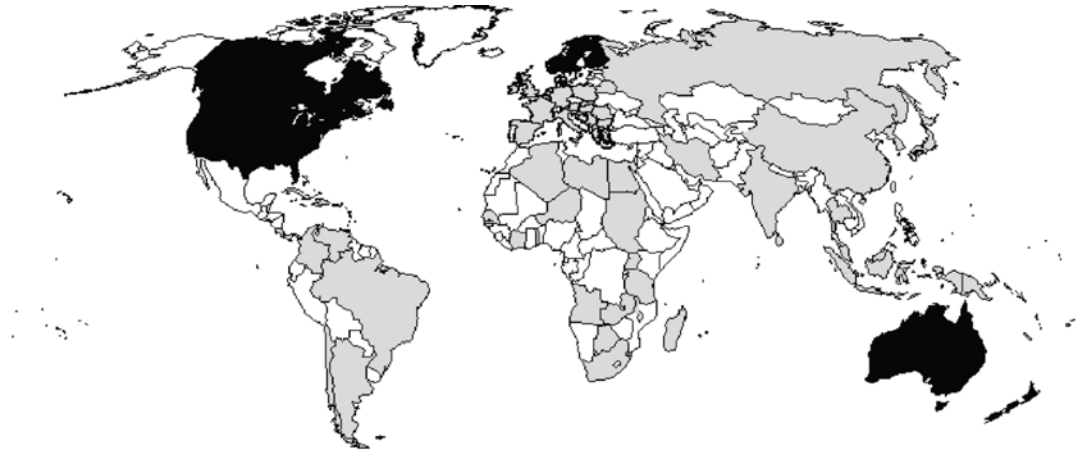


Figure 7. Distribution mondiale de la maladie de Gumboro selon sa forme clinique. Zones grises : pays dans lesquels sévit la forme aiguë de l'IBD causée par vvIBDV. Zones noires : pays dans lesquels sévit la forme subclinique de l'IBD causée par les variantes antigéniques. Zones blanches : pays dans lesquels aucune information n'a été rapportée sur IBD. (Source: van den Berg, 2000)

2.1.6 Impact économique

La maladie de Gumboro est une maladie immunosuppressive ayant un impact économique important partout dans le monde (Farooq et al., 2003). L'estimation de l'impact économique de la maladie de Gumboro est rendue difficile par la nature multifactorielle des pertes enregistrées. Cet impact économique est influencé par le type de la souche virale infectant les oiseaux, la susceptibilité génétique des oiseaux, la coexistence avec des maladies secondaires et par des facteurs environnementaux (Müller et al., 2003). À cela s'ajoutent des pertes liées au retard de croissance et au rejet de carcasses en raison de leur aspect hémorragique (Van Den Berg et al., 2000)

La forme clinique de l'IBD engendre un taux de morbidité élevé conduisant à l'immunosuppression des oiseaux ayant survécu à la maladie. Cette forme engendre aussi un taux de mortalité élevé et la mort rapide des oiseaux infectés (Van den Berg et al., 1991). L'émergence des souches hypervirulentes un peu partout dans le monde a encore augmenté cet impact financier sur les producteurs (van de Berg et al., 2000).

Quant à sa forme subclinique, l'IBD occasionne des pertes importantes car les oiseaux atteints par cette forme deviennent immunosuppresseurs et réfractaires à toute vaccination contre d'autres maladies virales et sont sujets à des maladies opportunistes. (Balamurugan et al., 2006). Les oiseaux immunosupprimés ont une performance médiocre, croissent lentement et ont un indice de consommation élevé (McIlroy et al., 1989).

En Nouvelle-Zélande, une possible introduction de souches classiques a entraîné une perte financière de 10 millions de dollars par an (Christensen, 1985).

Au Pakistan, cette maladie a entraîné une perte équivalant à 200 dollars par 1000 oiseaux par an (Farooq et al., 2003).

En Irlande du Nord, McIlroy et al. (1989 et 1992) ont déterminé une diminution du chiffre d'affaire de 14 % dans des cheptels de poulets de chair atteints par l'IBD subclinique par rapport aux troupeaux sains. Une diminution de 11 % du rendement fut rapportée pour les troupeaux atteints par l'IBD durant une période moyenne d'engraissement de 42 jours, en comparaison avec les troupeaux non exposés. Une chute de profit de 10 %, pour les 991 troupeaux infectés par l'IBDV dans l'étude, fut consécutive à une perte de poids et une baisse de la conversion alimentaire en comparaison avec les troupeaux non infectés (Van den Berg et al., 2000).

En Amérique du Nord, cette maladie engendre une augmentation de 10 % dans les dépenses liées à la production dans une industrie aviaire nord-américaine (Shane et al., 1994).

Bien que des programmes de vaccination existent, le secteur de la production aviaire est toujours menacé par une éventuelle émergence des souches virulentes de l'IBDV (Boot et al., 2002).

2.1.7 Prophylaxie contre l'IBD

L'IBDV est un virus très résistant dans l'environnement et ni la désinfection, ni les prophylaxies sanitaires ne suffisent à le prévenir (Kibenge et al., 1988). La prévention repose essentiellement sur la vaccination des reproductrices et des jeunes poulets (Fussel, 1998). L'hyperimmunisation des reproductrices confère une immunité passive aux jeunes poulets (Hamal et al., 2006). Comme cette immunité passive ne peut pas les protéger plus tard dans leur vie, une immunisation active est nécessaire pour prendre le relais à la protection conférée par les anticorps maternels. L'une des problématiques rencontrée dans la vaccination active des jeunes poulets est la détermination du temps

optimal de vaccination. La vaccination ne devrait pas être fait trop tôt pour éviter l'interférence avec les anticorps maternels ni trop tard pour éviter une infection à l'IBDV qui peut survenir à n'importe quel moment (de Wit, 2001). Idéalement, la vaccination des jeunes poulets doit se faire après la chute des anticorps maternels vers 21 jours d'âge (Kumar et al., 2000).

2.1.7.1 Les anticorps maternels chez les oiseaux

Chez les oiseaux, les anticorps maternels sont transférés de la mère, via le jaune d'œuf, aux poussins. Ils jouent un rôle dans la croissance des jeunes poulets car la dépense physiologique pour la réponse immunitaire par la progéniture est en compétition avec les nutriments requis pour la croissance et les autres fonctions. Cette hypothèse est basée sur le fait que la stimulation du système immunitaire, que le stimulus induise ou non une maladie, entraîne une déclinaison du taux de croissance. Ainsi, les jeunes poulets ayant un titre en anticorps maternels élevés vont avoir un taux de croissance plus élevé que ceux qui ont un titre en anticorps maternels bas (Grindstaff et al., 2003). Dans la production aviaire, le transfert d'anticorps maternels aux jeunes poulets est surtout essentiel pour la protection contre les infections, le temps que leur système immunitaire arrive complètement à maturité et prennent le relais. En effet, chez les poulets la période de vulnérabilité se situe entre l'éclosion et le moment où l'organisme serait capable de leur fournir les anticorps dont ils auraient besoin (Lawrence et al., 1981).

Chez l'oiseau, le transfert d'anticorps se fait essentiellement avec IgY de la mère vers sa progéniture. Les autres anticorps, IgA et IgM sont transférés dans l'albumen mais à faible concentration (Hamal et al., 2006). Les anticorps transférés aux progénitures reflètent l'histoire de maladie ou de vaccination de la mère. La quantité d'anticorps transférée aux poussins est proportionnelle à la concentration d'anticorps circulant dans le sang de la mère (Staszewski et al., 2007). La poule transfère 10 à 20 % de son taux d'anticorps dans les œufs (Kowalczyk et al., 1985).

a. Persistance et déclinaison des anticorps maternels chez les jeunes oiseaux

La protection conférée par les anticorps maternels est limitée. Les anticorps maternels ne persisteront que jusqu'au 17^{ème} au 20^{ème} jour d'âge du poulet puis ils seront catabolisés. Leur persistance varie selon le type, le moment, et la dose de vaccin administré aux reproductrices et aussi selon d'autres facteurs qui sont la race et le gain de poids du poulet. Cette persistance est déterminée par le calcul de la demi-vie des

anticorps maternels par un test de neutralisation virale. En mesurant, à l'échelle log₂, la déclinaison régulière des anticorps maternels, la demi-vie de ces derniers correspond au nombre de jour où le titre en anticorps initial est réduit de moitié. Cette demi-vie varie de 3 à 5,5 jours (de Wit, 2001 ; Alam et al., 2002 ; Al-Natour et al., 2004). La dose de vaccin administrée aux reproductrices influence le titre en anticorps maternels des jeunes poulets. Les poulets issus des reproductrices vaccinées 2 fois à la 12^{ème} et à la 16^{ème} semaine d'âge avant leur ponte ont un titre en anticorps maternels élevés que ceux qui sont issus des reproductrices qui ne sont vaccinées qu'une fois à la 12^{ème} semaine d'âge (Lucio et Hitchner, 1978). Certaines races de poulet ont aussi la possibilité d'avoir un titre en anticorps plus élevé que d'autres avec un même programme de vaccination. En effet, la vaccination de 3 races croisées de poulet (la race Dokki-4, la race Bandara et la race Montazah) et une race locale égyptienne (la race Dandara), a démontré que la race Montazah donnait un titre en anticorps maternels plus élevé que les 3 autres avec un même programme de vaccination (Abdel-Moneim et Abdel-Gawad, 2006). La croissance rapide des poulets entraîne aussi une rapide déclinaison des anticorps maternels par effet de dilution. En effet la déclinaison des anticorps maternels est plus rapide chez les poulets de chair que sur les futures pondeuses de même âge (Vaziry et al., 2007).

b. Rôle des anticorps maternels

Les anticorps maternels ne protègent pas seulement les jeunes poulets contre l'infection à l'IBDV mais ils améliorent aussi la croissance de ces derniers (Hasselquist et Nilsson., 2009). Si les poulets sont élevés dans un même environnement que les reproductrices, ils auront un système immunitaire acquis contre l'environnement pathogène (Grindstaff, 2006) et par conséquent dépenseront moins d'énergie que ceux qui ont juste un système immunitaire inné et qui vont devoir développer une réponse immunitaire endogène contre l'agent pathogène (Raberg et al., 2002). Comme cette réponse immunitaire engendre un ralentissement de la croissance parce qu'elle provoque une réponse inflammatoire entraînant une anorexie et de la fièvre, les anticorps maternels donnent à la progéniture les bénéfices de ne pas subir ce ralentissement de la croissance (Grindstaff, 2008).

c. Interférence des anticorps maternels sur la vaccination

Les anticorps maternels inhibent les signes cliniques de l'infection par l'IBDV chez les jeunes poulets (Winterfield et al., 1980) et interfèrent avec les vaccins à virus vivant. La

vaccination en présence d'anticorps maternels entraîne souvent l'échec de la vaccination avec un vaccin vivant (Naqi et al., 1982), car ce dernier est neutralisé par ces anticorps et n'arrive pas à stimuler le système immunitaire (Zaheer et Saeed, 2003). Ainsi pour éviter cette interférence, il est recommandé de vacciner les oiseaux contre IBD après la chute des anticorps maternels.

2.1.7.2 La vaccination contre l'IBD

a. La vaccination des reproductrices

L'hyperimmunisation des reproductrices est l'un des moyens pour lutter contre l'IBD. Cette vaccination se fait en 2 temps ; après la chute des anticorps maternels, les futures reproductrices sont vaccinées avec des vaccins vivants. À l'entrée en ponte, vers 18 semaines d'âge, un rappel vaccinal est effectué avec des vaccins inactivés avec adjuvant huileux (Naqi et al., 1982).

b. La vaccination des jeunes poulets

La protection conférée par les anticorps maternels ne suffit pas à protéger les poulets à long terme contre la maladie de Gumboro. L'immunisation active des poulets est donc nécessaire pour éviter un risque d'infection. Différents types de vaccins sont disponibles pour cette immunisation. Les plus utilisés sont les vaccins vivants commerciaux qui utilisent, soit des souches virales classiques soit des souches à virulence intermédiaire atténuées après passage répété sur culture cellulaire (Skeeles et al., 1978). Ces souches n'occasionnent pas de maladie (Cao et al., 1997). Les vaccins vivants issus de ces souches sont classifiés en vaccin vivant moyen, moyen intermédiaire, intermédiaire, intermédiaire plus et virulent en fonction des dommages qu'ils occasionnent sur la BF. À part l'atténuation par passage répété sur culture cellulaire, cette atténuation peut aussi se faire avec un clonage par purification de plaques (Müller et al., 2003). L'intérêt d'utiliser un vaccin clone est sa grande stabilité car même après 7 passages sur des oiseaux, suivis d'un isolement sur culture cellulaire d'embryon et d'une inoculation sur SPF (specific pathogen free) de 1 jour, le virus clone isolé à 21 jours post-inoculation provoque la même déplétion lymphocytaire modérée occasionnée par le virus vaccinal initial (Lütticken et Cornelissen, 1986). Ces vaccins ont de bon taux de protection qui peut atteindre les 100% (Sharma, 1986 ; Scanavini Neto et al., 2004). Il existe aussi des vaccins inactivés qui ont un taux de protection allant jusqu'à 91% (Rautenschlein et al., 2002).

Pour réduire l'effet immunosuppresseur de certains vaccins vivants sur la BF, de nouveaux vaccins ont été créés en combinant le virus avec de l'anticorps anti-IBDV. A part l'absence d'un effet nocif sur la bourse, l'autre avantage de ce vaccin est son efficacité à surmonter les anticorps maternels et à protéger les oiseaux contre un challenge avec des virus de souche virulente (Haddad et al., 1997 ; Jeurissen et al., 1998). Ces vaccins ont un taux de protection de 83% (Corley et al., 2002). Avec le progrès de la génétique, des vaccins recombinants utilisant souvent le gène de la protéine structurale VP2 (Villegas et al., 2008) couplée ou non à ceux des autres protéines structurales VP3, VP4 (Vakharia et al., 1993 ; Chang et al., 2002) ont été créés. Le gène de cette protéine est inséré dans l'ADNc d'une souche vaccinale d'un autre virus agent d'une maladie aviaire (Huang et al., 2004). Cet autre virus va exprimer le caractère immunogène de VP2 et pourra être utilisé contre IBD. Le vaccin recombinant deviendrait un vaccin bivalent qui peut conférer une protection contre la maladie de Gumboro et contre l'autre maladie aviaire (Huang et al., 2004). L'avantage de l'utilisation de ce type de vaccin est sa capacité à surmonter les anticorps maternels (Oshop et al., 2002) par contre le taux de protection qu'il confère est très variable, allant de 79 à 90%.

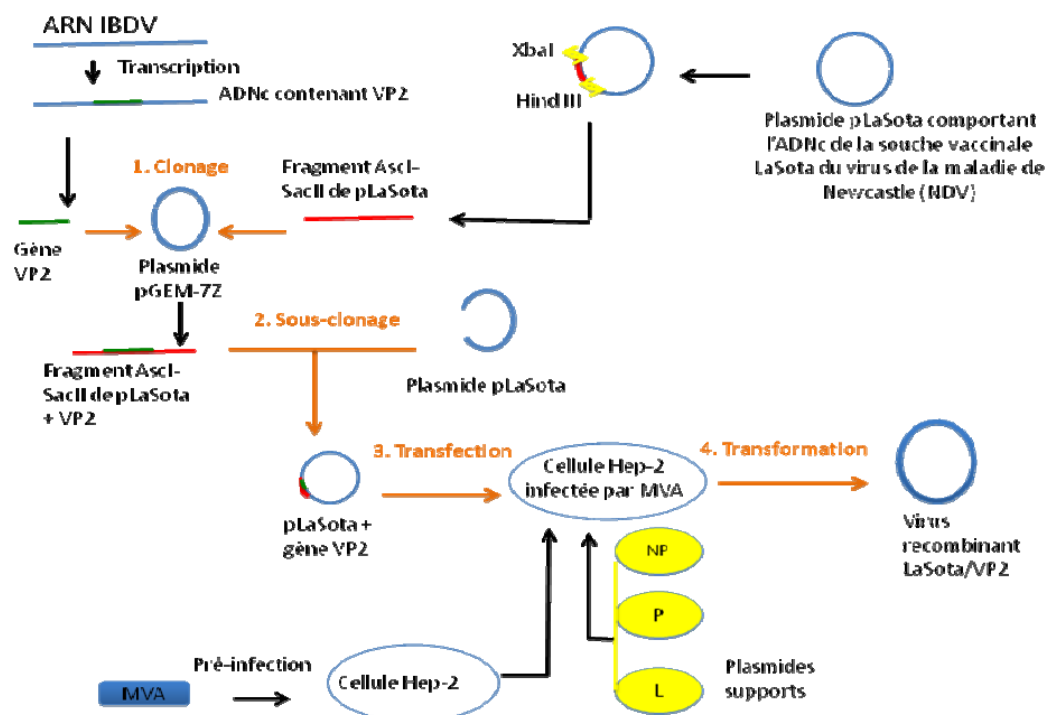


Figure 8. Principe du vaccin recombinant anti-IBD et anti-NDV. 1. Clonage du segment AscI-SacII, qui est excisé du plasmide pLaSota comportant l'ADNc de la souche vaccinale LaSota du virus de la maladie de Newcastle (NDV) par les enzymes de restriction XbaI et HindIII, avec le gène de VP2 de l'ARN de l'IBDV; 2. Sous-clonage du segment AscI-SacII et le gène de VP2 dans un plasmide pLaSota; 3. Transfection de la plasmide pLaSota comportant le gène de VP2 avec les plasmides supports comportant une protéine nucléocapsidique (NP), une phosphoprotéine (P) et une large protéine polymérase (L) dans une cellule épidermique cancéreuse humaine Hep-2 préalablement infectée par le virus recombinant vaccinia MVA ; 4. Transformation du virus recombinant LaSota/VP2. (Source Huang et al., 2003; Huang et al., 2004)

2.2 La vitamine E

La vitamine E a été découverte par Herbert Evans (1922), et a été dénommée par Benett Sure (1924). La vitamine E est le nom générique donné aux dérivés tocophérol et tocotrienol. Chaque dérivé se présente sous 4 formes naturelles (alpha, bêta, gamma et delta). La forme α -tocophérol est la forme la plus abondante dans la nature et aussi celle qui a une grande activité biologique (Brigelius-Flohé et Traber, 1999). Cette vitamine fait partie des vitamines liposolubles avec les vitamines A, D et K.

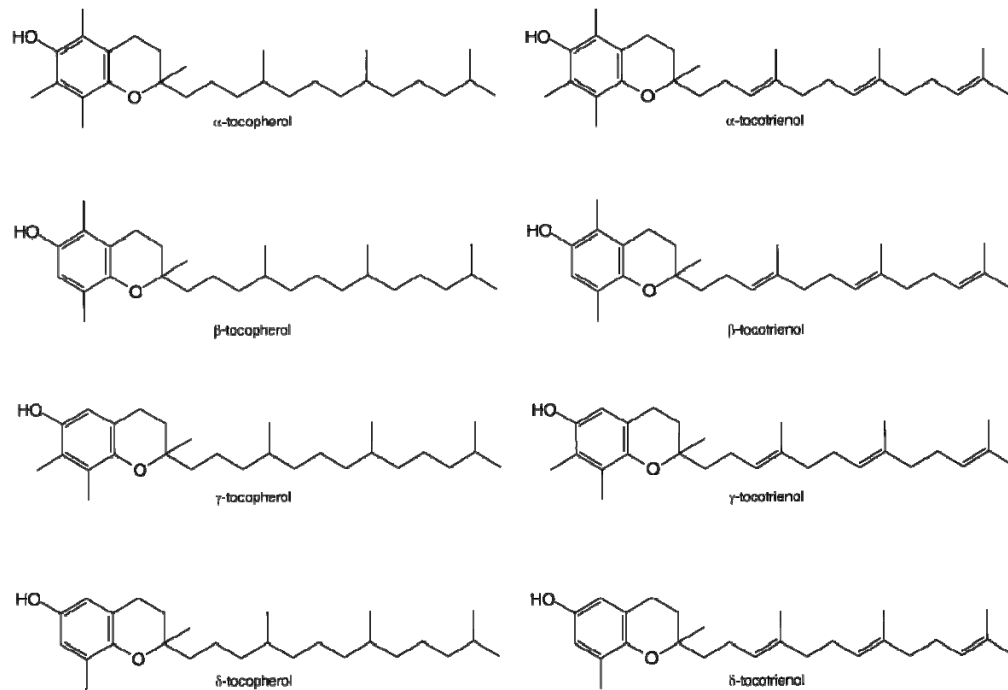


Figure 9. Les formes naturelles de la vitamine E

La vitamine E est un antioxydant connu pour sa capacité de diminuer les dommages causés par les radicaux libres sur les cellules (Packer, 1991). Elle agit comme un « piègeur » de radicaux libres en les transformant en composé stable. La vitamine E joue aussi un rôle anti-apoptotique par inhibition de la protéine kinase C. Cette propriété est bénéfique lors des atteintes ou des dommages survenant sur les tissus nerveux (Higgins et al., 2008). La vitamine E est aussi nécessaire pour l'intégrité et la fonction optimale du système reproducteur, musculaire, circulatoire, nerveux et immunitaire (Packer, 1991).

À part son rôle d'antioxydant, la vitamine E est connue pour son rôle immunomodulateur. La vitamine E stimule et améliore la réponse immunitaire soit par effet direct sur les cellules lymphoïdes soit indirectement en altérant les fonctions métaboliques et endocriniennes inhibitrices de la mitogénèse des cellules lymphoïdes (Corwin et Shloss, 1980 ; Simin et al., 2005; Erf et al., 1998). L'effet direct de la vitamine E sur l'immunité serait dû en partie par sa propriété antioxydant. Elle protège les cellules immunitaires contre les dommages occasionnés par la peroxydation des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire (Mascio et al., 1991). Ces dommages ne se limitent pas seulement sur la membrane cellulaire mais peuvent aller jusqu'à atteindre les acides nucléiques et entraîneront une modification de la réponse des cellules immunitaires (Machlin et al., 1987 ; Ames et al., 1993). Toutefois, l'effet direct de la vitamine E sur les cellules immunitaire ne peut pas être attribué exclusivement de part sa propriété antioxydant (Ke-Yin et al., 1995). La vitamine E agit indirectement sur la réponse immunitaire. Ceci se fait par l'entrave de l'effet inhibiteur de la prostaglandine E 2 (PGE₂) sur la production de l'interleukine 2 (IL-2) et de la prolifération des lymphocytes (Simin et al., 1986). La prostaglandine à faible concentration est connue comme nécessaire pour certains aspects de la réponse immunitaire. A forte concentration, elle devient immunosuppressive pour les lymphocytes (Dayong Wu et al., 1998). La PGE₂ n'est pas la seule inhibitrice de la prolifération lymphocytaire. Il a été rapporté que le peroxyde a aussi un effet inhibiteur sur cette prolifération. En étant un antioxydant efficace, la vitamine E diminue l'effet de H₂O₂ sur la production de IL-2 et la prolifération des lymphocytes (Beharka et al., 1996). Grâce à ces rôles, la vitamine E a un effet mitogénique sur les cellules immunitaires.

A part son rôle immunomodulateur, la vitamine E à forte dose (200 mg/kg) est utilisée pour préserver la qualité et améliorer la couleur de la viande (Leonhardt et al., 1997). Grâce à sa propriété antioxydant, elle réduit l'oxydation des lipides qui est une source de rancidité et de mauvaise odeur (De Winne et Dirinck, 1996). Cette vitamine protège aussi les poulets contre les maladies d'origines nutritionnelles telle que l'encéphalomalacie et la maladie du muscle blanc qui surviennent lors de la carence en vitamine E combinée ou non avec d'autres carences nutritionnelles (Sweeny et al., 1972 ; Sokol, 1988).

Pour la croissance, un poulet a un besoin quotidien en vitamine E de 10 UI/Kg d'aliments (NRC, 1994). Mais pour avoir un effet immunomodulateur et une protection contre les maladies carencielles, le besoin quotidien en vitamine E devrait être plus élevé (NRC, 1994 ; Muir et al., 2002).

Le dosage de cette vitamine se fait par HPLC (High performance liquid chromatography) ou chromatographie liquide à haute performance. Cette technique consiste à extraire la vitamine présente dans le plasma avec de l'hexane et de l'éthanol. Le plasma d'un volume de 500 µl est mélangé avec 1000 µl d'éthanol dans un tube. Le mélange est vortexé pendant 1mn puis 3000 µl d'hexane est ajouté au mélange. Après 15 mn de vortex, le tube est centrifugé à 1000 x g à 4°C pendant 10 mn. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube puis évaporé sous azote. L'extrait sec est ensuite dissout dans 30µl de chloroforme puis élué dans une phase mobile constituée de méthanol et d'acétonitrile (1:4). Cette phase mobile est ensuite filtrée et aspirée avec une certaine pression par une pompe vers une colonne afin d'être détectée par un détecteur à fluorescence avec une longueur d'onde de 285 nm. Les données sont ensuite enregistrées dans un système informatique. Pour permettre le calcul de la concentration de la vitamine E au niveau de l'échantillon, des standards interne et externe (α -tocophérol et α -tocophérol acétate) avec une concentration connue sont utilisés. La concentration de la vitamine E exprimée en µg/dl est calculée à partir d'une courbe de standard formée par l'extrapolation du pic de l'aire des standards internes sur leur concentration. Cette technique a un coefficient de détermination de la courbe standard (r) > 0,98 avec une erreur type \leq 20%, un seuil de détection = 85-115 % et un seuil de quantification = 80-120 %.

3. Hypothèses et objectifs

Au Québec, à cause du besoin du marché, les poulets sont abattus aux alentours de 33 à 40 jours d'âge lorsqu'ils atteignent un poids minimal de 1,9 kg. En tenant compte de la période de retrait de 21 jours du vaccin, les oiseaux vont être vaccinés en présence d'anticorps maternels vers 12 à 19 jours d'âge. Or la vaccination en présence d'anticorps maternels entraîne l'interférence de ces anticorps sur le vaccin et l'échec de la vaccination. Dans la présente étude, il a été proposé d'utiliser une forte dose de vaccin vivant accompagnée d'une forte dose de vitamine E. Ceci a pour objectif principal d'évaluer l'efficacité du vaccin et de la vitamine E, utilisés à forte dose, à contourner les anticorps maternels et à provoquer une réponse immunitaire en leur présence. Cette étude a aussi pour la même occasion des objectifs secondaires :

- déterminer si le virus contenu dans le vaccin vivant pourrait se transmettre d'oiseaux vaccinés aux oiseaux non vaccinés
- déterminer si la forte dose de vitamine E stimule la réponse immunitaire humorale.

4. Manuscript

Submitted in Avian Disease, Journal of American Association of Avian Pathologists on
May 2011

Reference number : 9757-041411-Reg

Running head: High-titered vaccine virus and vitamin E against IBD

**Effect of High-titered Vaccine Virus and High Dietary Vitamin E Concentration
On Antibody Response Against Infectious Bursal Disease in Broiler Chickens**

Rondro M. Ramahefarisoa^A, Younes Chorfi,^B Daniel Venne,^C Diane Frenette,^A
Amer Silim,^A

^ADepartment of Pathology and Microbiology, ^BDepartment of Veterinary Biomedicine
Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 rue Sicotte, Saint-
Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada; ^CScott Hatchery, 1798 rte du Président-Kennedy,
Scott Junction, QC;

Corresponding author: Amer Silim, Faculty of Veterinary Medicine, University of
Montreal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada.

4.1 SUMMARY

In Quebec, Canada, broilers chickens are slaughtered from 33 to 40 days of age depending on the targeted market. Considering the withdrawal period of 21 days following vaccination, chickens would have to be vaccinated in the presence of maternally derived antibodies (MDA). The purpose of this study was to determine the effectiveness of high dose of vaccine and high dietary concentration of vitamin E in circumventing the MDA. A normal dose vaccine containing $10^{4.35}$ TCID₅₀/ml/bird and a higher dose containing $10^{5.35}$ TCID₅₀/ml/bird were used on 1200 chickens, which were divided into 4 groups housed in 8 pens: a high dose of vaccine in which all chickens were given $10^{5.35}$ TCID₅₀/ml (HD100%), a high dose in which 10% of the birds were vaccinated (HD10%), a normal dose as prescribed by the manufacturer in which all birds received $10^{4.35}$ TCID₅₀/ml (ND100%), and unvaccinated control groups. Each group was divided into 2 sub-groups: one was supplemented with 50 to 100 IU/kg of vitamin E and the other was supplemented with 20 to 27 IU/kg. The result of this study showed that the vaccine virus was able to circumvent the MDA, which persisted until 20 days of age, and to initiate a high antibody response. The study also showed that the vaccine virus was able to spread by direct and indirect contact within the pen and to the next pens. No reversion to the virulence or mutation of VP2 nucleotide was detected from the contact vaccinated birds. Vitamin E at the concentration of 50 to 100 IU/kg of the diet induced significantly elevated antibody response against IBDV.

Key words: IBD, high vaccine dose, vitamin E, maternal antibodies

Abbreviations: B/BW: bursa to body weight; BF: bursa of Fabricius; CEF: chicken embryo fibroblasts; HD: high dose; IBD: infectious bursal disease; IBDV: infectious bursal disease virus; MDA: maternally derived antibodies; ND: normal dose; SP: sample to positive; TCID: tissue culture infectious dose; VP2: infectious bursal disease virus major capsid protein.

4.2 INTRODUCTION

Infectious bursal disease virus (IBDV) belongs to the genus *avibirnavirus* of the *Birnaviridae* family. It is a non-enveloped, icosahedral, double-stranded RNA virus that is widespread in most poultry producing areas of the world (25). It is the causative agent of infectious bursal disease (IBD), a highly contagious immunosuppressive disease in young chicken, which is characterized by destruction of the lymphoid cells in the bursa of Fabricius (BF) (19). Immunosuppression caused by IBDV increases the chicken's

susceptibility to other disease and reduces the chicken's abilities to respond to vaccination (32).

IBDV is resistant to environmental conditions and can persist in poultry house even after cleaning and disinfection (15). Biosecurity alone is not enough to prevent the spread of the disease between poultry houses or between farms. The control of IBD is therefore heavily depended on vaccination (2). It consists of vaccinating the breeder hens as well as young chickens coming from these hens (9). Hyperimmunization of the breeder hens confers a passive immunity via the egg yolk to young chickens for up to 2 to 3 weeks of age (12). Maternally derived antibodies (MDA) are necessary for the survival and the protection of young chickens against diseases. However, this protection is limited because MDA does not persist later in the life of broiler chicken (31). The persistence of MDA depends on its initial level in the breeder flock, and the amount transferred to the chicks (13). It also depends on the breed (1) and the broiler growth rate (30). The persistence of MDA is determined by its half-life, measured by virus neutralization, and it varies from 3 to 5.5 days (2,3,8,26).

One of the problems encountered in the immunization of young chickens against IBDV is the interference of MDA with the virus, resulting in vaccine failure (20,29). In order to protect chickens, it is important to determine the optimal time of vaccination. It should not be made too early whereby interference with the MDA could occur, nor should be too late by which time an infection with IBDV might have occurred. Ideally, the vaccination of young chickens should be done after a complete decline in MDA corresponding to approximately 21 days of age (16). Broiler chickens in Canada are slaughtered at 35 to 40 days of age, depending on targeted market, restaurants or supermarkets, at which time the birds will have attained a minimal average weight of 1.9 kg. Withdrawal period for vaccinations in USA and Canada is 21 days, meaning that birds slaughtered at 35 days would have to be vaccinated at the latest at 14 days of age.

Vitamin E is a fat-soluble vitamin with immunomodulatory effects through multiple functions. It acts directly on the immune cells by controlling free radical production, and indirectly by affecting the metabolism of arachidonic acid via cyclooxygenase and lipoxygenase pathways, leading to the synthesis of prostaglandins and leukotrienes, which in turn influence the immune function (5). Several studies reported a positive effect of dietary vitamin E supplementation on antibody production and its duration against sheep red blood cells, bacteria, viruses and coccidia (4,6,7,26). For these reasons, poultry industry often provides supplemental dietary vitamin E at inclusion

rates above the NRC (21) recommendation of 10 IU/Kg of the diet. This recommendation is far below the level of 50 IU/kg required for an optimum humoral response against several avian vaccines as demonstrated by Leshchinsky and K. C. Klasing (17) and more recently by Ruiz-Feria and Abdukalykova (24).

In the present study, in order to avoid interference of MDA with vaccine virus, and to improve humoral immune response of chickens, a high dose of vaccine as well as a high dietary vitamin E concentration were used. It is known that IBD vaccine virus is viable outside the chicken, and is able to spread from vaccinated to unvaccinated birds resulting in immunization of unexposed chickens (19). It should thus be possible to vaccinate a small percentage of broilers supplemented with dietary vitamin E in order to immunize of the whole flock.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Experimental design

One thousand two hundred day-old Ross 308 (Aviagen™, Huntsville, Alabama, USA) were used in the present study. Broilers were reared at the experimental farm of ITA (Institut des Technologies Agricoles) at La Pocatière, Quebec, Canada for 49 days. The birds were raised on floors with wood shavings as litter and were housed separately in 10 pens divided by plywood walls of 30 cm in height followed by a wire mesh of 120 cm for a total of 150 cm. Each pen contained 100 to 120 birds. All pens were cleaned and disinfected before chicken placement. Feed and water were available *ad libitum*. Animal care procedures followed the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and the protocol was approved by the Animal Care Committee of the ITA.

Birds were divided into 4 groups: normal vaccine dose for all birds (ND100%), high vaccine dose for 10% of the birds (HD10%) and high vaccine dose for all birds (HD100%) and unvaccinated control chickens (Fig. 1). At 1-day post hatch, blood samples were collected from 20 chicks, and at 14 days of age, before vaccination, 4 blood samples were collected from each group, and tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine MDA titers.

At 20, 28, 35 and 49 days post hatch, blood samples were collected from 10 birds from each group for antibody titration. On days 20 and 28, 4 birds from each group were sacrificed, weighed and the bursae were removed and weighed. Individual bursa to body weight (B/BW) ratio was determined and individual B/BW index was calculated for each bursa removed from the birds at 20 and 28 days as described by Lucio and Hitchner (12). This was done by dividing each B/BW ratio over the mean B/BW ratio of unvaccinated control groups. Standard deviation was determined, and a confidence limit of 95 % was used in considering a bursa as atrophied or not. Chickens with an index lower than 74 % were considered to have bursal atrophy.

4.3.2 Vaccine

Live attenuated sérotype 1 commercial vaccine (Clonevac D-78, Intervet Shering-Plough Animal Health, Millsboro, DE) was used to orally vaccinate the birds in the experiment, according to designated groups, at a volume of 1 ml per bird using a 5 ml syringe at 14 days of age as indicated in Fig. 1. The same unopened batch of the vaccine was sent to the laboratory for virus titration on primary chicken embryo fibroblasts

(CEF) cell cultures from SPF eggs grown in microtiter plates. The vaccine was resuspended in 10 ml deionized water and subjected to 2 freeze-thaw cycles, and clarified by centrifugation. The suspension was serially diluted 1:10 and titrated in CEF as previously described (19). Cytopathic effect (CPE) was recorded 5 days later and the titer was expressed as 100 TCID₅₀/ml.

4.3.3 Vitamin E (α -tocopherol) in the diet

According to groups, broilers were assigned to 2 diets containing different levels of added vitamin E in the form of α -tocopherol as in Fig. 1 (Group A vs Group B). In the diet containing a high-dose of vitamin E, the birds received 100 IU/Kg of starter feed from 1 to 14 days of age, and 50 IU/Kg of grower and finisher feeds. In the low-dose vitamin E diet, the dose was 27 IU/Kg of starter and grower feeds followed by 20 IU/Kg for finisher feed.

4.3.4 ELISA and serum neutralization test

An indirect ELISA using IBD ProFLOK® and ProFLOK®plus kits (Synbiotics Corporation, San Diego, CA, USA) for the determination of antibody titers were used according to manufacturer protocols. Titers were expressed as sample to positive (SP) ratio and antilog₁₀ titer.

Serum neutralization test was performed using sera collected on 28, 35 and 49 days of age. Equal parts of serum from each pen were pooled to form one sample and each sample was serially diluted twofold in M199 medium. The starting dilution for seroneutralization was 1:4 for all ELISA positive samples, and as such, sera from the control groups, which were all negative on day 28, were not tested. The serially-diluted serum was mixed with an equal volume of 100 ml of vaccine virus containing 100 TCID₅₀ and incubated for 1 h at 37°C. The serum-virus mixture was inoculated onto CEF cells in microtiter plates, incubated for 1h after which the inoculum was removed. Maintenance culture medium containing 1% FBS was added and incubated for 5 days at 37°C. The level of virus neutralization by antibodies was evaluated by visual screening of the infected monolayers. End point titration was determined as the reciprocal value of the highest serum dilution in which no cytopathic effect was observed.

4.3.5 Serum Vitamin E measurement

Plasma vitamin E was determined by HPLC, using Hewlett Packard Series 1100 liquid chromatograph (Agilent-Technologies, Mississauga, On., Canada) according to the

method published by Gueguen et al. (11) and modified in our laboratory. Briefly, samples were isocratically eluted with a mix mobile phase (75/25) respectively of acetonitrile (Fischer Chemical, Nepean, On., Canada) and methanol (Fischer Chemical, Nepean, On., Canada), and detected at 285 nm wavelengths through a Hewlett-Packard 1046 fluorescence diode-array detector (Agilent-Technologies, Mississauga, On., Canada). Column type was Zorbax Eclipse plus C18, 3,0 x 50 mm, 600 bars (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Ca., USA). External and internal standards were prepared from α -tocopherol and α -tocopherol acetate (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, On., Canada) and were injected before samples. Concentrations of vitamin E were determined in $\mu\text{g}/\text{dl}$ from a standard curve of the peak-area ratio of the analyte-internal standard plotted against the concentration of analyte. Conditions of compliance criteria and quality control included; coefficient of determination of standard curve (r) > 0.98, relative standard deviation (rsd) \leq 20%, detection limit (LOD) = 85-115 % and quantification limit (LOQ) = 80-120 %.

4.3.6 Vaccine virus re-isolation and identification

A portion of the bursa was individually ground, diluted 1:2 in cell culture medium and subjected to 2 cycles of freezing and thawing. The suspensions were clarified by centrifugation at 1000xg for 5 min. The supernatants were recovered and filtered through 0.20 μm filters. The filtrates were diluted 1:5, and inoculated onto CEF cell culture for vaccine virus re-isolation and readings were taken after 5 days of incubation. Once isolated, virus was randomly selected in each group at 21 and 28 days for a total of 7 isolates. They were inoculated onto CEF cells and observed for 3 days at which time the cells were trypsinized and placed into microcentrifuge tubes at a volume of 1 ml per tube. The tube was centrifuged at 500xg for 3 min. The cells were rinsed and centrifuged 2 times with phosphate buffered solution and drops of 50 μl were placed on microscope slides. After drying, the cells were fixed in acetone for 10 min and subjected to immunofluorescence test as described (33), using chicken IBDV antibody from ProFlok® (Synbiotics Corporation) and fluoresceine-conjugated goat anti-chicken antibody (Cederlane Labs, Hornby, ON). Controls included negative serum and chicken anti-reovirus antibodies (Synbiotics Corporation) and in house antibodies against avian adenovirus types 8 and 11.

4.3.7 Sequence analysis of IBDV RNA

The IBDV RNA was extracted from an elution of the Clonevac D78 vaccine, a bursal tissue suspension from HD100% group at the age of 20 days and a bursal extract from unvaccinated control group at the age of 28 days. The hypervariable region of the VP2 gene was amplified by RT-PCR using the technique previously described (14), and the products were sequenced at the diagnostic service of the Faculty of veterinary medicine.

4.3.8 Statistical analysis

Data were analyzed by a linear mixed model SAS (SAS Institute Inc., NC) with age, vaccine dose, dietary vitamin E and serum vitamin E concentration as fixed factors, and pens as a random factor. Sequential Bonferonni correction was allowed to consider multiple measurements in the groups. The significant differences were evaluated by *F-test* ($P \leq 0.05$).

4.4 RESULTS

4.4.1 Antibody evolution

The result of MDA decline and seroconversion measured by ProFLOKplus® ELISA is presented in Fig. 2. There was a steady decline of MDA in all groups up to 20 days of age. At 28 days all vaccinated groups showed seroconversion whereas control groups were still negative for IBDV antibodies. At 28 days, the ELISA titer of the groups in which all chickens were vaccinated with high dose vaccine was significantly higher ($P < 0.0001$) than those of other vaccinated groups. By 35 and 49 days, all groups, including controls, had a high detectable level of IBDV antibodies. When the sera collected from birds at 28, 35, and 49 days were subjected to test by ELISA and seroneutralization tests, a comparison between the two tests showed 87% correlation ($R^2 = 0.87$) (Fig. 3).

4.4.2 Virus isolation

At 20 days of age, IBDV was isolated in CEF from 12.5% of birds in the group that received ND100% vaccine, 37.5% of birds receiving HD10%, and 25% of birds that received HD100%. No virus was recovered from birds in the unvaccinated control group at this age. At 28 days, IBDV was isolated from 25% of birds that received ND100% vaccine, 12.5% of birds receiving HD10% vaccine, 12.5% of birds that received HD100% vaccine, and 81% of birds in unvaccinated control groups (Fig. 4). When virus prevalence was compared to the ELISA antibody titer (Fig. 5), the results showed that the higher the titer, the less the virus prevailed. The unvaccinated control groups with no detectable antibody at 28 days of age (Fig. 2) had the highest virus prevalence in the bursa at 81%, compared to the two high dose groups at 12.5%. The results of immunofluorescence test on re-isolated virus at 20 and 28 days confirmed that the isolates were IBDV. The sequence of the hypervariable region VP2 genes showed 100% homology between the vaccine virus, and the bursal viruses at 20 and 28 days of age (Fig. 6).

4.4.3 Evaluation of bursal atrophy

To evaluate bursal atrophy, the B/BW ratio and its index were determined, and atrophy was considered to have occurred when the B/BW index was under B/BW index limit (Fig. 7). According to Fig. 7, the B/BW index limit was 0.74. At 20 days of age, the B/BW index of all groups were higher than the index limit, but at 28 days of age the

B/BW index of control and ND100% groups remain higher than the limit, whereas in the HD10% and HD100% groups, the index was lower than the B/BW limit.

4.4.4 Effect of vitamin E (α -tocopherol) on humoral immune response

The HPLC analysis showed that the average concentrations of vitamin E in the serum at 28 days of age were significantly higher at 722.0 ± 197.5 $\mu\text{g/dl}$ for the high-dose vitamin E groups compared to 375.7 ± 117.8 $\mu\text{g/dl}$ for the low-dose groups ($P < 0.001$). Similarly, at 49 days the averages were 1221.6 ± 191.1 $\mu\text{g/dl}$ for the high-dose groups and 761.9 ± 106.3 $\mu\text{g/dl}$ for the low dose groups ($P < 0.001$). The averages of IBDV antibody titer measured by ELISA for groups with high serum concentrations of vitamin E were also significantly higher than that of groups with low serum vitamin E concentration ($P < 0.0001$) (Fig. 8).

4.5 DISCUSSION

In Quebec, Canada, broilers chickens are slaughtered at 33 to 40 days of age depending on the targeted market and the withdrawal period following vaccination is 21 days. In order to respect this period, the chickens would have to be vaccinated at 12 days of age. According to the data from our diagnostic laboratory in which breeder flocks were monitored for the maternal antibodies, the titer range measured in egg-yolk using Synbiotics ELISA is as follows: 7000 to 12000 at 25 weeks of age, 6000 to 11000 at 35 weeks, 6000 to 10000 at 45 weeks, and 6000 to 9000 at 55 weeks. Taking into consideration the immunoglobulin half-life and the fast growth rate of broiler chickens in this province, the MDA level at 12 to 14 days would still be able to interfere with the vaccine. To avoid eventual interference of MDA with the vaccine virus, a ten-times high dose of live vaccine and as well as a high concentration of vitamin E supplement (50 to 100 IU/kg) were used in this study. The high dose vaccine was meant to overcome MDA and once the virus starts to replicate in vaccinated birds, the birds would then contact-vaccinate the unvaccinated pen mates. Because vitamin E has an immunomodulatory effect, the use of this vitamin was to enhance the humoral immune response.

As can be seen in Fig. 2, MDA persisted, albeit at a low titer, until 20 days of age. A similar result was reported by Alam et al. (3), who found that MDA persisted up to 15 to 20 days of age, depending on the antibody status of parent stock from which the chicks derived. The presence of the virus in the BF of vaccinated birds at 20 days of age and their seroconversion at 28 days means that the vaccine virus replicated in these birds and the virus was not fully neutralized by MDA.

The efficacy of vaccination in this study was demonstrated by seroconversion of the vaccinated chickens, and by the presence of vaccine virus and its eventual atrophying effect on the BF. Results indicated that at 20 days of age no atrophy was detected in any group despite the presence of the virus in the bursa of vaccinated groups, but at 28 days of age, atrophy was detected in the HD10% and HD100% groups. Bursal atrophy following vaccination of broiler chickens has previously been observed at 14 days post-vaccination (23). Giambrone and Closser (10) found that atrophy of the BF did not occur until 21 days post-vaccination with the same Clonevac D78 vaccine. In the unvaccinated control and ND100% groups, the BF appeared to be slightly above the normal average weight at 28 days, and the virus was isolated from 81% of the control

birds and 25% of birds in ND100% groups. This slight hypertrophy indicates that the birds were in a viremic stage of infection by IBDV. The late viremia in these groups was due to cross infection of the birds in the unvaccinated control groups and due to initial vaccination as well as cross contamination for the ND100% groups. It is believed that although all the birds in the ND100% groups received the virus, most of them managed to neutralize the vaccine virus via MDA, and these chickens later used the cross-contaminating virus to mount a humoral immune response to IBDV resulting in a slight hypertrophy of the BF at 28 days of age.

This study showed that supplementing dietary vitamin E at 50 to 100 IU/kg significantly induced higher serum vitamin E concentrations than the basal supplementation of 20 to 27 IU/kg commonly used in broiler chicken industry in Quebec. It is interesting that vitamin E clearly enhanced humoral immune response against IBDV at 28 days of age and lasted until the end of the experiment. This result is in agreement with the study of Leshchinsky and K. C. Klasing (17) who showed that dietary vitamin E concentration of 50 to 100 IU/kg induced an optimal antibody titer against infectious bronchitis live vaccine. More recently, Ruiz-Feria and Abdukalykova (24) demonstrated, after vaccination with live IBDV vaccine, that broiler chickens fed on 80 IU/kg of vitamin E had higher titers of antibodies compared to birds fed on 40 or 200 IU/kg.

In conclusion, this study showed that it is possible to vaccinate a percentage of birds within a pen with a high-titered dose of vaccine as demonstrated by HD10% groups resulting in a seroconversion that appears to be rapid. The study also showed that aerial cross contamination occurred between pens, which resulted in the controls groups seroconverting late. This aerial cross contamination might also have helped birds in ND100% groups to seroconvert by 28 days of age. The reversion of the vaccine virus to virulence did not occur; neither did hypervariable VP2 region change in nucleotide sequence. Our study also confirmed previous studies (22,27), which showed that vitamin E enhances the humoral immune response as indicated by the ELISA titer (Fig. 7).

4.6 REFERENCES

1. Abdel-Moneim, A. S., and M. M. Abdel-Gawad. Genetic variation in maternal transfer and immune responsiveness to infectious bursal disease virus. *Vet. Microbiol.*, 114:16-24, 2006.
2. Al-Natour, M. Q., L. A. Ward, Y. M. Saif, B. Stewart-Brown, and D. Keck. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 48:177-204. 2004.
3. Alam, J., M.M. Rahman, and B. K. Sil. Effect of maternally derived antibody on vaccination against IBD (Gumboro) with live vaccine in broiler. *Int. J. Poult. Sci.*, 1(4):98-101, 2002.
4. Boa-Amponsem, K., S.E.H. Price, M. Picard, P.A. Geraert, and P.B. Siegel. Vitamin E and immune responses of broiler pureline chickens. *Poult. Sci.*, 79:466-470, 2000.
5. Blumberg, J. Vitamins. *in: Diet, Nutrition, and Immunity*. R. A. Forse, ed. CRC Press, Boca Raton, FL. Pages 237–247, 1994.
6. Boren, B., and P. Bond. Vitamin E and immunocompetence. *Broiler Industry*. 26–33. 1996.
7. Colnago, G. L., L. S. Jensen, and P. L. Long. Effect of selenium and vitamin E on the development of immunity to coccidiosis in chickens. *Poult. Sci.* 63:1136–1143. 1984.
8. de Wit, J.J. Gumboro disease: Estimation of optimal time of vaccination by Deventer formula. In: *Proceedings of the 3rd meeting of working group of COST Action 839 on passive protection and vaccination (current and future possibilities) in the presence of maternally derived antibody*; Pulawy, Poland. 2001.
9. Fussel, L. W. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive disease. *Poult. Sci.*, 77:1193-1196. 1998.
10. Giambrone, J. J., and J. Closser. Efficacy of live vaccine against subtypes of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 34:7-11. 1990.
11. Gueguen, S., B. Herbeth, G. Siest, and P. J. Leroy. An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of alpha-tocopherol, retinol, and five carotenoids in human serum. *J. Chromatogr. Sci.* Feb. 40(2):69-76. 2002.
12. Hamal, K. R., S. C. Burgess, I. Y. Pevzner, and G. F. Erf. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult. Sci.*, 85: 1364-1372. 2006.

13. Hasselquist, D., and Nilsson J. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: transgenerational effects on offspring immunity. *Phil. T. Roy. Soc. B.*, 364:51-60. 2009.
14. Jackwood, D.J. and Sommer-Wagner S.E. Detection and characterization of infectious bursal disease viruses in broilers at processing. *Prev. Vet. Med.*, 97:45-50. 2010.
15. Kibenge, F. B. S., Dhillon A. S., and Russel R. G. Biochemistry and immunology of infection bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, 69: 1757-1775. 1988.
16. Kumar, K., Singh K. C. P., and Prasad C. B. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Trop. Anim. Health Prod.*, 32::357-360. 2000.
17. Leshchinsky, T.V., and Klasing K.C. Relationship between the level of dietary vitamin E and the immune response of broiler chickens. *Poult. Sci.*, 80:1590-1599. 2001.
18. 12. Lucio, B., and Hitchner S. B. Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. *Avian dis.*, 23(2): 466-478. 1979.
19. Mazariegos, L. A., Lukert P. D., and Brown J. Pathogenicity and immunosuppressive properties of Infectious bursal disease «intermediate strains». *Avian dis.*, 34: 203-208. 1990.
20. Naqı, S. A., Marquez B., and Sahin N. Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease immunization. *Avian dis.*, 27 (3):623-631. 1983.
21. National Research Council. Nutrient requirements of poultry, National Academy Press, Washington, DC. 1994.
22. Puthongsiriporn, U., Scheideler S. E., Sell J. L., and Beck M. M. Effect of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. *Poult. Sci.*, 80:1190-1200. 2001.
23. Rasool, M. H., and Hussain I. Preparation and evaluation of vero cell infectious bursal disease vaccine in Pakistan. *Vaccine*, 24:2810-2814. 2006.
24. Ruiz-Feria, C.A., and Abdukalykova S.T. Arginine and vitamin E improve the antibody responses to infectious bursal disease virus (IBDV) and sheep red blood cells in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 50(3):291-7. 2009.
25. Sharma, J. M., Kim I., Rautenschlein S., and Yeh H. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Com. Immunol.*, 24: 223-235. 2000.

26. Skeeles, J. K., Lukert P. D., Fletcher O. J., and Leonard J. D. Immunization studies with a cell-culture-adapted infectious bursal disease virus. *Avian dis.*, 23: 456-465. 1979.
27. Tengerdy, R. P. Vitamin E: Biochemistry and health implication. *Ann. NY Acad. Sci.*, 570:335-344. 1989.
28. Tengerdy, R. P., and Nockels C. F. Vitamin E or vitamin A protects chickens against *Escherichia coli* infection. *Poult. Sci.* 54:1292–1296. 1975.
29. Van den Berg, T. P. and Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian pathol.*, 20:409-421. 1991.
30. Vaziry, A., Venne D., Frenette D., Gingras S., and Silim A. Prediction of optimal vaccination timing for infectious bursal disease based on chick weight. *Avian dis.*, 51:918-923. 2007.
31. Wyeth, P. J., and Cullen G. A. Maternally derived antibody effect on susceptibility of chicks to infectious bursal disease. *Avian Pathol.*, 5: 253-260. 1976.
32. Yao, K., and Vakharia V. N. Induction of apoptosis in vitro by the 17 kDa non structural protein of Infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology.*, 285 : 50-58. 2001.
33. Yu, L., Liu W., Schnitzlein W M., Tripathy D. N., and Kwang J. Study of Protection by Recombinant Fowl Poxvirus Expressing C-Terminal Nucleocapsid Protein of Infectious Bronchitis Virus Against Challenge. *Avian Dis.*, 45:340-348. 2001.

4.7 ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Guy Beauchamp for statistical analysis, to Donald Tremblay for VP2 sequence analysis and to Marie-Claude Gendron for vitamin E analysis. We thank also Scott Hatchery for material support and Institut des Technologies Agricoles at La Pocatière, Quebec for housing and care given to the experimental birds. Finally, we would like to thank Canadian International Development Agency (CIDA) for supporting the main author with a scholarship.

4.8 FIGURE CAPTION

Fig. 1. Real disposition of pens and repartition of vaccination and dietary vitamin E in each pen

Fig. 2. Evolution of ELISA antibody titers to IBDV according to age and groups; normal vaccine dose for all birds (ND100%), high vaccine dose for 10% of the birds (HD10%) and high vaccine dose for all birds (HD100%)

Fig. 3. Correlation between anti-IBDV antibody titer measured by ELISA and seroneutralization

Fig. 4. Virus prevalence in the chickens according to age and groups; normal vaccine dose for all birds (ND100%), high vaccine dose for 10% of the birds (HD10%) and high vaccine dose for all birds (HD100%)

Fig. 5. Comparison between ELISA antibody titer and virus prevalence at 28 days of age

Fig. 6. VP2 nucleotide sequences of vaccine virus Clonevac D78, virus retrieved from bursae of groups vaccinated with high dose 100% (HD100%) at 20 days and from unvaccinated control groups at 28 days

Fig. 7. Bursa body weight (B/BW) indices for the evaluation of bursal atrophy according to groups; normal vaccine dose for all birds (ND100%), high vaccine dose for 10% of the birds (HD10%) and high vaccine dose for all birds (HD100%)

Fig. 8. Effect of vitamin E on ELISA antibody titers at 28 and 49 days of age. * indicates statistically difference ($P < 0.0001$)

Fig. 1

Pen 1 Normal vaccine dose, all birds vaccinated B	Pen 2 Control group, no vaccine A	Pen 3 High vaccine dose, 10% of birds vaccinated A	Pen 4 Control group, no vaccine B	Pen 5 High vaccine dose, all birds vaccinated B
Pen 10 Normal vaccine dose, all birds vaccinated A	Pen 9 Control group, no vaccine A	Pen 8 High vaccine dose, 10% of birds vaccinated B	Pen 7 Control group, no vaccine B	Pen 6 High vaccine dose, all birds vaccinated A

Normal vaccine dose was $10^{4.35}$ TCID₅₀/ml/bird, and high dose was $10^{5.35}$ TCID₅₀/ml/bird.

Group A received 50 to 100 IU/Kg of dietary vitamin E, and group B received 20 to 27 IU/Kg.

Fig. 2

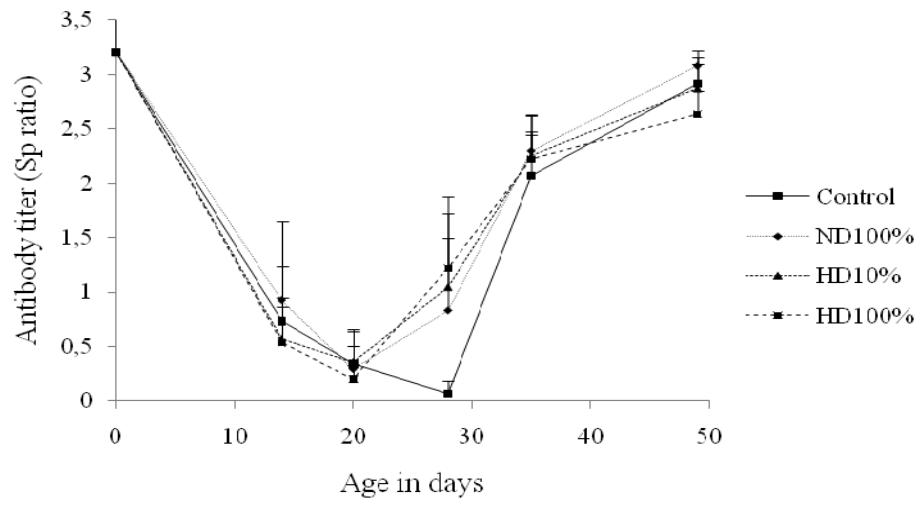


Fig. 3

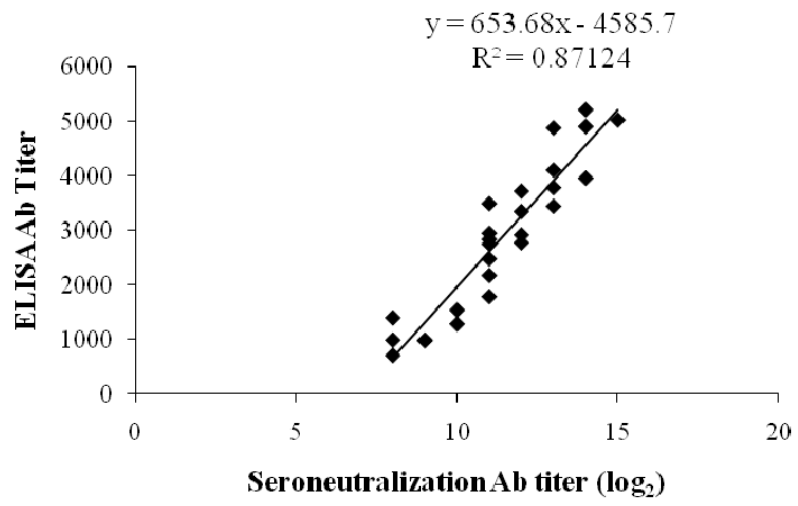


Fig. 4

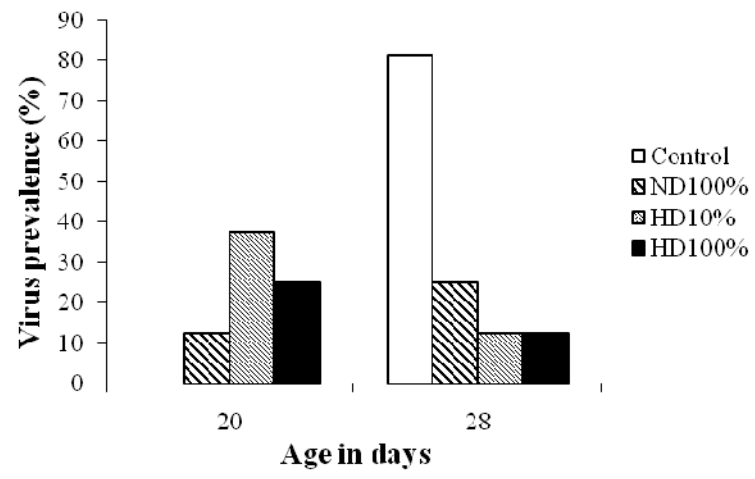


Fig. 5

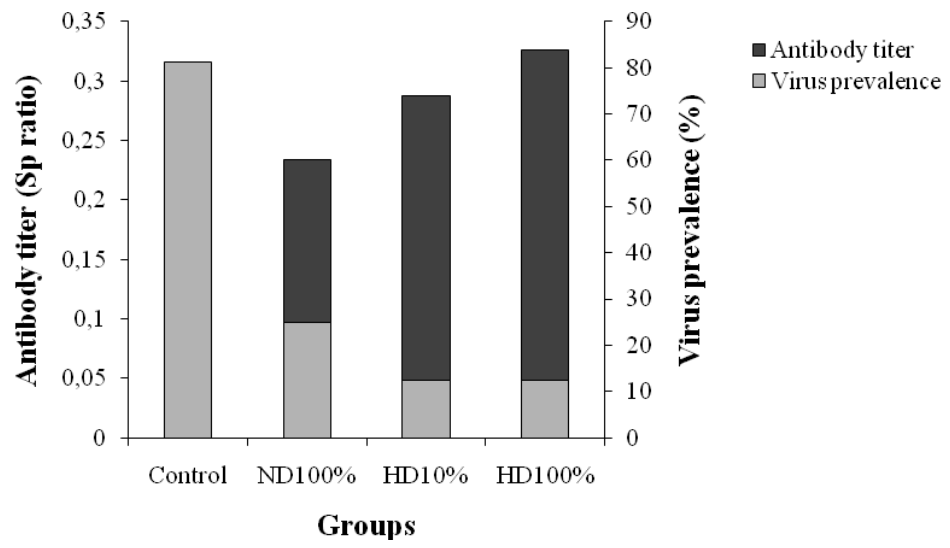


Fig. 6

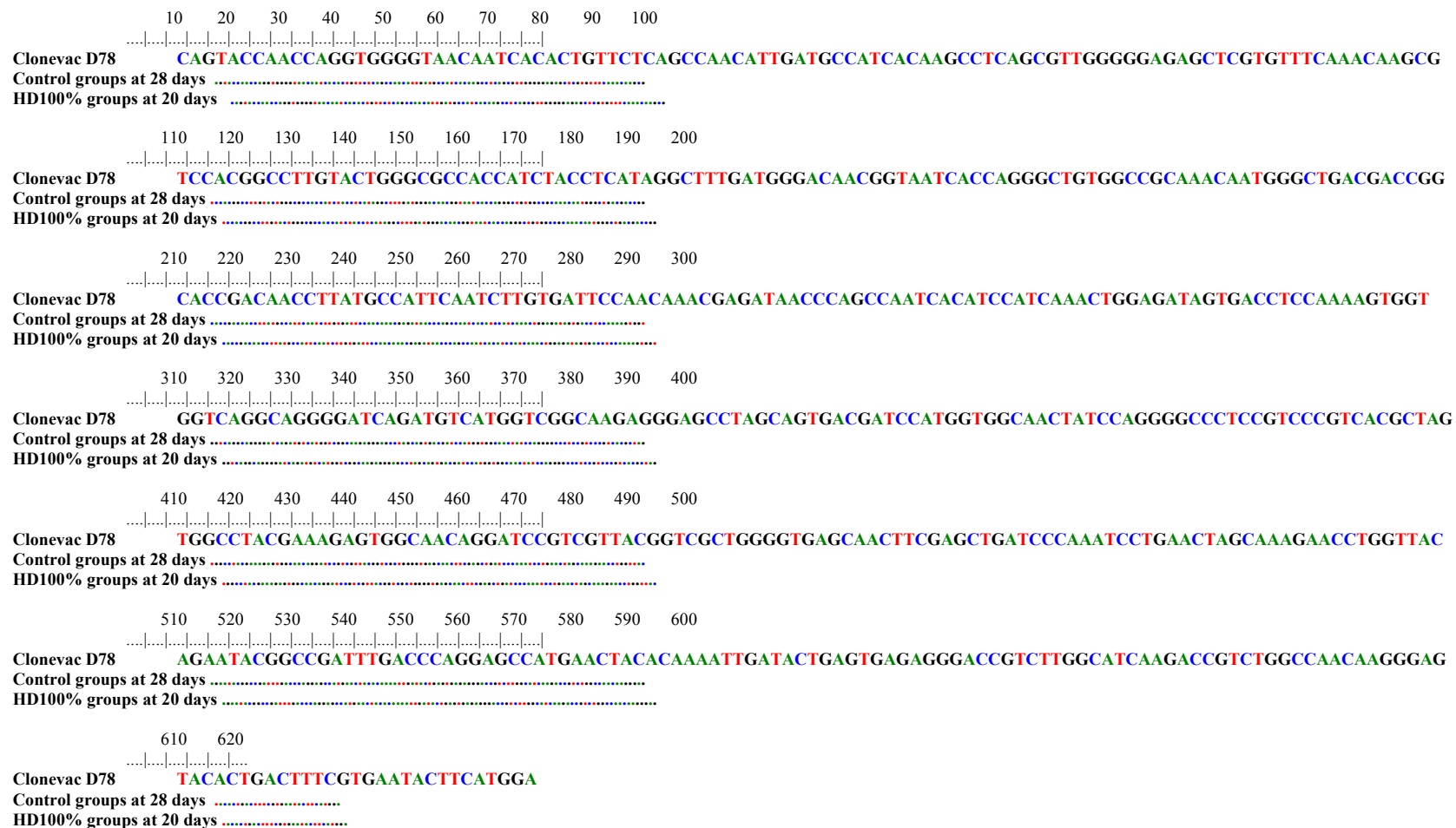


Fig.7

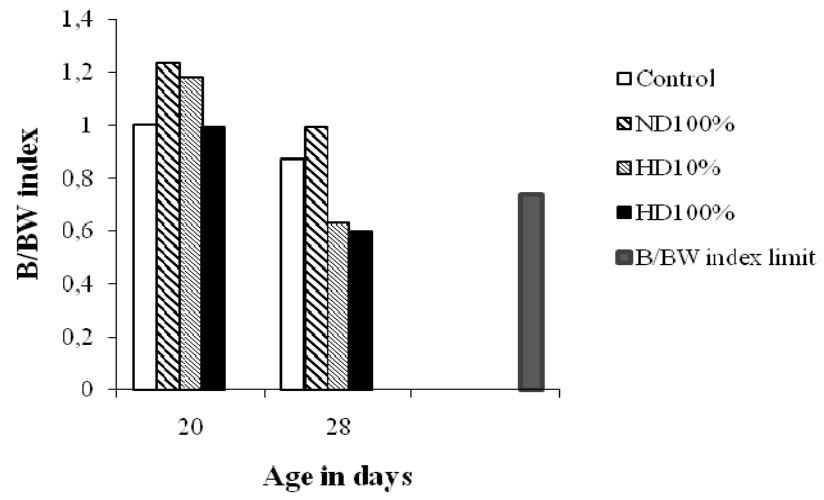
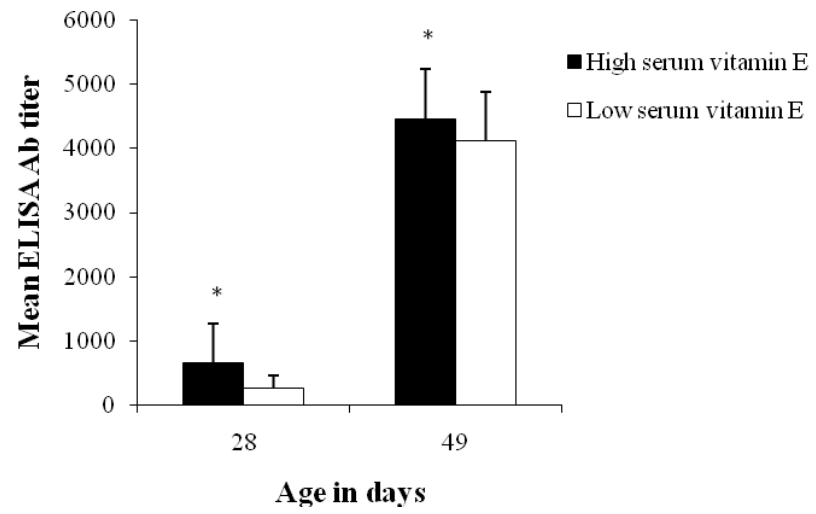


Fig. 8



5. Discussion générale

Au Québec, avec le besoin du marché, les poulets devraient être abattus entre 33 à 40 jours d'âge. Pour permettre cet abattage et en respectant la période de retrait du vaccin, il est nécessaire de vacciner les jeunes poulets avant 21 jours, une période pendant laquelle les anticorps maternels sont encore présents (Kumar et al., 2000). Dans ce cas, des moyens efficaces devront être proposés afin d'éviter l'échec vaccinal. Dans la présente étude, une forte dose de vaccin vivant ajoutée à une forte dose de vitamine E ont été utilisées afin de surmonter les anticorps maternels anti-IBDV. Comme il est connu qu'un vaccin vivant peut se répliquer et se transmettre d'un oiseau à l'autre, la possibilité d'une vaccination par contact a été évaluée par la même occasion.

Les oiseaux ont été vaccinés à 14 jours d'âge pendant que les anticorps maternels persistent encore et protègent les oiseaux contre toute infection bien qu'ils déclinent progressivement. A cet âge, il est encore fort possible que les anticorps maternels arrivent à neutraliser quelconque vaccin. Cette neutralisation dépend d'un côté du titre en anticorps et de l'autre côté de la concentration virale (Siegrist, 2003). Pour avoir un excès de virus sur les anticorps maternels, une forte dose de vaccin ($10^{5.35}$ TCID₅₀/ml/oiseau) a été utilisée. Le virus en excès a suffisamment saturé les anticorps maternels présents pour qu'une partie arrive à échapper à leur emprise et à induire une réponse immunitaire. Pour fortifier cette réponse immunitaire induite par la forte dose de vaccin, une forte dose de vitamine E a été utilisée. En effet dans cette étude, l'utilisation d'une dose élevée de vitamine E (50 à 100 UI/kg) a été faite car comme le NRC l'a indiqué, pour avoir un effet immunostimulateur, la vitamine E doit être utilisée à une dose beaucoup plus élevée que la dose nécessaire pour les besoins quotidiens de 10 UI/kg (NRC, 1994). Mais comme le NRC n'indique pas jusqu'à quelle dose la vitamine E peut être utilisée, cette étude a utilisé de la vitamine E jusqu'à 100 UI/kg. Cette dose a été utilisée car il a été rapporté qu'à 200 UI/kg, la vitamine E n'est pas efficace pour stimuler la réponse immunitaire (Leshchinsky et Klasing, 2001). Comme il est connu, cette vitamine a la propriété antioxydative, a un effet immunostimulateur (Leshchinsky et Klasing, 2001) qui permet de fortifier et d'améliorer la réponse immunitaire. Pour mettre en évidence l'influence de la forte dose tant au niveau du vaccin qu'au niveau de la vitamine E, d'autres doses plus faibles ont été utilisées dans l'étude. L'objectif principal était de déterminer la capacité du vaccin et de la vitamine E, utilisés à forte dose, à contourner les anticorps maternels. Les résultats ont indiqué

qu'à 20 jours, tous les groupes, même ceux du contrôle, présentaient encore un titre en anticorps. Cela veut dire que les anticorps maternels ont persisté jusqu'à 20 jours d'âge. Des résultats similaires ont été rapportés par Alam et al. (2002) qui ont trouvé que les anticorps maternels persistent jusqu'à 15 à 20 jours. Dans la présente étude, à 20 jours d'âge, l'attestation que le virus ait pu contourner les anticorps maternels ne peut pas être confirmée par ELISA. Effectivement, à cet âge la réponse immunitaire passive ne peut pas être distinguée de la réponse active. Par contre en regardant les résultats du ré-isolément viral effectué à 20 jours, la confirmation d'un contournement des anticorps maternels par le vaccin peut être apportée. En effet, bien que les anticorps maternels persistent, le virus est ré-isolé au niveau de la BF des oiseaux des groupes FD100%, FD10% et DN100%. Cela implique que les anticorps maternels n'ont pas pu entièrement neutraliser le vaccin (Rautenschlein et al. 2005). Une partie du virus vaccinal a pu échapper à l'emprise des anticorps maternels et a pu coloniser la BF. Concernant la vitamine E, les résultats ont indiqués que la dose de vitamine E n'influence en rien le contournement des anticorps maternels par le virus vaccinal. En effet aucune différence n'a été observée au niveau de la prévalence du virus entre le sous-groupe supplémenté en vitamine E à forte dose et celui supplémenté en vitamine E à faible dose.

À 28 jours d'âge, aucun titre en anticorps n'a été détecté au niveau du groupe contrôle. Cela signifie qu'à cet âge les anticorps maternels ont totalement décliné. Par contre, les oiseaux des groupes vaccinés présentaient un titre en anticorps. Les oiseaux ont répondu à la vaccination et leur séroconversion montre l'efficacité du vaccin en présence d'anticorps maternels (Mundt et al., 2003).

Dans la présente étude, une forte dose et une dose normale de vaccin ont été utilisées et l'influence de la dose de vaccin sur le contournement des anticorps maternels par le vaccin a été déterminée. À 28 jours, le titre en anticorps des oiseaux du groupe ND100% était sensiblement égal à celui du groupe FD10%. L'égalité entre la réponse humorale donnée par la vaccination des oiseaux de ces 2 groupes peut être expliquée par le fait que dans ces 2 groupes, la même concentration de vaccin a été utilisée. Dans le groupe ND100%, 100 oiseaux ont été vaccinés avec $10^{4,35}$ TCID₅₀/ml/oiseau de vaccin et dans le groupe FD10%, 10 oiseaux ont été vaccinés avec $10^{5,35}$ TCID₅₀/ml/oiseau. Économiquement, vacciner tous les oiseaux à dose normale revient à vacciner les 10% des oiseaux à forte dose. Ce qui est intéressant, c'est au

niveau du temps car vacciner juste les 10% permet de gagner plus de temps. En effet, la vaccination des 90% restants du groupe FD10% va être effectuée naturellement par la transmission orale du virus vaccinal via les fientes des 10% vaccinés. Les oiseaux du groupe FD100% ont un titre nettement élevé comparé à ceux des 2 autres groupes. Il semble alors que la réponse immunitaire dépend de la dose et de la concentration du virus utilisé dans le vaccin (Long Li et al., 2006). Par conséquent, le contournement des anticorps maternels est plus efficace et plus rapide avec un vaccin à forte dose (Van den Berg et Meulemans, 1991). Cela dit, une vaccination avant 14 jours pourrait être envisagée avec cette forte dose. Mais il faut quand même tenir compte du statut immunitaire des oiseaux et des reproductrices d'où ils sont issus avant de pouvoir vacciner plus tôt que 14 jours. Les résultats démontrent aussi qu'après 28 jours, quel que soit la dose de vaccin utilisée, tous les oiseaux présentaient un titre sensiblement égal. Ainsi l'effet de dose agit uniquement au niveau du contournement des anticorps maternels et il n'a aucun effet sur la rapidité de la séroconversion des oiseaux.

L'efficacité du vaccin est évaluée d'un côté par la séroconversion des oiseaux vaccinés et de l'autre par la présence du virus vaccinal et l'éventuelle atrophie qu'il pourra provoquer sur la BF. À 20 jours d'âge, les résultats ont démontré qu'aucun virus n'a été détecté au niveau du groupe contrôle et les oiseaux des groupes vaccinés présentaient différentes prévalences virales. Dans le groupe FD10%; 37,5% des oiseaux présentaient le virus au niveau de leur BF contre 25% pour le groupe FD100%. Cela pourrait être expliqué par le fait qu'à 20 jours d'âge, les oiseaux du groupe FD100% ont déjà passé la phase virémique; qui s'est passée 2 à 3 jours après la vaccination (Maclachlan et Dubovi., 2001) vers 16 à 17 jours d'âge; une phase pendant laquelle le virus est à sa concentration maximale dans la BF. Par contre à cet âge les oiseaux du groupe FD10% sont en pleine phase virémique car comme ces oiseaux constituent les 90% des oiseaux non vaccinés du groupe FD10%, ils vont être vaccinés par contact et leur infection n'a commencé qu'après l'excrétion de virus des 10% vaccinés. Cette excrétion commence 2 jours après la vaccination, donc l'infection des oiseaux non vaccinés du groupe FD10% commençait vers 16 jours d'âges et la phase virémique se situe à 2 à 3 jours après l'infection vers 18 à 19 jours d'âge. À 28 jours d'âge, les résultats montrent que la prévalence du virus au niveau des oiseaux des groupes FD100% et FD10% diminue. Seulement 12,5% des oiseaux de chaque groupe présentaient le virus au niveau de leur bourse. Tandis que celle des groupes contrôle et ND100% augmente. Quatre-vingt et un

pourcent (81%) des oiseaux du groupe contrôle et 25% du groupe ND100% présentaient l'IBDV au niveau de leur BF. À 28 jours d'âge aussi, les oiseaux des groupes FD100% et FD10% présentaient un titre en anticorps élevé que celui des autres groupes. La prévalence au niveau de ces groupes FD100% et FD10% diminue car la réponse immunitaire active des oiseaux de ces groupes a commencé à éliminer le virus.

Un des objectifs de cette étude était d'évaluer la possibilité d'une vaccination par contact. Les mêmes paramètres qui sont utilisés dans la vaccination orale, tels que la séroconversion et la présence du virus au niveau de la BF, sont déterminés au niveau des oiseaux non vaccinés afin d'évaluer la transmission horizontale du virus. La vaccination par contact direct a été évaluée avec les oiseaux non vaccinés du groupe FD10% et dans ce groupe le virus était présent à 20 jours d'âge et avec une séroconversion des oiseaux à 28 jours d'âge. Quant à la vaccination par contact indirect, elle a été évaluée avec les oiseaux du groupe contrôle. Dans ce groupe l'infection et la séroconversion étaient effectuées plus tard. Le virus de l'IBDV n'était détecté qu'à 28 jours d'âge et les oiseaux n'ont séroconvertis qu'à 35 jours d'âge.

Bien que ce groupe contrôle ait pris du retard dans l'infection et la séroconversion, ce qui est intéressant, c'est de voir qu'à 28 jours d'âge aucun titre en anticorps n'a encore été décelé au niveau des oiseaux du groupe contrôle et 7 jours après ces oiseaux ont séroconvertis en égalisant le titre en anticorps des oiseaux des autres groupes. Comme aucune prise sanguine journalière n'a été faite dans cette étude, il est impossible de déterminer le moment exact de la séroconversion des oiseaux. Quoiqu'il en soit, la séroconversion des oiseaux en une semaine peut être qualifiée de rapide par rapport à celle des autres investigateurs. En effet avec le même vaccin, Van den Berg et Meulemans (1991) ont trouvé que les oiseaux ont séroconvertis 10 jours après la vaccination. Par contre Block et al., (2007) ont trouvé qu'en moyenne les oiseaux ont séroconvertis 14 jours après une vaccination avec un vaccin intermédiaire.

La séroconversion des oiseaux non vaccinés démontre la possibilité d'une vaccination par contact. Que le virus vaccinal, excrété par les oiseaux vaccinés, soit transmis directement ou indirectement aux oiseaux non vaccinés, la séroconversion s'est fait rapidement après l'infection. Cette rapide séroconversion des oiseaux non vaccinés va réduire l'éventuel risque d'infection par une souche sauvage de IBDV. Par rapport aux oiseaux du groupe contrôle, l'infection des 90% d'oiseaux non vaccinés du groupe

FD10% est plus précoce (vers 16 jours d'âges) cela s'explique par le fait que ces oiseaux non vaccinés du groupe FD10% étaient en contact direct avec les fientes des 10% vaccinés tandis que ceux des contrôles étaient séparés par une cloison et n'étaient pas en contact avec les fientes. Bien que rare soient les études effectuées sur la transmission aérienne de l'IBDV, cette étude veut émettre l'hypothèse d'une possible transmission aérienne du virus. Ainsi le virus vaccinal qui a infecté les oiseaux du groupe contrôle aurait emprunté une voie aérienne, une voie autre que la voie orale habituelle.

La présence du virus chez les oiseaux non vaccinés a démontré que le virus vaccinal est capable de se répliquer et de se transmettre d'un oiseau à l'autre. Comme l'IBDV est un virus à ARN bisegmenté, il est sujet à diverses mutations qui conduisent soit à l'atténuation du virus lors de ses passages sur cultures cellulaires soit à sa réversion à la virulence lors des passages d'un oiseau à l'autre (Muskett et al., 1985 ; Yamaguchi et al., 2000). Cette transmission horizontale (transmission du virus vaccinal d'un oiseau à un autre) emmène donc à poser des questions sur un possible retour à la virulence de la souche vaccinale. Ce retour à la virulence du virus vaccinal peut être déterminé soit macroscopiquement par l'évaluation de l'atrophie de la BF soit microscopiquement par l'examen histologique de la BF ou encore par séquençage de la région hypervariable de VP2. Pour évaluer l'atrophie de la bourse, le ratio entre le poids de la bourse et le poids de l'oiseau a été calculé. Les résultats ont démontrés qu'à 20 jours aucune atrophie n'a été détectée dans tous les groupes et à 28 jours, seuls les oiseaux des groupes FD100% et FD10% ont présenté une atrophie. À 20 jours aucune atrophie n'a été détectée au niveau de la BF des oiseaux du groupe contrôle car le virus n'y était pas encore. Dans les groupes FD100% et FD10%, la BF était probablement encore en hypertrophie. Dans le groupe ND100%, vu la prévalence des oiseaux de ce groupe, la concentration virale utilisée n'était pas assez pour produire une atrophie. Giambone et Closser (1989) ont trouvé qu'aucune atrophie n'a été détectée jusqu'à 21 jours après vaccination avec le même vaccin. A 28 jours, l'atrophie n'a pas encore été détectée au niveau des groupes contrôles car probablement la BF de ces oiseaux était encore en hypertrophie. L'atrophie de la BF des oiseaux des groupes FD100% et FD10% est peut-être l'effet de concentration de virus utilisé dans le vaccin. Mais même si l'atrophie est présente au niveau de la BF des oiseaux de ces groupes, rien ne peut certifier qu'il ait un retour à la virulence. Comme aucun examen histologique n'a été effectué dans cette étude, aucun

score lésionnel ne peut être donné et par conséquent le degré de l'atrophie ne peut pas être évalué. Mais quoi qu'il en soit, la présence de l'atrophie ne peut pas être attribuée à un retour à la virulence. En effet, l'atrophie à elle seule ne peut pas être considérée comme un paramètre qui définit le retour à la virulence d'un vaccin car presque tous les vaccins vivants occasionnent des dommages au niveau de la BF et entraînent une atrophie ne serait-ce que modérée (Mazariegos et al., 1990). Mais le moyen le plus sûr pour déterminer cette réversion est le séquençage génomique de la région hypervariable de VP2 du virus. D'un côté ce séquençage aide à confirmer la parenté de la souche isolée avec la souche vaccinale et de l'autre côté à déterminer les mutations qui se présentent au niveau du nucléotide. Une mutation d'acide aminé résiduel Histidine en Glutamine à la position 253 du nucléotide est en faveur de l'accroissement de la virulence du virus après son passage d'oiseaux à oiseaux (Yamaguchi et al., 2000). Dans la présente étude, la comparaison entre la séquence de la région hypervariable de VP2 du virus vaccinal et celles des virus présents au niveau de la bourse des oiseaux du groupe FD100% à 20 jours et du groupe contrôle à 28 jours a démontré une parfaite homologie entre les 3 séquences. Bien que le virus vaccinal ait subi des répliquations et qu'il soit transmis d'oiseaux vaccinés aux non vaccinés, aucune mutation n'a eut lieu au niveau de la séquence. La menace par rapport à la réversion à la virulence par le passage d'oiseau à oiseau pourrait donc être éliminée. Grâce à cette homologie des séquences, l'atrophie de la BF des oiseaux non vaccinés des groupes FD10% à 28 jours ne peut pas être attribuée au retour à la virulence du virus. L'assurance sur l'absence d'un possible retour à la virulence pourrait être confortée par le fait que le vaccin utilisé est fabriqué avec des virus clones obtenus par purification de plaques.

Le dernier objectif de cette étude était de déterminer si la vitamine E à forte dose stimule la réponse humorale. Dans cette étude, 2 doses (20 à 27 UI/kg et 50 à 100UI/kg) de vitamine E ont été utilisées dans la ration alimentaire des oiseaux. L'assimilation de ces doses alimentaires de vitamine E a été évaluée par dosage de la concentration sérique de la vitamine E. Les résultats de ces dosages démontrent une bonne assimilation de la vitamine E par les oiseaux. Les concentrations sériques du 28 jours d'âges ont été par la suite comparées avec celles du 49 jours. Les résultats ont démontré que la concentration sérique en vitamine E du 49 jours ($991,72 \pm 237,73 \mu\text{g/dl}$) est nettement plus élevée que celle du 28 jours ($900,15 \pm 317,76 \mu\text{g/dl}$) car il y a sûrement un effet cumulatif de cette vitamine (Jensen et al., 1998).

L'effet immunostimulateur de la vitamine E a été par la suite évalué en comparant le titre en anticorps des oiseaux supplémentés avec une forte dose de vitamine E avec celui des oiseaux supplémentés avec une faible dose de vitamine E. Les résultats ont démontré que les oiseaux supplémentés avec de la vitamine E présentaient un titre en anticorps nettement plus élevé. Cela démontre que la vitamine E stimule la réponse immunitaire humorale. Mais comme dans cette étude la seule évaluation de l'effet immuno-stimulateur de la vitamine E n'a été faite que par comparaison du titre en anticorps et que ni une étude sur la prolifération lymphocytaire ni sur l'effet anti-inflammatoire de la vitamine E a été faite, aucun argument sur la fonction interne et cellulaire de la vitamine E ne peut être avancé. Néanmoins, en se référant aux investigations des autres auteurs sur les rôles de la vitamine E, des hypothèses pourraient être avancées. Comme la vaccination entraînerait une réaction inflammatoire, il y aurait une production de prostaglandine E2. Cette dernière va avoir un effet inhibiteur sur la production de l'interleukine 2 et indirectement sur la prolifération lymphocytaire (Walker et al., 1983). Mais comme la vitamine E a un effet inhibiteur de la prostaglandine (Yano et al., 1997), elle va indirectement stimuler la prolifération lymphocytaire. Comme la vaccination induirait aussi un grand stress aux poulets, il y aurait une sécrétion des modulateurs de stress comme les corticostéroïdes associée à une augmentation de la prostaglandine (Tengerdy, 1989). Comme précédemment, la vitamine E va inhiber l'effet inhibiteur de la prostaglandine sur la prolifération des lymphocytes et va permettre la stimulation de la réponse immunitaire humorale.

6. Conclusion et perspectives

Il a été démontré que la dose de vaccin, le mode de vaccination ainsi que la supplémentation en vitamine E constituent les facteurs qui peuvent influencer une réponse immunitaire contre l'IBD. Chaque facteur agit de manière différente mais au final, la combinaison de chaque facteur contribue à une réponse immunitaire plus efficace. La dose de vaccin est le facteur qui contribue à l'efficacité de la vaccination par contournement des anticorps maternels. La vitamine E en soi n'influence en aucun cas le contournement des anticorps maternels par le vaccin. Néanmoins, elle agit sur l'amplitude de la réponse en anticorps lors de la séroconversion des oiseaux. Vacciner avec un vaccin à forte dose combiné à une supplémentation à forte dose de vitamine E donne une réponse immunitaire plus élevée que de vacciner avec un vaccin à forte dose combiné à une faible supplémentation en vitamine E. Quant au mode de vaccination, qu'il soit par contact direct ou indirect, il donne une même réponse immunitaire après séroconversion des oiseaux. En comparant le titre en anticorps des oiseaux vaccinés oralement à ceux qui sont vaccinés par contact, aucune différence ne peut être détectée à 35 jours d'âge. Au final vacciner oralement ou vacciner par contact revient au même sur le plan immunitaire. La différence réside essentiellement sur le plan pratique. La vaccination par contact serait moins encombrante. Ainsi en pratique, il serait préférable de faire une vaccination partielle avec une forte dose de vaccin en combinaison avec une supplémentation à la vitamine E à forte dose.

Cette étude a donc permis de démontrer qu'une forte dose de vaccin permet de surmonter l'interférence des anticorps maternels sur le vaccin lorsque la vaccination se fait avant la déclinaison des anticorps maternels. Elle a permis de confirmer la possibilité d'une vaccination par contact dénuée d'une réversion à la virulence avec une transmission du virus vaccinal par une voie autre qu'orale. Mais bien qu'il existe une affirmation par séquençage de l'absence du retour à la virulence et vu qu'il y a eu une atrophie, un examen histologique des BF aurait dû être fait pour vraiment s'assurer que cette atrophie n'occasionne aucune lésion sur la BF. L'évaluation de l'atrophie de la bourse aussi aurait du être effectuée après 28 jours d'âge pour déterminer si les oiseaux des groupes contrôle et DN100% ont présenté une atrophie au niveau de leur BF. La connaissance de l'évaluation de l'atrophie surtout au niveau du groupe DN100% aurait permis de savoir si la dose de vaccin utilisée influencerait la présence ou l'absence

d'une atrophie. Cette étude aussi a démontré la capacité de la vitamine E à forte dose à stimuler la réponse immunitaire humorale. Mais comme cet effet immuno-stimulateur n'a été évalué que par détermination du titre en anticorps par ELISA, une étude approfondie sur le mécanisme de la stimulation de la réponse immunitaire humorale par la vitamine E à forte dose lors de la vaccination des poulets contre la maladie de Gumboro serait intéressante. Une reproduction dans le champ de l'expérience conduite dans cette étude devrait aussi être effectuée car les conditions réelles d'élevage sont bien différentes des conditions expérimentales. Ceci permettrait de voir la faisabilité de cette étude sur les terrains.

7. Références

- Abdel-Moneim A., S., Abdel-Gawad M. M. A., 2006. Genetic variation in maternal transfer and immune responsiveness to infectious bursal disease virus. *Vet. Microbiol.*, 114:16-24
- Al-Natour M. Q., Ward L. A., Saïf Y. M., Stewart-Brown B., Keck D., 2004. Effect of different level of maternally derive antibodies on protection against Infectious bursal disease virus. *Avian dis.*, 48:177-204
- Alam J., Rahman M.M., Sil B. K., 2002. Effect of maternally derived antibody on vaccination against IBD (Gumboro) with live vaccine in broiler. *Int. J. Poult. Sci.*, 1(4): 98-101
- Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radicals). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7915-7922
- Balamurugan V., Kataria J.M., 2006. Economically Important Non-oncogenic Immunosuppressive Viral Diseases of Chicken—Current Status. *Vet. Res. Commun.*, 30 (2): 541–566
- Beharkaa A. A., Dayong W., Hana S. N., Simin N. M., 1997. Macrophage prostaglandin production contributes to the age-associated decrease in T cell function which is reversed by the dietary antioxidant vitamin E. *Mech. Ageing Dev.*, 93: 59–77
- Benton W. J., Cover M. S., Rosenberger J. K., 1967. Studies On The Transmission Of The Infectious Bursal Agent (Iba) Of Chickens. *Avian. Dis.*, 11 (3): 430-438
- Benton W. J., Cover M. S., Rosenberger J. K., Lake R. S., 1967. Physicochemical Properties Of The Infectious Bursal Agent (Iba). *Avian dis.*, 11(3): 438-445
- Bickford A. A., Kuney D. R., Zander D. V., McMartin D. A., 1985. Histologic Characterization of the Involuting Bursa of Fabricius in Single-Comb White Leghorn Chickens. *Avian Dis.*, 29 (3): 778-797
- Block H., Meyer-Block K., Rebeski D. E., Scharr H., de Wit S., Rohn K., Rautenschlein S., 2007. A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathol.*, 36(5): 401-409
- Boot H. J., ter Huurne A. H. M., Hoekman J. W., et al., 2002. Exchange of the C-Terminal Part of VP3 from Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Results in an Attenuated Virus with a Unique Antigenic Structure. *J. Virol.* 76(20): 10346-10355
- Brandt M., Yao K., Liu M., Heckert R. A., Vakharia V. N., 2001. Molecular Determinants of Virulence, Cell Tropism, and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.*, 75 (24): 11974–11982

- Brandt M., Yao K., Liu M., Heckert R. A., Vakharia V. N., 2001. Molecular Determinants of Virulence, Cell Tropism, and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.*, 75 (24): 11974–11982
- Brigelius-Flohé R., Traber M. G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J.*, 13 (1): 145-155
- Bruenn J. A., 1991. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA Polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 19(2): 217- 226
- Burkhardt E., Muller H., 1987. Susceptibility of Chicken Blood Lymphoblasts and Monocytes to Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). Brief Report. *Arch. Virol.*, 94:297-303
- Cao Y. C., Yeung W. S., Law M., Bi. Y. Z., Leung C., Lim B. L., 1998. Molecular Characterization of Seven Chinese Isolates of Infectious Bursal Disease Virus: Classical, Very Virulent, and Variant Strains. *Avian Dis.*, 42:340-351
- Cardoso T. C., Sousa R. L. M., Alessi A. C., Montassier H. J., Pinto A. A., 1998. A double antibody sandwich ELISA for rapid diagnosis of virus infection and to measure the humoral response against infectious bursal disease on clinical material. *Avian Pathol.*, 27: 450-454
- Carstens E. B., Ball L. A., 2009. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2008). *Arch Virol.*, 154:1181–1188
- Cho B. R., 1979. Growth of Infectious Bursal Disease Virus with Plaque Formation in Chick Embryo Fibroblast Cell Culture. *Avian Dis.*, 23 (1): 209-218
- Christensen N.H., 1985. The cost to the meat chicken industry of the introduction of infectious bursal disease to New Zealand. *N.Z. vet.J.*, 33: 191-193
- Ciriaco E., Pinera P. P., Diaz-Esnal B., Laura R., 2003. Age-Related Changes in the Avian Primary Lymphoid Organs (Thymus and Bursa of Fabricius). *Microsc. Res. Techniq.*, 62:482-487
- Corwin L. M., Shloss J., 1980. Influence of Vitamin E on the Mitogenic Response of Murine Lymphoid Cells. *J. Nutr.*, 110:916-923
- Dayong W, Casilda M., Beharka A. A., Han S. N., Paulson K. E., Hwang D., Simin N. M., 1998. Age-associated increase in PGE2 synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J. Physiol. Cell Physiol.*, 275:661-668
- de Wit, J.J., 2001. Gumboro disease: Estimation of optimal time of vaccination by Deventer formula. In: Proceedings of the 3^o meeting of working group of COST Action 839 on passive protection and vaccination (current and future possibilities) in the presence of maternally derived antibody; Pulawy, Poland.

De Winne A., Dirinck P., 1996. Studies on vitamin E and meat quality. 2. Effect of feeding high vitamin levels on chicken meat quality. *J. Agric. Food Chem.*, 44:1691-1696

Dobos P., Hill B. J., Hallett R., Kells D. T. C., H., Teninges D., 1979. Biophysical and Biochemical Characterization of Five Animal Viruses with Bisegmented Double-Stranded RNA Genomes. *J. Virol.*, 32 (2): 593-605

Domanska K., Mato T., Rivallan G., Smietanka K., Minta Z., de Boisseson C., Toquin D., Lomniczi B., Palya V., Eterradossi N., 2004. Antigenic and genetic diversity of early European isolates of Infectious bursal disease virus prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of Infectious bursal disease virus revisited? *Arch. Virol.*, 149: 465-480

Erf G. F., Bottje W. G., Bersi T. K., Headrick M. D., Fritts C. A., 1998. Effects of Dietary Vitamin E on the Immune System in Broilers: Altered Proportions of CD4 T Cells in the Thymus and Spleen. *Poultry Sci.*, 77:529-537

Eterradossi N., Arnauld C., Tekaiia F., Toquin D., Le Coq H., Rivallan G., Guittet M., Domenech J., van den Berg T.P., Skinner M.A., 1999. Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. *Avian Pathol.*, 28, 36-46

Eterradossi N., Picault J. P., Drouin M., Uittet I., L'hospitalier R., Bennejean G., 1992. Pathogenicity and Preliminary Antigenic Characterization of Six Infectious Bursal Disease Virus Strains Isolated in France from Acute Outbreaks. *J. Vet. Med.*, 39: 683-691

Fadly A. M., Nazerian K., 1983. Pathogenesis of Infectious Bursal Disease in Chickens Infected with Virus at Various Ages. *Avian dis.*, 27 (3): 714-723

Farooq M., Durrani F. R., Imran N., Durrani Z., Chand N., 2003. Prevalence and Economic Losses Due to Infectious Bursal Disease in Broilers in Mirpur and Kotli Districts of Kashmir. *Int J. Poultry Sci.*, 2 (4): 267-270

Friedman A., Bartov I., Sklan D., 1998. Humoral Immune Response Impairment Following Excess Vitamin E Nutrition in the Chick and Turkey. *Poultry Sci.*, 77:956-962

Fussel L. W., 1998. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive disease. *Poult. Sci.*, 77:1193-1196

Gilchrist P., 2005. Involvement of free-flying wild birds in the spread of the viruses of avian influenza, Newcastle disease and infectious bursal disease from Poultry products to commercial Poultry. *World Poultry Sci. J.*, 61:198-214

Grindstaff J. L., Brodie III E. D., Ketterson E. D., 2003. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270: 2309-2319

- Grindstaff J. L., Hasselquist D., Nilsson J., Sandell M., Smith H. G., Stjernman M., 2006. Transgenerational priming of immunity: maternal exposure to a bacterial antigen enhances offspring humoral immunity. *Proc. R. Soc. B.*, 273: 2551-2557
- Grindstaff J. L., 2008. Maternal antibodies reduce costs of an immune response during development. *J. Ex. Biol.*, 211: 654-660
- Grindstaff. J. L., 2010. Initial levels of maternally derived antibodies predict persistence time in offspring circulation. *J. Ornithol.*, 151:423-428
- Haddad E. E., Whitfill C. E., Avakian A. P., Ricks C. A., Andrews P. D., Thoma J. A., Wakenell P. S., 1997. Efficacy of a Novel Infectious Bursal Disease Virus Immune Complex Vaccine in Broiler Chickens. *Avian dis.*, 41:882-889
- Hamal K. R., Burgess S. C., Pevzner I. Y., Erf G. F., 2006. Maternal Antibody Transfer from Dams to Their Egg Yolks, Egg Whites, and Chicks in Meat Lines of Chickens. *Poultry Sci.*, 85:1364-1372
- Harkness J. W., Alexander D. J., Pattison M., Scott A. C., 1975. Infectious Bursal Disease Agent: Morphology by Negative Strain Electron Microscopy. *Arch. Virol.* 48: 63-73
- Hassan M. K., 2004. Very virulent Infectious Bursal Disease Virus in Egypt: epidemiology, isolation and immunogenicity of classic vaccine. *Vet. Res. Commun.*, 28: 347-356
- Hasselquist D., Nilsson J-A., 2009. Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 364 : 51-60
- Heller E.D., Leitner G., Drabkin N., Melamed D., 1990. Passive Immunisation Of Chicks Against Escherichia Coli. *Avian Pathol.*, 19: 345-354
- Higgins J. K., Puschner B., Kass P. H., Pusterla N., 2008. Assessment of vitamin E concentrations in serum and cerebrospinal fluid of horses following oral administration of vitamin E. *AJVR*, 69 (6): 785-790
- Hirai K., Calnek B. W., 1979. *In vitro* Replication of Infectious Bursal Disease Virus in established Lymphoid Cell Lines and Chicken B Lymphocytes. *Infect. Immun.*, 25 (3): 964-970
- Hirai K., Kunihiro K., Shimakura S., 1979. Characterization of Immunosuppression in Chickens by Infectious Bursal Disease Virus. *Avian dis.*, 24 (4): 950-965
- Homer B. L., Butcher G. D., Miles R. D., Rossi A. F., 1992. Subclinical infectious bursal disease in an integrated broiler production operation. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 406-411
- Hoque M. M., Omar A., Chong L. K., Hair-Bejo M., Aini I., 2001. Pathogenicity of SspI-positive Infectious Bursal Disease Virus and molecular characterization of VP2 hypervariable region. *Avian pathol.*, 30 : 369-380

- Howie R. and Thorsen J., 1981. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Infectious Bursal Disease Virus. *Can. J. Comp. Med.* 45: 51-55
- Huang Z., Elankumaran S., Panda A., Samal S. K., 2003. Recombinant Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector. *Poultry Sci.*, 82: 899-906
- Huang Z., Elankumaran S., Yunus A. S. et al., 2004. A Recombinant Newcastle Disease Virus (NDV) Expressing VP2 Protein of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Protects against NDV and IBDV. *J. Virol.*, 78(18): 10054-10063
- Hudson P. J., McKern N. M., Power B. E., Azad A. A., 1986. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res.*, 14 (12): 5001-5012
- Ikuta N., El-Attrache J., Villegas P., Garcia M., Lunge V. R., Fonseca A. S. K., Oliveira C., Marques E. K., 2001. Molecular Characterization of Brazilian Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian dis.*, 45:297-306
- Ismail N. M., Saif Y. M., Moorhead P. D., 1988. Lack of Pathogenicity of Five Serotype 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens. *Avian dis.*, 32:757-759
- Jackwood D. H., Saif Y. M., 1987. Antigenic Diversity of Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian dis.*, 31:766-770
- Jackwood D. J., Jackwood R. J., 1997. Molecular Identification of Infectious Bursal Disease Virus Strains. *Avian dis.*, 41:97-104
- Jackwood D. J., Wagner S. S., 2007. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology* 365: 369-375
- Jackwood D.J., Saif Y.M., Hughes J.H., 1982. Characteristics and Serologic Studies of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus in Turkeys. *Avian dis.*, 26(4): 871-882
- Jensen C., Lauridsen C., Bertelsen G., 1998. Dietary vitamin E: Quality and storage stability of pork and poultry. *Trends Food Sci. Tech.*, 9:62-72
- Jeon W., Lee E., S. Joh, J. Kwon, C. Yang, Y. Yoon, K. Cho. 2008. Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: Epidemiological implications. *Virus Res.*, 137: 153-156
- Jeurissen S. H. M., Janse E. M., Lehrbach P. R., Haddad E. E., Avakian T. A., Whitfill C. E., 1998. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immunology*, 95: 494-500
- Jungmann A., Nieper H., Muller H., 2001. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J. Gen. Virol.*, 82:1107-1115

- Kasanga C. J., Yamaguchi T., Wambura P. N., Munang'andu H. M., Ohya K., Fukushi H., 2008. Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) genome in free-living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. *Virus Genes*, 36:521-529
- Kaufner I., Weiss E., 1980. Significance of Bursa of Fabricius as Target Organ in Infectious Bursal Disease of Chickens. *Infect. Immun.*, 27 (2): 364-367
- Ke-Yin T., Randall M., Kathleen S. M., 1995. Protective effect of vitamin E on lymphocyte growth capacity during incubation *In vitro*. *Mech. Ageing Dev.*, 82: 129-148
- Khatri M., Palmquist J. M., Cha R. M., Sharma J. M., 2005. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Res.*, 113: 44-50
- Kibenge F. S. B., Dhillon A. S., Russell R. G., 1988. Biochemistry and Immunology of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Gen. Virol.*, 69: 1757-1775
- Kibenge K. S. B., Qian B., Cleghorn J. R., Martin C. K., 1997. Infectious Bursal Disease Virus processing does not involve cellular protease. *Arch. Virol.*, 142: 2401-2419
- Kim I., You S. K., Kim H., Yeh H., Sharma J. M., 2000. Characteristics of Bursal T Lymphocytes Induced by Infectious Bursal Disease Virus. *J. Virol.*, 74 (19): 8884-8892
- Klasing K. C., 1998. Nutritional Modulation of Resistance to Infectious Diseases. *Poultry Sci.* 77:1119-1125
- Kowalczyk K., Daiss J., Halpern J., Roth T. F., 1985. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* 54: 755
- Kumar K., Singh K. C. P., Prasad C. B., 2000. Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Trop. Anim. Health Prod.*, 32:357-360
- Lasher H. N., Davis V. S., 1997. History of Infectious Bursal Disease in the U.S.A.-The First Two Decades. *Avian dis.*, 41:11-19
- Lawrence E. C., Arnaud-Battandier F., Grayson J., Koski I. R., Dooley N. J., Muchmore A. V., Blaese R. M., 1981. Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spleen, lungs and intestine. *Clin. Exp. Immunol.*, 43: 450-457
- Leonhardt M., Gebert S., Wenk C., 1997. Vitamin E content of different animal products: influence of animal nutrition. *Z Ernährungswiss* 36:23-27
- Leshchinsky T. V., Klasing K. C., 2001. Relationship Between the Level of Dietary Vitamin E and the Immune Response of Broiler Chickens. *Poultry Sci.*, 80:1590-1599

- Lucio B., Hitchner S. B., 1979. Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. *Avian dis.*, 23(2): 466-478
- Lukert P. D., Davis R. B., 1974. Infectious Bursal Disease Virus: Growth and Characterization in Cell Cultures. *Avian dis.*, 18 (2): 243-250
- Lütticken H. D., Cornelissen D. R. W., 1985. Infectious bursal disease vaccine. United State Patent, patient number: 4,530,831
- Machlin L. J.; Bendich A., 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1: 441-445
- Majo N., El-Attrache J., Banda A., Villegas P., Ramis A., Pages A., Ikuta N., 2002. Molecular Characterization of Spanish Infectious Bursal Disease Virus Field Isolates. *Avian dis.*, 46:859-868
- Mardassi H., Khabouchi N., Ghram A., Namouchi A., Karboul A., 2004. A Very Virulent Genotype of Infectious Bursal Disease Virus Predominantly Associated with Recurrent Infectious Bursal Disease Outbreaks in Tunisian Vaccinated Flocks. *Avian dis.*, 48 (4): 829-840
- Mascio P. D., Murphy M. E., Sies H., 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:1945-2005
- Mazariegos L.A., Lukert P.D., Brown J., 1990. Pathogenicity and Immunosuppressive Properties of Infectious Bursal Disease "Intermediate" Strains. *Avian dis.*, 34:203-208
- McIlroy S.G., Goodall E.A., McCracken R.M., 1989. Economic Effects Of Subclinical Infectious Bursal Disease On Broiler Production. *Avian Pathol.*, 18: 465-480,
- McIlroy S. G., Goodall E. A., Bruce D. W., McCracken R. M., McNulty M. S., 1992. The cost benefit of vaccinating broiler flocks against subclinical infectious bursal disease. *Avian Pathol.*, 21: 65-76
- Muir W.I., Husband A. J., Bryden W. L., 2002. Dietary supplementation with vitamin E modulates avian intestinal immunity. *Brit. J. Nutr.*, 87:579-585
- Muller H., Becht H., 1982. Biosynthesis of Virus-Specific Proteins in Cells Infected with Infectious Bursal Disease Virus and Their Significance as Structural Elements for Infectious Virus and Incomplete Particles *J. Virol.*, 44(1): 384-392
- Muller H., Islam M. R., Rauea R., 2003. Research on infectious bursal disease-the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.*, 97:153-165
- Muller H., Scholtissek C., Becht H., 1979. The Genome of Infectious Bursal Disease Virus Consists of Two Segments of Double-Stranded RNA. *J. Virol.*, 31 (3): 584-589

- Mundt E., Beyer J. I and Miiller H., 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, 76: 437-443
- Mundt E., de Haas N., van Loon A. A.W.M., 2003. Development of a vaccine for immunization against classical as well as variant strains of infectious bursal disease virus using reverse genetics. *Vaccine* 21: 4616–4624
- Mundt E., Kollner B., Kretzschmar D., 1997. VP5 of Infectious Bursal Disease Virus Is Not Essential for Viral Replication in Cell Culture. *J. Virol.*, 71 (7): 5647-5651
- Murphy F. A., Gibbss E. P. J., Horzinek M. C., Studdert M. J., *Veterinary Virology*, 3th ed., Academic Press, London, (1999), chap. 25, 405-411
- Muskett J. C., Reed N. E., Thornton D. H., 1985. Increased virulence of an Infectious bursal disease live virus vaccine after passage in chicks. *Vaccine*, 3: 309-312
- Nakamura T., Otaki Y., Nunoya T., 1992. Immunosuppressive Effect of a Highly Virulent infectious Bursal Disease Virus Isolated in Japan. *Avian dis.*, 36:891-896
- NRC (National Research Council), 1994. Nutrient Requirements of Poultry: 9th revised edition, National Academy Press, Washington, DC
- Naqi S. A., Marquez B., Sahin N., 1983. Maternal Antibody and its Effect on Infectious Bursal Disease Immunization. *Avian dis.*, 27 (3): 623-631
- Nunoya T., Otaki Y., Tajima M., Hiraga M., Saito T., 1992. Occurrence of Acute Infectious Bursal Disease with High Mortality in Japan and Pathogenicity of Field Isolates in Specific-Pathogen-Free Chickens. *Avian dis.* 36:597-609
- Ojkic D., Martin E., Swinton J., Binnington B., Brash M., 2007. Genotyping of Canadian field strains of Infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.*, 36(5): 427-433
- Okoye J.O.A., Uche U.E., 1986. Serological Evidence Of Infectious Bursal Disease Virus Infection In Wild Rats. *Acta. Vet. BRNO.*, 55: 207-2119
- Oshop G.L., Elankumaran S., Heckert R.A., 2002. DNA vaccination in the avian. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 89: 1-12
- Owoade A. A., Mulders M. N., Kohnen J., Ammerlaan W., Muller C. P., 2004. High sequence diversity in infectious bursal disease virus serotype 1 in poultry and turkey suggests West-African origin of very virulent strains. *Arch. Virol.*, 149: 653-672
- Pagès-Manté A., Torrents D., Maldonado J., Saubi N., 2004. Dogs as potential carriers of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.*, 33(2): 205-209
- Park M. J., Park J. H., Kwon H. M., 2010. Mice as potential carriers of infectious bursal disease virus in chickens. *Vet. Journal* 183: 352-354

- Packer L., 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:1050S- 1055S
- Petek M., D'apirile P. N., Cancellotti F., 1973. Biological And Physico-Chemical Properties Of The Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). *Avian Pathol*, 2(2): 135-152
- Pringle C. R., 1999. The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during. *Arch. Virol.* 144 (2): 421-429
- Raberg L., Vestberg M., Hasselquist D., Holmdahl R., Svensson E., Nilsson J., 2002. Basal metabolic rate and the evolution of the adaptive immune system. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 269:817-821
- Ratcliffe M. J. H., 2002. B cell development in gut associated lymphoid tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 87: 337-340
- Rautenschlein S., Kraemer Ch. , Vanmarcke J. , Montiel E., 2005. Protective Efficacy of Intermediate and Intermediate Plus Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Vaccines Against Very Virulent IBDV in Commercial Broilers. *Avian dis.*, 49:231-237
- Rautenschlein S., Yeh H., Sharma J.M., 2002. The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 89: 159-167
- Repp H., Nieper H., Draheim H. J., Koschinski A., Muller H., Dreyer F., 1998. Infectious Bursal Disease Virus Changes the Potassium Current Properties of Chicken Embryo Fibroblasts. *Virology*, 246: 362-369
- Rodriguez-Lecompte J. C., Nino-Fonga R., Alfonso Lopeza, Markhama R.J. F., Kibenge F. S.B., 2005. Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells. *Com. Immunol., Microbiol. Infect. Dis.*, 28: 321-337
- Rosales A. G., Villegas P., Lukert P. D., Fletcher O. J., Mohamed M. A., Brown J., 1989. Isolation, Identification, and Pathogenicity of Two Field Strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian dis.* 33:35-41
- Rudd M. F., Heine H. G., Sapats S. I., Parede L., Ignjatovic J., 2002. Characterisation of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.*, 147: 1303-1322
- Rudd M. F., Heine H. G., Sapats S. I., Parede L., Ignjatovic J., 2002. Characterisation of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Arch Virol.*, 147: 1303–1322
- Saif Y. M., 1998. Infectious Bursal Disease and Hemorrhagic Enteritis. *Poultry Sci.* 77:1186-1189

- Sapats S. I., Ignjatovic J., 2000. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch. Virol.* 145: 773-785
- Sharma J. M., Kim I., Rautenschlein S., Yeh H., 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Com. Immunol.*, 24: 223-235
- Shane S.M., Lasher H.N. & Paxton K.W., 1994. Economic impact of infectious bursal disease. In Proc. First International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, 21-24 juin, Rauschholzhausen (E. Kaleta, édit.). *World Veterinary Poultry Association*, Giessen, 196-205
- Siegrist C., 2003. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*, 21: 3406-3412
- Simin N. M., Mohsen M., Verdon C. P., Shapiro A. A., Blumberg J. B., Hayes K.C., 1986. Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E₂ synthesis and enhances the immune response of aged mice. *Mech. Ageing Dev.*, 34(2): 191-201
- Simin N. M., Sung N. Han, Dayong W., 2005. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. *Immunol. Rev.*, 205: 269-284
- Singh H., Sodhi S., Kaur R., 2006. Effects of dietary supplements of selenium, vitamin E or combinations of the two on antibody responses of broilers. *Brit. Poultry Sci.* 47 (6): 714-719
- Skeeles J. K., Lukert P. D., De Buysscher E. V., Fletcher O. J., Brown J., 1979. Infectious Bursal Disease Viral Infections. I. Complement and Virus-Neutralizing Antibody Response Following Infection of Susceptible Chickens. *Avian dis.*, 23 (1): 95-106
- Snyder D.B., 1990. Changes In The Field Status Of Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Pathol.*, 19: 419-423
- Sokol M. D., 1988. Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Ann. Rev. Nutr.*, 8:351-373
- Staszewski V., Gasparini J., Mccoy K. D., Tveraa T., Boulinier T., 2007. Evidence of an interannual effect of maternal immunization on the immune response of juveniles in a long-lived colonial bird. *J. Anim. Ecol.*, 1-9
- Sweeny P. R., Buchanan-Smith J. E., de Mile F., Pettit J. R., Moran E. T., 1992. Ultrastructure of muscular atrophy. *Am. J. Pathol.*, 68:493-510
- Tan D. Y., Hair-Bejo M., Omar A A. R., Aini I., 2004. Pathogenicity and Molecular Analysis of an Infectious Bursal Disease Virus Isolated from Malaysian Village Chickens. *Avian dis.*, 48:410-416

- Tengerdy R. P., 1989. Vitamin E: Biochemistry and health implication. *Ann. NY Acad. Sci.*, 570:335-344
- Tsukamoto K., Tanimura N., Kakita S., Ota K., Mase M., Imai K., Hihara H., 1995. Efficacy of Three Live Vaccines against Highly Virulent Infectious Bursal Disease Virus in Chickens with or without Maternal Antibodies. *Avian dis.*, 39:218-229
- Vakharia V. N., Snyder D. B., He J., Edwards G. H., Savage P. K., Mengel-Whereat S. A., 1993. Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. *J. Gen. Virol.*, 74: 1201-1206
- Van den Berg T.P., 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.*, 29 : 175-194
- Van den Berg T.P., Etteradossi N., Toquin D., Meulemans G., 2000. La bursite infectieuse (maladie de Gumboro). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 19 (2): 509-526
- Van den Berg T. P., Gonze M., Meulemans G., 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.*, 20: 133-143
- Van den Berg T. P., Meulemans G., 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol.*, 20: 409-421
- Villegas P., Hamoud A. M., Purvis L. B., Perozo F., 2008. Infectious Bursal Disease Subunit Vaccination. *Avian dis.*, 52:670-674
- Walker C., Kristensen F., Bettens F., de Weck A. L., 1983. Lymphokine regulation of activated (G₁) lymphocytes. I. Prostaglandin E₂ – induced inhibition of interleukin 2 production. *J. Immunol.*, 130 (4)
- Wei Y., Li J., Zheng J., Xu H., Li L., Yu L., 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 350: 277-287
- Winterfield R. W., Dhillon A. S., Thacker H. L., Alby L. J., 1980. Immune Response of White Leghorn Chicks from Vaccination With Different Strains of Infectious Bursal Disease Virus and In the Presence of Maternal Antibodies. *Avian dis.*, 24(1): 179-188
- Winterfield R. W., Fadly A. M., Bickford A., 1972. Infectivity And Distribution Of Infectious Bursal Disease Virus In The Chicken. Persistence Of The Virus And Lesions. *Avian dis.*, 16(3): 622-632
- Winterfield R. W., Hitchner S. B., 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 23:1273- 1279
- Yamaguchi T., Setiyono A., Kobayashi M., Takigami S., Fukushi H., Hirai K., 2000. Infectious bursal disease live vaccine: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblasts cells. *Avian dis.*, 44: 284-290

Yao K., Goodwin M. A., Vakharia V. N., 1998. Generation of a Mutant Infectious Bursal Disease Virus That Does Not Cause Bursal Lesions. *J. Virol.*, 72 (4): 2647-2654

Yamaguchi T. , Setiyono A. , Kobayashi M. , Takigami S. , Fukushi H. , Hirai K., 2000. Infectious Bursal Disease Live Vaccines: Changes in the Virus Population During Serial Passage in Chickens and Chicken Embryo Fibroblast Cells. *Avian dis.*, 44:284-290

Yano T., Yano Y., Uchida M., Murakami A., Hagiwara K., Otani S., Ichikawa T., 1997. The modulation effect of vitamin E on prostaglandin E₂ level and ornithine decarboxylase activity at promotion phase of lung tumorigenesis in mice. *Biochem. Pharmacol.*, 53:1757-1759

Zaheer A., Saeed A., 2003. Role of Maternal Antibodies in Protection Against Infectious Bursal Disease in Commercial Broilers. *Int. J. Poultry Sci.* 2 (4): 251-255

Zierenberg K., Nieper H., van den Berg T. P., Ezeokoli C. D., Voß M., Muller H., 2000. The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, "classical" virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. *Arch. Virol.* 145: 113-125

Zierenberg K., Raue R., Muller H., 2001. Rapid identification of "very virulent" strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol.*, 30: 55-62

8. Annexe

Composition de l'aliment de base des poulets

	Démarrage (D)		Croissance (C)		Finition (F)	
	0 to 14 jours		15 to 28 jours		29 to 49 jours	
	A	B	A	B	A	B
Maïs (g/kg)	557,75	559,2	538,35	538,8	713,51	714,12
Prémélange en vitamine E (g/kg)	1,45	0	0,45	0	0,61	0
Ingrédients constants* (g/kg)	440,85	440,8	461	461	285,88	285,88
Vitamine E (UI/kg)	100	27	50	27	50	20
Analyse calculée						
Énergie métabolisable (kcal)	252,64	343,89	350,23	347,42	352,33	356,42
Protéine brute (%)	20,8	20,8	19,6	20,7	16,2	17,7
Gras brut (%)	3,04	3,07	4,12	3,37	4,15	4,45

* Soya (48%) D:329 , C: 276, F :204 ; farine de pain energro D: 0 , C: 100, F : 47 ; pierre à chaux D: 17, C: 16 F : 14 ; tourteaux de canola D: 17 , C: 29, F : 0 ; gluten D:50, C: 14, F : 0 Biofos D: 10 , C: 9, F : 5 ; huile de soya excel : 5 ; sel FC vrac D: 2 ; C:0,8 ; F : 1,4 ; P méthionine D: 2,1 ; C: 1,8 ; F : 1,1 ; bicarbonate de soude D: 1,8 ; C: 2,8 ; F : 2,6 ; micronutriments D: 2, C: 2, F : 1,48 ; L lysine D: 1, C: 1,7 ; F : 1,3 ; chlorure de choline D: 0,7 ; C:0,6 ; F : 0,4; additifs : 1,4 ; Sulfate de cuivre D: 0,3; C: 0,3; F : 0,4 L-Thréonine D: 0,2 ; C: 0,3 ; F : 0,2