

Synthèse Virologie

1. Introduction

La composante virologique du projet a les objectifs suivants :

- des études de prévalence chez les espèces sauvages, commensales et domestiques au travers d'études virologiques.
- la détection, l'isolement et la caractérisation moléculaire des souches virales à partir de prélèvements faits sur terrain.
- l'étude phylogénétique et phylogéographique des isolats viraux.

Pour l'année 2009, trois des observatoires ont utilisé le dispositif de diagnostic mis à disposition au CIRAD à Montpellier pour les analyses en attendant la mise en place des moyens humains et matériels manquants. Il s'agit du LCV (Mali), du FOFIFA/DRZV (Madagascar) et du CNERV (Mauritanie). Concernant le Vietnam, les analyses ont été effectuées par le NIVR qui dispose d'une expérience acquise en matière de diagnostic de l'IA. Les analyses de l'observatoire du Zimbabwe ont été réalisées à l'OVI. Pour s'assurer du niveau d'expertise sur les techniques de diagnostic, un essai inter laboratoires d'aptitude (EILA) a été mis en place par le CIRAD sur une base annuelle et des programmes de formation seront adaptés à chaque laboratoire dont les résultats de l'EILA ne sont pas satisfaisants.

2. Moyens mis en place

Le projet dispose d'un chercheur à temps complet et d'un technicien à 3/4 temps au niveau du laboratoire de virologie du CIRAD à Montpellier. Les échantillons analysés sont récoltés par les différents chercheurs des autres unités du projet, y compris par les allocataires de recherche. Le projet assure également le travail d'analyse virologique, pour un allocataire du SCAC de Madagascar, Olivier Fridolin Maminiana qui conduit une thèse co-encadrée par le FOFIFA et le CIRAD sur la caractérisation du virus de la maladie de Newcastle circulant sur les Hauts Plateaux de Madagascar. De plus, un nouveau allocataire de recherche en virologie au LCV, Marthin Dakouo, a été recruté pour assurer une partie des analyses virologiques prélevé au Mali dans le cadre d'une thèse co-encadrée par l'Université de Bamako et le CIRAD sur la caractérisation des virus d'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle circulant dans l'avifaune domestique et sauvage du Mali.

Sur le plan méthodologique, la détection moléculaire des gènes M du VIA et du VMN et celle des sous-types (H5 et H7) se font par des techniques de RT-PCR en temps réel (RRT-PCR). Le protocole RRT-PCR utilisé pour la détection du virus influenza aviaire type A est celui recommandé par le laboratoire de référence du VLA de Weybridge avec quelques adaptations faites au CIRAD pour optimiser la qualité des résultats. Les protocoles RRT-PCR utilisés pour la détection du virus influenza aviaire de sous-type H5 et H7 sont ceux recommandés par le laboratoire européen de référence du VLA.

La détection du virus de la maladie de Newcastle se fait dans un premier temps par une RRT-PCR basée sur le gène M selon la publication de Wise (2004) et modifiée par le laboratoire de référence OIE (RRT-PCR plus sensible et plus spécifique). Les échantillons détectés M positif sont ensuite analysés à l'aide d'une RRT-PCR basée sur le gène F du virus, développée par le CIRAD permettant le pathotypage de l'échantillon à l'aide du séquençage utilisé comme outil d'appui.

Tous les échantillons positifs VIA ou MN sont soumis à l'isolement sur oeufs embryonnés. Afin d'augmenter les chances d'isolement, après décongélation les échantillons du début de la chaîne de screening jusqu'à l'isolement ne sont pas recongelés. Une fois les souches isolées les gènes F et HN sont amplifiés par PCR dans un premier temps et les produits d'amplification sont envoyés au séquençage chez une société spécialisée, la totalité du génome est ensuite séquencée en fonction de l'intérêt phylogénétique.

3. Activités 2009

En 2009, le CIRAD a reçu et analysé des prélèvements en provenance d'oiseaux domestiques et sauvages de Madagascar, du Mali et de Mauritanie. La campagne de prélèvement a été retardée en Ethiopie et les premiers échantillons prélevés ont été envoyés au CIRAD fin 2009 mais n'ont pas encore été analysés. Les premiers prélèvements du Vietnam ont été analysés au NIVR (2238 échantillons en mélange de 6= 373 mélanges testés). Les premières analyses des échantillons prélevés au Zimbabwe ont été faites par l'OVI (voir tableaux des prélèvements en annexe). Le détail ainsi que le nombre total d'analyses réalisées par le CIRAD en 2009 dans le cadre du projet GRIPAVI sont listés dans le tableau 1 :

Tableau 1. Détails des analyses réalisées au CIRAD en 2009 (données au 25/11/2009)

OBSERVATOIRE MALI				
Type d'échantillon	Prélevés	Analysés	Positif (type virus)	Isolés (type virus)
Domestiques	352	352	17 (VMN) 1 (VIA)	2 (VMN) 0 (VIA)
Sauvages	1613	656	4 (VMN) 2 (VIA)	0 (VMN) 0 (VIA)
Total	1965	1008	21 (VMN) 3 (VIA)	2 (VMN) 0 (VIA)
OBSERVATOIRE MADAGASCAR				
Type d'échantillon	Prélevés	Analysés	Positif (type virus)	Isolés (type virus)
Domestiques	1534	360	19 (VMN) 0 (AIV)	3, en cours
Sauvages	704	704	3 (VMN) 10 (VIA)	2 (VMN) 0 (VIA)
Total	2238	1064	22 (VMN) 10 (VIA)	1 (VMN) 0 (VIA)

4. Résultats 2009

OBSERVATOIRE MALI :

Parmi les échantillons prélevés en 2009, la totalité des échantillons d'oiseaux domestiques a été analysée ainsi que 40% des prélèvements d'oiseaux sauvages. Parmi les domestiques un seul échantillon a été positif au VIA (prévalence prélèvement = 0,09%, prévalence oiseaux = 0,17%) tandis que 17 ont été positifs au VMN (prévalence prélèvement = 1,97%, prévalence oiseaux = 3,69%). Deux souches VMN ont été isolées (APMV1/Chicken/MLC/007/2009 et APMV1/Chicken/MLC/008/2009 provenant du même élevage) et la séquence d'une partie du gène M et F ainsi que le site de clivage du gène de fusion (F) montrent d'une part que les deux souches sont identiques entre elles (sur 760 pb) et d'autre part qu'elles ont le même profil de séquence d'acides aminés que les 3 autres souches VMN isolées l'année dernière, c'est-à-dire, une série d'au moins 4 acides aminés basiques caractéristiques des souches vélogènes.

Parmi les sauvages 4 échantillons ont été positifs en VMN et 2 en VIA, malheureusement aucune souche provenant des oiseaux sauvages n'a pu être isolée, probablement en raison de la faible charge virale et/ou éventuellement l'adaptation nécessaire des souches d'origine sauvage aux œufs de poule.

Les analyses phylogénétiques basées sur 500 nucléotides du gène F des 2 dernières souches VMN isolées ainsi que les souches VMN isolées pendant la première année du projet montrent que ces souches appartiennent au génotype VII, actuellement responsable des foyers de MN en Afrique, Asie et Europe. Au sein du génotype VII, les analyses montrent que les souches APMV1/Chicken/ML/029/2007 (isolée en 2007 à Mopti) et APMV1/Chicken/ML/007/2008 (Sikasso, 2008) appartiennent respectivement aux sous-génotypes VIIh et VIIg, récemment décrits comme circulant dans des pays voisins comme le Nigeria et Burkina Faso (Snoeck et al., 2009).

Deux autres souches APMV1/Chicken/ML/039/2007 (Mopti, 2007) et APMV1/Chicken/ML/225/2008 (Mopti, 2008) ainsi que les souches MLC007 et MLC008 isolées en 2009 (Région de Mopti, Commune de Toguéré Coumbé) forment un cluster phylogénétique assez éloigné de tous les autres sous-génotypes décrits dans la littérature. Pour classer ces souches, nous proposons un nouveau sous-génotype, le VIII.

Malgré l'absence des souches originaires de la faune sauvage, des séquences courtes (95nt sur le gène F) issues de la RRT-PCR utilisées pour la première détection du VMN dans les échantillons ont pu être exploitées pour 4 des échantillons sauvages détectés positifs. Les analyses phylogénétiques montrent que deux de ces souches appartiennent également au nouveau sous-génotype VIII. Les deux autres séquences détectées sur 2 espèces d'oiseaux sauvages (*Dendrocygna viduata* et *Nycticorax nycticorax*) montrent une proximité avec le génotype I et un profil lentogène sur leur site de clivage de la protéine F.

OBSERVATOIRE MAURITANIE :

Les échantillons prélevés pendant la campagne de prélèvement de 2009 doivent arriver à Montpellier à la fin du mois de novembre, les analyses débuteront en décembre.

Comme pour le Mali, des séquences courtes (95nt sur le gène F) obtenues à partir des échantillons VMN positifs issus de la campagne de prélèvement de 2008 ont été analysées. Le même sous-génotype VIII circulant au Mali semble être présent chez les oiseaux sauvages du Parc National du banc d'Arguin. Le génotype I a été également détecté sur trois oiseaux sauvages de la même espèce (*Larus genei*) ainsi que chez un oiseau domestique (*Cairina moschata*)

Les résultats trouvés au Mali et Mauritanie mettent en évidence une probable circulation et/ou émergence des sous-génotypes du VMN particulier de l'Afrique de l'Ouest qui impliquent les oiseaux domestiques ainsi que les sauvages. Vu qu'il n'existe pas de lien entre les espèces sauvages prélevées au Mali et celles prélevées en Mauritanie, la prochaine campagne de prélèvements en

Mauritanie devra cibler d'autres espèces servant de relais entre les deux pays et par conséquent qui seraient potentiellement impliquées dans la circulation commune des souches VMN.

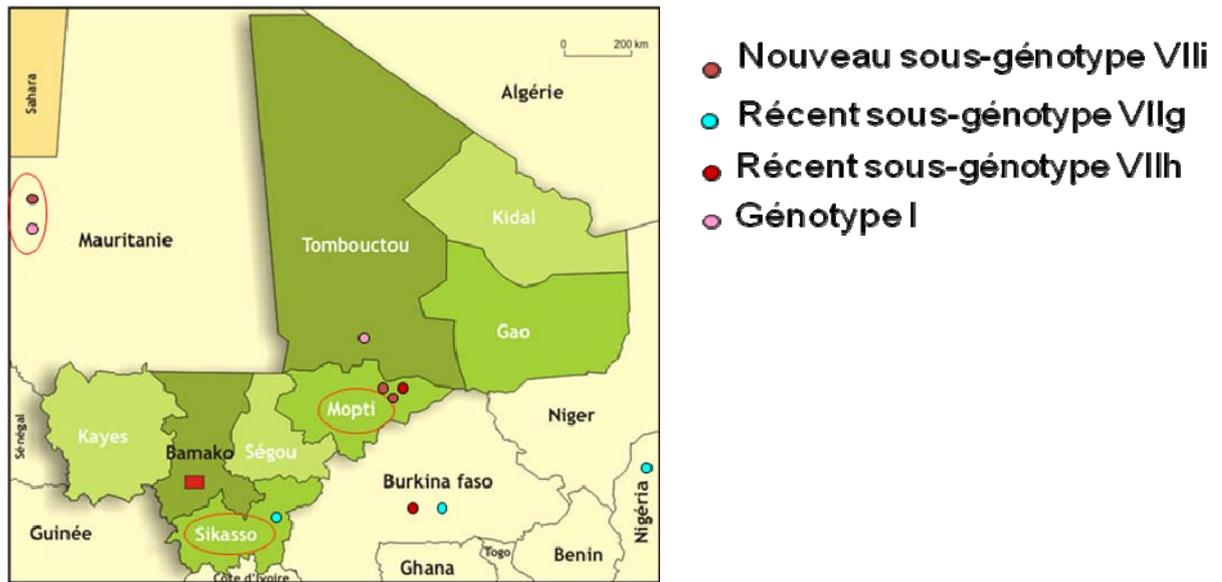


Figure 1. Localisation géographique des différents types de souches VMN isolées au Mali et en Mauritanie et en circulation dans les pays voisins.

OBSERVATOIRE MADAGASCAR :

Parmi 704 échantillons analysés sur la faune sauvage du Lac Alaotra en 2009, trois ont été trouvés positifs au VMN (prévalence prélèvement = 0,42%, prévalence oiseaux = 0,85%) et dix positifs au VIA au sein d'une majorité de canard (prévalence prélèvement = 1,42%, prévalence oiseaux = 2,84%). Deux souches NDV ont pu être isolées (une provenant d'un canard sauvage et l'autre d'un dendrocygne). La caractérisation moléculaire et phylogénétique d'un fragment de 116 nt du gène F d'une de ces souches montre un site de clivage lentogène et son classement dans le groupe du génotype I. La caractérisation de l'autre souche est en cours. Jusqu'à présent, 360 échantillons prélevés sur la faune domestique en 2009 à Madagascar ont été analysés. Parmi ces échantillons, 19 ont été positifs au VMN ce qui représente une prévalence supérieure à celle trouvée l'année dernière (prévalence prélèvement = 5,2%, prévalence oiseaux = 10,61%) sur des échantillons prélevés de un à deux mois plus tard dans l'année par rapport à 2009 (juillet-août en 2008 et mai-juin en 2009). Pour l'instant, aucun échantillon domestique a été trouvé positif au VIA. Pour le moment, trois souches VMN ont été isolées sur la campagne de prélèvement domestique de 2009 dont 2 issues du prélèvement cloacal et trachéal d'une volaille malade. Une séquence de 192 nucléotides montre qu'elles sont identiques.

Un nouveau génotype (génotype XI) a été identifié à Madagascar dont l'ancêtre direct est une souche responsable d'une panzootie qui a sévi il y a plus de 50 ans. Le virus correspondant n'a plus été détecté dans le monde depuis plusieurs années. Ce même génotype a été trouvé en 1992 et circule actuellement à Madagascar. Ces résultats mettent en évidence une évolution particulière du VMN à Madagascar par rapport au reste de l'Afrique et remettent en question l'efficacité de la vaccination e/ou du vaccin contre la maladie de Newcastle à Madagascar.

Comme il a été évoqué dans le rapport de l'année dernière, il est surprenant d'avoir isolé des souches qui montrent un profil moléculaire vélogène sur des volailles apparemment en bonne santé et non vaccinées comme il a été observé au Mali et Madagascar. Pour vérifier le réel pouvoir pathogène de ces souches en conditions expérimentales, des inoculations intracérébrales chez des poussins d'un jour (index de pathogénicité par voie intracérébrale – IPIC) ont été réalisées en collaboration avec l'AFSSA de Ploufragan au sein de leurs installations protégées ainsi que le

séquençage du génome complet des souches APMV/Chicken/MG/1992 et APMV1/MG/1322/2008 de Madagascar et APMV1/Chichen/ML029/2007, APMV1/Chichen/ML038/2007, et APMV1/Chichen/ML007/2008 du Mali. Les résultats obtenus par l'AFSSA montrent que les valeurs d'IPIC sont très élevées c'est-à-dire, supérieures ou égale à 1,8 pour toutes les souches étudiées et proches de la valeur maximale de 2, confirmant le caractère virulent des souches selon la réglementation internationale OIE (IPIC \geq 0,7). Une résistance des animaux locaux à ces souches virulentes est ainsi évoquée. L'analyse phylogénétique du génome quasi entier confirme l'appartenance des 2 souches maliennes (les données de séquence concernant la souche APMV1/Chichen/ML038/2007 n'ont pas été exploitables en raison de l'existence de 2 sous populations) au génotype VII et les 2 souches malgaches à un groupe le plus proche du génotype IV mais assez éloignées pour constituer le nouveau génotype XI proposé.

CIRAD-EILA-VIA-2009

Pour la vérification de la capacité diagnostique du VIA des laboratoires partenaires, un deuxième essai inter-laboratoires d'aptitude a été organisé par le CIRAD en 2009 (CIRAD-EILA-VIA-2009).

Quatre laboratoires ont participé à cet essai : le FOFIFA/DRZV à Madagascar, le NIVR au Vietnam, l'OVI en Afrique du Sud et le LCV au Mali. Jusqu'à présent seul les résultats du FOFIFA, de l'OVI et du NIVR ont été envoyés. Une analyse partielle de ces résultats sera présentée dans le présent rapport car l'analyse complète fera objet du rapport spécifique du CIRAD-EILA-VIA-2009.

Les résultats rendus par le FOFIFA sont très satisfaisants avec une bonne sensibilité générale sauf pour un échantillon en limite de détection qui n'a pas été détecté comme positif. Vu la faible charge virale de l'échantillon en question, le résultat obtenu par le FOFIFA est satisfaisant.

Concernant le NIVR, les résultats envoyés jusqu'à présent sont incomplets (les analyses H5 et H7 n'ont pas été faites). L'évaluation des résultats obtenus sur la RRT-PCR du gène M du VIA laisse suspecter une chute de sensibilité par rapport à l'année dernière ce qui a entraîné quatre faux négatifs (échantillons dilués de 10^{-3} à 10^{-5}). Le problème lié aux témoins positifs utilisés dans les réactions de RRT-PCR détectés lors de la mission d'Emmanuel Albina au NIVR l'année dernière a été de nouveau évoqué. La faible sensibilité peut venir du fait que le NIVR utilise un seul témoin positif et fixe le seuil de fluorescence basé sur un échantillon négatif. Ce type de procédure peut représenter une source de variation inter-tests. La recommandation faite par Emmanuel Albina dans son rapport de mission devrait être renforcée. Une formation au CIRAD sur le site de Montpellier sur les techniques de diagnostic moléculaire de l'IA pour le technicien responsable des analyses au NIVR est recommandée. Après mesures correctives prises par le NIVR en concertation avec le CIRAD, un nouveau test sera proposé pour vérifier que les mesures correctives prises étaient appropriées.

Le résultat du CIRAD-EILA-VIA-2009 qui concerne l'OVI montre une correcte interprétation du statut positif, négatif ou suspect des échantillons, à l'exception d'un échantillon H11, détecté H5. En revanche, les résultats quantitatifs (valeurs de Ct) ne sont pas toujours en conformité avec le résultat qualitatif, laissant supposer que d'autres critères sont pris en compte pour l'interprétation qualitative finale. Les critères utilisés pour l'interprétation des résultats de la RRT-PCR ne sont pas ceux recommandés dans les instructions du CIRAD-EILA-VIA-2009. Une investigation concernant l'origine du problème de spécificité lié à l'échantillon H11 à travers l'analyse d'un nouveau panel d'échantillons ciblés est recommandée. De plus, la procédure utilisée par l'OVI pour l'interprétation qualitative des résultats doit être détaillée.

Les résultats rendus par le NAHDIC montrent plusieurs problèmes liés à la sensibilité, spécificité, répétitivité et interprétation des résultats. Le laboratoire montre une interprétation incorrecte des résultats quantitatifs, car un échantillon H5N2 ayant une valeur de CT de 32 a été déclaré comme négatif. Le problème de spécificité a été détecté pour 2 échantillons H1N1 et H11N9 détectés comme H7 et H5, respectivement. Les résultats montrent également un manque de

linéarité des résultats quantitatifs issus des échantillons en dilutions sérielles. Une basse sensibilité générale est aussi observée. Le CIRAD recommande une formation à Montpellier dans la technique de RRT-PCR pour le diagnostic de l'IA et la MN pour le technicien responsable des analyses au NAHDIC.

5. Conclusions et recommandations

Les résultats obtenus jusqu'à présent montrent que Madagascar ainsi que l'Afrique de l'Ouest représentent des écosystèmes intéressants pour l'étude de la diversité du virus de la maladie de Newcastle chez les oiseaux sauvages et domestiques. Un nouveau génotype et un nouveau sous-génotype ont été identifiés. L'étude approfondie doit permettre de comprendre la circulation de ces virus à l'intérieur des sous-populations d'oiseaux domestiques et sauvages et entre ces sous-populations. Vu la faible prévalence du virus de l'influenza aviaire qui se confirme cette année et face aux résultats intéressants obtenus pour le virus de la maladie de Newcastle, les efforts pour l'année prochaine pourraient être concentrés essentiellement sur ce dernier virus.

- **Mali/Mauritanie** : Analyse des nouveaux échantillons dans le but de connaître la diversité génétique des souches du VMN circulantes au sein d'espèces d'oiseaux réservoirs et « relai » entre les deux sites ; vérification du rapprochement des souches entre ces deux pays et d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest par une étude plus approfondie des génomes des souches isolées.
- **Madagascar** : Analyse des échantillons prélevés pendant le suivi longitudinal mis en place au Lac Alaotra et sur des foyers de MN pour vérifier l'hypothèse de la prédominance du génotype XI dans le cas clinique de MN à Madagascar ; analyse des nouveaux échantillons prélevés sur la faune sauvage dans l'objectif de connaître les espèces impliquées dans le maintien, l'évolution et l'émergence des nouveaux génotypes du VMN.

Pour le Mali et Madagascar, nous envisageons de compléter les études en épidémiologie moléculaire par des recherches sur place en conditions contrôlées visant notamment à vérifier le pouvoir pathogène des nouveaux génotypes identifiés sur des volailles locales et l'efficacité des vaccins, utilisés dans ces pays, contre ces nouveaux génotypes.

6. Références

Snoeck CJ, Ducatez MF, Owoade AA, Faleke OO, Alkali BR, Tahita MC, et al. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Arch Virol.* 2009;154(1):47-54.

7. Publications

Servan de Almeida R., Maminiaina O. F., Gil P., Hammoumi S., Molia S., Chevalier V., Koko M., Andriamanivo H. R., Traoré A., Samaké K., Diarra A., Grillet C., Martinez D., Albina E. (2009). Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus? *Vaccine* 27, 3127-3129.

Hammoumi S., Servan de Almeida R., Gil P., Molia S., Gaidet N., Cappelle J., Chevalier V., Balança G., Traoré A., Grillet C., Samaké K., Diarra A., Martinez D., Albina E. New virulent subgenotypes of Newcastle disease virus in West-Africa, implication of wild birds. (soumis à EID)

Maminiaina, O.F., Gil, P., Albina E., Andriamanivo H.R., Chevalier V., Renaud L., Martinez D., Rakotondrao, Rajaonarison J.J., Koko M., Andriantsimahavandy A.A., Servan de Almeida R. Newcastle disease virus in Madagascar: identification of original genotypes possibly resulting from a self-contained evolution of viruses introduced in the 50-60's. (en cours de finalisation)