

Synthèse Virologie

Renata Servan de Almeida, Emmanuel Albina et Patricia Gil

1. Introduction

Le projet GRIPAVI prévoit l'étude et la comparaison des souches du virus de l'influenza aviaire (VIA) et de la maladie de Newcastle (VMN) circulant dans les populations d'oiseaux domestiques et sauvages de zones humides d'Afrique. Ce programme de recherche est déployé sur six pays : Ethiopie, Madagascar, Mali, Mauritanie, Vietnam, Afrique du Sud et Zimbabwe et vise à mieux comprendre les dynamiques d'introduction, de circulation et de maintien des virus en question dans les populations aviaires par des approches combinant l'étude des facteurs environnementaux, des populations de virus, des pratiques d'élevage et de commercialisation. La composante virologique du projet vise 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 2010, cinq 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) du NAHDIC (Ethiopie), du NIVR (Vietnam) et du CNERV (Mauritanie). L'allocataire de recherche du LCV, Monsieur Marthin Dakouo et l'allocataire du SCAC de Madagascar Monsieur Olivier Fridolin Maminiaina ont séjourné pendant 3 mois au CIRAD en 2010 période pendant laquelle ils ont analysé des échantillons en provenance de leur pays respectif. Concernant le Vietnam, les analyses des campagnes des années précédentes ont été effectuées par le NIVR. Cependant, pendant le séjour de Monsieur Tung Dao Duy au CIRAD de juin à juillet 2010, une partie des échantillons du Vietnam a été analysée au CIRAD. Les analyses de l'observatoire du Zimbabwe ont été réalisées à l'OVI. En 2010, le CIRAD a assumé également l'analyse d'une partie des échantillons de l'Ethiopie qui a pris du retard à cause de problèmes techniques liés au non fonctionnement de la machine de PCR en temps réel. Pour un problème de retard d'expédition dû aux autorisations de transport, l'analyse des échantillons en provenance de Mauritanie en 2010 n'a pas encore été faite

Pour s'assurer du niveau d'expertise sur les techniques de diagnostic, un essai inter laboratoires d'aptitude (EILA) est mis en place par le CIRAD sur une base annuelle et des programmes de formation sont 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, d'un ingénieur à mi-temps et d'une intérimaire récemment recrutée pour 12 mois, 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 l'allocataire du SCAC de Madagascar, Olivier Fridolin Maminiana et pour l'allocataire de recherche en virologie au LCV, Marthin Dakouo. Olivier F. Maminiana 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. Marthin Dakouo, conduit 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 par une RRT-PCR basée sur le gène F développée par le CIRAD permettant le pathotypage de l'échantillon à l'aide du séquençage utilisé comme outil d'appui.

Les échantillons positifs VIA ou MN sont soumis à l'isolement sur oeufs embryonnés. Pour l'isolement, une sélection des échantillons avec une charge virale plus importante (normalement <36 Ct pour AIV et <38 Ct pour NDV) est faite afin d'augmenter les chances isolement. 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.

Une solution logicielle et un automate ont été développés au cours de l'année, en vue d'établir un réseau de surveillance intégré. La société Beckman Coulter a été retenue pour répondre à l'objectif. La solution logicielle a été mise en développement par cette société après une première réunion de cadrage avec les épidémiologistes et microbiologistes du CIRAD, le 16 février 2010. Une seconde réunion le 23 juin, a permis de voir l'état d'avancement de la suite logicielle et d'en affiner les contours. L'installation du prototype de cette solution logicielle a été effectuée au CIRAD, du 19 au 21 octobre. Des améliorations limitées ont été demandées avant d'en envisager la pleine application et progressivement le transfert aux laboratoires partenaires et l'utilisation dans les conditions terrains pour la traçabilité des échantillons. La mise en place opérationnelle se fera dans un premier temps sur un des observatoires : ce sera l'observatoire de Madagascar qui nous paraît le plus approprié pour « roder » le système.

Le petit automate de préparation des PCR a été acquis et mis en œuvre opérationnelle depuis janvier 2010. Il complète le dispositif de détection haut-débit mis en place au CIRAD (voir schéma du dispositif ci-après).

3. Activités 2010

Depuis la finalisation du dernier rapport d'activités du projet GRIPAVI (année 2) le CIRAD a reçu et analysé 9959 échantillons. Cependant, 6724 prélèvements en

provenance d'oiseaux domestiques et sauvages de Madagascar, Mali, Ethiopie et Vietnam ont été analysés en 2010 dont certains provenant de campagnes précédentes. Les échantillons de la faune sauvage prélevés en Mauritanie en 2010 doivent arriver à Montpellier vers la semaine 50 (13-17 décembre) et seront analysés en début 2011.

Le détail ainsi que le nombre total d'analyses réalisées par le CIRAD en 2010 dans le cadre du projet GRIPAVI sont listés dans le tableau 1 :

Tableau 1. Détails des analyses réalisées au CIRAD en 2010 (données jusqu'au 07/12/2010).

2010			
OBSERVATOIRE ETHIOPIE			
Type d'échantillon	Analysés	Positif (type	Isolés (type virus)
Domestiques	1958	75 (VMN)	0 (VMN)
Total	1958	75(VMN)	0 (VMN)
OBSERVATOIRE MADAGASCAR			
Type d'échantillon	Analysés	Positif (type	Isolés (type virus)
Domestiques	359	10 (VMN) 0 (VIA)	2 (VMN) 0 (VIA)
Total	359	10 (VMN) 0 (VIA)	2 (VMN) 0 (VIA)
OBSERVATOIRE VIETNAM			
Type d'échantillon	Analysés	Positif (type	Isolés (type virus)
Domestiques	1637	0 (VIA)	0 (VIA)
Total	1637	0 (VIA)	0 (VIA)
OBSERVATOIRE MALI			
Type d'échantillon	Analysés	Positif (type	Isolés (type virus)
Domestiques	662	43 (VMN) 0 (VIA)	en cours (VMN) 0 (VIA)
Sauvages	2108	19 (VMN) 1 (VIA)	0 (VMN) 0 (VIA)
Total	2770		
TOTAL	6724		

OBSERVATOIRE MALI :

Parmi les échantillons analysés en 2010, 2108 correspondent à des prélèvements d'oiseaux sauvages et 662 à des prélèvements d'oiseaux domestiques. Parmi les sauvages, 19 échantillons ont été positifs au VMN et 43 parmi les domestiques tandis qu'un seul échantillon sauvage été trouvé positif au VIA. Malheureusement aucune souche provenant des oiseaux sauvages n'a pu être isolée, probablement en raison de la faible charge virale et/ou éventuellement de l'adaptation nécessaire des souches d'origine sauvage aux œufs de poule. Les isollements des échantillons domestiques positifs sont actuellement en cours. Malgré l'absence des souches, des séquences courtes (95nt sur le gène F) issues de la RRT_PCR utilisées pour la première détection du VMN

ont pu être exploités pour certains des échantillons détectés positifs. Les analyses phylogénétiques basées sur ce court fragment montrent une circulation des sous-génotypes VIIId, VIIi et VI vélogènes et I et II lentogènes dans le domestique ainsi que dans le sauvage. Le génotype VIIi, déjà détecté dans les années précédentes au Mali et Mauritanie (voir rapport d'activités du projet GRIPAVI, année 2), semble être spécifique de l'Afrique de l'ouest (Servan de Almeida, 2009 ; Cattoli et al., 2010). Il est intéressant de noter que ce génotype a été trouvé à la fois sur le prélèvement cloacal et trachéal d'un poulet présentant des signes cliniques alors que le génotype VIIId prédominant en Asie est retrouvé dans des volailles apparemment saines. Le génotype VI, moins présent actuellement que le VII, a été récemment détecté en Afrique, plus spécifiquement en Ethiopie dans le cadre de ce projet et au Nigéria. Les génotypes I et II sont vraisemblablement des virus vaccinaux qui circulent à bas bruit entre les populations domestique et sauvage.

OBSERVATOIRE MADAGASCAR:

En ce qui concerne les 359 échantillons analysés sur la faune domestique, 76 provenaient de foyers de maladie avec des signes cliniques compatibles avec la MN. Parmi ces 76 échantillons, 7 ont été détectés positifs au VMN. Parmi les échantillons restants prélevés dans le cadre des suivis longitudinaux et sur des animaux sains, 3 se sont avérés positifs au VMN. Aucun échantillon n'a été détecté positif au VIA. Deux souches VMN issues de foyers ont pu être isolées. La caractérisation moléculaire et phylogénétique de ces souches, ainsi que sur de petits fragments nucléotidiques du gène F montre que tous les virus détectés sur les foyers appartiennent au nouveau génotype XI découvert à Madagascar dans les années précédentes dans le cadre de ce projet (résultats présentés dans les rapports d'activités du projet GRIPAVI, années 1 et 2). Aucune souche issue des suivis longitudinaux n'a pu être isolée. L'analyse phylogénétique basée sur le fragment nucléotidique amplifié par la PCR initiale suggère que deux de ces souches appartiennent au génotype I, souche lentogène probablement originaire d'un vaccin et que la troisième appartient au génotype VIIId, cluster de souches vélogène. Ces résultats mettent en évidence que nous avons probablement au moins deux génotypes vélogènes de VMN qui circulent à Madagascar. Cependant, le génotype XI semble prédominer et il est le seul à être détecté sur les foyers analysés jusqu'à présent.

Compte tenu de la distance phylogénétique entre les souches vaccinales utilisées actuellement à Madagascar et le nouveau génotype XI un essai de protection croisée entre les vaccins HB1 et La Sota et une souche d'épreuve malgache appartenant au génotype XI a été réalisé à l'AFSSA de Ploufragan. Les résultats obtenus pour cet essai de vaccination montrent que la vaccination associée avec le vaccin vivant atténué HB1 et le vaccin inactivé huileux La Sota Clone 30 confère en conditions expérimentales une protection clinique satisfaisante envers le virus du génotype XI. Néanmoins, la vaccination n'empêche pas l'excrétion virale au niveau oropharyngé (avec un pic d'excrétion maximal de la souche d'épreuve vers les 5 jours après inoculation). Cette protection vaccinale non stérilisante (ne permettant pas d'empêcher la réplication du virus d'épreuve) peut favoriser la sélection de nouvelles souches variantes qui pourraient être à l'origine de l'émergence de nouveaux génotypes.

Un autre essai sur des poules de race locale a été réalisé à Madagascar avec les vaccins La Sota, Hitchner B1 et Mukteswar (les plus utilisés contre la MN à Madagascar)

et la souche de génotype XI de Madagascar. L'analyse des résultats de cet essai est actuellement en cours.

OBSERVATOIRE ETHIOPIE:

Parmi les 1958 échantillons provenant de l'Ethiopie, 75 ont été détectés positifs au VMN. La détection du VIA ne concerne pas ce pays. Malheureusement aucune souche n'a pu être isolée, probablement en raison de la faible charge virale. L'analyse phylogénétique faite sur les courtes séquences amplifiées dans la PCR du diagnostique nous a montré une probable circulation des génotypes I, II (probablement vaccinaux), VI et VIIId (vélogènes).

OBSERVATOIRE VIETNAM:

Les échantillons provenant du Vietnam n'ont été soumis qu'à la détection du VIA. La détection du VMN n'est pas programmée pour ce pays. Parmi les 1637 échantillons analysés, aucun ne s'est avéré positif. Ce résultat peut être dû à la dégradation virale dans les échantillons qui, dans plusieurs cas, ont été soumis à plusieurs cycles de congélations/décongélations au NIVR et à un transport long vers la France. Toutefois, on ne peut écarter l'interférence de la vaccination pratiquée au Vietnam qui pourrait réduire les charges virales en circulation.

CIRAD-EILA-VIA-2010

Pour la vérification de la capacité diagnostique du VIA dans les laboratoires partenaires, le CIRAD est en cours d'organisation du troisième essai inter-laboratoires d'aptitude en 2010 (CIRAD-EILA-VIA-2010). Les 6 laboratoires partenaires du projet, LCV (Mali), CNERV(Mauritanie), NAHDIC (Ethiopie), FOFIFA (Madagascar), NIVR (Vietnam) et OVI (Afrique du Sud, responsable des analyses pour le Zimbabwe) ont été contactés. A ce jour, deux laboratoires ont répondu à cette demande.

FORMATIONS

L'UMR15 du CIRAD a assuré la formation aux techniques de QRT-PCR et d'isolement sur œuf du thésard Marthin Dakouo recruté au Mali en 2009 dans le cadre du projet GRIPAVI par des séjours au CIRAD entre 2009 et 2010 (Tableau 2). La capacité diagnostique de Marthin Dakouo au LCV a été confirmée par l'EILA 2009 et s'est montrée assez satisfaisante. Les aptitudes de Mr Dakouo seront confirmées lors de l'EILA 2010. L'allocataire de recherche du FOFIFA Fridolin O. Maminiaina a passé 3 mois au CIRAD en 2010 pour sa formation annuelle.

Une formation sur le diagnostique moléculaire de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle mise en place tous les ans par l'UMR-15 au CIRAD a eu lieu en juin de cette année, à Montpellier. Dans le cadre de cette formation, le vietnamien Tung Dao Duy et l'éthiopien Abera Kebede Dinku, responsables des analyses virologiques au NIVR et au CNERV, respectivement, ont été formés. A la suite de la formation de 5 jours, Tung Dao Duy est resté un mois au laboratoire de virologie de l'UMR-15 afin d'approfondir ses connaissances dans le domaine. Abera Kebede Dinku a également suivi une formation de 3 jours sur la technique ELISA pour le diagnostic de l'IA.

Tableau 2 : Stagiaires formés en 2010 au CIRAD Montpellier dans le cadre du projet.

Formation à Montpellier					
Nom	Pays	Institution	Formation	Financement	Dates
Tung Dao Duy	Vietnam	NIVR	Diagnostic moléculaire pour la détection précoce des virus de l'influenza aviaire type A et de la maladie de Newcastle.	Gripavi	Juin 2010 (5 jours) + séjour d'un mois
Abera Kebede Dinku	Ethiopie	NAHDIC	Diagnostic moléculaire pour la détection précoce des virus de l'influenza aviaire type A et de la maladie de Newcastle.	Gripavi	Juin 2010 (5 jours)
Marthin Dakouo	Mali	LCV	Diagnostic moléculaire pour la détection du VIA et VMN et isolement viral. Comité de thèse.	DESI + Gripavi	10/09 à 31/10/2009 03/08 à 30/10/2010
Fridolin O. Maminiaina	Madagascar	FOFIFA	Diagnostic moléculaire pour la détection du VIA et VMN et isolement viral. Comité de thèse.	DESI + Gripavi	29/05 à 29/08/2010

4. 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. Des nouveaux génotypes 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 encore une fois cette année et face aux résultats intéressants obtenus pour le virus de la maladie de Newcastle, les efforts pour l'année prochaine seront de nouveau concentrés essentiellement sur ce dernier virus.

- **Mali/Mauritanie** : Support technique et scientifique à Marthin Dakouo pour l'analyse au LCV des derniers échantillons domestiques et analyse des échantillons prélevés dans la campagne 2010 en Mauritanie, dans le but de connaître la diversité génétique des souches du VMN circulantes ; vérification du rapprochement des souches entre ces deux pays et d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest par des études phylogénétiques. Mise en place au Mali d'un essai de protection croisée entre les vaccins contre la MN utilisé sur terrain et les souches VMN circulantes (faisabilité et analyse de coût en cours de vérification).
- **Madagascar** : Support technique et scientifique à Fridolin O. Maminiaina pour la continuité des analyses au FOFIFA sur les 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 les cas cliniques de MN à Madagascar ; analyse des échantillons prélevés sur la faune sauvage en 2010 dans l'objectif de connaître les espèces impliquées dans le maintien, l'évolution et l'émergence des nouveaux génotypes du VMN ;

analyse des résultats de l'essai de protection croisée réalisé à Madagascar. Soutenance de thèse de Fridolin O. Maminiaina.

- **Ethiopie** : Environ 1700 échantillons prélevés sont en attente d'analyse au NAHDIC. Ces échantillons devraient être analysés sur place par Abera Kebede Dinku formé au CIRAD. Cependant, la machine de PCR en temps réel semble être hors service du à un défaut de logiciel. Compte tenu du délai pour analyser ces échantillons au CIRAD vu le nombre d'échantillons déjà en attente d'analyse, il a été décidé après discussion entre l'UMR-15 et la responsable de l'observatoire Ethiopie, Flavie Goutard, que la détection du VMN et l'isolement viral seraient faits à l'OVI en Afrique du Sud et que la caractérisation des souches isolées serait faite au CIRAD à Montpellier.

5. Références

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.

Cattoli G., Fusaro A., Monne I., Molia S., Le Menach A., Maregeya B., et al. (2010). Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa-Implications for diagnosis and control. *Vet Microbiol* 142: 168-176.

6. 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.

Maminiaina F.O., Gil P., Briand F.X., Albina E., Keita D., Rasamoelina Andriamanivo H., Chevalier V., Lancelot R., Martinez D., Rakotondravao R., Rajaonarison J.J., Koko M., Andriantsimahavandy A.A., Jestin V Servan de Almeida R.S. Newcastle disease virus in Madagascar: identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. *PLoS ONE*. 5(11): 1-12.

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. (en cours de finalisation)

7. Communications

Maminiaina F.O., Gil P., Briand F.X., Albina E., Keita D., Rasamoelina Andriamanivo H., Chevalier V., Renaud L., Martinez D., Jourdan M., Jestin V., Servan de Almeida R., Rakotondravao R., Rajaonarison J.J., Koko M., Andriantsimahavandy A.A. (2010). Newcastle disease virus in Madagascar: identification of an original genotype. *Fourth*

Annual Meeting Epizone, Saint Malo, France.

Gil P., Servan de Almeida R., Hammoumi S., Molia S., Chevalier V., Traore A., Samake K., Albina E. (2009). Molecular Characterization of virulent Newcastle disease viruses isolated in Mali in 2007 and 2008. *Third Annual Meeting Epizone, Antalya, Turkey.*