

Synthèse Virologie

1. Introduction

La composante virologique du projet a les objectifs suivants :

- Les études de prévalence chez les espèces sauvages, commensales et domestiques au travers d'études virologiques.
- La détection moléculaire, l'isolement et la caractérisation moléculaire des souches virales à partir des prélèvements de terrain.
- L'étude phylogénétique et phylogéographique des isolats viraux.
- La formation, le transfert de méthodes et d'expertise vers les laboratoires partenaires du projet (voir rapport spécifique sur la formation)

Outre le CIRAD à Montpellier, cinq autres laboratoires sont partie prenante du dispositif de diagnostic établi pour le projet : le LCV (Mali), le NAHDIC (Ethiopie), l'OVI (Afrique du sud), le FOFIFA (Madagascar) et le NIVR (Vietnam). Ces laboratoires n'ont pas le même niveau d'expertise dans le diagnostic moléculaire. Un programme de formation, d'équipement et d'évaluation a donc été adapté à chaque cas dans le cadre du projet « Mesures d'urgence » financé par le MAE. Ce programme a été clôturé en 2008 par un essai inter laboratoires d'aptitude (EILA) mis en place par le CIRAD et impliquant le LCV, le NAHDIC et le NIVR. Les résultats indiquent que les laboratoires évalués ont eu des résultats assez satisfaisants mais pour les besoins du projet GRIPAVI d'autres EILA devront être organisés sur une base annuelle.

En attendant la mise en place des moyens humains et matériels manquants dans certains laboratoires partenaires, il a été décidé pour la première année du projet GRIPAVI, année de mise en place des dispositifs de terrain, que les échantillons seraient systématiquement soit analysés au CIRAD, soit traités en double au CIRAD et au laboratoire national; le NIVR disposant d'une expérience plus importante en raison de l'épidémie H5N1 effectuera en première intention les analyses relatives au Vietnam. Les analyses de l'observatoire du Zimbabwe ont été réalisées à l'OVI.

2. Moyens mis en place

Un chercheur à temps complet a été recruté dès le début du projet au niveau du laboratoire de virologie du CIRAD. Les échantillons analysés ont été ceux récoltés par les différents chercheurs des autres composantes du projet, y compris les allocataires de recherche. En outre, le projet assure le fonctionnement laboratoire, en particulier le travail d'analyse virologique, pour un allocataire du SCAC de Madagascar, Olivier Fridolin Maminiana qui conduit une thèse co-cadrée par le FOFIFA et le CIRAD sur la caractérisation des virus d'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle circulant sur les Hauts Plateaux de Madagascar.

Un allocataire de recherche en virologie prévu dans le cadre du projet n'a pas encore été recruté. Un candidat avec une formation initiale adaptée n'a pas pu être identifié.

Une mission d'un virologue a été réalisée auprès du NIVR au Vietnam et a permis de conclure que les capacités de ce laboratoire sont suffisantes et les résultats des essais inter laboratoires satisfaisants pour répondre aux besoins d'analyses du projet GRIPAVI.

Concernant les méthodes, la détection moléculaire des gènes M du virus de l'influenza aviaire (VIA) et du virus de la maladie de Newcastle (VMN) et celle des sous-types se fait par la technique 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 OIE (IZSve de Padoue) avec quelques adaptations faites au CIRAD pour optimiser la qualité des résultats. Le protocole RRT-PCR utilisé pour la détection du virus influenza aviaire de sous-type H5 est celui recommandé par le laboratoire de référence OIE (IZSve de Padoue), modifié par le laboratoire européen de référence (VLA de Weybridge). Le protocole RRT-PCR utilisé pour la détection du virus influenza aviaire de sous-type H7 a été développé et optimisé par le laboratoire européen de référence (VLA de Weybridge). La détection du virus de la maladie de Newcastle se fait à l'aide d'une RRT-PCR développée par le CIRAD dans l'objectif de pouvoir faire un diagnostic différentiel VIA/VMN. La réaction a été optimisée avec le couple d'amorce F+4839 et F2 AS tiré de la littérature. Le séquençage est utilisé comme outil d'appui pour permettre le pathotypage des échantillons détectés positifs (VIA ou VMN) par RRT-PCR.

Pour préserver la viabilité des virus, tous les échantillons positifs par RRT-PCR VIA ou VMN sont directement soumis à l'isolement sur œufs embryonnés. Les produits d'amplification des différentes régions du génome sont envoyés au séquençage chez une société spécialisée.

3. Activités 2007 - 2008

En 2007-2008 le CIRAD a reçu et analysés des prélèvements en provenance d'oiseaux sauvages et domestiques de Madagascar, du Mali et de la Mauritanie.

La campagne de prélèvement a été retardée en Ethiopie à cause des difficultés de recrutement du thésard (recruté en octobre 2008) ; les prélèvements ont commencé au Vietnam mais n'ont pas encore été analysés par le NIVR ; les analyses des échantillons prélevés au Zimbabwe sont en cours à l'OVI (voir tableaux des prélèvements en annexe).

Le nombre total d'analyses réalisées au laboratoire du CIRAD en 2007-2008 dans le cadre du projet GRIPAVI apparaissent dans le tableau ci-dessous :

Type d'analyses	Sérologie	RRT-PCR	Isolement viral
Nombre total d'analyses (au 27/11/08)	441	2880	4

Le détail de ces analyses est présenté dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1. Détails des analyses réalisées au CIRAD en 2007-2008 (données au 27/11/2008)

OBSERVATOIRE	MALI			
Type d'échantillons Types d'analyses	Prélevés	Analysés	Positifs (type virus)	Isolés (type virus)
Domestiques				
Sérologie	-	-	-	N/A
RRT-PCR	1250	630	3 (VMN) 0 (VIA)	3 (VMN) 0 (VIA)
Sauvages				
Sérologie	-	-	-	N/A
RRT-PCR	1041	723	12 (VMN) 1 (VIA)	0 (VMN mais 5 prélèvements toujours en cours) 0 (VIA)
Total RRT-PCR Mali	2291	1353	15 (VMN) 1 (VIA)	3 (VMN) 0 (VIA)
OBSERVATOIRE	MADAGASCAR			
Type d'échantillons Types d'analyses	Prélevés	Analysés	Positifs (type virus)	Isolés (type virus)
Domestiques				
Sérologie	1800	441 (FOFIFA)	49 (IA)	N/A
RRT-PCR	1094	730	16 (VMN) 2 AIV	1 (VMN) En cours (AIV)
Sauvages				
Sérologie	-	-	-	N/A
RRT-PCR	-	-	-	-
Total RRT-PCR Madagascar	1094	730	16 (VMN) 2 AIV	1 (VMN) En cours (AIV)
OBSERVATOIRE	MAURITANIE			
Type d'échantillons Types d'analyses	Prélevés	Analysés	Positifs (type virus)	Isolés (type virus)
Domestiques				
Sérologie				
RRT-PCR	56	56	0	0
Sauvages				
Sérologie				
RRT-PCR	741	741	27 (VMN) 1 (VIA)	0 (VMN) 0 (VIA)
Total RRT-PCR	797	797	27 (VMN) 1 (VIA)	0 (VMN) 0 (VIA)

4. Résultats 2007 - 2008

A **Madagascar**, les analyses sérologiques réalisées au cours d'un premier screening transversal sont en cours.

Lors d'un premier séjour au CIRAD de Mr Manminiaina, la caractérisation d'une partie du génome de la souche malgache NDV-Mada/92 a été faite (Souche isolée en 1992 au FOFIFA à partir d'une suspicion MN à Antananarivo). L'analyse phylogénétique a montré que la souche

NDV-Mada/92 est un APVM-1 de classe II et se rapproche des génotypes III et IV, tout en étant assez éloignée des génotypes décrits jusqu'à présent dans la littérature. Les génotypes III et IV sont responsables de la première panzootie de la MN entre 1926 et 1960 et qui a infecté Madagascar pour la première fois en 1946. Dès lors se posent deux questions : est ce que le virus NDV-Mada/92 isolé en 1992, 40 ans après la première panzootie à Madagascar est resté inchangé ? Y a-t-il eu introduction d'autres génotypes ? L'analyse des prélèvements provenant de Madagascar sera fondamentale pour répondre à ces questions. Les données préliminaires obtenues sur une séquence courte du virus isolé en 2008 tendraient à montrer que ce virus est proche du virus 1992.

Au **Mali**, parmi les échantillons analysés en RRT_PCR jusqu'à présent (50% du nombre total) aucun échantillon n'a été positif au VIA (prévalence = 0) tandis que 3 ont été positifs au VMN (prévalence prélèvement = 0,47% ; prévalence oiseaux = 0,95%). Trois souches VMN ont été isolées et les séquences de leur site de clivage du gène F ont montré une série d'au moins 4 acides aminés basiques caractéristiques des souches vélogènes. On notera aussi que sur 446 écouvillons issus de volailles domestiques prélevées dans le cadre du projet « Mesures d'urgence » des prévalences du même ordre avait été trouvées en 2007 (prévalence prélèvement de 0,6% en VIA et 0,45% en VMN) et 3 souches de VMN avaient aussi pu être isolées (aucune en VIA). La séquence du site de clivage de ces isolats correspondant également à un site de clivage vélogène. L'alignement des séquences montre que les souches isolées dans le même site (marché de mopti par exemple) et dans la même année sont identiques entre elles mais différentes des souches isolées dans un autre site (Sikasso) ou dans l'année suivante. L'analyse phylogénétique des 6 isolats montre qu'elles se rapprochent du génotype VII du VMN qui représente le génotype circulant actuellement. Au sein du génotype VII ces souches se rapprochent du sous-génotype VIIb, mais elles ne représentent pas toutes les caractéristiques de ce sous-génotype. L'analyse d'autres régions du génome est en cours.

En **Mauritanie**, tous les échantillons reçus ont été analysés (797) parmi lesquels 27 ont été trouvés positifs pour le VMN (oiseaux sauvages et domestiques) et 1 seul pour le VIA (oiseau sauvage, prélèvement cloacal). Parmi les échantillons positif pour le VMN, 15 sont des prélèvements trachéaux et 12 des cloacaux. Ils correspondent à 3 espèces différentes d'oiseaux sauvages et 1 domestique et des profils de souches vélogènes et lentogènes ont été détectés à la fois dans deux de ces espèces. Cela montre une prévalence échantillon de 0,12% au VIA et 3,4% au VMN. Aucun isolement viral n'a pu être obtenu sur ces échantillons. Quelques hypothèses concernant cet échec peuvent être formulées comme l'adaptation nécessaire des virus originaires des oiseaux sauvages aux œufs de poules, la faible charge virale ou encore le problème de stockage des échantillons durant la campagne de prélèvements.

Les prélèvements viennent de débiter en **Ethiopie** ; les analyses sont en cours au **Vietnam** et au **Zimbabwe**.

5. Conclusions et recommandations

Une très faible prévalence du virus de l'influenza aviaire a été observée chez les oiseaux sauvages et domestiques des observatoires analysés jusqu'à présent. La prévalence du virus de la maladie de Newcastle est également faible bien que systématique supérieure à celle du VIA. Des recommandations pour chaque observatoire ont été discutées au CIRAD et devront être validées par le projet :

- **Ethiopie** : se concentrer essentiellement sur VMN oiseaux domestiques et sauvages, peu d'intérêt de continuer sur VIA.
- **Madagascar** : continuer l'effort sur RRT-PCR VIA et VMN sur volailles domestiques ; l'étude des oiseaux sauvages est en cours de discussion pour 2009 (lac Aloatra).

- **Mali** : continuer RT-PCR VMN oiseaux sauvages et domestiques et RT-PCR VIA oiseaux sauvages
- **Mauritanie** : continuer RT-PCR VMN et VIA oiseaux sauvages (essentiellement limicoles)
- **Vietnam** : intérêt avéré pour continuer RT-PCR VIA, à la fois HP et LP et également Swine Influenza Virus, mais pas VMN.
- **Zimbabwe** : Continuer sur VMN et VIA en oiseaux sauvages et domestiques (thèse A Caron)

Note

Compte tenu des résultats virologiques, il a été décidé d'un point de vue éco-épidémiologique d'augmenter le nombre d'analyses sérologiques prévues par la suite du projet afin d'obtenir les informations suivantes :

- Prévalence VIA et VMN chez des groupes d'oiseaux dont on a aucune information
- Pré-screening avant sélection de zones ou populations d'intérêt et analyses virologiques (intérêt si suivi de population)
- définition du cas sur une base sérologique pour analyses statistiques et épidémiologie quantitatives

La détection des 2 virus est équivalente dans les prélèvements trachéaux et cloacaux. Il est donc recommandé de continuer à prélever les 2 types d'échantillons.

Concernant les souches VMN isolées au Mali, il est surprenant d'avoir isolé des souches vélogènes sur des volailles apparemment en bonne santé et non vaccinées. La vérification du pouvoir pathogène de ces souches en conditions expérimentales est programmée en collaboration avec l'Afssa, laboratoire national de référence sur les pestes aviaires.

La fiabilité des analyses RT-PCR dans les laboratoires du Mali (LCV) et de l'Ethiopie (NAHDIC) n'a pas été démontrée : les doublons des échantillons prélevés en année 1 et analysés au CIRAD n'ont pas été encore analysés au LCV et au NAHDIC, il est donc difficile de conclure sur la fiabilité de leur diagnostic. Il a donc été proposé que les analyses en année 2 du projet soient effectuées au laboratoire du CIRAD sans doublons dans les laboratoires partenaires afin qu'ils puissent se concentrer sur les échantillons année 1 ; ce point devra être rediscuté en année 3 en fonction des résultats obtenus par ces laboratoires sur les prélèvements de l'année 1.