Analyse et modélisation des risques d'introduction et de diffusion par l'avifaune sauvage des virus influenza aviaire dans des écosystèmes africains et asiatiques

Candidat : **Julien Cappelle**

Superviseurs : S. Morand et M. Gilbert
Institutions : Univ. Montpellier II ; Univ. Libre de Bruxelles

BILAN de l'année 2

Principaux résultats

Les deux premières années du projet on été marquées par une prépondérance du travail de terrain pour la récolte de données environnementales et épidémiologiques. Une mission a été menée lors de chaque saison majeure du cycle hydrologique du DIN (crue, décrue et étiage), lors des deux années. Ces 6 missions ont permis de remplir les objectifs de récolte d'échantillons biologiques et de données environnementales.

- Des comptages ornithologiques on été effectués de manière à prolonger le travail fait par nos partenaires (WI, ONCFS) et déjà en cours depuis plus de 10 ans. Nous avons ainsi contribué à compléter les bases de données ornithologiques existantes pour le DIN. Ceci nous permet également de mettre en place nos analyses sur la base de ces données cumulées.
- Un total de 2785 oiseaux sauvages a été prélevé sur l'ensemble de ces missions. Ceci permet la constitution d'une banque d'échantillons biologiques dont la majeure partie sera analysé via le projet Gripavi et permettra de produire pour la première fois des informations issue d'un suivi longitudinal sur la circulation des virus de peste aviaire en Afrique de l'Ouest.

Les premières analyses écologiques sont en cours (cf. § précédent) et vont permettre de mieux estimer le rôle que joue l'avifaune sauvage dans la circulation de ces virus. Elles permettront également de mettre en place des systèmes de surveillance de l'avifaune sauvage mieux adaptés et plus précis d'un point de vue temporel, spatial et écologique. Ces travaux sont en cours et deux articles complémentaires sont en préparation, chaque doctorant (Bouba Fofana et Julien Cappelle) étant responsable d'un.

Les premières analyses virologiques (sur les échantillons récoltés en 2008) tendent à montrer une très faible circulation de virus Influenza aviaire lors de l'absence des oiseaux migrateurs. Ceci est en faveur de l'hypothèse d'une introduction de virus influenza par les migrateurs paléarctiques expliquant les prévalences plus élevées atteintes entre janvier et mars. Par contre les prévalences mesurées pour le virus de la maladie de Newcastle sont beaucoup plus élevées et vont permettre de mieux comprendre le rôle des oiseaux sauvages dans le cycle de ce virus. Cependant, étant donné la forte variabilité environnementale interannuelle de cette région, il est préférable d'avoir les résultats virologiques pour les deux années afin de confirmer ces premiers résultats.

Publications scientifiques

Soumises

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 1 in West-Africa, implication of wild birds. (quel journal ??)

En préparation

Cappelle, J., B. Fofana, O. Girard, B. Kone, N. Gaidet, M. Gilbert. Modelling the spatial distribution of wild birds in the IND, Mali to predict the emergence of avian inluenza.

Cappelle,J., B. Fofana, G. Balanca, N.Gaidet. Epidemiological yearly cycle of avian influenza and Newcastle disease viruses in wild birds of the Inner Niger Delta in Mali.

Fofana, B., G.Balanca, J.Cappelle, A.Caron, N.Gaidet. Estimating the risk of avian influenza virus circulation in wild birds of the Inner Niger Delta in Mali from an ecological community analysis.

Communications orales

Gaidet N., Cattoli G., Dodman T., Hammoumi S., Caron A., Cappelle J., Monne I., Fusaro A., Manu S., Hagemeijer W., Takekawa J. Y., Newman S. H.. Epidemiological investigations of Avian Influenza Viruses in wild birds in Eastern Europe, the Middle East and Africa. Second Pan-European Duck Symposium, 23-25 Mars 2009, Montpellier, France.

Cappelle, J. M. Spatial distribution of wild waterbirds in the Inner Niger Delata in Mali. “Host-Pathogen Community Interaction: from Mobility to Contact” ATP Emergence First Meeting, 28-29 avril 2009, Montpellier, France.

PERSPECTIVES

La dernière année du projet à venir devrait permettre de finaliser les analyses écologiques et épidémiologiques, ce qui permettra une production scientifique (publication d’articles) et opérationnelle (mise en place de surveillance) en fin de projet.

Circulation de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle chez la volaille au Mali : enquêtes épidémiologiques et modélisation en vue d'améliorer la surveillance et le contrôle

Candidate : **Sophie Molia**, DVM, DESV, MPVM

Superviseur : D. Pfeiffer; J. Guitian, A. Ghani
Institution : Royal Veterinary College, University of London

BILAN de l'année 2

Principaux résultats

Question de recherche 1 : Prévalence

- Les analyses de laboratoire des prélèvements 2008 se sont poursuivies jusque juin 2009. Elles ont été retardées par des problèmes de dédouanement des kits de diagnostic commandés en Europe et par l'endommagement de la machine à PCR en temps réel du LCV suite à des problèmes d'approvisionnement en courant. Cette machine à PCR en temps réel a été envoyée à Vienne pour réparation et n'a été renvoyée en état de marche à Bamako qu'en novembre 2009
- Le détail des analyses est donné en Annexe 2. Globalement le pourcentage d'échantillons positifs pour l'influenza aviaire est faible en PCR (0%) et en sérologie (3,1%). Le pourcentage d'échantillons positifs pour la maladie de Newcastle est faible en PCR (3,6%) mais élevé en sérologie (73,9%). Ce pourcentage élevé d'échantillons positifs en sérologie Newcastle témoigne à la fois d'un excellent taux de séroconversion (99,6%) chez les volailles commerciales vaccinées, d'un taux de séroconversion plutôt satisfaisant (71,0%) chez les volailles traditionnelles vaccinées, et d'une très forte circulation du virus de la maladie de Newcastle chez les volailles traditionnelles non vaccinées puisque 87,0% présentaient des anticorps
- L'analyse des facteurs influençant la séroprévalence chez les volailles traditionnelles non vaccinées a montré que seule la région avait une influence sur la séroprévalence de l'influenza aviaire (Mopti > Sikasso), tandis que la séroprévalence Newcastle est influencée par l'espèce (poulet > canard), le sexe (femelle > mâle), l'âge (adulte > jeune) et la région (Sikasso > Mopti)
- Compte tenu de ces résultats et des biais rencontrés lors des enquêtes 2008 (manque de représentativité des villages enquêtés et couverture géographique limitée), il a été décidé, en concertation avec les partenaires maliens du projet (DNSV, LCV), de changer la stratégie des campagnes de prélèvement 2009-2010. La zone d'étude a ainsi été étendue aux 5 premières régions du Mali (qui totalisent près de 95% des effectifs nationaux de volaille), et les villages à enquêter ont été sélectionnés par échantillonnage aléatoire proportionnel au nombre de ménages de chaque village. Une liste de 32 villages a ainsi été établie. Par ailleurs, afin de permettre un suivi longitudinal et d'identifier la saisonnalité de la circulation des virus influenza et de la maladie de Newcastle, il a été décidé de procéder à des prélèvements dans ces villages tous les trois mois et chez les mêmes propriétaires de volaille. Des missions de sensibilisation ont ainsi été conduites en octobre 2009 dans les villages concernés afin d'obtenir la coopération des éleveurs

- La première campagne de prélèvement utilisant cette nouvelle stratégie a été conduite en novembre 2009 et a permis de récolter 1031 sérums. Du fait des coûts élevés d'analyse et de la très faible prévalence par les techniques PCR ce qui limite les possibilités d'identification statistique de facteurs de risque, il a été décidé de ne prélever des écouvillons que sur un seul animal dans chaque concession enquêtée. Un nombre total de 256 écouvillons (128 trachéaux et 128 cloacaux) a ainsi été récolté durant la campagne de prélèvement de novembre 2009.

Question de recherche 2 : Identification et caractérisation des souches de virus chez les volailles domestiques

- Deux souches de virus de la maladie de Newcastle ont été isolées en 2009. Le séquençage et les analyses phylogénétiques de ces deux souches ont montré qu'elles étaient identiques et vélogènes
- Les analyses phylogénétiques basées sur 500 nucléotides du gène F de ces deux dernières souches et des souches isolées pendant la première année du projet montrent qu'elles appartiennent au génotype VII, actuellement responsable des foyers de MN en Afrique, Asie et Europe. Deux de ces souches appartiennent aux sous-génotypes VIIh et VIIg, récemment décrits comme circulant dans des pays voisins comme le Nigeria et Burkina Faso (Snoeck et al, 2009) tandis que les autres souches forment un cluster phylogénétique assez éloigné de tous les autres sous-génotypes décrits dans la littérature. Pour classer ces souches, un nouveau sous-génotype, le VIIi a ainsi été proposé (Servan de Almeida et al, 2009)
- Afin de poursuivre ce travail sur l'identification des souches d'influenza et de maladie de Newcastle circulant chez la volaille domestique, un thésard en virologie a été recruté au LCV, Mr Martin Dakouo, qui sera encadré par Renata Servan de Almeida et Emmanuel Albina. Ce thésard a effectué un premier séjour de deux mois (septembre-octobre) au laboratoire du CIRAD à Montpellier afin d'être formé aux techniques diagnostiques

Question de recherche 3 : Caractérisation des marchés de volailles du district de Bamako

- La bibliographie, le recrutement d'un stagiaire de l'IPR/IFRA de Katibougou, et le design de la méthodologie ont été réalisés d'avril à juin 2009
- Les enquêtes de terrain ont été conduites entre juillet et octobre 2009 au niveau des 56 marchés de volaille du district de Bamako et les données ont été saisies dans une base de données
- Les données ont été analysées en novembre et décembre 2009 et une réunion de restitution des résultats est prévue pour janvier 2010. Cette réunion permettra de définir les termes de référence de la suite de l'étude de la filière avicole, notamment la mise en place d'une étude similaire dans les marchés des régions de Kayes, Koulikoro, Sikasso, Ségou et Mopti

Question de recherche 4 : Système de surveillance des pestes aviaires

- La bibliographie, le design de la méthodologie, le recrutement d'un stagiaire de Master SAEPS de Montpellier, et les premiers entretiens avec la DNSV ont été réalisés de janvier à avril 2009
- Les enquêtes de terrain ont été conduites entre mai et juillet 2009 auprès des 61 unités du réseau de surveillance situées dans la moitié sud du pays et les données ont été saisies dans une base de données
- Une restitution partielle des résultats a eu lieu en août 2009 à la DNSV durant laquelle il a été recommandé de faire valider la base de données par l'Unité centrale d'EPIVET et les directeurs des DRSV ayant été visitées (Kayes, Koulikoro, Sikasso, Segou, Mopti, Bamako)

- Entre septembre et novembre 2009, la base de données a été validée, le système de surveillance noté par quatre personnes ressources en matière d'épidémiosurveillance (dont deux faisant partie d'EPIVET et deux pas) sur la base de la grille d'évaluation élaborée spécifiquement pour l'étude
- L'analyse des notes et l'élaboration de recommandations pour améliorer le fonctionnement d'EPIVET seront effectuées en 2010

Publications scientifiques :

Acceptées

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

- Molia S, Traoré A, Gil P, Hammoumi S, Lesceu S, Servan de Almeida R Albina E, Chevalier V. Avian influenza in backyard poultry of the Mopti region, Mali. Trop Anim Health Prod 2009. In press

Soumises

- 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 1 in West-Africa, implication of wild birds. *(soumise à EID)*

Communications orales

- Molia S, Samaké K, Diarra A, Kanté S, Kamissoko B, Diakité A, Sidibé MS, Doumbia L, Camara S, Gil P, Hammoumi S, Servan de Almeida R, Albina E. Varying circulation levels of avian influenza and Newcastle disease viruses in domestic chickens and ducks of the Mopti and Sikasso regions, Mali, in 2008. 12th Conference of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Durban, South Africa, August 10-14 2009

Posters

- Molia S, Traoré A, Gil P, Hammoumi S, Lesceu S, Servan de Almeida R, Albina E, Chevalier V. Avian influenza in the Mopti region, Mali" 2009 meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, London, UK, 1st-3rd April 2009

PERSPECTIVES

La troisième année du projet (et deuxième année de thèse) permettra :

- d'obtenir des données de prévalence représentatives et couvrant la moitié sud du territoire malien qui totalise plus de 95% de la population de volailles
- de continuer le travail d'isolement et de typage des souches circulant dans le compartiment volaille domestique
- d'élargir les enquêtes sur la filière avicole en fournissant des données pour les marchés des 5 régions de la moitié sud du Mali, en particulier celle de Sikasso qui est la plus intéressante en terme d'approvisionnement de Bamako et de proximité avec des pays ayant connu des foyers d'IAHP H5N1
- de finaliser l'étude du réseau de surveillance des pestes aviaires

Etude du rôle des composantes structurelles et fonctionnelles des communautés d'oiseaux réservoirs de pathogènes dans les processus épidémiologiques dans le Delta du Niger (Mali)

Candidat : **Bouba FOFANA**

Superviseurs : M. Maiga (directeur de thèse, Université de Bamako), G. Balança (Cirad)

BILAN de l'année 2

Principaux résultats

Travail de terrain

Les deux premières années du projet on été surtout consacrées au travail de terrain pour la récolte de données environnementales et épidémiologiques. Une mission a été menée lors de chaque saison majeure du cycle hydrologique du delta du Niger (crue, décrue et étiage), lors des deux années. Ces six missions ont permis de remplir les objectifs de récolte d'échantillons biologiques et de données environnementales.

- Des comptages ornithologiques ont permis de prolonger le travail fait par nos partenaires (Wetlands International, Office national de la Chasse) depuis plus de 10 ans. Nous avons ainsi contribué à compléter les bases de données ornithologiques existantes pour le delta du Niger. Ceci nous permet également de mettre en place nos analyses sur la base de ces données cumulées.

- 2785 oiseaux sauvages ont été prélevés pendant ces missions. La majeure partie de cette banque d'échantillons biologiques sera analysée dans le cadre du projet Gripavi et permettra de produire pour la première fois des informations issues d'un suivi longitudinal sur la circulation des virus de peste aviaire en Afrique de l'Ouest.

Traitement des données

Les premières analyses écologiques, basées sur les comptages réalisés au cours des missions de terrain et sur l'expérience du doctorant, sont en cours. Elles vont permettre de mieux estimer le rôle que joue l'avifaune sauvage dans la circulation de ces virus. Elles contribueront aussi à la mise en place d'une surveillance épidémiologique de l'avifaune sauvage mieux adaptée d'un point de vue temporel, spatial et écologique. Ces travaux d'analyse sont en cours et deux articles complémentaires sont en préparation, chaque doctorant (Bouba Fofana et Julien Cappelle) étant responsable de l'un d'eux.

Les premières analyses virologiques (sur les échantillons récoltés en 2008) tendent à montrer une très faible circulation de virus Influenza aviaire lors de l'absence des oiseaux migrateurs d'origine paléarctique. Ceci est en faveur de l'hypothèse d'une introduction de virus influenza par les migrateurs paléarctiques expliquant les prévalences plus élevées atteintes entre janvier et mars. Par contre, les prévalences mesurées pour le virus de la maladie de Newcastle sont beaucoup plus élevées et vont permettre de mieux comprendre le rôle des oiseaux sauvages dans le cycle de ce virus. Cependant, étant donné la forte variabilité environnementale interannuelle de cette région, il est préférable d'avoir les résultats virologiques pour les deux années afin de confirmer ces premiers résultats.

Publications scientifiques en préparation :

Cappelle, J., B. Fofana, O. Girard, B. Kone, N. Gaidet, M. Gilbert. Modelling the spatial distribution of wild birds in the IND, Mali to predict the emergence of avian inluenza.

Cappelle,J., B. Fofana, G. Balança, N. Gaidet. Epidemiological yearly cycle of avian influenza and Newcastle disease viruses in wild birds of the Inner Niger Delta in Mali.

Fofana, B., G. Balança, J. Cappelle, A. Caron, N. Gaidet. Estimating the risk of avian influenza virus circulation in wild birds of the Inner Niger Delta in Mali from an ecological community analysis.

PERSPECTIVES

La dernière année du projet à venir devrait permettre de finaliser les analyses écologiques et épidémiologiques, de publier les résultats sous forme d'articles scientifiques et devrait déboucher sur la mise en place d'une surveillance améliorée des pestes aviaires en fin de projet.

Describing and Understanding Host-Pathogen Community Interactions at the Wildlife/Domestic Interface

Candidat: **Alexandre Caron**, DVM, MSc

Superviseur : Elissa Cameron, MRI Director
Institutions : CIRAD, Dept. Environment & Societies, UR 22 "Wildlife Integrated Management", Mammal Research Institute, Dept. Zoology & Entomology, U. Of Pretoria

BILAN de l'année 2

Principaux résultats

En fin 2009, la partie descriptive de chacun des compartiments, tant du point de vue écologique que du point de vue épidémiologique a été réalisée et est en cours d'analyse et de publication.

Compartiment « oiseaux d'eaux »

Deux années de récolte des données ont été réalisées de mai 2007 à mars 2009 : en tout 12 missions de comptage et capture ont permis de réaliser :

- **360 heures d'observation** des communautés d'oiseaux d'eau
- **2159 oiseaux sauvages concernant 101 espcèes** ont été capturés, comprenant 1975 oiseaux échantillonnés et 184 recaptures directes non ré-échantillonnées ; pour chaque oiseau, 2 écouvillons cloacaux et 2 écouvillons trachéaux ont été collectés ; un frottis sanguin ; des plumes et des données biométriques classiques.
- Les résultats PCR pour AIV ont été quasiment tous envoyés par l'OVI au responsable de l'observatoire et les analyses sont en cours ; il semble que pour au moins les 10 premières missions, la prévalence AIV soit non nulle montrant une persistance de ces virus tout au long de l'année dans un écosystème africain (fait jamais encore démontré – article court en cours de rédaction) ; les espèces les plus touchées sont les canards à bec rouge, les dendrocygnes veufs et les jacanas africains (mais ces espèces sont aussi celles avec le plus grand nombre d'échantillons) ; aucune isolation n'a pu être effectuée à partir de ces prélèvements ;

Une première analyse des données de comptage montre une variation des populations d'oiseaux corrélées avec la pluviométrie de l'année précédente et le niveau des lacs (qui offrent en s'asséchant des niches alimentaires propices aux oiseaux d'eau). Suite à ces premiers résultats et au vue de la saison des pluies 2008-2009 qui semble contrastée par rapport à celles de 2006-2007 et 2007-2008, nous avons décidé de continuer les comptages sur les sites les plus représentatifs (7 en tout) tous les 2 mois et couplés avec des comptages dans les compartiments domestiques (cf ci-dessous). En parallèle, des comptages totaux des lacs sont toujours en cours 4 fois par an et devraient s'arrêter en Avril 2010 (contrat avec experts en ornithologie).

Compartiment « poulets intensifs »

500 poulets ont été échantillonnés en 08/08, 12/08 et 05/09 respectivement à des âges de 5 semaines (poulets de chair), 53 semaines (pondeuses) et 21 semaines (pondeuses). Tous les échantillons se sont révélés **négatifs pour la sérologie AIV** ; ces animaux sont **vaccinés contre la NCDV** et donc la sérologie de détection de ce virus s'est avérée **fortement positive (en moyenne 93%)** ; tous ces oiseaux ont été prélevés en écouvillons trachéaux et cloacaux et certains ont été

analysés **en PCR** ; les résultats venant d'arriver, il semble qu'une **faible prévalence existe** (analyse en cours). Les tests PCR NCDV sont en cours.

Compartiment « autruches d'élevage »

A cause de la situation économique dans le pays, le secteur élevage d'autruche dans la région des lacs Chivero et Manyame s'est arrêté fin 2008. L'ensemble des animaux (500 autruches) a été abattu fin 2008 et début 2009. A cette occasion, l'équipe a pu prélever ces oiseaux à l'abattoir. **2% de séroprévalence AIV** ont été trouvés sur le premier lot de 300 et **34% de séroprévalence AIV** sur le 2ème lot ; ces différences reflètent sûrement la différence dans l'âge des animaux.

Compartiment « poulets de basse cours »

Ce compartiment est a priori le plus intéressant en termes de contact sauvage/domestique. En effet, les poulets de basse-cours sont laissés en divagation pendant la journée dans et autour des villages-compounds. C'est donc le compartiment qui a fait et fait encore l'objet du plus gros effort d'activités.

- **1335 poulets prélevés** (sang + écouvillons stockés) ; plus de 650 de ces échantillons ont été prélevés en 11/08 pour tester la relation entre séroprévalence AIV et distance par rapport au lac. Malheureusement, toutes les sérologies se sont avérées **négatives pour AIV**. Les sérologies NCDV ont détectées des séroprévalences élevées, justifiées parfois par une vaccination (élevage en périphérie des élevages d'autruches qui effectuaient des vaccinations 2 fois par an dans un périmètre de 10kms) : **80,3% (n=254) de séroprévalence NCDV chez les poulets vaccinés et 79,5% (n=648) chez les poulets non vaccinés**. Des enquêtes de terrain ont été réalisées afin de confirmer que les poulets non-vaccinés ne l'étaient pas. Il semble qu'aucun éleveur n'ait vacciné ses poulets contre quoi que ce soit pendant la période de l'étude. Certains résultats de PCR viennent d'être envoyés par l'OVI et **la positivité PCR est très faible mais non nulle dans ce compartiment pour AIV**. Les tests PCR pour NCDV sont en cours.

Compartiment « espèces relais potentielles »

A la suite de l'année de comptage dans les compartiments domestiques et sauvages, les communautés en présence ont été analysées suivant un protocole utilisant les présence/absence de chaque espèce mais aussi les facteurs de risque dynamiques et non-dynamiques. Ainsi une courbe annuelle de risque d'interaction entre chaque compartiment domestique et le compartiment sauvage a pu être mise en relation avec la courbe de risque de circulation des AIV dans le compartiment sauvage (encore une fois basé uniquement sur des critères écologiques et non épidémiologiques). Ces courbes permettent de mettre en évidence pour chaque compartiment domestique les périodes de l'année les plus à risque d'être contaminée par le compartiment sauvage. Les 2 pics d'interaction pour chaque compartiment domestique ont été étudiés et des espèces potentielles relais ont été identifiées.

Publications scientifiques :

Acceptées

- **Caron, A.**, **Gaidet N., de Garine-Wichatitsky, M**., Morand, S., **Cameron, E.** Evolutionary Biology, Community Ecology and Avian Influenza Research. Infections, Genetics & Evolution, 9: 298-303. DOI information: 10.1016/j.meegid.2008.12.001

En préparation

- **Caron, A., Gaidet, N., Cumming, G., de Garine-Wichatitsky, M.** Estimating epidemiological interaction using community ecology: Risk of introduction of AIV strains by bridge species from the waterfowl community into three domestic bird compartments in the lake Manyame-Chivero ecosystem, Zimbabwe.
- **Caron, A., Abolnik, C., Cumming, G.** Yearly circulation of avian influenza virus in waterbird population in Zimbabwe.
- **Mundava, J., Caron, A., de Garine-Wichatitsky, M., Gaidet, N., Mundy, P.** Trends in community composition of waterfowl at 2 neighbouring lakes in Zimbabwe: determinants and relation to introduction and maintenance of AIV in the system.
- **Mundava, J., Caron, A., de Garine-Wichatitsky, M., Gaidet, N., Mundy, P.** Temporal variation of waterfowl dynamics related to age of birds in relation to AIV epidemiology.

Présentations dans des congrès/conférences

- **Caron A., Cumming G.S., Albonik C.,** Chiweshe N., **de Garine-Wichatitsky M**. A community approach to explore host-pathogen interactions at the wildlife/domestic interface: avian communities and avian influenza in a Zimbabwean ecosystem. *ISVEE Conference XII, 10-14 August 2009, Durban, South Africa.*
- **Caron A.** & **de Garine-Wichatitsky M.** Using community ecology to infer epidemiological interactions. *"Host-Pathogen Community Interaction: from Mobility to Contact" ATP Emergence First Meeting, 28-29 avril 2009, Montpellier, France.*
- **Gaidet N.,** Cattoli G., Dodman T., Hammoumi S., **Caron A**., Cappelle J., Monne I., Fusaro A., Manu S., Hagemeijer W., Takekawa J. Y., Newman S. H.. Epidemiological investigations of Avian Influenza Viruses in wild birds in Eastern Europe, the Middle East and Africa. *Second Pan-European Duck Symposium, 23-25 Mars 2009, Montpellier, France.*
- **Caron, A.**, Fritz, H., Morand, S., **de Garine-Wichatitsky, M.** 2008. Network of Interaction, Geographic Mosaic of Coevolution and Community Ecology: Sanitary Risk at the Wildlife / Livestock Interface. *Meeting of the two GDRIs on Biodiversity and Sustainable Use in the context of Global Change - Madagascar and Southern Africa at the Corum and CNRS, 3rd November 2008, Montpellier, France.*

Posters

- **Mundava J., Mundy P., Caron A., Gaidet N., de Garine-Wichatitsky M.,** Couto T., Couto F. An ecological approach to estimating the risks of introduction, maintenance and spread of avian influenza viruses in the Chivero and Manyame Ecosystem. *ISVEE Conference XII, 10-14 August 2009, Durban, South Africa.*

- **Mundava J., Mundy P., Caron A**., Couto T., Couto F., **de Garine-Wichatitsky M.** Seasonal trends in waterbird numbers, community structure and species diversity in Lakes Chivero and Manyame (Zimbabwe), 1993-2003. *Second Pan-European Duck Symposium, 23-25 Mars 2009, Montpellier, France.*

Communication dans des formations

Caron A. Investigating outbreaks in wild birds. *Support Program for Integrated National Action Plan (SPINAP) for Avian and Human Influenza Provisional Rapid Response Teams (RRTs) Training of Trainers (ToT) Workshop Programme, 19-23 October 2009, Masvingo, Zimbabwe.*

Caron A. Collection and preservation of samples from wild birds. *Support Program for Integrated National Action Plan (SPINAP) for Avian and Human Influenza Provisional Rapid Response Teams (RRTs) Training of Trainers (ToT) Workshop Programme, 19-23 October 2009, Masvingo, Zimbabwe.*

PERSPECTIVES

Compartiment « oiseaux d'eaux »

Afin de permettre de mettre en place d'autres protocoles, les sessions de capture ont été arrêtées après 2 ans de suivi longitudinal. Cependant, il est prévu 3 séances de capture par an afin de continuer à suivre l'évolution de la circulation du virus et de valider en continu le modèle proposé. En sus de ce protocole de routine, il est prévu un protocole spécial concernant les espèces de cormorans présentes sur le site. En effet, les cormorans sont très présents mais les systèmes de capture mis en place n'ont pas permis d'en échantillonner. Ainsi fin 2009, des prélèvements spécifiques sur fèces cibleront ces espèces.

Compartiment « poulets intensifs »

Des prélèvements à intervalle régulier seront réalisés en routine dans ce compartiment 2 à 3 fois par an (mais la sérologie Newcastle sera arrêtée).

Compartiment « autruches d'élevage »

Des discussions avec C. Abolnik de l'OVI ont abordé le cas de la West Nile. Il semble que dans les élevages d'autruches sud-africains, ce virus circule sans rapport officiel pour l'instant. Il a donc été décidé de développé avec l'OVI un projet autour de la West Nile sur les autruches et autres (cf « Transversalité pathogènes »).

Compartiment « poulets de basse cours »

Un **protocole de capture/recapture** (**CMR**) a été mis en place depuis le 11/08 ; **200 poulets** dans 2 élevages ont été initialement bagués et sont « recapturés » tous les mois depuis ; la population de poulets bagués est maintenue à 200 et ils sont prélevés 3 fois par an pour suivre leur statut sanitaire (AIV, NCDV et West Nile). Ce protocole permettra de déterminer avec précision les paramètres de dynamiques de populations dans ces élevages. Une base de données est mise à jour tous les mois.
Un protocole de capture/recapture sur foyer NCDV a aussi été réfléchi avec V. Grosbois afin d'intervenir potentiellement sur foyer (l'équipe avait été informé en 2008 de foyers dans le site d'étude). En cas d'information sur des mortalités importantes, des séances de capture de 3 jours consécutifs seront réalisées à une semaine d'intervalle, l'objectif étant de déterminer les paramètres de transmission du virus dans la population (estimation du R0).

Les analyses de la première année de CMR sur poulets de basse-cours devraient commencer début 2010.

Compartiment « espèces relais potentielles »

Cette approche permet de mettre en place un programme d'échantillonnage sur ces espèces potentiellement relai afin de confirmer ou non ce rôle épidémiologique. Ces protocoles « relai » ont commencé fin 2009 et continueront en 2010.

La transversalité « Pathogènes »

L'objectif scientifique final de cet observatoire est de quantifier les interactions épidémiologiques entre les différents compartiments qu'ils soient sauvages ou domestiques afin de prédire le comportement de souches fortement pathogènes lors d'une émergence. Comme prévu, les résultats de comptage réalisés dans les compartiments sauvages et domestiques permettent de mettre en évidence des interactions d'hôtes (espèces relais) entre les différents compartiments. Cette première approche qualifiée d' « approche hôtes » peut-être renforcée par une « approche pathogènes ». En effet les modes de contamination de différents pathogènes exigent des contacts entre hôtes, directs ou indirects. Ces contacts peuvent être inférés *a posteriori* à partir des résultats de prévalence sur les souches LPAI mais aussi d'autres pathogènes comme la maladie de Newcastle, la West Nile ou le cholera aviaire. L'ensemble de ces informations peut permettre d'identifier les grandes voies de transmission dans l'écosystème et permettre de modéliser pour contrôler les interactions épidémiologiques entre les différentes populations aviaires.
C'est pourquoi en addition des virus AI et NCD, il a été décidé d'ajouter le diagnostique du virus de la West Nile et le maximum d'autres pathogènes. En collaboration avec l'OVI, 1 ou 2 mastères seront mis en place en 2010 sur la West Nile. La collaboration avec le FPI permettra d'accéder au diagnostique d'autres pathogènes.

Using Waterbird Ornithological Data in Predicting the Transmission, Maintenance and Spread of Avian Influenza Virus in Zimbabwe

Candidat: **Josphine Mundava**

Superviseur : Peter Mundy, NUST
Institutions : National University of Science and Technology (Bulawayo, Zimbabwe)

BILAN de l'année 2

Principaux résultats

Mademoiselle Mundava, thésarde à l'Université de Bulawayo (NUST) et enregistrée en thèse depuis le début de l'année 2008 a proposé en Octobre 2009 un plan de thèse détaillé qui a été discuté lors d'une réunion avec les principaux superviseurs (à l'exception du Dr. Gaidet) le 22 Octobre 2009. Les 2 premiers chapitres de sa thèse reposent sur des analyses de bases de données et bibliographique pour analyser :

1) L'évolution des communautés d'oiseaux d'eau sur une base de données de 10 ans, leur relation avec des données environnementales et les hypothèses de circulation des virus AIV basées sur ces facteurs écologiques (article en préparation ; soumission prévue fin 2009)

2) La modélisation des dynamiques de populations des principales espèces d'oiseaux d'eau en fonction de la proportion de juvéniles dans la population ; ce modèle sera discuté en fonction de la probabilité de maintenance et de dissémination des virus AIV au Zimbabwe (article en préparation ; soumission prévue premier semestre 2010).

Pour son troisième chapitre, la thésarde met en place des protocoles pour étudier le rôle des juvéniles dans la circulation des virus. Il a donc été décidé, à partir de l'étude des cartes de reproduction (chaptitre2) et comme la reproduction des espèces clés ne se fait sur le site d'étude Chivero-Manyame d'ajouter un site de reproduction autour de l'observatoire. Le site de Hwange (National Park) semble être un lieu idéal pour prélever et tester des jeunes canards avant qu'ils aient acquis leur capacité à voler. En complément des captures sur Chivero-Manyame, 2 séances de capture seront donc prévues à Hwange en 2010 (notamment en février-mars 2010).

Publications scientifiques :

En préparation

- **Mundava, J., Caron, A., de Garine-Wichatitsky, M., Gaidet, N., Mundy, P.** Trends in community composition of waterfowl at 2 neighbouring lakes in Zimbabwe: determinants and relation to introduction and maintenance of AIV in the system. *In prep. (draft circulated, submission in 2009)*
- **Mundava, J., Caron, A., de Garine-Wichatitsky, M., Gaidet, N., Mundy, P.** Temporal variation of waterfowl dynamics related to age of birds in relation to AIV epidemiology. *In prep. (submission beginning 2010)*

Posters

- **Mundava J., Mundy P., Caron A., Gaidet N., de Garine-Wichatitsky M.,** Couto T., Couto F. An ecological approach to estimating the risks of introduction, maintenance and spread of avian

influenza viruses in the Chivero and Manyame Ecosystem. *ISVEE Conference XII, 10-14 August 2009, Durban, South Africa.*

- **Mundava J., Mundy P., Caron A**., Couto T., Couto F., **de Garine-Wichatitsky M.** Seasonal trends in waterbird numbers, community structure and species diversity in Lakes Chivero and Manyame (Zimbabwe), 1993-2003. *Second Pan-European Duck Symposium, 23-25 Mars 2009, Montpellier, France.*

PERSPECTIVES

- Protocole Hwange – Thésarde Zimbabwe

Ce protocole vise à étudier le rôle des dynamiques de reproduction des principales espèces de canards représentées dans l'écosystème et notamment le rôle dans un contexte africain joué par l'entrée dans la population des juvéniles des espèces les plus importantes pour la circulation du virus. En effet, en Amérique du Nord comme en Europe, ce rôle des juvéniles est important dans l'écologie des virus AI (Stallknecht *et al*. 1990, Olsen et al. 2006). En Afrique, il est inconnu.

Epidemiology of Newcastle disease in Ethiopia: Identification of risk factors and evaluation of the role of poultry markets in the seasonal pattern of NCD outbreaks

Candidate: **Hassen Chaka**, DVM, MSc

Supervisor: Peter Thompson, University of Pretoria
Institutions: National Animal Health Disease Investigations Center (Sebata, Ethiopia)

BILAN de l'année 2

Principaux résultats

Enquêtes transversales répétées de prévalence virologique sur marchés

L'intérêt premier de ces enquêtes transversales est d'identifier à différente période de l'année (en saison de haute circulation et de basse circulation virale) le type de souche virale Newcastle circulante. L'idée est de mettre en relation les souches circulantes entre les différents marchés et les villages qui approvisionnent ou s'approvisionnent ces marchés. Puis de comparer d'une année sur l'autre la diversité des souches.

Pour cela, des écouvillons trachéaux et cloacaux sont collectés sur 6 marchés (marches identifiés au préalable au cours de l'étude de filière) durant 3 mois consécutifs (Juin, Juillet et Aout). Un total de 719 oiseaux ont été prélevés, les analyses sont en cours.

Enquêtes transversales répétées de prévalence sur villages

Le premier objectif est d'estimer la séroprévalence de la NCD dans les villages des Weredas d' Ada'a Liban et d'Adami Tulu Jido Kombolcha. L'idée étant également d'identifier des souches de virus circulantes dans les villages lors de prélèvements d'animaux malades.

Le deuxième objectif est d'identifier les différents facteurs de risques de l'apparition de foyers de NCD à l'échelle du village et de la ferme.

Pour cela, des sérum sur 4 poulets par fermes (un pool de sérum par ferme), des écouvillons trachéaux et cloacaux sur les animaux malades, un questionnaire large sur l'environnement de la ferme et sur les pratiques d'élevage, de vente et d'échanges d'animaux ont été collectés/renseignés. Un total de 250 fermes a été interviewé et 1000 oiseaux prélevés, les analyses sont en cours.

Publications scientifiques :

Posters :

Goutard F, Olive MM, Vallée E, **Chaka H**, Duboz R, Thompson PN , Roger F (2009) Exploring trade patterns and contact structure of poultry movement in Oromia and NNP regions in Ethiopia, to determine potential role of markets in the spread of NCD between villages. Proceedings of the 12th symposium of the International Society for veterinary Epidemiology and Economics, Durban, South Africa, 10-14 August 2009.

PERSPECTIVES

L'année 2010 permettra aux différentes études de terrain de se poursuivre :

- deuxième études SNA sur les marchés en recouvrant une zone géographique plus grande, comparaison entre deux saisons avec des niveaux d'échanges différents
- deuxième étude marchés en saison de basse circulation virale couplée avec une étude sérologique pour suivre le niveau de séroprévalence des marchés et des villages connectés.
- Etudes des pathologies aviaires les plus fréquentes en dehors de la NCD (sérologie) avec une approche laboratoire et participative
- deuxième étude villages en saison de forte circulation virale (dans les mêmes villages que l'enquête 1 pour comparer les niveaux de prévalence)

Il faudra également valoriser les résultats de l'année 1 :

- Article sur l'analyse des flux de volaille
- Analyse laboratoire des prélèvements
- Analyse des premières données de l'enquête village (facteurs de risques)

Déterminants et patrons épidémiologiques d'introduction, de diffusion et de persistance du virus influenza aviaire hautement pathogène H5N1 dans la région du delta du fleuve rouge au Nord Vietnam. Conséquences en termes de surveillance

Candidate : **Stéphanie DESVAUX,** DVM; Msc

Superviseur: S. Fenwick; F. Roger
Institutions: Univ. Murdoch, Australie; CIRAD-AGIRs

BILAN de l'année 2

Principaux résultats

Ces travaux s'attachent à comprendre les déterminants de l'influenza aviaire hautement pathogène H5N1 dans le Nord Vietnam, plus précisément dans le delta du Fleuve Rouge.

L'objectif général étant d'u**tiliser les résultats des études et modèles épidémiologiques pour proposer un système de surveillance efficient, ciblé** pour l'influenza hautement pathogène au Vietnam.

Différentes approches ont été mise en œuvre : épidémiologie quantitative (facteurs de risques), écologie appliquée (avifaune péri-domestique, facteurs de risques) et modélisation comme outil d'analyse et d'aide à la décision. La modélisation sera avant tout axée autour des outils SMA (Système Multi-Agents) en collaboration étroite avec l'IRD et l'Institut français d'informatique de Hanoi.

- E**tude rétrospective** sur le Nord Vietnam

L'échelle de travaille représente le Nord Vietnam, correspondant à 5603 communes.

En fin d'année 2 les activités suivantes en été réalisées:

- Collecte des données relatives aux foyers de H5N1 depuis différentes sources (déclaration OIE, données mise en ligne par les services vétérinaires et base de données FAO)
- Collecte des informations sur les populations à risque, les campagnes de vaccination et l'occupation des sols sur plusieurs districts (3 districts de Bac Giang et 2 districts de Hai Duong).
- Extraction des données « environnementales » par l'interprétation d'images satellites (stage master de S.Tollis).

Les données nettoyées sont maintenant prêtes à être analysées par les méthodes de statistiques spatiales.
Un total de 549 foyers a été rapporté sur cette zone depuis la vague de foyer d'octobre 2005 (vague 3). Les vagues précédentes ont été exclues de l'analyse car mal renseignées.

- **Etude cas témoin des foyers 2007 dans la province de Bac Giang**

Cette étude vise à identifier différents facteurs de risques de l'apparition de foyers de H5N1 à l'échelle du village et de la ferme.

19 villages cas et 38 villages contrôles ainsi que 18 fermes cas et 18 contrôles ont été enquêté en année 1.

De nouvelles variables ont été intégrées en année 2 (variables extraites d'images satelitte + données issus de données géoréférencées)

Les analyses initiales ont été réalisées en fin d'années 2 et plusieurs facteurs de risques semblent ressortir (par exemple : présence de gros élevages dans le village, présence d'un commerçant de volailles vivantes dans le village, nombre de lots d'animaux de chair).

Une publication est en cours de finalisation sur cette étude.

- **Etude longitudinale : l'observatoire**

L'objectif général de cette étude vise à suivre l'évolution de la prévalence de virus influenza sur les oiseaux domestiques et sauvages et de suivre la prévalence d'anticorps contre de virus H5 dans le but de comprendre les mécanismes épidémiologiques de cette maladie.

Pour rappel, l'observatoire Vietnam est composé de 9 communes situées dans 2 provinces du Delta du Fleuve Rouge

Résultats :

Après une phase initiale d'identification de l'observatoire et de discussion avec les autorités locales, un contrat a pu être signé avec les services vétérinaires des 2 provinces pour démarrer les campagnes de prélèvements en décembre 2008.

Les quatre campagnes de prélèvements ont pu être finalisées en année 2 du projet.

- Un total de 4356 oiseaux domestiques échantillonnés dans 239 élevages et 67 villages..
- 1247 échantillons collectés dans les marchés de volailles vivantes
- 784 oiseaux sauvages prélevés.

Jusqu'à présent les analyses sérologiques ont été analysées mais les analyses virologiques sont toujours en cours.

Il sort d'une première analyse des résultats que le taux de couverture vaccinale est largement en deçà des taux annoncés par les services vétérinaires avec un taux maximal de 20% d'animaux présentant des anticorps sur les différentes campagnes (sans différentiation des anticorps vaccinaux des anticorps post-infection).

Publications scientifiques :

Publiées :

Desvaux S., Hoa. D P. T.T.. Gripavi, a project to study avian influenza and newcastle disease: epidemiological studies in Vietnam. Prise Scientific committee proceedings. 2008. Hanoi, Vietnam.

Communications orales / Posters

Ariane Payne, Stéphanie Desvaux, Karine Chalvet-Monfray, Jean-François Renard, Dominique J. Bicout. Flux de volailles et propagation de l'Influenza aviaire dans la filière avicole au Vietnam. Proceeding conférence AEEMA, juin 2009.

C. Le Bas, S. Desvaux, P. D. Thang, N. V. Duy, N. C. Oanh, H. Q. Hanh, V. D. Ton, J.-F. Renard. High Pathogenic Avian Influenza in the Poultry Production systems in Vietnam: Tentative Approach for a Semi-Quantitative Risk Assessment Methodology. Prise Scientific committee proceedings. Hanoi, Vietnam.

R.Duboz, S.Desvaux, V.Grosbois, B.Bonté. Simulation of avian influenza propagation in the poultry production network of the North Vietnam. Poster. Conférence Epidemics, Décembre 2009.

PERSPECTIVES

L'année 2010 sera une année importante pour l'analyse et la valorisation des données collectées en année 2.
D'autre part, certaines activités de terrain vont se poursuivre tel que :

- l'étude sur l'efficacité de la vaccination ;
- l'étude sur le risque d'introduction depuis la Chine

D'autres vont démarrer dans le prolongement des études déjà réalisées, tel que :

- une étude d'évaluation de la vaccination (M.Peyre, S.Desvaux)

Étude épidémiologique de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle à Madagascar

Candidat **: Rasamoelina Andriamanivo Harentsoaniaina**

Superviseurs : Co-directeurs de thèse: Renaud Lancelot & Serge Morand ; Responsable Observatoire et encadrement : Véronique Chevalier
Institution : Univ. Montpellier II (SIBAGHE)

BILAN de l'année 2

Objectifs Principaux

1. Décrire les acteurs, leurs relations et les facteurs de risque de transmission des agents pathogènes entre eux
   - Classifier et décrire les élevages suivant les profils d'exposition aux facteurs/marqueurs de risque de transmission inter-élevages des agents pathogènes
   - Classifier et décrire les relations entre ces classes et les réseaux de commercialisation
   - Evaluer les niveaux de circulation de l'IA et de la NCD et les facteurs associés
2. Décrire, analyser et modéliser les dynamiques de l'IA et MN au sein des réseaux d'acteurs formés par les élevages et les filières de productions avicoles
   - Identifier la ou les structures des réseaux d'acteurs et évaluer leurs caractéristiques
   - Tracer et décrire la circulation des virus dans ces réseaux

Principaux résultats

1. Etudes des filières

La classification des élevages en fonction des risques de transmission des pathogènes inter-élevages (Figure 2) a permis d'identifier 4 grands types d'élevages : (i) canards gras et poulets gasy en milieu sec et à faible densité ; (ii) oies et autres espèces en milieu humide, bâtiment ouvert, vente au village, taille d'élevage moyenne ; (iii) poules pondeuses, protection sanitaire élevée ; (iV) coqs de combats, claustration, vaccination.

La classification de ces élevages au regards de leurs échanges commerciaux avec les autres acteurs de la filière (Figure 3) a permis d'identifier 4 classes , ces classes incluant ou non les classes précédemment décrites : (i) renouvellement et vente à un seul marché ; (ii) pas de relations avec les marchés ; (iii) fortes interaction avec plusieurs marchés, collecteurs, vente au village , vente hors région ; (iv) renouvellement par couvoir, peu de relation avec marchés locaux mais vente hors région, et débouchés fixes

L'étude des relations entre types d'élevage et les réseaux commerciaux (Figure 4) montre qu'il existe 4 types de relations : (i) les **élevages de poulets locaux et de canards gras** achètent et vendent au marché. Ils **fréquentent généralement un seul marché** de type communal, ou de type régional ; (ii) **élevages de coqs de combat** et quelques élevages de poulets locaux. Ne fréquentent pas les marchés. Vendent à des collecteurs ou des débouchés fixes ; (iii) Les **élevages de poules pondeuses** renouvellent leur cheptel par les couvoirs. Entretiennent des relations fixes avec les collecteurs et les débouchés fixes, ainsi qu'avec les marchés hors régionaux ; (iv) les **élevages de palmipèdes et autres** espèces entretiennent de fortes interactions avec les marchés villageois ou communaux.

2. Enquêtes de prévalence

Jusqu'à présent, 360 échantillons prélevés sur la faune domestique en 2009 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 d'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 n'a été trouvé positif en VIA.

Pour le moment, trois souches VMN ont été isolées sur la campagne de prélèvements domestiques de 2009. D'autres isolements sont en cours.

Des analyses phylogénetiques et moléculaires ont été réalisées sur 6 nouvelles souches du VMN isolées de la faune domestique aux alentours d'Antananarivo et du Lac Alaotra.
L'ensemble des souches NDV isolée et analysées à Madagascar est nommé Groupe MG.
Les analyses phylogénétiques du Groupe MG montrent que le Groupe MG forme un cluster unique en dehors des autres génotypes déjà décrits et présents dans le clade des anciens génotypes responsables de la première épizootie de maladie de Newcastle dans le monde entre 1926 et 1960. Ce Groupe MG dans le clade des anciens génotypes peut constituer un autre génotype que nous proposons comme génotype XI ou lignage 3g. Ce nouveau génotype XI existe dans les deux sites (Antananarivo et Lac Alaotra) d'étude et chez différentes espèces d'oiseaux (Gallus gallus et Anas sp). Toutes les souches du Groupe MG isolées et classées dans le nouveau génotype XI présentent le même site de clivage inédit que la souche MG/1992 (présentés dans le rapport d'activité du projet GRIPAVI, année 1). Le génotype XI semble prédominer lors de manifestations cliniques de la maladie car il a été isolé sur la majorité des animaux malades. Le plus surprenant est que tous ces animaux ont été vaccinés contra la MN. De plus, en incluant une analyse sur les courtes séquences produites (76 à 80pb du gène F) à partir des souches dont l'isolement n'a pas abouti, nous pouvons suspecter la présence d'autres génotypes anciens I et III et du génotype plus récent, le génotype VII circulant actuellement en Afrique et Asie.

Plusieurs hypothèses à confirmer peuvent être émises à l'issue de ces résultats : le nouveau génotype XI pourrait être le génotype le plus prévalent à Madagascar et être responsable des cas cliniques de la MN dans l'ile. La confirmation de la présence du génotype VII, montrerait que des introductions de VMN ont eu lieu après 1980, date où la première épizootie de la MN causée par ce génotype a été signalée pour la première fois en Asie. La présence du génotype III, si elle était confirmée, pourrait être consécutive à une circulation des virus vaccinaux. Signalons que le vaccin issu de la souche Mukteswar, appartient à ce génotype et est le vaccin le plus utilisé en milieu villageois (surtout chez les coqs de combat).

Publications scientifiques :

En préparation:

Poultry breeding and trade in Madagascar: description and identification of risk factors
H. Rasamoelina et al

Ecological risk factors of IA and NCD virus presence in Madagascar
V. Chevalier, H. Rasamoelina, L. Guerrini et al

Modelling of the circulation of IA and NCD using SNA in Madagascar
H. Rasamoelina et al

PERSPECTIVES

Description des élevages et des filières et données de prévalence

L'analyse des données pour ces 2 études ne sont pas terminées et sont en cours.
Pour l'étude de typologie des élevages, il s'agit de :

- Vérifier la distribution spatiale des types d'élevages.
- Classer les élevages de l'enquête de prévalence parmi les types d'élevages identifiés et vérifier le niveau de prévalence instantanée par type d'élevage

Pour l'étude de prévalence, il s'agit de :

- Calculer les associations statistiques entre les séroprévalences et les types d'élevages et les variables qui ont servis de critères de stratification (espèces et types de milieu)
- Vérifier les autocorrélations spatiales

Les autres activités vont être centrées sur le site du Lac Alaotra, vu les niveaux de prévalence qu'on y a observé et surtout pour des questions logistiques et organisationnelles.

Construction du modèle de réseaux d'acteurs (SNA)

La collecte des données pour la construction de ce(s) réseau(x) d'acteurs est en cours.
Pour compléter les données déjà disponibles, quelques enquêtes sont prévues :

- Des fiches d'enquêtes ont déjà été distribuées aux agents communautaires de santé animale (ACSA). Ces fiches d'enquêtes renseignent les pratiques commerciales dans les villages où ces ACSA interviennent. Ces ACSA se réunissent une fois par mois, et ce sera lors de ces réunions que ces fiches seront récupérées, discutées (focus groupe) et validées. Ce qui donnera une très bonne image des circuits de commercialisation, des acteurs concernés et de la nature et le flux des échanges.
- Le contact a été établi auprès de certains marchés pour discuter des aspects approvisionnements et débouchés des produits avicoles. Des focus groupes sont aussi possible avec les associations de commerçants de volailles. Une enquête ay départ des marchés est aussi prévue en vue d'identifier les points de collecte autour de ces marchés.
- En résumé, il s'agit de faire une approche participative avec des informations de diverses natures et recueillies de plusieurs manières : focus groupe, observation directe, interviews semi-structures, valorisation des donnée s données secondaires. Une démarche de triangulation sera nécessaire avant de valider les informations. Cette partie du travail est déjà bien entamée, prévue se terminer au plus tard en fin janvier 2009 (schéma du réseau validé).

Surveillance épidémiologique

Le dispositif de surveillance épidémiologique est en place. Il est basé sur les réseaux d'ACSA et de vétérinaires sanitaires, les services vétérinaires et AVSF. L'équipe d'intervention est prête à répondre aux alertes. Le laboratoire d'analyse est le FOFIFA/DRZV. Des réunions d'animation sont prévues dont les premiers auront lieu vers la dernière semaine du mois de novembre 2009 (une réunion avec les vétérinaires et deux réunions avec 2 associations d'ACSA différentes).

Thèses démarrées en 2009

Analyse et modélisation du risque de transmission du virus Influenza type A entre les filières avicoles et porcines au Vietnam

Candidate : **Karen TREVENNEC,** DVM; Msc

Superviseur: S. Morand; F. Roger
Institutions: ENVT; CIRAD-AGIRs

Thème : Epidémiologie (et écologie) des virus influenza
Sujet : Analyse et modélisation du risque de transmission du virus Influenza type A entre les filières avicoles et porcines au Vietnam
Contexte : Pandémie A-H1N1 ; Aucune donnée influenza porcin au Vietnam ; Epizootie/panzootie influenza aviaire ; connaissance épidémiologie pour approches opérationnelles : analyse de risque, surveillance et contrôle
Terrain : Vietnam
Discipline : Epidémiologie, surveillance et contrôle des maladies animales
Mots clés : Influenza type A, épidémiologie, transmissions interspécifiques, surveillance, contrôle, Vietnam

Comité de thèse

École Doctorale de rattachement : SIBAGHE – Montpellier 2
Établissement d'inscription de la thèse : Université de Montpellier 2, France
Directeur de Thèse : Serge MORAND, UM2-CNRS
Comité de Pilotage de la Thèse : *UM2-CNRS, CIRAD, INRA, ENVT*
François Roger (épidémiologie, CIRAD)
Marie Noel De Visscher (écologie, CIRAD)
Christian Ducrot (épidémiologie, INRA de Clermont-Ferrand/Theix, Unité Epidémiologie Animale)
Jean Luc Guérin (virologie et pathologie aviaire, INRA-ENVT)

Résumé introductif

L'espèce porcine revêt une importance particulière dans l'épidémiologie des virus influenza car elle est potentiellement porteuse de virus influenza porcin, aviaire et humain. Un porc doublement infecté par une souche aviaire hautement pathogène et une souche porcine ou humaine peut participer à l'émergence d'une souche pandémique. La transmission interspécifique, bien que rare, est favorisée par des systèmes d'élevage mixtes où plusieurs espèces animales cohabitent dans le même environnement. Le risque s'accroit en particulier lorsque la prévalence du virus est forte, comme c'est le cas au Vietnam. Le faible niveau de biosécurité des élevages traditionnels et les fortes densités animales dans les bassins de production sont autant de facteurs de risque qui participent au maintient du virus influenza dans le pays. Les filières avicoles et porcines seront étudiées par des méthodes d'épidémiologie quantitative et d'analyse de risque. Une approche économique s'appliquera

aux domaines de la santé et des filières. Cette étude sur la transmission interspécifique des virus influenza vise à réduire la circulation virale entre les différents secteurs de production.

Présentation du projet

Présentation sommaire

Introduction

Le contrôle et l'éradication des virus pandémiques A-H1N1 et zoonotique H5N1 de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) est une priorité internationale.
La forte variabilité génétique des virus influenza de type A ne s'exprime pas uniquement au niveau du réservoir naturel du virus (oiseaux aquatiques) mais aussi chez d'autres espèces hôtes. Le porc revêt une importance particulière dans l'épidémiologie des virus influenza car il est potentiellement porteur de plusieurs sous types viraux. Principal réservoir des sous types viraux H1N1, H3N2 et H1N2, l'espèce est potentiellement réceptive à tous les autres sous types connus. Malgré un potentiel de réplication restreint, un porc coinfecté par plusieurs souches virales peut être le siège de recombinaisons génétiques et conduire à l'émergence de souches pandémiques.
Le séquençage génétique des 3 sous types porcins de virus influenza, H1N1, H3N2 et H1N2, révèle des souches dites « avian like » et/ou « human like », c'est-à-dire des séquences issues de virus aviaires ou humains. Cette mixité génétique du virus est la preuve de la circulation du virus influenza entre les espèces avicole, porcine et humaine. De nombreux cas de transmission interspécifiques ont été recensés impliquant des espèces avicoles, porcine et l'Homme. Par exemple, la souche H1N1 impliquée dans la pandémie de 1918 était d'origine aviaire. Une forte recrudescence de ce sous-type avait été constatée chez le porc à cette période là, témoignant d'une probable transmission interspécifique d'humains à porcs.
En 2004 la souche H5N1 IAHP est isolée chez le porc en Chine. L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), préconise le renforcement de la surveillance et l'évaluation des conséquences de la présence du virus H5N1 IAHP dans cette espèce. La campagne de prélèvement qui suivit, ne permis pas d'isoler le virus H5N1 IAHP chez le porc (4447 prélèvements).
En 2009, la souche pandémique A-H1N1 a été isolée chez le porc à plusieurs reprises, dans des pays différents. Cependant, la transmission du virus entre porc n'a pas encore été mise en évidence.
Les systèmes d'élevage au Vietnam semblent propices aux transmissions interspécifiques des virus influenza : mélange des espèces, fortes densités animale et humaine et faible niveau de biosécurité. Le Vietnam se caractérise par une production avicole et porcine importante et croissante. Mais malgré le développement rapide des filières de productions industrielles dans le delta du Fleuve Rouge et le delta du Mékong, l'élevage traditionnel y reste largement prédominant tant pour les volailles que pour les porcs. L'intérêt d'un modèle épidémiologique résidera dans sa capacité à étudier des scénarios hypothétiques et à fournir aux décideurs des informations anticipées sur les conséquences de la transmission interspécifique du virus influenza et sur l'impact des stratégies d'intervention.

Questions de recherche et objectif des travaux

Question générale

Quel est le risque qu'un porc soit infecté par le virus de l'influenza au Vietnam, notamment par le virus de l'influenza aviaire ?

Questions spécifiques

Les porcs sont-ils ou ont-ils été infectés par le virus de l'influenza ?
Le virus influenza type A circule-t-il à la fois chez les porcs et les volailles au Vietnam?
Quel est le risque d'introduction du virus influenza aviaire dans un élevage de porc?
Quel est le risque qu'un porc dans un élevage s'infecte par le virus de l'influenza ?
Quelles seraient les conséquences du franchissement de la barrière d'espèce ?

Objectif général

Évaluer le risque de transmission du virus Influenza type A entre les oiseaux et les porcs, puis de proposer une stratégie de surveillance adaptée axée sur la détection précoce de l'émergence de nouveaux sous-types viraux chez le porc.

Terrain et cadre théorique de la recherche

Terrain : le Vietnam, aucune donnée publiée sur l'influenza porcin, infecté par H5N1 HPAI depuis fin 2003

Situation épidémiologique de l'influenza porcin en Asie du Sud Est

Aucune étude n'avait été réalisée jusque ce jour sur l'influenza porcin au Vietnam.
La revue bibliographique des résultats de surveillance de l'influenza porcin en Asie du Sud Est, dont les résultats sont présentés sur la figure 1.

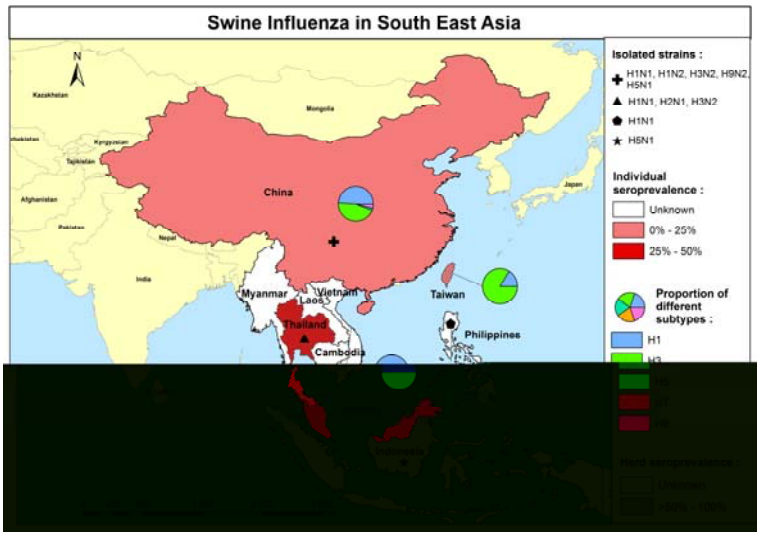

Figure 1: Carte représentant la situation épidémiologique de l'influenza porcin en Asie du Sud Est, d'après les études publiées

Aux vues des données publiées, l'influenza porcin circule dans plusieurs pays du Sud est asiatique, avec un niveau de séroprévalence proche de 15-20%. Des souches ont été isolées en Chine, Thaïlande, Philippines et Indonésie. Les sous-types les plus répandus sont les sous-types connus chez le porc. En revanche, les sous-types H5N1 et H9N2 aviaires ont également été mis en évidence à plusieurs reprises en Chine et en Indonésie.
Cette revue effectuée en 2009 a permis d'identifier quels étaient les sous-types à surveiller et d'émettre des recommandations en termes de surveillance dans les pays du Sud Est Asiatique. Ces travaux seront soumis prochainement au journal Veterinary Research (facteur d'impact > 3).

Situation épidémiologique de l'influenza aviaire au Vietnam

Le Vietnam a connu 3 vagues épidémiques de H5N1 IAHP. La première vague de janvier à mi-février 2004, la seconde vague de janvier à mars 2005 et la troisième vague de novembre à mi décembre 2005. La durée des vagues épidémiques varie de 2 à 4 mois. Elle dépend de la persistance des facteurs de risque, et donc de la rapidité d'intervention des services vétérinaires. Le 3ème vague est plus précoce et moins importante, grâce à la campagne de vaccination et aux autres mesures de contrôle. Une 4ème vague a débuté en décembre 2006 et sévit toujours en 2008. Elle est causée probablement par l'absence de suivi de la campagne de vaccination.

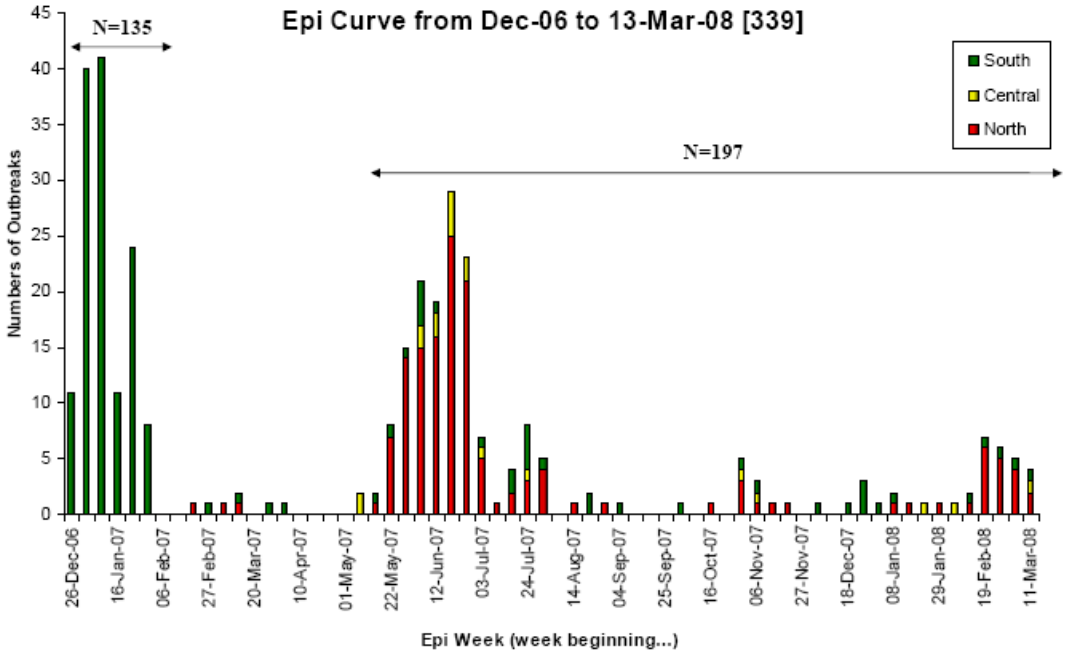

Figure 2: Déclarations de foyers H5N1 HPAI entre 2006 et 2008 au Vietnam

Les campagnes de vaccination continuent. Depuis, le Vietnam déclare encore périodiquement des nouveaux cas de H5N1 HPAI sur l'ensemble du pays.

Concernant les autres sous-types viraux, peu d'études donnent la situation épidémiologique.

La première étude de prévalence des différents sous types du virus influenza aviaire au Vietnam date de 2001. Quatre sous types de virus sont isolés sur les marchés d'oiseaux vivants à Hanoï: H4N6 (1/13), H5N2 (1/13), H9N3 (2/13) chez le canard et H5N1 (2/33) chez l'oie. Le taux d'isolement viral est de 31% chez le canard, contre 6,1% chez l'oie. Au total, 98 poulets ont été testés, mais aucun virus influenza aviaire n'a été isolé. Tous les animaux testés étaient asymptomatiques [1].
En 2005, une enquête sérologique dans une province du delta du Fleuve Rouge, met en évidence la présence des sous-types suivants : H5, H3 et H12. Les séroprévalences obtenues sont les suivantes :
chez les poulets : 5,8% de H5, 36,2% de H3 et 30,6% de H12
chez les canards : 77,6% de H5, 10,5% de H3 et 14,4% de H12
chez les canards de Barbarie : 24,1% de H5, 17,2% de H3 et 5,2% de H12
L'étude virologique n'a permis d'isoler qu'une souche H12 chez un canard de Barbarie [2].

Sous types de virus influenza présents au Vietnam, taux d'isolement viral et séroprévalence (2001-2005)

Sous type	Espèce	Isolement viral	Sérologie %
H3	Poulet	-	36.2
	Canard	-	10.5
	Canard de B	-	17.2
H4	Canard	1/13 (7.7%)	-
H5	Poulet	-	5.8
	Canard	-	77.6
	Canard de B	-	24.1
H5N1	Oie	2/33 (6%)	-
H5N2	Canard	1/13 (7.7%)	-
H9N3	Canard	2/13 (15,4%)	-
H12	Poulet	-	30.6
	Canard	-	14.4
	Canard de B	-	5.2

Tableau 1: Revue synthétique des études de l'influenza aviaire au Vietnam

Le dispositif de recherche au Vietnam

Le CIRAD travaille au Vietnam en santé et production animales dans le cadre d'un consortium de recherche, Prise, Pole de Recherche sur les risques liés à l'intensification des systèmes d'élevage. Prise regroupe 4 structures de recherches vietnamiennes, dont le NIVR (National Institute of Veterinary Research) qui en assure actuellement la présidence et accueille également la candidate. Prise est l'interlocuteur national du projet Gripavi dont la candidate assure la coordination au Vietnam.
Le NIVR dépend du Ministère de l'Agriculture. L'unité de virologie, principal interlocuteur dans le projet de thèse, est le laboratoire national de référence pour la confirmation et le typage des souches d'Influenza aviaire. Elle possède les capacités de diagnostic nécessaires aux travaux envisagés (RRT-PCR, RT-PCR, inoculation de virus, séquençage, sérologie).

Méthodologie proposée

Etude virologique et séro-épidémiologique de l'influenza porcin et aviaire dans les différents systèmes d'élevage

Les montagnes du Nord Vietnam

L'analyse séro-épidémiologique de l'influenza porcin et aviaire dans la région des montagnes du Nord Vietnam a pour but d'évaluer le niveau de prévalence de ces virus dans les élevages extensifs et familiaux, et les facteurs de risque d'infection.

Questions de recherche associées

1. Quelle est la prévalence du SIV?
2. Quelle est la prévalence de AIV?
3. Quels sont les sous-types qui circulent?
4. Quels sont les facteurs de risque de séropositivité à l'échelle du village?

Introduction

Le projet BIODIVA FSP 2001-111 « Caractérisation et valorisation de la biodiversité animale domestique et sauvage des zones montagneuses du Vietnam » s'est terminé en 2008. La zone d'étude limitrophe de la Chine et peuplée par les minorités ethniques est caractérisée par des systèmes d'élevage de type traditionnel familiaux, comme le montre la photo ci-dessous.

Figure 3: Elevage de porc dans les montagnes du Nord Vietnam

Au cours de ce projet, une banque de sérums a été constituée (Thèse de Cécile Berthouilly). Cette serothèque est constituée de 1541 sérums de porcs et 2848 sérums de poulets. En 2006, 352 sérums de poulets ont été testés avec le test Idexx®. L'influenza aviaire type A est détecté chez 27% (25,3 – 28,6) des poulets, et le sous-type H9 a été identifié. Les suites envisagées par le rapport l'évaluation finale externe pour le projet BIODIVA étaient en 2008 :

- Etude séro-épidémiologique et sociologique de l'impact de la vaccination contre la grippe aviaire
- Etudier l'importance des épizooties dans les performances des petits élevages
- Projet sur la résistance génétique aux maladies des races des poulets locaux

Méthode et résultats en 2009

Nous avons donc testé l'ensemble de la sérothèque, avec le test Idvet®, de manière à estimer la seroprévalence de l'influenza type A chez les porcs et les volailles. L'analyse statistique a été entamée. Elle devra être finalisée en choisissant une unité épidémiologique adaptée, en précisant la définition du cas et en tenant compte d'éventuels clusters géographiques. En fonction des résultats définitifs, ces travaux pourront éventuellement être intégrés dans les publications sur les études transversales ou faire l'objet d'une communication distincte.

Le Delta du Fleuve Rouge

L'analyse virologique et séro-épidémiologique de l'influenza porcin et aviaire dans la région du Delta du Fleuve Rouge a pour but d'évaluer le niveau de prévalence de ces virus dans les élevages semi-commerciaux et familiaux, et les facteurs de risque d'infection.

Questions de recherche associées

1. Quelle est la prévalence du SIV?
2. Quelle est la prévalence de AIV?
3. Quels sont les sous-types qui circulent?
4. Les porcs sont-ils infectés par le virus AIV?
5. Quels sont les facteurs de risque de séropositivité à l'échelle de l'élevage?

Introduction

Cette zone d'étude est caractérisée par une forte densité de porcs et de volailles, avec des systèmes familiaux ou semi-commerciaux. Les porcs et les volailles peuvent être élevés sur le même site, avec possibilité de contacts directs ou indirects, comme le montrent les photos ci-dessous.

Figure 4: élevage porcin et basse cour dans le delta du Fleuve Rouge

Figure 5: élevage mixte porc, poulet de chair et pisciculture dans le Delta du Fleuve Rouge

La notion de contact est définie en termes de distance, de fréquence et d'intensité. Ces paramètres dépendent du degré de claustration des animaux et du nombre d'animaux sur le site. Les photos ci-dessus illustrent bien la notion de contact proche, fréquent mais peu intense dans le cas d'une basse cour, ou de contact indirect, peu fréquent mais sous une forte pression infectieuse dans le cas d'un élevage commercial. Ces notions restent cependant à préciser, par l'étude de facteurs de risque, qui permettra d'identifier une typologie des élevages en fonction du contact porc-volailles.

Méthode et résultats en 2009

Les résultats de l'enquête en mars 2009 sont bien en faveur d'une circulation virale dans les élevages de porcs avec une séroprévalence de l'influenza porcin proche de 17%. L'interprétation des résultats sérologiques a permis d'identifier une définition éventuelle de l'élevage « cas sérologique », qui servira pour les études suivantes. Cependant la notion de définition du cas doit encore être précisée, ce qui devra faire l'objet d'un intérêt particulier. Concernant la viro-prévalence, l'ensemble des résultats étaient négatifs chez les porcs et chez les volailles, ce qui renforce l'idée que le virus circule à bas bruit dans les élevages de porcs. L'analyse de ce résultat doit cependant être précisée par une analyse statistique bayésienne, tenant compte de l'incertitude et de la variabilité des performances des tests diagnostiques. L'isolement viral étant particulièrement difficile, une étude supplémentaire est nécessaire.

Concernant l'approche séro-épidémiologique, grâce à l'étude de plus de 30 variables, des indicateurs de risque et des indicateurs de protection ont pu être mis en évidence, notamment liés à

l'association élevage porc/volaille. Ces facteurs de risque concernant les élevages monospécifiques *versus* multispécifiques devraient être étudiés plus en détail avec des enquêtes analytiques.
Le travail effectué sera valorisé sous forme de publications dans une revue à fort facteur d'impact :
"Serological and virological survey of SIV and AIV in Vietnam and risk factors of cross species transmission"
C.Trévennec, M. Petit Sinturel, E. Baudon, S. Desvaux, NIVR, HK (?), S. Morand, F. Roger

Enquêtes en cours fin 2009-2010

Suite à une longue réflexion sur la faisabilité et sur le coût d'un suivi longitudinal de type cohorte ou cas/témoin, il a été finalement décidé d'effectuer 2 enquêtes transversales en début et en fin de saison froide pour des raisons de faisabilité. La période et la fréquence des prélèvements cible plus précisément la saison des syndromes respiratoires porcins dans le Delta du Fleuve Rouge. Cette période a pu être définie grâce à l'enquête transversale préliminaire effectuée en 2009.

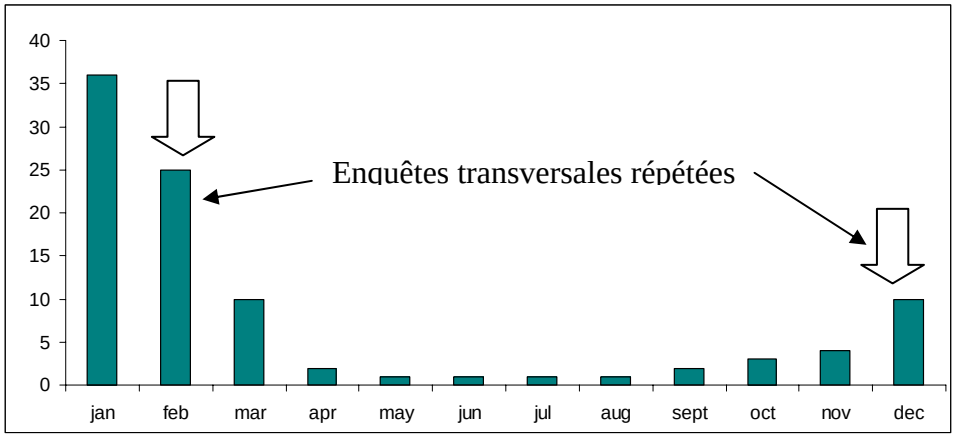

Figure 6: Fréquence des syndromes respiratoires d'après dires d'éleveurs (résultat enquête transversale mars 2009)

Ces nouvelles études transversales répétées permettront de suivre l'évolution de la prévalence et des facteurs de risque de l'influenza porcin et aviaire, et de confirmer le rôle de la présence de volailles dans les élevages.

« Chasse au virus » dans le Delta du Fleuve Rouge

La surveillance systématique ou occasionnelle dans les élevages ou en abattoir sur animaux sains fournit des taux d'isolement très faibles et nécessite de très grands échantillons. L'une des principales raisons est la durée d'excrétion virale courte. La surveillance virologique peut s'organiser en 2 stratégies, qui menées de front augmenteront les chances d'isoler le virus et de détecter précocement les émergences de nouveau sous-types. Une surveillance virologique efficace repose nécessairement sur un réseau de détection précoce des syndromes respiratoires.
Mais, le taux d'isolement du virus de l'influenza porcin dans les élevages présentant des signes cliniques est inférieur à 10% [3]. La surveillance des syndromes respiratoires doit être complémentée par un suivi en abattoir, de manière à optimiser nos chances d'isoler le virus.

Surveillance des syndromes respiratoires porcins dans les fermes

Objectif

Détection et isolement du virus influenza porcin dans les élevages du Vietnam, en vue de sa caractérisation génétique et antigénique.

Introduction

En l'absence de critère clinique et épidémiologique permettant de faire le diagnostic de l'influenza porcin et la fréquence des coïnfections, la définition du cas porte sur le complexe respiratoire porcin (CRP) en général. Il provoque un syndrome respiratoire caractérisé par la toux et la dyspnée, de la fièvre, une baisse de croissance, une chute de consommation voire une anorexie chez les porcs en croissance. Plusieurs agents pathogènes sont à l'origine de ce complexe. Virus et bactéries interviennent seuls ou en coinfection [4]. Le CRP peut atteindre un taux de morbidité dans les élevages de 80% en quelques jours [5, 6]. Parmi les différents agents pathogènes respiratoires, des études montrent que le virus influenza est mis en cause dans 10% à 20% des cas de CRP [5, 7].

Méthode et résultats en 2009

Les cas seront recrutés sur la base des déclarations par les éleveurs. Seront donc considérés comme *cas suspect* d'influenza, les élevages où au moins 3 animaux présentent des signes respiratoires (dyspnée, toux, jetage) avec fièvre (hyperthermie, chute de consommation…). Sur le terrain, nous avons utilisé le test Flu Detect Synbiotics® sur les porcs, porcelets, et truies. Ce kit est un test d'immunomigration rapide de détection qualitative du virus de l'influenza type A. Il détecte les 16 sous types de virus influenza type A. Au total 17 fermes présentant un syndrome respiratoire ont été visitées. Tous les tests de détection rapide, ainsi que les RRT PCR ont été négatifs.

Enquêtes en cours fin 2009-2010

La surveillance des syndromes respiratoires se poursuit dans les fermes de porcs pendant l'hiver 2009-2010.

Suivi longitudinal en abattoir

Objectifs

- Virologie : isolement du virus influenza porcin
- Epidémiologie descriptive : effectuer le profil sérologique et virologique des infections respiratoires chez le porc, en particulier du virus influenza porcin, dans le delta du Fleuve Rouge et dans le Nord Vietnam.
- Epidémiologie analytique : étude des déterminants temporels de l'influenza porcine dans le delta du Fleuve Rouge.

Introduction

Les provinces du Delta du Fleuve Rouge produisent plus de 25% de la production nationale de porcs. Les abattoirs au Sud de Hanoi sont regroupés dans une zone d'abattage. Environ 10 abattoirs indépendants, abattent chacun jusqu'à 100-150 porcs par jour. Les animaux proviennent des provinces de Hai Duong, Ha Tay, Bac Ninh et Hung Yen. Ils sont acheminés par les petits et/ou grand collecteurs de porcs.

Méthode et résultats en cours d'analyse

Cette enquête longitudinale dans les grands abattoirs a débuté en octobre 2009 et doit durer 1 an, pendant lequel nous effectuons des prélèvements mensuels. Cette étude offre la possibilité de prélever un grand nombre d'échantillon, avec un échantillonnage aléatoire. Pour chaque animal, une

prise de sang et un double prélèvement trachéal sont réalisés, de manière à optimiser nos chances d'isoler le virus. Un questionnaire est rempli sur l'origine des procs et le débit d'abattage de la journée. L'isolement du virus se fera à l'université de Hong Kong, sur cellules MDCK, cette technique n'étant pas pratiquée au Vietnam. Le séquençage sera effectué à HK également.
Ces données permettront d'effectuer le profil virologique et sérologique de l'influenza porcin. Une analyse spatio-temporelle est prévue. Les résultats seront publiés à la fin de l'étude en 2011 : Seasonal (and spatial?) pattern of SIV in the Red River Delta in Vietnam over 1 year. *C. Trévennec, O. Nguyen Cong, NIVR, HK, F. Roger*

Encadrement de la thèse

Direction de la thèse et comité de thèse

La candidate est inscrite à l'université de Montpellier 2, à l'école doctorale SIBAGHE.
Le travail de thèse est supervisé par le **CIRAD** (Unité AGIRs) et l'**ENVT** (médecine vétérinaire, pathologie, infectiologie). Le comité de pilotage de la thèse associe également l'**INRA** (biostatistiques et épidémiologie) et le CNRS (écologie). En plus des membres du comité de thèse la candidate s'appuie sur différentes personnes ressources.

2nd comité de pilotage de la thèse (par ordre alphabétique) :

Marie Noel De Visscher écologue, chef provisoire de l'unité CIRAD-AGIRs
Christian Ducrot, responsable de l'unité épidémiologie à l'INRA (Epi-A), interviendra sur les aspects relatifs à l'épidémiologie quantitative et également dans le domaine des analyses biostatistiques, notamment spatiales.
Jean Luc Guérin, enseignant chercheur en virologie et pathologie aviaire, INRA-ENVT.
Serge MORAND, directeur de thèse, écologue, CIRAD-UM2-CNRS et représentant de l'ED
François Roger, co-directeur de thèse, vétérinaire-épidémiologiste, responsable du groupe épidémiologie au sein de l'unité CIRAD-AGIRs, a une longue expérience outremer dans les domaines des maladies infectieuses animales et de l'épidémiologie. Il est coordonnateur et/ou impliqué dans plusieurs projets de recherche sur les maladies émergentes et transfrontalières en Asie et Afrique. Il sera prochainement affecté en Asie du sud-est afin de coordonner les activités relatives aux maladies transfrontalières et émergentes dans cette région.

Laboratoire d'accueil

Le CIRAD est le laboratoire d'accueil.
L'affectation programmée au cours de l'année universitaire 2008-2009 de François Roger dans la sous-région (Université de Kasetsart à Bangkok, Thaïlande, avec un mandat régional en Asie du Sud-est) permettra de renforcer la supervision de proximité.
Les études en cours sont supervisées de France. Un bureau d'étude franco-vietnamien, ASVELIS, a été contracté pour effectuer les prélèvements dans les fermes de porc. L'étude à l'abattoir est effectuée par les services vétérinaires, en étroite collaboration avec le National Institute of Veterinary Research et l'Université d'Agriculture de Hanoi.

Partenariats

Les contacts établis l'année précédente sont maintenus.

Un nouveau contact a été établi avec l'institut Pasteur et l'université de Hong Kong (accord officiel – lettre d'agrément - en cours de finalisation). L'équipe de virologie participera à l'analyse des prélèvements et au développement de tests diagnostiques.

Elle fournira également une expertise pour l'interprétation des résultats sérologiques et la comparaison des tests diagnostics.

Calendrier indicatif de la thèse et valorisation scientifique

Calendrier prévisionnel

- **Année 1** Développement des collaborations et élaboration de la méthodologie
- **Année 2** Mise en place et réalisation des études de terrain au Vietnam
- **Année 3** Analyse de données, valorisation scientifique et rédaction

Calendrier de la valorisation

Surveys and Surveillance of swine influenza in South East Asia: strategy to early detect emergences and cross species transmissions	Janvier 2010
Serological and virological survey of SIV and AIV in Vietnam and risk factors of cross species transmission.	Mars 2010
Risk assessment of SIV and AIV introduction in pig farms in Vietnam.	Aout 2010
Surveillance of SIV and AIV in the pig farms of the Red River Delta in Vietnam and risk factors of cross species transmission.	Octobre 2010
Seasonal (and spatial?) pattern of SIV in the Red River Delta in Vietnam over 1 year.	Février 2011

Bibliographie

[1] Nguyen D.C., Uyeki T.M., Jadhao S., Maines T., Shaw M., Matsuoka Y., Smith C., Rowe T., Lu X., Hall H., Xu X., Balish A., Klimov A., Tumpey T.M., Swayne D.E., Huynh L.P., Nghiem H.K., Nguyen H.H., Hoang L.T., Cox N.J., Katz J.M., Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam, in 2001, Journal of virology. (2005) 79:4201-4212.

[2] Phuong D.Q., Seroprevalence study on avian influenza in rural poultry of Thai Binh province and characterization of the environmental survival of the agents involved, Dyrlaegevej 2005.

[3] Sanchez M.D., Carreon N.R., Palacios A.J., Antigen detection for SIV disease in pigs uisng a commercial rapid test and virus isolation in a non vaccinated farm in Mexico, Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, 2008.

[4] Thacker E.L., Thacker B.J., Janke B.H., Interaction between Mycoplasma hyopneumoniae and swine influenza virus, Journal of clinical microbiology. (2001) 39:2525-2530.

[5] Nakharuthai C., Boonsoongnern A., Poolperm P., Wajjwalku W., Urairong K., Chumsing W., Lertwitcharasarakul P., Lekcharoensuk P., Occurrence of swine influenza virus infection in swine with porcine respiratory disease complex, The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. (2008) 39:1045-1053.

[6] Rossow K.D., Yeske P., Goyal S.M., Richard Webby, Collins J.E., Diagnostic investigation of unexpected serology results for swine influenza virus (SIV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Journal of Swine Health and Production. (2003) 11:33-35.

[7] Janke B.H., Swine Influenza and the Porcine Respiratory Disease Complex, George A. Young Swine Conference, 2003.

Contribution à la caractérisation des virus d'influenza aviaire (VIA) et de la maladie de Newcastle (VMN) circulant dans l'avifaune domestique et sauvage du Mali.

Candidat : Marthin Dakouo

Superviseurs : Flabou BOUGOUDOGO, Renata SERVAN DE ALMEIDA et Emmanuel ALBINA
Institutions : Faculté des Sciences et Techniques, Université de Bamako; CIRAD.

Mots clés : Mali - virus de l'influenza aviaire - virus de la maladie de Newcastle - caractérisation moléculaire

Introduction

L'influenza aviaire (IA) et la maladie de Newcastle (MN) sont des maladies virales aviaires qui se trouvent dans l'ex-liste A (AI : A160 et MN : A150) de l'Organisation mondiale de la santé animale (Office International des Epizooties ou OIE). La lutte contre l'IA et la MN nécessite l'extension des connaissances encore limitées en Afrique, sur les souches circulantes et l'épidémiologie de ces deux maladies. Le Mali ne fait pas partie des onze pays africains ayant connu des foyers d'influenza aviaire hautement pathogène dus au virus H5N1. Il reste cependant considéré comme un pays à risque, notamment par la présence du Delta Intérieur du Niger (DIN), une de plus importantes zones inondables de l'Afrique de l'ouest où se concentrent des millions d'oiseaux migrateurs potentiellement porteurs de virus, et un élevage avicole en développement dans une zone où les pays frontaliers ont connu des foyers d'IA hautement pathogène. De plus, la maladie de Newcastle, dont les signes cliniques sont indissociables de ceux de l'IA, est endémique au Mali, occasionnant une forte mortalité avec des pics observés en janvier, mai et novembre. Le projet FSP GRIPAVI dont les objectifs principaux sont (1) d'avoir une meilleure connaissance du mode de transmission de ces virus faisant la part entre diffusion virale par les oiseaux sauvages ou par les volailles domestiques, (2) d'analyser les méthodes de lutte actuelles et futures reposant sur la modélisation de la diffusion des virus et (3) de déduire les méthodes de surveillance adaptées aux spécificités épidémiologiques de ces infections et aux méthodes de contrôle disponibles, pourrait apporter des solutions dans la lutte et prévention contre ces deux maladies au Mali.

Contexte

Au Mali, parmi les échantillons domestiques analysés durant la première campagne de prélèvement dans le cadre du projet GRIPAVI aucun échantillon n'a été détecté positif au virus de l'influenza aviaire (VIA) tandis que 3 ont été détectés positifs au virus de la maladie de Newcastle (VMN). 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 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. Les analyses phylogénétiques basées sur les gènes de la glycoprotéine de fusion (F) et hémagglutinine-neuraminidase (HN) montrent que les souches de VMN circulant au Mali appartiennent soit à deux sous-génotypes récemment décrits dans des pays voisins comme le Nigeria et le Burkina Faso (Snoeck et al., 2009) soit à un nouveau sous-

génotype (VIIi) proposé pour la première fois pour classer ces souches isolées au Mali (Servan de Almeida et al., 2009 et second article en préparation). Ces résultats suggèrent une évolution particulière des souches de VMN liées à cette région. De plus, le nouveau sous-génotype VIIi a été également détecté chez certaines espèces d'oiseaux aquatiques au Mali ce qui suggère une circulation de ce virus entre les populations domestique et sauvage. On peut également s'interroger sur la possibilité de la circulation à bas bruit du VMN chez ces espèces d'oiseaux sauvages et par conséquent une persistance du virus dans cette zone. Les vaccins contre la MN utilisés actuellement en Afrique d'Ouest sont produits à partir d'une souche appartenant au génotype II, génétiquement éloigné du génotype VII circulant dans la région. Malgré l'existence d'un seul sérotype et d'une réponse immunitaire croisée attendue issue de la vaccination, le niveau de protection de ces vaccins contre les nouvelles souches de ce virus, qui est en constante évolution, mérite une étude plus approfondie.

Questions de recherche

1. Quelle est la prévalence de l'IA et de la MN chez les oiseaux domestiques et sauvages au Mali ?
2. Quels sont les sous-types du VIA et les génotypes et sous-génotypes de VMN circulants dans les différents compartiments au Mali ?
3. Est-ce que les mêmes souches de virus circulent entre les compartiments domestique et sauvage ?
4. Quel est le pouvoir pathogène des souches du VIA et VMN isolées au Mali ?
5. Quel est le niveau de protection croisée entre les vaccins utilisés contre la MN au Mali et les souches du VMN circulantes ?

Objectifs

- Détection et isolement de souches du VIA et du VMN circulantes dans les populations d'oiseaux domestiques et sauvages au Mali à partir des échantillons prélevés sur la campagne de prélèvement 2010 dans le cadre du projet GRIPAVI.
- Evaluation, du pouvoir pathogène intracérébral chez des poussins d'un jour (indice de pathogénicité) des souches virales isolées au Mali.
- Evaluation de la capacité de protection des vaccins contre la MN utilisés au Mali par rapport aux différentes souches du VMN circulantes.

Matériel et méthodes

1. *Formation et Essai-interlaboratoire*

L'UMR15 du CIRAD devra assurer la formation aux techniques de QRT-PCR et isolement sur œuf de Mr Marthin Dakouo. Un programme de formation et d'évaluation sera donc adapté à Mr Dakouo avec des séances à Montpellier (estimées à 5 mois sur 2 périodes) et au LCV dans l'objectif de faire le transfert d'expertise concernant le diagnostic moléculaire de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle. Par ailleurs, Mr Dakouo pourra s'appuyer au LCV de Bamako sur les compétences de Mr Badian Kamisoko, formé par le CIRAD à deux reprises (de janvier 2007 à janvier 2008 et de juin à août 2008) pour la détection moléculaire des virus d'intérêt en santé animale dont influenza aviaire et la maladie de Newcastle. La capacité diagnostique du LCV sera éprouvée par un essai inter-laboratoire d'aptitude pour le diagnostic moléculaire de l'IA (EILA) à mettre en place par l'UMR-15 et réalisé par Mr Dakouo au LCV après sa formation.

2. *Prélèvement des échantillons*

Les prélèvements sont mis en œuvre sous la direction des l'UPR22 AGIRS avec la contribution de Mr Marthin Dakouo. Des prélèvements d'écouvillons cloacaux et trachéaux sont faits sur le même animal (oiseaux domestiques et sauvages). Les échantillons, une fois prélevés, sont immédiatement conservés en azote liquide jusqu'à leur transfert vers un congélateur à -80°C où ils sont préservés jusqu'à l'analyse.

3. *Détection Virale*

Les détections virales sur les échantillons prélevés sur la faune domestique sont mises en œuvre au LCV par Mr Dakouo et collègues, après validation de l'essai interlaboratoire et sous la supervision de l'UMR15. Les premières séries d'analyses sur la faune domestique (par tranche de 200) seront analysées conjointement par le LCV et l'UMR15 aux fins de vérifier que les résultats générés sont robustes. En cas de difficulté, des mesures seront prises pour remédier au problème localement ou pour faire acheminer les prélèvements sur le site de Montpellier. Dans cette dernière hypothèse, le LCV et le CIRAD étudieront toutes les possibilités pour qu'une personne du LCV vienne à Montpellier pour tester sous encadrement de l'UMR15, les prélèvements maliens. Tous les prélèvements faits sur la faune sauvage seront directement acheminés au CIRAD à Montpellier pour détection virale et analyse.

3.1 Screening par RT-PCR quantitative (QRT-PCR)

La détection moléculaire du gène de matrix (M) du VIA et VMN se fait par la technique de QRT-PCR. La détection des sous-types H5 et H7, également par QRT-PCR, est réalisée pour tous les échantillons positifs pour le gène M du VIA.

Le protocole de QRT-PCR utilisé pour la détection du **virus influenza aviaire de 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. Il est basé sur l'amplification et la détection du gène M.

L'interprétation des résultats est comme suit :

- Valeur de Ct <35 : échantillon VIA type A positif
- Valeur de Ct entre 35 et 36 avec une courbe d'amplification logarithmique supérieure à la ligne de base observée pendant les premières cycles : échantillon VIA type A faiblement positif
- Valeur de Ct >36 : échantillon VIA type A négatif. Cependant une allure sigmoide de la courbe d'amplification peut nécessiter une confirmation sur une seconde extraction d'ARN ainsi qu'une vérification du sous type H5 –H7.
- Valeur « No Ct » : échantillon VIA type A négatif

Le protocole de QRT-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). Cette technique ne permet pas de faire du pathotypage moléculaire.

L'interprétation des résultats est comme suit :

- Valeur de Ct ≤36 : échantillon VIA type A sous-type H5 positif
- Valeur de Ct >36 avec une courbe d'amplification logarithmique supérieure à la ligne de base observée pendant les premières cycles : résultat douteux. L'échantillon doit être retesté par RRT-PCR, puis analysé par PCR conventionnelle (« appendix 4 » de l'annexe 2).
- Valeur « No Ct » : échantillon H5 négatif.

Le protocole de QRT-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). L'amplification est située dans la région HA2 du gène de l'hémagglutinine, elle ne permet pas de faire le pathotypage moléculaire.

L'interprétation des résultats est comme suit :

- Valeur de Ct < 37 : échantillon VIA type A sous-type H7 positif
- Valeur de Ct >37 avec une courbe d'amplification logarithmique supérieure à la ligne de base observée pendant les premières cycles : résultat douteux. L'échantillon doit être retesté par RRT-PCR, puis analysé par PCR conventionnelle.
- Valeur « No Ct » : échantillon H7 négatif.

La détection du **virus de la maladie de Newcastle** se fait à l'aide d'une QRT-PCR développée par le laboratoire de référence OIE (IZSVe de Padoue). La réaction est basée sur le gène M du virus et a été optimisée. Elle ne permet pas le pathotypage moléculaire. Pour faire le pathotypage, une deuxième QRT-PCR développée par le CIRAD et avec le couple d'amorces sur le gène F est nécessaire.

- Interprétation des résultats :
- Valeur de Ct ≤ 38 : échantillon mis en isolement viral.
    - Si l'isolement est positif : échantillon VMN positif.
    - Si l'isolement est négatif : séquencer le produit de PCR
        - Si la séquence correspond au VMN : échantillon VMN positif.
        - Si la séquence ne correspond pas au VMN : échantillon VMN négatif.

4. *Isolement viral*

Les échantillons positifs en QRT-PCR sont passés au LCV à l'isolement viral sur œufs embryonnés de poule indemnes d'organismes pathogènes spécifiques (IOPS). L'isolement est effectué par injection dans la cavité allantoïque. Après l'inoculation, les œufs sont mis à incuber à 37°C pendant 7 jours. La présence de virus dans les œufs contenant des embryons morts est confirmée par QRT-PCR. Trois passages en aveugle sont effectués.

5. *Pathotypage*

5.1 *Moléculaire*

Le pathotypage moléculaire basé sur la séquence nucléotidique des souches isolées sera effectué au CIRAD à Montpellier.

5.2 *In vivo*

Le pouvoir pathogène des souches isolées sera évalué au LCV par détermination de l'indice de pathogénicité intracérébral (IPIC) chez des poussins d'un jour.

5.3 *Evaluation de la protection croisée*

La capacité de protection des vaccins de la MN utilisés au Mali contre les souches isolée sera évaluée sur les poulets locaux précédemment testés pour l'absence d'anticorps anti-VMN. Le protocole à mettre en place pour cette évaluation sera défini ultérieurement.

6. *Analyses phylogénétique et moléculaire*

Le séquençage et les analyses des séquences ainsi que les analyses phylogénétiques des souches isolées seront réalisés au CIRAD à Montpellier.

Financement

M. Marthin Dakouo est un agent du LCV à Bamako et les activités décrites dans ce projet de thèse seront financées par le projet FSP GRIPAVI dont la coordination a été confiée au CIRAD par le Ministère Français des Affaires Etrangères. Mr Dakouo est inscrit en thèse à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako sous la responsabilité du Professeur Flabou BOUGOUDOGO et exécutera les travaux liés au déroulement de cette thèse au LCV.

Comité d'encadrement

Superviseurs officiels :

Flabou BOUGOUDOGO	Professeur à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako	Université de Bamako		
Emmanuel ALBINA	Virologiste responsable de l'équipe de virologie	UMR-15/CIRAD	Campus International de Baillarguet TA A-15/G (bur. 203), 34398 Montpellier, Cedex 5 France	Emmanuel.albina@cirad.fr Tél : +33 4 67 59 37 05 Fax: +33 4 67 59 37 98

Encadrement scientifique complémentaire :

Renata SERVAN DE ALMEIDA	Virologiste	UMR-15/CIRAD	Campus International de Baillarguet TA A-15/G (bur. 217), 34398 Montpellier, Cedex 5 France	renata.almeida@cirad.fr Tél : +33 4 67 59 37 24 Fax: +33 4 67 59 37 98

Calendrier

Le suivi de la thèse se fera au travers de l'organisation d'un comité de thèse qui se réunira par télé ou visioconférence. La périodicité de réunion du comité de thèse devra être annuelle. Les progrès accomplis y seront analysés et des propositions d'inflexion pourront y être formulées. Il est entendu que si les progrès réalisés par Mr Dakouo au cours de sa première année de thèse sont manifestement incompatibles avec un achèvement de la thèse dans un délai raisonnable (normalement 3 ans), le calendrier proposé ci-dessous ainsi que l'engagement du CIRAD devront être revus.

	Trimestres															
	2009				2010				2011				2012			
	1	2	3	4												
Formations de Mr Marthin Dakouo au CIRAD																
Essai inter-laboratoire au LCV																
Prélèvement des échantillons																
Détection et isolement viraux																
Pathotypage *in vivo*																
Evaluation de la protection croisée																
Analyse des résultats et publication																
Comités de thèse																
Rédaction de thèse																
Soutenance de thèse																

Références

1. 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. and Albina, E. (2009) Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus? Vaccine 27(24), 3127-3129.

2. Snoeck, C., Ducatez, M., Owoade, A., Faleke, O., Alkali, B., Tahita, M., Tarnagda, Z., Ouedraogo, J.-B., Maikano, I., Mbah, P., Kremer, J. and Muller, C. (2009) Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. Archives of Virology 154(1), 47-54.