

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS.....	i
DEDICACES.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIERES.....	vii
GLOSSAIRES.....	viii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES ANNEXES.....	xviii
LES AUTRES PUBLICATIONS, CONFERENCES ET POSTERS EN RELATION AVEC LE SUJET.....	xix
CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET CONTEXTE SUR LA MALADIE DE NEWCASTLE A MADAGASCAR.....	4
A. Revue bibliographique sur la maladie de Newcastle	4
1. <i>Historique</i>	4
2. <i>Etiologie et classification</i>	5
3. <i>Structure et organisation du virion</i>	7
4. <i>Cycle viral</i>	19
5. <i>Evolution et épidémiologie moléculaire des souches d'APMV-1</i>	23
1. <i>Distribution des souches et les panzooties</i>	29
2. <i>Epidémiologie</i>	31
3. <i>La vaccination</i>	34
B. Contexte actuel de paramyxovirus aviaire type 1 (APMV-1) chez les oiseaux domestiques et sauvages aquatiques à Madagascar et objectifs de cette étude	38
1. <i>Aviculture à Madagascar</i>	38
2. <i>Les oiseaux sauvages</i>	40
3. <i>Projet GRIPAVI</i>	40
4. <i>Les principaux objectifs de cette étude</i>	41
CHAPITRE III: MATERIELS ET METHODES	43
A. Caractérisation des souches d'AMPV-1 circulantes	43
1. <i>Zone d'étude</i>	43
2. <i>Locaux et types de prélèvement</i>	45
3. <i>Analyse sérologique</i>	47
4. <i>Analyse virologique</i>	49
5. <i>Analyses Moléculaires</i>	56
B. Détermination de l'indice de pathogénicité intracérébrale ou IPIC.....	60
C. Essai vaccinal avec une souche du génotype XI	61
1. <i>Essai vaccinal réalisé au FOFIFA-DRZV</i>	61
2. <i>Essai vaccinal réalisé à l'UVIPAC (ANSES-Ploufragan)</i>	63
3. <i>Déclaration d'éthique</i>	66
CHAPITRE IV: RESULTATS.....	67
Partie 1: Détermination de la circulation des souches d'APMV-1 par l'analyse sérologique et virologique.....	67
A. Analyses sérologiques.....	67

1.	<i>Résultats des analyses sérologiques dans les deux compartiments d'oiseaux domestiques (I et II)</i>	67
2.	<i>Résultats des analyses sérologiques chez les oiseaux sauvages aquatiques (compartiment III) en 2009</i>	68
B.	Analyses virologiques	69
1.	<i>Résultats d'analyse virologique dans les deux compartiments (I et II) des oiseaux domestiques</i>	69
2.	<i>Surveillance épidémiologique dans le compartiment III des oiseaux sauvages aquatiques</i>	69
Partie 2:	Caractérisations phylogénétiques des souches circulantes	69
A.	Isolement viral et séquençage	69
1.	<i>Les isolats obtenus dans cette étude</i>	69
2.	<i>Les produits de QRT-PCR</i>	72
B.	Analyses phylogénétiques des souches isolées au cours de cette étude (2008 – 2009)	73
1.	<i>Analyse basée sur les isolats</i>	73
2.	<i>Analyse phylogénétique à partir des produits de QRT-PCR</i>	77
3.	<i>Pathotypage moléculaire des souches circulantes</i>	81
Partie 3:	Caractérisation moléculaire des souches circulantes.....	84
A.	Caractérisation moléculaire des souches malgaches dans le génotype XI	84
1.	<i>La protéine de fusion (F)</i>	84
2.	<i>La protéine hémagglutinine-neuraminidase (HN)</i>	89
B.	Caractérisation moléculaire des souches du génotype I issues des oiseaux sauvages.....	96
C.	Caractérisation moléculaire des souches malgaches du génotype III issues des oiseaux domestiques.....	98
Partie 4:	Analyses biologiques sur les poulets.....	103
A.	Détermination de l'index de pathogénicité intra cérébrale ou ICPI des deux souches malgaches MG-1992 et MG-725/08.....	103
B.	Protection issue des vaccins commercialisés à Madagascar contre la souche MG-1992 du génotype XI	103
1.	<i>Détermination de la létalité de la souche MG-1992 et du délai de survie</i>	103
2.	<i>Evaluation de la protection vaccinale contre la souche MG-1992</i>	104
C.	Protection conférée au poussin EOPS par la vaccination HB1 vivant/La Sota-Clone 30 inactivé contre la souche malgache MG-725/08 du génotype XI.....	106
1.	<i>Protection clinique</i>	106
2.	<i>Détermination de l'excrétion virale après l'épreuve de virulence</i>	107
CHAPITRE V:	DISCUSSION	108
Partie 1:	La maladie de Newcastle et les souches d'APMV-1 circulant à Madagascar.....	109
Partie 2:	Caractéristiques des APMV-1 dans le génotype XI et leur évolution	118
Partie 3:	Protection croisée entre les souches vaccinales et les souches du génotype XI	119
CHAPITRE VI:	PERSPECTIVES ET CONCLUSION	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	121

GLOSSAIRES

ACSA	Agent Communautaire de Santé Animale. Les ACSA sont des acteurs issus et approuvés par sa communauté, chargés d'assurer des soins et des actions zootechniques de base, d'utiliser et de gérer un stock de produits vétérinaires considérés comme non dangereux, rémunéré par les bénéficiaires et formé à travers des stages courts et successifs construits selon une démarche de pédagogie par objectifs
Conjonctivite	Inflammation de la conjonctive des yeux provoquée par un virus (conjonctivite virale), une bactérie (conjonctivite bactérienne), une allergie (conjonctivite allergique) ou encore une irritation
Epizootie	Une épizootie est une maladie frappant, dans une région plus ou moins vaste, une espèce animale ou un groupe d'espèces dans son ensemble
Fokontany	A l'origine, c'est un village traditionnel malgache. Aujourd'hui, c'est une subdivision administrative de base malgache. Il comprend soit des hameaux, des villages, des secteurs ou des quartiers
Incidence	Nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période et pour une population déterminée. Critères les plus importants pour évaluer la fréquence et la vitesse d'apparition d'une pathologie, exprimé généralement en pourcentage
Larmolement	Production de larmes par les glandes lacrymales, provoquée par une irritation de l'œil ou par des émotions
Lyophilisé	Etant d'un produit après déshydratation effectuée par dessiccation dans le but de conservations
Panzootie	Contagion d'une maladie qui s'étend à la quasi-totalité d'une population animale d'un ou de plusieurs continent(s), voire dans certains cas de la planète
Prévalence	Mesure de l'état de santé d'une population à un instant donné. Pour une affection donnée, elle est calculée en rapportant à la population totale, le nombre de cas de maladies présents à un moment donné dans une population, exprimé généralement en pourcentage
Tm	« melting temperature » : Température de fusion ou dénaturations des acides nucléiques comme l'ADN est la température pour laquelle 50 % des molécules d'ADN sont désappariées

LISTE DES ABREVIATIONS

3D	tridimension
AA	Acide Aminé
ACM	anticorps maternel
ACSA	Agents Communautaires en Santé Animale
ADN	Acide désoxoribonucléique
ADNc	Acide désoxoribonucléique complémentaire ou ADN complémentaire
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANSES	Agence National de sécurité Alimentaire
APMV-1	Avian paramyxovirus type 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger ou ARN messenger
ARNv	Acide ribonucléique viral ou ARN viral
CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Montpellier-France)
CMI	cell mediated immunity
CNERV	Centre National d'Elevage et de Recherche Vétérinaires de Nouakchott en Mauritanie
C-terminale	Extrémité carboxylée des peptides ou protéines
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animal
DL50	Dose létale 50%
DSAPS	Direction de la Santé Animale et du PhytoSanitaire.
DWCT	Durrell Wildlife Conservation Trust
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
DIE50	Dose infectieuse sur embryon de poulet
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EOPS	exemptes d'organismes pathogènes spécifiques
FAO	Food and Agricultural Organization: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, dont l'objectif est d'éradiquer la faim dans le monde
FOFIFA/DRZV	"Foiben'ny Fikarohana ho Fampanandrosoana ny eny Ambanivohitra" (Centre de Recherche Appliquée au Développement Rural) / Direction de recherche zootechnique et vétérinaire

FSP	Fonds de solidarité prioritaire
GPMV-1	Goose paramyxovirus type 1
h	heure
HN	Hémagglutinante - Neuraminidasique
HR	Heptad repeats
IA	Influenza aviaire
IPIC	Indice de pathogénicité intracérébrale
Ig	Immunoglobuline
ILRI	International Livestock Research Institute
IMVAVET	Institut malgache des vaccins vétérinaires
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
ISCOM	immune stimulating complex
IPIV	indice de pathogénicité intraveineuse
kDa	Kilo Dalton
kpb	Kilo paire de base ou 1000 pb
MAEP	Ministère de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche de Madagascar
MDT	Mean Death Time ou Délai correspond à la durée moyenne, en heure, nécessaire pour obtenir la mort de tous les embryons inoculés
min	minute
MN	Maladie de Newcastle
NAHRC	National Animal Husbandry Research Centre
NCR	Non coding region ou Région non codante 3' et 5'
nt	Nucléotide
N-terminale	Extrémité aminée des peptides ou protéines
°C	degrés Celsius
OIE	Office international des épizooties (Organisation Mondiale de la Santé animale)
ONCFS	Office national de la chasse et de la faune sauvage
ONG	Organisation Non Gouvernementale
ORF	Open Reading Frame
OVI	Onderstepoort Veterinary Institute
pb	Paire de base
PBS	Phosphate buffer saline ou solution tamponné de phosphate
PCR	polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank (base de données des structures cristallographiques de

	protéines)
PM	Poids moléculaire
PPMV-1	Pigeon paramyxovirus type 1
QPCR	PCR en temps réel ou quantitative
RNP	Ribonucléoprotéine
rpm	rotations par minute
RT	Reverse transcriptase
SOPRAMAD	Société de production animale avicole à Madagascar
T^{°m}	Température de fusion ou melting temperature
UI	Unité international
UVIPAC	Unité de Virologie, Immunologie, Parasitologie Aviaires et Cunicoles Ploufragan France
v/v	volume à volume
w/o	Water in Oil ou eau dans l'huile

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Relations phylogénétiques entre les différents genres de la famille des Paramyxoviridae. L'échelle indique le nombre de substitution par site (Gardès et al., 2009)
- Figure 2 :** Structure du génome (ARN- simple brin) d'un *Avulavirus*.
- Figure 3 :** Génome complet d'un APMV-1 (Souche Beaudette C-15186nt) montrant les différentes tailles de séquences intergéniques (Krishnamurthy & Samal, 1998)
- Figure 4 :** Structure 3D (trimère) de la protéine de fusion d'un APMV-1 (PDB : 1g5g EMBL-EBI).
- Figure 5 :** Diagramme représentant une glycoprotéine virale transmembranaire de type I (A) et II (B) (Bossart & Broder, 2007)
- Figure 6 :** Relation site de clivage et pathotypes (OIE, 2009)
- Figure 7 :** Diagramme schématique des domaines importants et caractéristiques de la glycoprotéine F (Yusoff & Tan, 2001).
- Figure 8 :** Représentation schématique d'un dimère de protéine HN d'un virus de la MN, en structure cristalline (vue de dessus), (Crennell et al., 2000).
- Figure 9 :** Diagramme schématique des domaines importants et caractéristiques de la glycoprotéine HN (Yusoff & Tan, 2001).
- Figure 10 :** Interaction entre la protéine F et HN lors de la fusion de la membrane cellulaire avec l'enveloppe virale (Zaitsev et al., 2004)
- Figure 11 :** Transcription et réplication du génome du virus de l'APMV-1 (Ninkam Nghemning, 2002).
- Figure 12 :** Cycle réplcatif de l'APMV-1 (Terrier et al., 2008)
- Figure 13 :** Bourgeonnement des Paramyxovirus (Feusier, 2004).
- Figure 14 :** Arbre phylogénétique des APMV-1
- Figure 15 :** Evolution des APMV-1 d'après (Czeglédi et al., 2006; Servan de Almeida et al., 2009; Yu et al., 2001).
- Figure 16 :** Evolution des différents génotypes dans la classe II de l'APMV-1 au long de l'histoire (d'après Yu et al., 2001 ; Czegladi et al., 2006).
- Figure 17 :** Distribution mondiale depuis sa première apparition des virus de l'APMV-1 liés à des cas de la MN
- Figure 18 :** Les pays observatoires (en rouge) dans le projet FSP GRIPAVI

- Figure 19 :** Les sites d'étude du lac Alaotra et d'Antananarivo et ses environs
- Figure 20 :** Procédure d'analyse virologique
- Figure 21 :** Inoculation dans la cavité allantoïdienne
- Figure 22 :** Exemple d'agencement schématique des séquences amplifiées pour la construction des gènes F et HN
- Figure 23 :** Partie variable du gène de fusion (F) et la courte séquence
- Figure 24 :** Chronologie de l'expérience (FOFIFA-DRZV)
- Figure 25 :** Chronologie de l'expérience (ANSES-Ploufragan France)
- Figure 26:** Migration sur gel d'agarose 1% coloré avec bromure d'éthidium. Amplicon (1 : MG-1992 ; 2 : MG-725/08) obtenu avec le couple de primer F2A/F2AS. TN : témoin négatif; TP : témoin positif (La Sota).
- Figure 27:** Migration sur gel d'agarose 1% coloré avec bromure d'éthidium. Amplicon (1 : MG-1992 ; 2 : MG-725/08) obtenu avec le couple de primer MFS1/MFS2 (une partie des gènes M et F). TN : témoin négatif ; TP : témoin positif (La Sota).
- Figure 28:** Migration sur gel d'agarose 1% coloré avec bromure d'éthidium des amplicons (1 et 2 : MG-1992) obtenus avec les couples de primer MFS1/MFS2 et F+4952/#33 (à l'intérieur du gène F). TN : témoin négatif ; TP : témoin positif (La Sota).
- Figure 29:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en basant sur les 374 nucléotides (47-421nt) du gène F.
- Figure 30:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en basant sur les 1713 nucléotides (92-1805nt) du gène HN.
- Figure 31:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 se basant sur les 14977 nucléotides, encadrant les six gènes NP, P, M, F, HN et L.
- Figure 32:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en se basant sur les 80 nucléotides (295-374nt) du gène F.
- Figure 33:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en se basant sur les 80 nucléotides (295-374nt) du gène F (Génotype I et II).
- Figure 34:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en basant sur les 80 nucléotides (295-374nt) du gène F (Génotype VII).
- Figure 35:** Alignement des séquences de la protéine F (souches : isolées 68 à 159aa et séquences : 88 à 113aa) montrant le site de clivage des APMV-1 malgaches (en rouge).
- Figure 36:** Structure tridimensionnelle de la protéine F des souches malgaches du génotype XI. Les épitopes neutralisants sont colorés en rouge.

- Figure 37:** Alignement de la protéine F (0 à 553aa) montrant les substitutions d'acide aminés. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (0 à 553). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles(*). Les AA caractéristiques de génotype XI sont encadrés en rouge.
- Figure 38:** Alignement de la protéine HN (1 à 571aa, 578aa et 616aa) montrant les substitutions d'acides aminés. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (1 à 616). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles. Les AA caractéristiques de génotype XI sont encadrés en rouge.
- Figure 39:** Structure tridimensionnelle de la protéine HN des souches malgaches du génotype XI.
- Figure 40:** Alignement montrant l'insertion de 6 nt dans la région non codante 5' du gène N.
- Figure 41:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 basé sur les 374 pb (position 47 – 421nt) du gène F montrant la position des deux souches MG dans le sous-génotype Ib par rapport aux autres souches classe II isolées dans avifaunes d'autres pays.
- Figure 42:** Alignement de la protéine F (1 à 125aa) montrant les substitutions d'AA. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (1 à 125). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles. Les AA caractéristiques de sous-génotype Ib sont encadrés en rouge.
- Figure 43:** Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en se basant sur les 374 pb (position 47 – 421nt) du gène F montrant la position des trois souches malgaches (écrites en rouge) dans le génotype III par rapport aux 23 séquences des génotypes I, II, III, IV et XI.
- Figure 44:** Alignement de la protéine F (1 à 124aa) montrant les substitutions d'AA. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (1 à 125). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles. Les AA caractéristiques des souches issues de Mukteswar sont encadrés en rouge. Les acides aminés caractéristiques des souches MG sont encadrés en vert.
- Figure 45 :** Courbe d'évolution des% de compétition en ELISA MN dans les 5 groupes (la ligne rouge représente le seuil de positivité)
- Figure 46 :** Graphique montrant la variation d'excrétion virale jusqu'au 14ème jour en équivalent DIE50 (ANSES – Ploufragan)

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1:** Classification des Paramyxoviridae
- Tableau 2:** Les subdivisions des groupes pathotypes selon les méthodes in vivo ou in vitro visant à caractériser les souches de paramyxovirus aviaire type 1
- Tableau 3:** Les différentes tailles du génome et les protéines correspondantes
- Tableau 4:** Génotype, lignée et pathogénicité des souches de l'APMV-1
- Tableau 5:** Exemple de schéma de vaccination utilisé à Madagascar
- Tableau 6:** Les vaccins anti-MN commercialisés à Madagascar
- Tableau 7:** Comparaison de l'aviculture de type villageois et de type commercial.
- Tableau 8:** Les différents échantillons analysés dans cette étude
- Tableau 9:** Préparation et composition des mix PCR avec le couple de primer (F259 et F488rev)
- Tableau 10:** Les primers utilisés pour le screening virologique QRT-PCR/MN
- Tableau 11:** Les amorces utilisées pour générer la séquence génomique
- Tableau 12:** Les séquences des souches avec leurs sites de clivage représentant les dix génotypes utilisés
- Tableau 13:** Caractéristiques des vaccins et recommandations des fournisseurs
- Tableau 14:** Caractéristiques des vaccins utilisés à l'ANSES
- Tableau 15:** Caractéristiques des souches d'épreuve utilisées à l'ANSES
- Tableau 16:** Protocole de l'essai à l'ANSES
- Tableau 17:** Résultats sérologiques effectués chez les oiseaux domestiques en 2008
- Tableau 18:** Résultats sérologiques (ELISA compétition-MN) effectués sur les oiseaux sauvages aquatiques (année : 2009)
- Tableau 19:** Les différentes souches isolées dans cette étude
- Tableau 20:** Les différents échantillons possédants des produits de QRT-PCR-NDV exploitables après séquençage
- Tableau 21:** Matrice de distance génétique (%) entre les différents génotypes de l'APMV-1
- Tableau 22:** La taille génomique, les gènes et les protéines correspondantes du génotype XI et les autres génotypes
- Tableau 23:** Matrice de divergence génétique des deux souches malgaches par rapport aux autres séquences d'APMV-1 dans le génotype I et II.
- Tableau 24:** Matrice de divergence génétique (%) entre les séquences d'APMV-1 dans le génotype III de la classe II

- Tableau 25:** Résultats de létalité de la souche MG-1992 titrant à 10^7 DL₅₀/ml à 4 dilutions
- Tableau 26:** Temps de survie des poulets infectés par la souche MG-1992 de chaque groupe calculé par la méthode de Kaplan-Meier (XLSTAT-2010)
- Tableau 27:** Résultats des tests de détection d'anticorps par ELISA pendant quatre semaines (S0 à S4 et PC)
- Tableau 28:** Résultats de protection clinique avec les deux souches d'épreuve
- Tableau 29:** Résultats des analyses de détection des gènes M d'APMV-1 dans les écouvillons oropharyngiens

LISTE DES PUBLICATIONS ET ANNEXES

- ANNEXE : 1** Épidémiologie de la maladie de Newcastle en aviculture villageoise à Madagascar (Maminiaina *et al.*, 2007)
- ANNEXE : 2** Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus? (Servan de Almeida *et al.*, 2009).
- ANNEXE : 3** Newcastle Disease Virus in Madagascar: Identification of an Original Genotype Possibly Deriving from a Died Out Ancestor of Genotype IV (Maminiaina *et al.*, 2010)
- ANNEXE : 4** Role of the trading network in the diffusion of Newcastle disease in the lake Alaotra region, Madagascar: a social network analysis (Rasamoelina Andriamanivo, 2011a)
- ANNEXE: 5** Listes des oiseaux sauvages au lac Alaotra

LES AUTRES PUBLICATIONS, CONFERENCES ET POSTERS EN RELATION AVEC LE SUJET

1. Koko; **Maminiaina O. F.**: L'élevage dans le sud, problématique et solution "l'aviculture villageoise: une alternative de production animale face à la peste porcine africaine" *Communication scientifique: HARENA Tuléar juin 1999*
2. Koko; **Maminiaina O. F.**: Amélioration de la production de l'aviculture familiale en Afrique *Communication scientifique: 25^{ème} anniversaire FOFIFA Antananarivo 2000.*
3. Koko; **Maminiaina O. F.**; Ravaomanana J.; Rakotonindrina S. J.: Aviculture villageoise à Madagascar : productivité et situation épidémiologique. *Characterstics and parameters of family poultry production in Africa. (2002) p: 47-63*
4. Koko; **Maminiaina O. F.**; Ravaomanana J.; Rakotonindrina S J. : Impact de la vaccination anti-Newcastle et du Déparasitage des poussins sous mère sur la productivité de l'aviculture villageoise à Madagascar : *Dernière réunion de Coordination du contrat programme de recherche. Vienna International Center du 24 – 28 Mai 2004.*
5. Koko; **Maminiaina O. F.**; Ravaomanana J.; Rakotonindrina S J. : Aviculture villageoise: Productivité et Performance de croissance : *Dernière réunion de Coordination du contrat programme de recherche. Vienna International Center du 24 – 28 Mai 2004.*
6. Koko; **Maminiaina O. F.**; Ravaomanana J.; Rakotonindrina S J. : Impact de l'amélioration de conduite sur la productivité de l'Aviculture villageoise à Madagascar: *Dernière réunion de Coordination du contrat programme de recherche. Vienna International Center du 24 – 28 Mai 2004.*
7. Koko; **Maminiaina O. F.**; Ravaomanana J.; Rakotonindrina S J. : Aviculture villageoise à Madagascar : Enquête épidémiologique: *Dernière réunion de Coordination du contrat programme de recherche. Vienna International Center du 24 – 28 Mai 2004*
8. **Maminiaina, O. F.**, Gil. P., Briand. F. X., Albina. E., Keita. D., Rasamoelina Andriamanivo. H., Chevalier. V., R., L., D., M., Rakotondravao. R., Rajaonarison. J. J., Koko. M., Andriantsimahavandy. A. A., Jestin. V. & Servan de Almeida. R.. Newcastle disease virus in Madagascar: identification of original genotypes. *Annual meeting of EPIZONE 2010 Saint Malo France (2010).*
9. H. Rasamoelina Andriamanivo¹, R. Lancelot, **O.F. Maminiaina**, T.F. Rakotondrafara, M. Jourdan, J.F. Renard, P. Gil, R. Servan de Almeida, E. Albina, D. Martinez, E. Tillard, Rakotondravao¹, V. Chevalier. Risk factors for avian pests in smallholder farming systems, Madagascar highlands (2011)

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE

La maladie de Newcastle ou MN est une maladie infectieuse, contagieuse des volailles provoquée par le paramyxovirus aviaire de type 1 ou APMV-1 (Alexander, 1997). Des souches d'APMV-1 peuvent entraîner des signes cliniques variables allant d'une forme asymptomatique à une forme mortelle suivant leur virulence, les espèces hôtes, l'âge de l'hôte, l'infection par d'autres organismes, le stress environnemental et l'état immunitaire de l'hôte (Alexander, 2000). L'appellation MN est réservée exclusivement à la maladie résultant d'une infection avec des souches virulentes d'APMV-1 qui engendrent la mortalité ou la maladie chez les poulets domestiques (Leighton & Heckert, 2007), les cormorans (Kuiken *et al.*, 1998), les oiseaux de cage et les pigeons (Lister *et al.*, 1986; Monne *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 1999). La virulence des souches d'APMV-1 peut être rapidement approchée par la biologie moléculaire en séquençant le site de clivage au niveau du gène de fusion (Römer-Oberdörfer *et al.*, 2006) ou caractérisée par des tests biologiques sur l'hôte sensible (OIE, 2009).

Cette maladie provoque chez l'espèce humaine des symptômes sans gravités, comme la conjonctivite et larmoiement.

Depuis la première description de la MN, trois panzooties se sont succédées dans le monde (Czeglédi *et al.*, 2006). Ces panzooties ont été caractérisées par des souches virulentes d'APMV-1 qui ont été ultérieurement classées dans différents génotypes ou sous-génotypes. A partir de 1990, les foyers de la MN enregistrés en Afrique, en Europe et en Asie ont été généralement liés à des souches groupées dans le génotype VII. Les études en épidémiologie moléculaire réalisées dans différents pays montrent la co-circulation de plusieurs souches appartenant à des génotypes différents, y compris les souches vaccinales (Abolnik *et al.*, 2004a; Adi *et al.*, 2009; Barbezange & Jestin, 2003; Barlič-Maganja *et al.*, 2005; Bogoyavlenskiy *et al.*, 2009; Cattoli *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007a; Kim *et al.*, 2008; Kuiken *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Panshin *et al.*, 1999; Servan de Almeida *et al.*, 2009; Snoeck *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 1999). Cependant, la prévalence de chaque génotype peut varier d'une année à l'autre et d'un pays ou d'un continent à l'autre.

Les épizooties d'influenza aviaire (IA) et de maladie de Newcastle menacent l'aviculture moderne et villageoise dans un grand nombre de pays d'Afrique (Koko *et al.*, 2006a; Maho *et al.*, 2004; Squarzoni, 2006). En vue d'avoir une meilleure connaissance sur la circulation des pestes aviaires (influenza aviaire et maladie de Newcastle) à Madagascar, deux sites d'étude (Lac Alaotra et Antananarivo) ont été choisis dans le cadre du projet Fonds de Solidarité Prioritaire ou FSP GRIPAVI. Ce projet est coordonné par le CIRAD et associe d'autres instituts Français (ANSES, INRA et ONCFS) ainsi que des laboratoires internationaux : OVI (Afrique du Sud), NAHDIC ou National Animal Husbandry Research Centre (Sebata-Ethiopie), LCV ou Laboratoire Central Vétérinaire (Bamako, Mali), CNERV ou Centre National d'Elevage et de Recherche Vétérinaires ou (Nouakchott, Mauritanie), pôle PRISE (Hanoi, Vietnam) et le Département de Recherches Zootechniques et Vétérinaires ou FOFIFA-DRZV (Ampandrianomby Antananarivo, Madagascar).

Les activités développées dans la présente étude font partie intégrante du projet GRIPAVI à Madagascar. Cependant, elles sont exclusivement axées sur le virus de la maladie de Newcastle (VMN) en raison de sa forte incidence mise en évidence au cours du projet. En effet, aucun virus influenza n'a été détecté durant les quatre années du projet. Le travail a successivement porté (i) d'abord sur la caractérisation des souches circulantes d'APMV-1, en particulier celles à l'origine des foyers de la maladie dans deux sites d'étude et (ii) en suite, sur l'efficacité des souches vaccinales les plus utilisées à Madagascar.

Dans le cadre de ce travail, les échantillons provenant des deux sites d'étude ont été groupés dans trois compartiments (I, II et III) : les échantillons prélevés chez les volailles domestiques des aviculteurs villageois dans le **compartiment I** ; ceux prélevés à partir des oiseaux domestiques dans les fermes de type commercial essentiellement dans la zone d'Antananarivo dans le **compartiment II** et ceux prélevés lors de l'enquête de prévalence chez l'avifaune aquatique du lac Alaotra groupés dans le **compartiment III**.

Pour évaluer la circulation des APMV-1, nous avons fait appel à des prélèvements biologiques consistant en des prélèvements de sang, des écouvillonnages trachéaux et cloacaux et le cas échéant sur oiseaux malades ou morts, des prélèvements d'organes. Pour la détection, nous avons utilisés des techniques de PCR quantitative en temps réel après transcription inverse (QRT-PCR) et le test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). La

première technique permet de rechercher des APMV-1 excrétés par les oiseaux infectés (analyse virologique) au niveau trachéal et cloacal ou le cas échéant dans des organes. Pour la caractérisation des APMV-1 circulants, l'analyse de biologie moléculaire a été complétée d'un essai d'isolement viral. Le test ELISA permet par la recherche d'anticorps sériques spécifiques de dépister le passage de l'APMV-1 à son hôte, en particulier chez les oiseaux sauvages qui ne sont pas vaccinés et qui ne présentent donc aucune interférence avec les anticorps post-vaccinaux.

Ce document comporte cinq chapitres composé de :

- Chapitre II : Revue bibliographique et contexte sur la maladie de Newcastle à Madagascar
- Chapitre III : Matériels et méthodes
- Chapitre IV : Résultats
- Chapitre V : Discussion
- Chapitre II : Perspectives et conclusion

Et ainsi que la liste des références bibliographiques et les publications et la liste des oiseaux sauvages au lac Alaotra citées en annexes.

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE ET
CONTEXTE DE LA MN**

CHAPITRE II: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET CONTEXTE SUR LA MALADIE DE NEWCASTLE A MADAGASCAR

A. Revue bibliographique sur la maladie de Newcastle

1. Historique

La première référence à la «peste aviaire» remonte en 1878 dans le nord de l'Italie, lorsqu'une maladie contagieuse et hautement mortelle affectant les volailles est décrite (Perroncito, 1878). A cette époque, cette maladie, appelée «peste aviaire», a tout d'abord été confondue avec une forme septicémique aigüe de choléra aviaire (*Pasteurellose aviaire*). Cependant, en 1880, peu après cette première description, Rivolta et Delprato (Rivolta & Delprato, 1880) démontrent que cette maladie possédait des propriétés pathologiques et cliniques différentes du choléra aviaire et la nomme *Typhus exudatious gallinarum*. En 1901, Centanni et Savunzzi (1902) déterminent que la peste aviaire est causée par un virus filtrable. La première description d'une maladie aviaire avec des symptômes identiques à la MN date de 1926 et provient de l'île de Java en Indonésie (Kranefeld, 1926). Néanmoins, une maladie présentant des symptômes semblables à la MN avait été déjà notifiée en Corée depuis 1924 (Alexander, 1997; Konno *et al.*, 1929). Pourtant, c'est seulement quelques années plus tard que Doyle (1927) a identifié, décrit pour la première fois l'agent étiologique responsable d'une épizootie des poulaillers à Newcastle Sur-Tyne (Grande Bretagne) et utilisé l'appellation de « Maladie de Newcastle ». Le virus de la MN a été identifié et classifié en 1955 dans la famille *Paramyxoviridae*, genre *Paramyxovirus*. Depuis cette date, la MN, devenue une maladie à déclaration obligatoire par l'Organisation mondiale de la santé animale (ex Office International des Epizooties, OIE), est distinguée de l'Influenza aviaire dont l'agent causal appartient au genre *Orthomyxovirus*.

Cette maladie est appelée *pesta akoho* ou *ramibomogno* à Madagascar (Koko *et al.*, 2006a; Maminaiina *et al.*, 2007), *konoku* ou *twase obgo* au Ghana (Dankwa *et al.*, 2000), *muzungo* au Mozambique (Maho *et al.*, 2004) et maladie *Ranikhet* dans une bonne partie de l'Asie. Le premier foyer de la MN a été observé et diagnostiqué à Madagascar en Août et Septembre 1946 dans le grand port de Toamasina (Rajaonarison, 1991). Après cette première description, des foyers ont éclatés en Décembre 1946 aux alentours de la gare

d'Antananarivo. A travers l'axe ferroviaire et les grandes routes, la maladie s'est disséminée et des foyers ont été observés à Ambatolampy en Décembre 1946 puis à Antsirabe en Janvier 1947, en premier lieu au voisinage des gares. A cette époque, l'introduction de la MN a été suspectée comme résultant d'importations clandestines d'Afrique du Sud de coqs de combat et de volailles. Depuis ces premières observations, la présence de la maladie est régulièrement signalée dans toute l'île (Koko *et al.*, 2006a; Maminiaina *et al.*, 2007). La MN est devenue le principal obstacle au développement de l'aviculture villageoise en Afrique et dans les autres continents en occasionnant de lourdes pertes économiques. (Mamis, 1995).

2. Etiologie et classification

L'agent causal de la MN, le paramyxovirus aviaire de sérotype 1 (APMV-1) ou virus de la maladie de Newcastle (VMN), appartient à l'ordre des *Mononegavirales*, à la famille *Paramyxoviridae* (Tableau 1; Figure 1), à la sous-famille *Paramyxovirinae*, genre *Avulavirus*. Neuf sérotypes d'APMV sont identifiés (APMV-1 à APMV-9). Ces différents sérotypes présentent des réactions croisées entre eux, en particulier l'AMPV-1 et l'AMPV-3 (Alexander, 1988a).

Tableau 1 : *Classification des Paramyxoviridae*

Sous-famille	Genre	Exemples
	<i>Respirovirus</i>	Sendai virus
	<i>Morbillivirus</i>	Virus de la peste des petits ruminants
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Rubulavirus</i>	Virus de l'oreillon ou Mumps virus
	<i>Henipavirus</i>	Virus Hendra
	<i>Avulavirus</i>	Virus de la maladie de Newcastle (APMV-1)
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	Virus respiratoire syncytial Humaine ou bovine
	<i>Metapneumovirus</i>	Pneumovirus aviaire

Les APMV-1 ont une virulence extrêmement variée. Les virus les plus pathogènes entraînent chez les oiseaux sensibles une morbidité et une mortalité atteignant parfois 100% (Alexander, 1988a). Ils sont classés en trois groupes appelés pathotypes en fonction des symptômes observés chez les poulets (Alexander, 2003a) : les souches apathogènes ou **lentogènes**, les souches **mesogènes** et les souches **velogènes** viscérotropes et neurotropes. Les souches lentogènes sont des souches avirulentes qui provoquent une légère infection

respiratoire. Les souches mesogènes ont une virulence intermédiaire provoquant des troubles respiratoires à faible mortalité. Les souches velogènes présentent une haute virulence. Les velogènes neurotropes provoquent des troubles neurologiques et respiratoires et les viscérotropes causent des lésions hémorragiques dans le tractus digestif (Alexander, 1997).

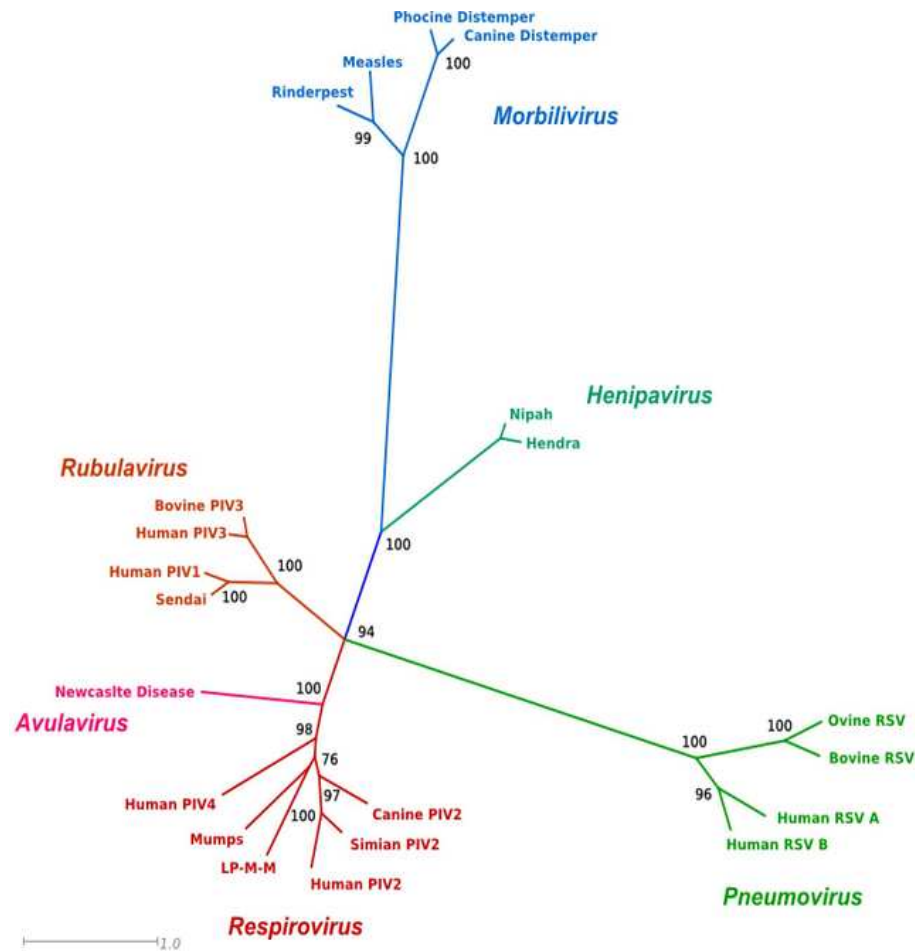


Figure 1: Relations phylogénétiques entre les différents genres de la famille des Paramyxoviridae. L'échelle indique le nombre de substitution par site (Gardès et al., 2009)

Selon l'OIE la forme virulente de la MN est causée par un APMV-1 qui présente un des deux critères suivants : (i) un indice de pathogénicité intracérébrale (IPIC) sur des poussins (*Gallus gallus*) d'un jour égal ou supérieur à 0,7 ; (ii) la présence d'au moins trois acides aminés basiques (arginine : R ou lysine : K) au niveau de la portion C-terminale du site de clivage de du précurseur la protéine de fusion (F_0), c'est-à-dire à la position située entre les acides

aminés 112 et 116 de la glycoprotéine active (F1) (Tableau 2). Ces caractéristiques sont présentées en détail à la page 27.

Tableau 2: *Les subdivisions des groupes pathotypes selon les méthodes in vivo ou in vitro visant à caractériser les souches de paramyxovirus aviaire type 1*

Méthodes	Pathogénicité		
	Velogène	Mesogène	Lentogène/asymptomatique
IPIC ^a	>1,5	[1,5 - 0,7]	<0,7
IPIV ^b	>2,5	<2,5	<2,5
MDT ^c	<60h	[60h - 90h]	>90h
Site de clivage	¹¹² RR/KQ/KR/KR*F ¹¹⁷	¹¹² RR/KQ/KR/KR*F ¹¹⁷	¹¹² GR/KQGR*L ¹¹⁷

IPIC^a : L'indice de pathogénicité intracérébrale est calculé après infection intracérébrale de poussins d'un jour ; Un score (0 : normal ; 1 : malade ; 2 : mort) est attribué à chaque poussin quotidiennement durant huit jours.

IPIV^b : L'indice de pathogénicité intraveineuse est calculé de manière similaire à l'ICPI mais chez des volailles infectées par voie intraveineuse à l'âge de six semaines.

MDT^c ou Mean Death Time Délai correspond à la durée moyenne, en heure, nécessaire pour obtenir la mort de tous les embryons des œufs inoculés

3. Structure et organisation du virion

L'APMV-1 est un virus enveloppé de forme sphérique, parfois pléiomorphe dont le diamètre est compris entre 100 nm et 500 nm (Figure 3). Le virus peut se présenter sous une forme filamenteuse avec un diamètre de 100 nm et une longueur variable (Yusoff and Tan, 2001).

a. Organisation du génome

Le génome des APMV-1, comme des autres *Mononegavirales*, est formé d'un simple brin d'ARN de polarité négative ou ssARN (Lamb & Kolakofsky, 1996). L'ARN génomique ou ARNv des APMV-1, contient six gènes structuraux (Figure 3) organisés de la façon suivante de 3' en 5' : nucléoprotéine (N), Phosphoprotéine (P), Protéine de matrice (M), protéine de fusion (F), protéine hémagglutinine-neuraminidase (HN) et la protéine large (L) (Chambers *et al.*, 1986b).

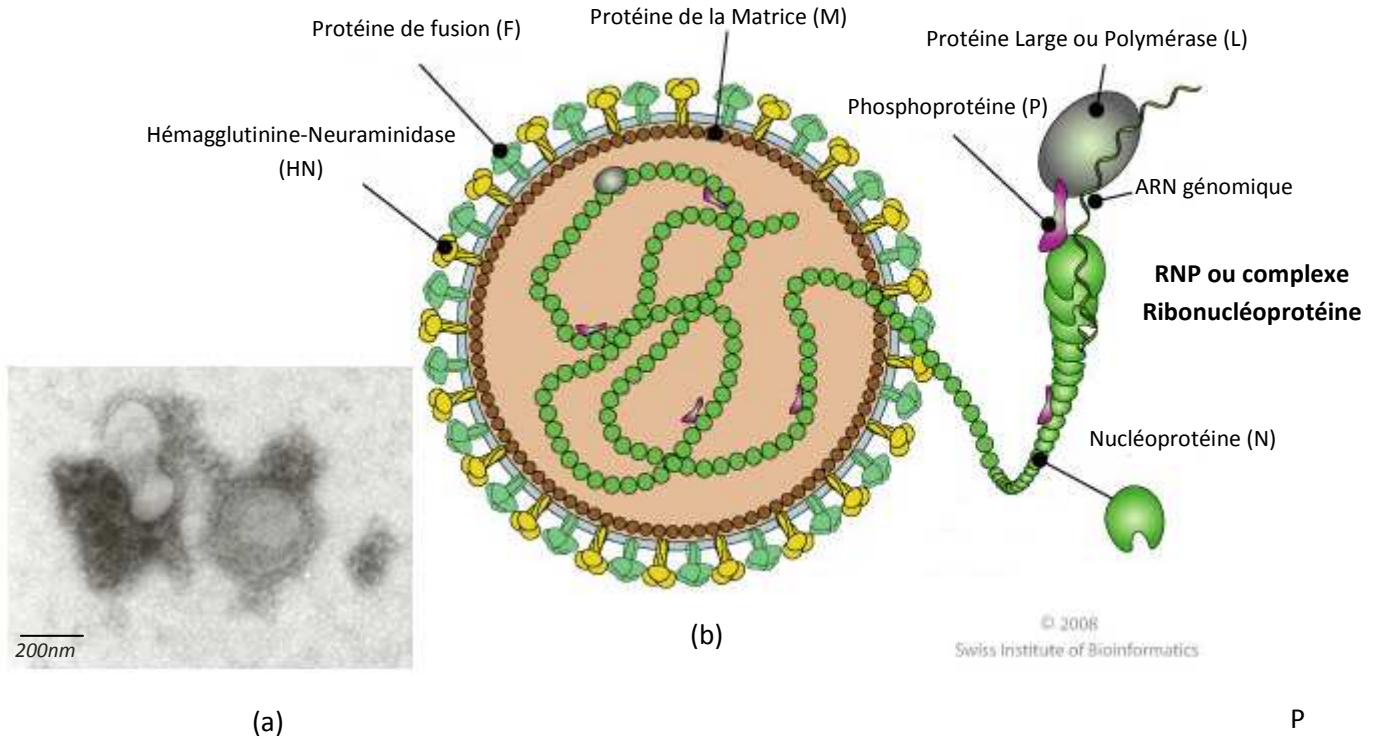


Figure 2 : Virus de la MN : (a) vue au microscope électronique avec coloration négative ; (b) Structure schématique d'un Avulavirus (© Swiss Institute of bioinformatics).



Figure 3 : Structure du génome (ARN- simple brin) d'un Avulavirus.

La taille du génome d'un APMV-1, comme pour tous les paramyxovirus, respecte la règle de 6 (*rule of six*) : la taille du génome doit être un multiple de 6 nucléotides pour que la réplication ne soit pas affectée (Kolakofsky *et al.*, 1998). Cette caractéristique, inhérente aux paramyxovirus, est directement liée à l'interaction entre la protéine N et l'ARN génomique. En effet, la N forme des hexamères où chaque unité de protéine s'associe à 6 bases. Chez les APMV-1, une variation dans la taille du génome multiple de 6 est observée pouvant comprendre 15 186, 15 192 ou 15 198 nucléotides (Czeglédi *et al.*, 2006; de Leeuw & Peeters, 1999; Huang *et al.*, 2004).

Comme tous les virus au sein de l'ordre des *Mononegavirales*, ce virus contient deux séquences non codantes appelées *leader* et *trailer* (Tableau 3), situées aux extrémités 3' et 5' du génome viral (Krishnamurthy & Samal, 1998). Le *leader* composé de 55 nucléotides (nt) et la région non codante 3' ou 3'RNC de la N composé de 66 nt constituent le promoteur génomique (121nt) utilisés par l'enzyme polymérase virale (ARN polymérase ARN dépendante) pour la synthèse des ARNm et l'ARN intermédiaire ou ARN+ (Kurilla *et al.*, 1985). Le *trailer*, composé de 114 nt et la région non codante 5' ou 5'RNC (77nt) de la protéine L, constituent le promoteur antigénomique (191 nt) utilisés par l'enzyme polymérase virale (ARN polymérase ARN dépendante) pour la synthèse des ARNv à partir de ARN+ (Kolakofsky & Bruschi, 1975; Phillips *et al.*, 1998). L'extrémité 3' du «*leader*» possède un degré élevé de complémentarité avec 40 nucléotides du «*trailer*» à l'extrémité 5' qui suggère une formation possible d'une structure «en lasso» (Kurilla *et al.*, 1985).

Les six gènes de l'APMV-1 codent pour 6 protéines structurales à partir de six cadres de lecture ouverts (*open reading frame* ou ORF). Les ORF sont séparés par de courtes séquences intergéniques comprenant entre 1 à 47 nucléotides (Tableau 3 ; Figure 3). Ces séquences intergéniques permettent de réguler l'activité transcriptionnelle des gènes (Finke *et al.*, 2000). Chaque cadre de lecture ouvert est formé par une séquence de début de transcription ou «*gene start*» : 3'-GCCCAUCU(C)U-5' suivie par la séquence codant pour les six protéines structurales du virus et terminée par un «*gene end*» : 3'-AA(U)CUUUUUU-5' ou une séquence de terminaison (Chambers *et al.*, 1986a; Chambers *et al.*, 1986b; Krishnamurthy & Samal, 1998; Millar *et al.*, 1986; Yusoff *et al.*, 1987).

Tableau 3: *Les différentes tailles du génome et les protéines correspondantes*

Région ou Gène	Classe	Génotypes	Total	Taille génomique (nt)				Protéines
				3'RNC ^a	ORF ^b	5'RNC ^c	RIG ^d	
Leader	I	-	55	-	-	-	-	-
	II	I à X	55	-	-	-	-	-
N	I	-	1746			210	CA	
	II	I à IV / IX à XI	1747	66	1470	211	A	489
		V à VIII	1753			217		
P	I	-	1463	83	1200	180	A	399
	II	I à X			1188			395
M	I	-	1241	311	1095	112	G	364
	II	I à X						
F	I	-	1742	46	1662	112	31	553
	II	I à X						
HN	I	-	2001	91	1719 - 1758	152 - 191	48	572 - 585
		I			1851	60		616
	II	II	2002	91	1734	177	47	577 - 581
		III à X			1716	195		571
L	I	-	6703	11	6615	77	-	2204
	II	I à X						
Trailer	I	-	114	-	-	-	-	-
	II	I à X						
Génome	I	-	15198					
		I à IV et X	15186					
	II	V à VIII et IX	15192					

3'RNC^a : Région non codante 3', 5'RNC^c : Région non codante 5', RIG^d : Région intergénique (motif ou taille en nucléotides), ORF^b : Open Reading Frame ou phase de lecture ouverte.

a. La nucléoprotéine

La nucléoprotéine (N) est un polypeptide de poids moléculaire 53 kDalton composé de 489 acides aminés, fortement conservé de 91 à 98% d'identité dans le genre *Avulavirus* et 35% avec les autres genres dans la famille des paramyxovirus (Kho *et al.*, 2003). Elle est la plus abondante de toutes les protéines. L'association des monomères de N forme une particule en forme d'anneau ou « *ring-like particule* », et à l'intérieur du canal formé par la structure engendrée par ces anneaux se trouve l'ARNv en symétrie hélicoïdale (Kho *et al.*, 2001). Le complexe, extrêmement stable, formé par plusieurs monomères de N et de l'ARNv constitue la nucléocapside (Iseni *et al.*, 1998). Cette dernière est associée à la phosphoprotéine (P) et la protéine large (L) pour former le complexe ribonucléoprotéique ou RNP (Figure 3) qui est la plus petite structure virale à propriété auto répliquative dans la cellule (Yusoff and Tan, 2001). La protéine N protège le génome viral contre les activités nucléasiques présentes dans les cellules de l'hôte (Kho *et al.*, 2001).

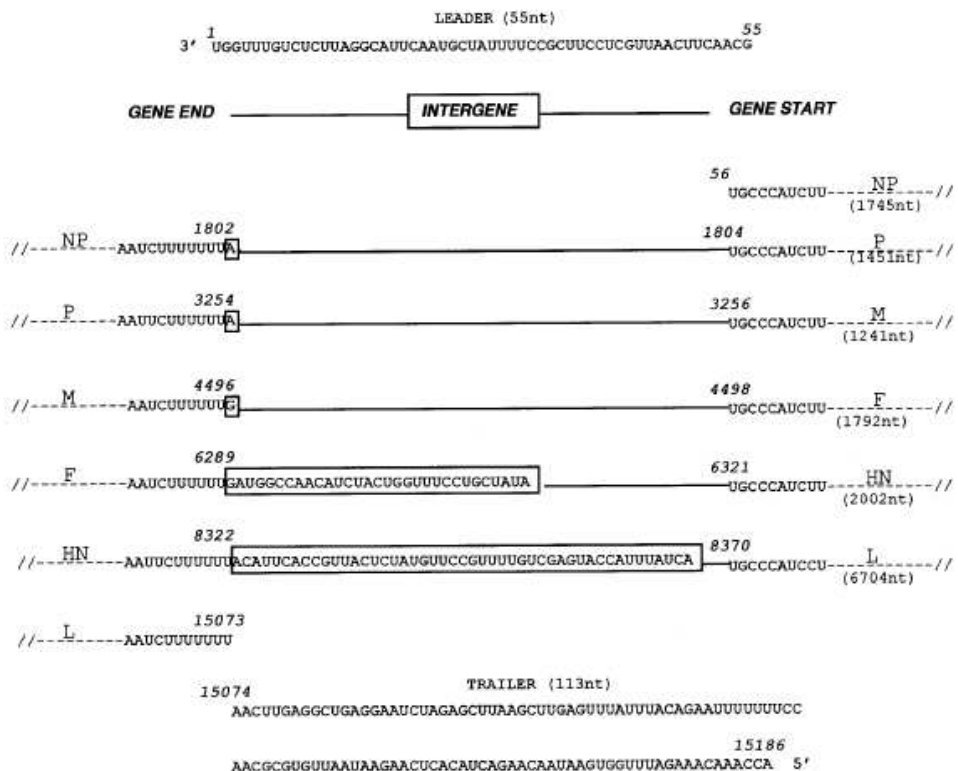


Figure 3 : Génome complet d'un APMV-1 (Souche Beaudette C-15.186nt) montrant les différentes tailles de séquences intergéniques (Krishnamurthy & Samal, 1998).

b. La phosphoprotéine (P) et les protéines non structurales (V et W)

De poids moléculaire de 42 kDa, la phosphoprotéine ou protéine P est composée de 395 acides aminés (Yusoff & Tan, 2001). Elle fait partie du complexe transcriptase-répliqueuse de l'APMV-1 (Hamaguchi *et al.*, 1983a). Elle est le principal produit obtenu avec le cadre de lecture ouvert (ORF) du gène P (Peeters *et al.*, 2004). Elle constitue un cofacteur de la polymérase virale L (ARN polymérase ARN dépendante). Ces deux protéines jouent ensemble un rôle central dans la réplication et la transcription du génome (Hamaguchi *et al.*, 1985; Hamaguchi *et al.*, 1983a) ainsi que dans la stabilisation du complexe P-L (Smallwood *et al.*, 1994). Elle peut aussi jouer le rôle de chaperon pour éviter l'encapsulation accidentelle des ARN non viraux par la nucléoprotéine avant l'assemblage du complexe NP-ARNv (Errington & Emmerson, 1997).

Comme tous les virus de la sous-famille *Paramyxovirinae*, le gène P de l'APMV-1 peut être transcrit en deux autres protéines non structurales V et W par le mécanisme de « *stuttering* » ou de bégaiement, caractérisé par l'arrêt et le glissement du complexe de transcription sur la matrice, par insertion d'une (G) ou de deux (2G) guanosines au niveau du site d'édition situé entre les positions 476 et 489 (Hausmann *et al.*, 1996; Kolakofsky *et al.*, 2005; Steward *et al.*, 1993). L'analyse des ARN messagers (ARNm) produits à partir du gène P montre que 68% d'entre eux sont des P-ARNm, 29% des V-ARNm et seulement 2% des W-ARNm (Mebatsion *et al.*, 2001). Les protéines accessoires V et W sont impliquées dans la régulation de l'expression virale et interfèrent dans les réponses cellulaires antivirales (Gotoh *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2010).

c. La protéine large (L)

La protéine large ou L est la plus grande et la moins abondante des protéines structurales des APMV-1. Elle est composée de 2204 acides aminés avec un poids moléculaire approximatif de 249 kDalton (Yusoff *et al.*, 1987). Comme pour tous les autres paramyxovirus, la protéine L des APMV-1 possède six domaines (I à VI) (Poch *et al.*, 1990; Smallwood *et al.*, 2002). En association avec les protéines P et N, la protéine L assure toutes les activités catalytiques de la polymérase virale associées à la transcription et la réplication (Hamaguchi *et al.*, 1983a; Lamb & Parks, 2007; Smallwood *et al.*, 1994). En plus du site de clivage de la protéine de fusion, la protéine L, contribue aussi au déterminisme de la

virulence des souches des APMV-1 (Rout & Samal, 2008). Elle est également responsable des activités guanilyl et méthyl transférase requises lors de la mise en place de la coiffe en position 5' des ARNm (Gopinath & Shaila, 2009).

d. L'enveloppe virale ou Peplos

L'enveloppe virale ou peplos est formée de deux couches. La couche ou enveloppe externe est essentiellement une bicouche lipidique provenant de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte acquise lors du bourgeonnement viral. Dans la bicouche lipidique sont ancrées comme des spicules deux glycoprotéines : l'hémagglutinine-neuraminidase (HN) et la protéine de fusion F (Romer-Oberdorfer *et al.*, 1999). Juste en-dessous de la bicouche lipidique se trouve la couche interne de l'enveloppe qui est formée par la protéine de matrice (M).

- La glycoprotéine F

La glycoprotéine F est une glycoprotéine transmembranaire de type I (Figure 5) qui assure la fusion de l'enveloppe virale, indépendamment du pH, avec la membrane cellulaire lors de la pénétration du virus dans la cellule cible. Cette fusion a lieu après l'activation par l'attachement de la protéine HN sur les récepteurs cellulaires. La protéine F activée assure aussi la fusion des cellules contigües lors du passage des virions de cellule en cellule formant le syncytium (Hernandez *et al.*, 1996; Seth *et al.*, 2007; Yamakawa *et al.*, 2007). La protéine F activée est un homotrimère constitué de trois monomères liés par des liaisons non covalentes (Figure 4). Elle est synthétisée et glycosylée dans le réticulum endoplasmique, comme un précurseur F₀ inactif (Yusoff and Tan, 2001) qui contient 553 acides aminés avec un poids moléculaire de 55 kDa (Chambers *et al.*, 1986; Seal *et al.*, 2005; Yusoff and Tan, 2001). Ce précurseur devient actif après le clivage par les protéases cellulaires spécifiques à l'intérieur des appareils de Golgi (Gotoh *et al.*, 1992; Nagai *et al.*, 1976; Ogasawara *et al.*, 1992). La protéine F active est composée des deux sous-unités clivées F₁ (48 à 54 kDa) et F₂ (10 à 16 kDa) reliées par un pont disulfure (-S-S-) (Bossart & Broder, 2007; Yusoff and Tan, 2001). C'est cette forme clivée qui est capable d'entraîner la fusion cellulaire (Choppin & Scheid, 1980; Mahon *et al.*, 2008; Scheid & Choppin, 1974). La protéine F est un exemple d'une glycoprotéine de type I où l'extrémité N-terminale est dirigée vers l'extérieur de

l'enveloppe. La tige de la structure protéique en forme de clou traverse la bicouche lipidique et supporte la tête globulaire.

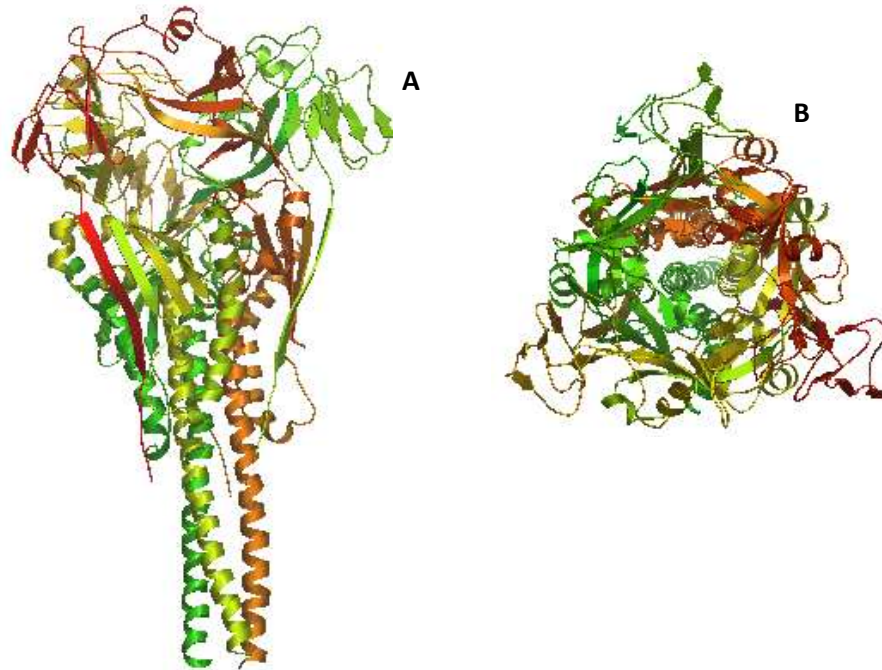


Figure 4 : Structure 3D (trimère) de la protéine de fusion d'un APMV-1 (PDB : 1g5g EMBL-EBI).

(A) Vue de face d'un modèle de la protéine F. Chaque monomère qui forme le trimère est représenté en une couleur différente. (B) : Vue de dessus de la tête de la protéine F.

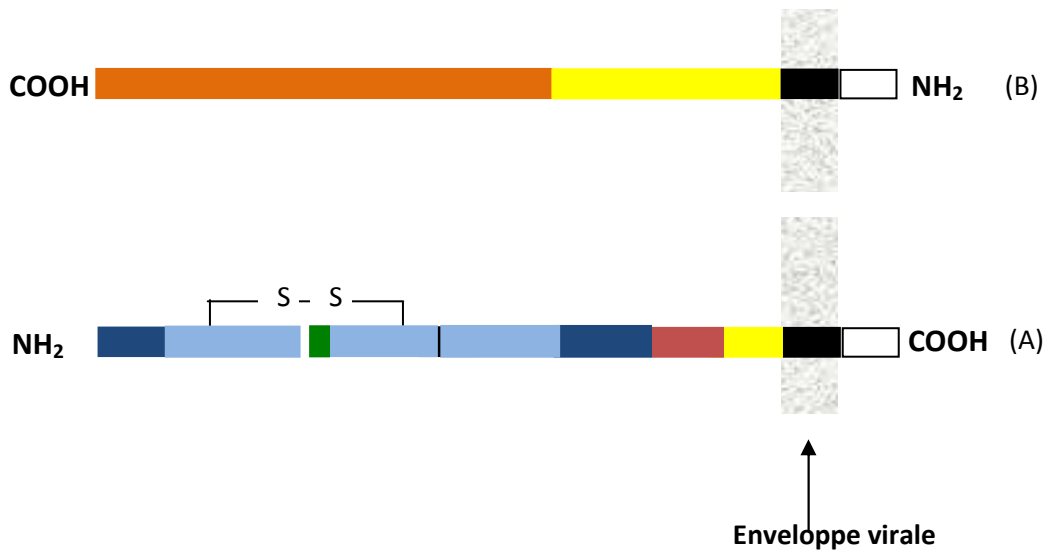


Figure 5 : Diagramme représentant une glycoprotéine virale transmembranaire de type I (A) et II (B) (Bossart & Broder, 2007)

Le site de clivage qui se trouve entre les positions 112 et 117 du précurseur de la protéine de fusion, est formé par au moins deux acides aminés basiques, arginine (R) ou lysine (K) (Figure 7). Ce site de clivage constitue la base moléculaire de la pathogénicité de l'APMV-1. (Romer-Oberdorfer *et al.*, 2003). Les souches velogènes et mesogènes présentent un site de clivage formé d'au moins 3 acides aminés basiques (R et/ou K) et d'une phénylalanine (F) en position 117 (Figure 6) (de Leeuw *et al.*, 2005; Peeters *et al.*, 1999; Römer-Oberdorfer *et al.*, 2006; Romer-Oberdorfer *et al.*, 2003; Wakamatsu *et al.*, 2006). Ce type de site est clivé par les enzymes du type furine qui sont ubiquitaires dans l'organisme alors que les sites de clivage à deux acides aminés basiques ne sont clivés que par des enzymes de type trypsine localisées au niveau des muqueuses digestives et respiratoires (Tashiro *et al.*, 1992). Cette différence explique que les souches virulentes soient plus invasives et entraînent des maladies systémiques dans l'organisme infecté (Figure 6). En plus, la présence du résidu F en position 117, au lieu de la leucine L¹¹⁷ dans les souches lentogènes, peut contribuer à l'émergence de formes neurologiques (Kattenbelt *et al.*, 2006).

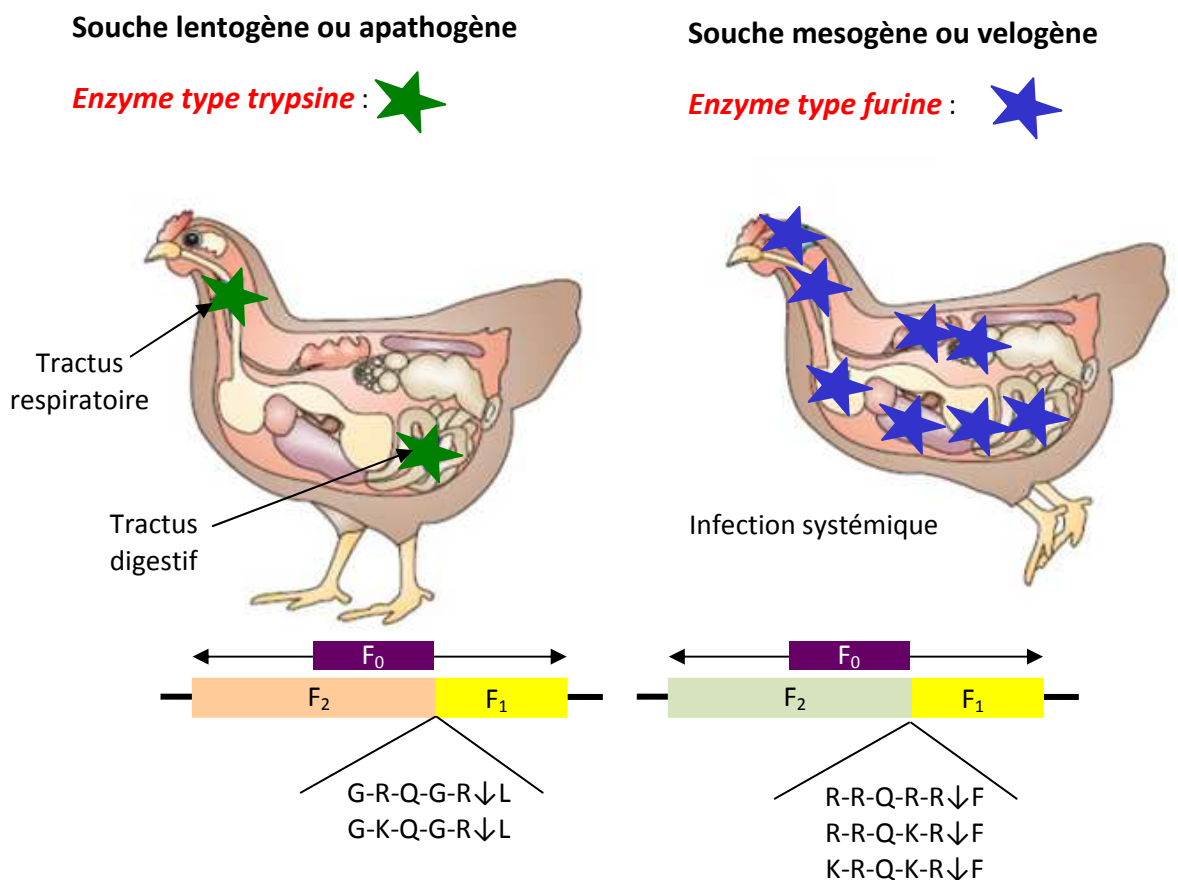


Figure 6 : Relation site de clivage et pathotypes (OIE, 2009)

La protéine de fusion des APMV-1 possède trois domaines HR ou «*Heptad repeats*» : HRa (HR1), HRb (HR2) et HRc (HR3) (Luque & Russell, 2007; Swanson *et al.*, 2010; Yusoff & Tan, 2001). Ces domaines HR adoptent une conformation en hélice indispensable à l'activité de fusion de la protéine (Chen *et al.*, 2001; Morrison, 2003; Ren *et al.*, 2006).

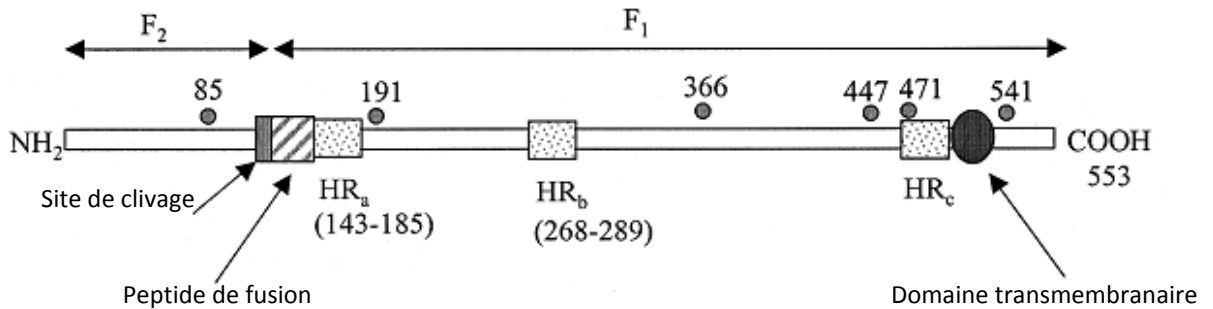


Figure 7 : Diagramme schématisé des domaines importants et caractéristiques de la glycoprotéine F (Yusoff & Tan, 2001).

La barre représente le précurseur F_0 . Les sous-unités actives de la protéine de fusion F_2 et F_1 sont figurées au-dessus de la barre. Les sites potentiels de glycosylation sont indiqués par des

Pendant la maturation post-traductionnelle des peptides formant la glycoprotéine F, la glycosylation cellulaire ajoute, en général, six résidus de carbohydrate de mannose au niveau des sites Asparagine-X-Serine/thréonine ou N-X-S/T, aux positions 85, 191, 366, 447, 471 et 541 (Figure 7). Ces glycosylations sont très importantes pour le transport des protéines F neo-formées vers la surface cellulaire (Chen *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2004).

La glycoprotéine F rejoint la membrane cytoplasmique sous la forme d'un trimère relié par des liaisons non covalentes (Malvoisin & Wild, 1993). Une partie des protéines F actives exprimées sur la membrane est utilisée comme médiateur de la fusion avec les cellules avoisinantes pour former les *syncytia* ou cellules géantes (Hernandez *et al.*, 1996).

- La glycoprotéine HN

L'Hémagglutinine Neuraminidase est une glycoprotéine transmembranaire de type II (Figure 15) où l'extrémité N-terminale est fixée dans l'enveloppe du virus (Bossart & Broder, 2007). L'HN possède un poids moléculaire d'environ 63 kDa (Yusoff & Tan, 2001). Comme la protéine F, l'HN des APMV-1 a la structure d'un clou formé de deux parties : la tige et la tête globulaire (Chen *et al.*, 2001; Yusoff and Tan, 2001). La tige qui est une structure tubulaire supportant la tête globulaire traverse la bicouche lipidique de l'enveloppe virale. La HN

activée est un homotetramère constitué de deux dimères liés par des liaisons non covalentes et chaque dimère est formé de deux monomères liés entre eux par un pont disulfure (Figure 8) (Iorio *et al.*, 2001).



Figure 8: Représentation schématique d'un dimère de protéine (aa124-aa570) HN d'un virus de la MN, en structure cristalline (vue de dessus), (Crennell *et al.*, 2000).

L'extrémité N-terminale est colorée en bleu tandis que la C-terminale, en rouge. Les sites de N-glycosylation sont montrés par les points noirs.

Le cadre de lecture ouvert codant pour le monomère possède 2002 nucléotides (Chambers *et al.*, 1986; Seal *et al.*, 2005; Yusoff and Tan, 2001). La structure primaire de l'oligopeptide de la HN contient 571, 577, 581 ou 616 acides aminés (Romer-Oberdorfer *et al.*, 2003). Les peptides HN contenant 616 aa sont trouvés chez les APMV-1 avirulentes alors que ceux avec 581 et 577 aa sont présents à la fois chez les souches virulentes et avirulentes. La protéine HN contenant 571aa se trouve uniquement chez les souches virulentes d'APMV-1 (Romer-Oberdorfer *et al.*, 2003). Pendant la maturation post-traductionnelle des peptides formant l'HN, la glycosylation cellulaire ajoute plusieurs résidus de carbohydrate de mannose au niveau des sites Asparagine-X-Serine/thréonine (Chen *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2004). En général, l'HN contient six sites de glycosylation (Figure 9) situés respectivement aux positions 119, 341, 433, 481, 508 et 538 (Seal, 2004).

L'HN du virus de la MN est une protéine multifonctionnelle (Huang *et al.*, 2004) et constitue le déterminant antigénique majeur du virus (Panda *et al.*, 2004). Elle possède à la fois l'activité hémagglutinante (HA) et neuraminidase (NA) (Kawano *et al.*, 1990; Scheid & Choppin, 1974) et assure l'attachement du virus au récepteur des cellules cibles (acide sialique). Les deux sites responsables de l'activité HA et NA se trouvent côte à côte ou très

proches sur la tête globulaire. Des mutations autour des résidus 234 à 239 ou à l'intérieur de cette région très conservée empêchent non seulement l'activité HA mais aussi celle liée à la NA (Deng *et al.*, 1999; Mirza *et al.*, 1993; Sheehan & Iorio, 1992).

Lors de la libération des virus néo-synthétisés, l'activité NA de la protéine HN permet de couper la liaison entre l'hémagglutinine et l'acide sialique de la cellule hôte (Gubareva *et al.*, 1995; von Itzstein *et al.*, 1993). Ainsi, les virus n'interagissent pas avec leur récepteur au niveau des cellules productrices et peuvent s'en libérer pour commencer leur étape de dissémination.

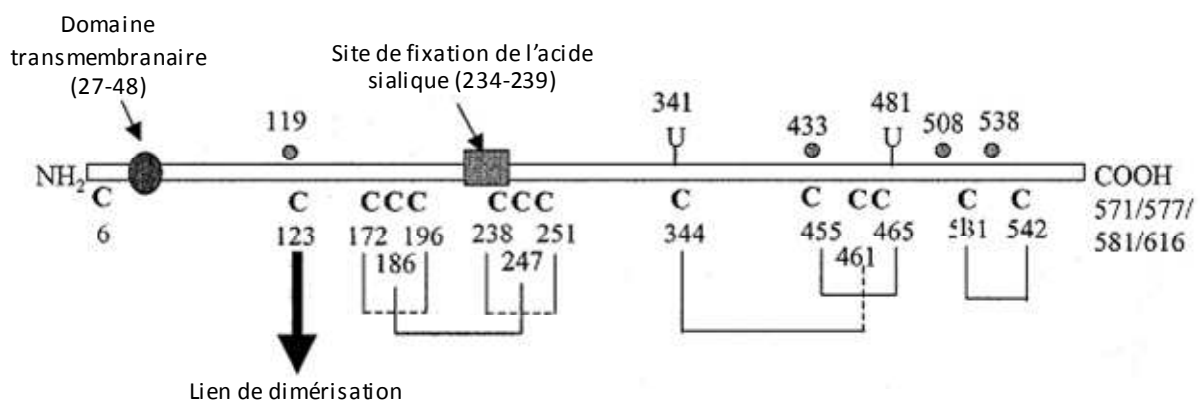


Figure 1 : Diagramme schématisé des domaines importants et caractéristiques de la glycoprotéine HN (Yusoff & Tan, 2001).

La barre représente la protéine HN avec les différentes longueurs. Les résidus cystéiques sont indiqués en C au dessous de la barre. Les ponts disulfures sont représentés par des lignes reliant les résidus cystéiques (C). Le pont disulfure intermoléculaire (position 123) est indiqué avec une flèche. Les sites potentiels de glycosylation sont indiqués par des ronds gris. Les nombres désignent les positions d'acides aminés.

- La protéine de matrice M

La protéine de matrice M des APMV-1 est formée de 364 aa. Il s'agit d'une protéine basique avec plusieurs régions hydrophobes conservées (Bellini *et al.*, 1986). Cette protéine non glycosylée tapisse non seulement la surface interne de la membrane virale mais se lie également avec la région N-terminale de la glycoprotéine HN dans la surface interne de la membrane de l'enveloppe virale (Garcia-Sastre *et al.*, 1989). La protéine M est considérée comme un organisateur central de la morphologie et de l'assemblage du virion. Elle interagit à la fois avec le nucléocapside et les domaines cytoplasmiques des deux glycoprotéines HN et F (Griffin, 2001). La protéine de matrice M est impliquée dans la compaction de la ribonucléoprotéine principalement dans les étapes d'assemblage et de bourgeonnement

viral (Iwasaki *et al.*, 2009). La protéine M pourrait ainsi bloquer l'export des ARN messagers et inhiber l'expression des gènes de la cellule hôte (Her *et al.*, 1997; Kopecky & Lyles, 2003; Yuan *et al.*, 2001).

2. Cycle viral

Comme tous les paramyxovirus, les *Avulavirus*, se propagent selon deux modes : (i) pénétration d'une cellule, transcription des protéines virales, réplication du génome viral, bourgeonnement et libération de nouvelles particules virales infectieuses, ou (ii) formation de cellules géantes multi-nucléées appelées syncytia, par fusion entre une cellule infectée, exprimant les glycoprotéines HN et F, et une cellule voisine, exprimant un récepteur des avulavirus. Ces syncytia ou cellules géantes sont facilement observables lors de l'infection *in vitro* des cellules par les virus de la MN (Ahamed *et al.*, 2004).

a. Attachement et pénétration du virus dans les cellules hôtes

La glycoprotéine HN initie l'attachement des virions aux récepteurs cellulaires. L'activation de la glycoprotéine F permet ensuite la fusion, à pH neutre, de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique de la cellule cible, ce qui conduit la libération de la ribonucléocapside dans le cytosol. Ces deux glycoprotéines assurent les premières interactions entre le virus et la cellule cible (Scheid & Choppin, 1974; Yusoff and Tan, 2001). La HN virale s'attache aux récepteurs cellulaires qui sont constitués par deux types de résidus d'acide sialique : acide N-acetylneuraminique ou l'acide N-glycolylneuraminique (Suzuki *et al.*, 1985). L'interaction de la glycoprotéine HN avec le récepteur cellulaire entraîne un changement de conformation dans cette protéine (Figure 10) qui, à son tour, active la glycoprotéine F (Lamb & Kolakofsky, 2001b). L'activation de la glycoprotéine F entraîne une rupture de structure entre les deux hélices alpha HRA et HRB (Gravel & Morrison, 2003; Stone-Hulslander & Morrison, 1999). Les deux hélices alpha se réassocient ensuite permettant aux peptides de fusion d'interagir et de s'orienter vers la membrane cellulaire. Le rapprochement des membranes virales et cellulaires a lieu au cours de ce processus favorisant ainsi la fusion et l'injection du RNP dans le cytosol (Hernandez *et al.*, 1996; Morrison, 2003). Les cellules infectées exprimant les glycoprotéines de surface F et HN peuvent fusionner avec des cellules environnantes (Hernandez *et al.*, 1996). En culture cellulaire, la formation de cellules géantes multi-

nucléées peut être observée et est considérée comme caractéristique des infections dues aux paramyxovirus (Hernandez *et al.*, 1996).

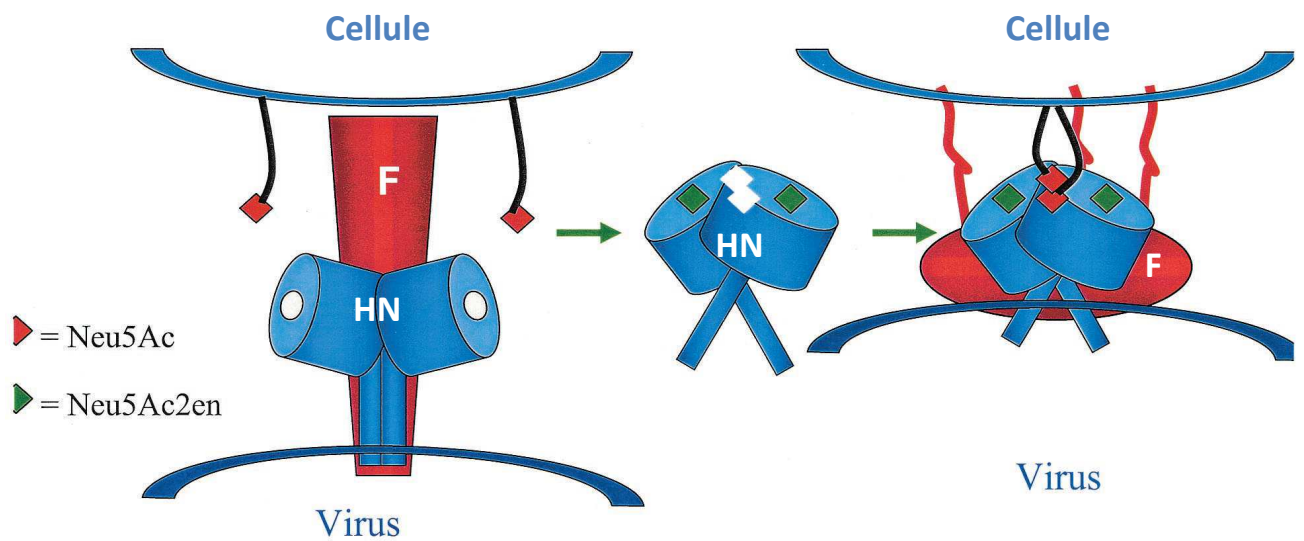


Figure10 : Interaction entre la protéine F et HN lors de la fusion de la membrane cellulaire avec l'enveloppe virale (Zaitsev *et al.*, 2004)

b. Transcription et répllication de l'ARN viral

La répllication de l'APMV-1 a entièrement lieu dans le cytoplasme cellulaire (Lamb & Kolakofsky, 2001a). En plus des protéines virales néo-synthétisées, des protéines de la cellule hôte sont nécessaires au fonctionnement optimal des complexes protéiques lors de la répllication ou la transcription (Bose & Banerjee, 2004).

Une fois dans le cytoplasme, le complexe RNP transcrit l'ARN génomique du virus (ARNv) en ARN messager ou ARNm, coiffé et polyadénylé par la polymérase virale (protéine large ou L). La synthèse de l'ARNm commence aussitôt que le génome viral rencontre les ribonucléosides triphosphates dans le cytoplasme (Figure 11B). Seuls les ARNv encapsidés par la nucléoprotéine sont reconnus et transcrits par la polymérase virale (Hamaguchi *et al.*, 1985; Hamaguchi *et al.*, 1983b). L'initiation de la transcription a lieu à l'extrémité 3' de l'ARNv, au niveau de la région promotrice formée par le *leader* et la région non codante 3' ou 3'RNC de la N (Krishnamurthy & Samal, 1998). Pendant la transcription, il existe un gradient de quantité d'ARNm et de protéines produites lié à la position du gène par rapport au point de départ de la transcription. De ce fait, l'ARN de la nucléoprotéine représente plus de 50% des transcrits et celui de la protéine L est le moins abondant. La variation de la fréquence d'initiation des différents gènes est une stratégie adoptée par les virus à ARN

négatif simple brin pour réguler l'expression des gènes au niveau de la transcription. C'est ce gradient qui permet une régulation différentielle de la production des protéines virales (Cattaneo *et al.*, 1987). A la fin de chaque transcription, les ARNm nouvellement synthétisés sont ensuite pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire (Longhi & Canard, 1999).

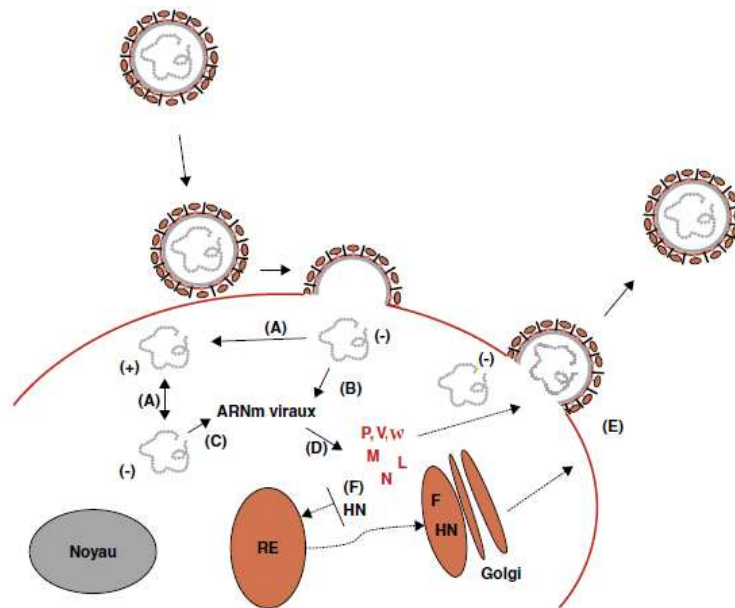


Figure 11 : Cycle réplcatif de l'APMV-1 (Terrier *et al.*, 2008)

Dans une deuxième phase, juste après la traduction des premiers transcrits et l'accumulation de protéines virales, l'enzyme polymérase virale réplique l'ARNv de façon continue en un ARN "antigénomique" complet de polarité positive ou ARN+. L'encapsidation de l'ARN synthétisé par la nucléoprotéine oblige la polymérase à traverser les jonctions sans marquer l'arrêt (Errington & Emmerson, 1997) : lorsque la concentration de protéine N atteint un seuil critique permettant l'encapsidation de l'ARN+ concomitante à sa synthèse, la polymérase virale passe en mode de réplcation en utilisant le complexe nucléoprotéique du génome (ARNv) comme matrice (Figure 12). Le nouveau complexe nucléocapside du génome (ARN+) sert ensuite de matrice pour la synthèse de nouveaux ARNv (Roux, 2005). La même polymérase engagée dans la transcription et la réplcation de l'ARNv assure la réplcation de l'ARN+ : la polymérase virale synthétise l'ARNv en utilisant l'ARN+ comme matrice et le complément de la région *trailer* et la région non codante 5' de l'ARNv comme promoteur de réplcation.

Dans les cellules infectées, il existe dix génomes pour un antigénome (Kolakofsky & Bruschi, 1975). La régulation est en faveur de la synthèse du génome viral où l'efficacité du promoteur génomique est supérieure à l'efficacité du promoteur antigénomique. L'ARNv nouvellement synthétisé et encapsidé sert dans un nouveau cycle de transcription. Il peut également être transporté vers la membrane plasmique pour la formation de nouvelles particules virales (Figure 11E).

Les protéines HN et F sont transportées à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Figure 11F) où elles sont oligomérisées et glycosylées, avant de gagner la membrane plasmique (Yusoff & Tan, 2001).

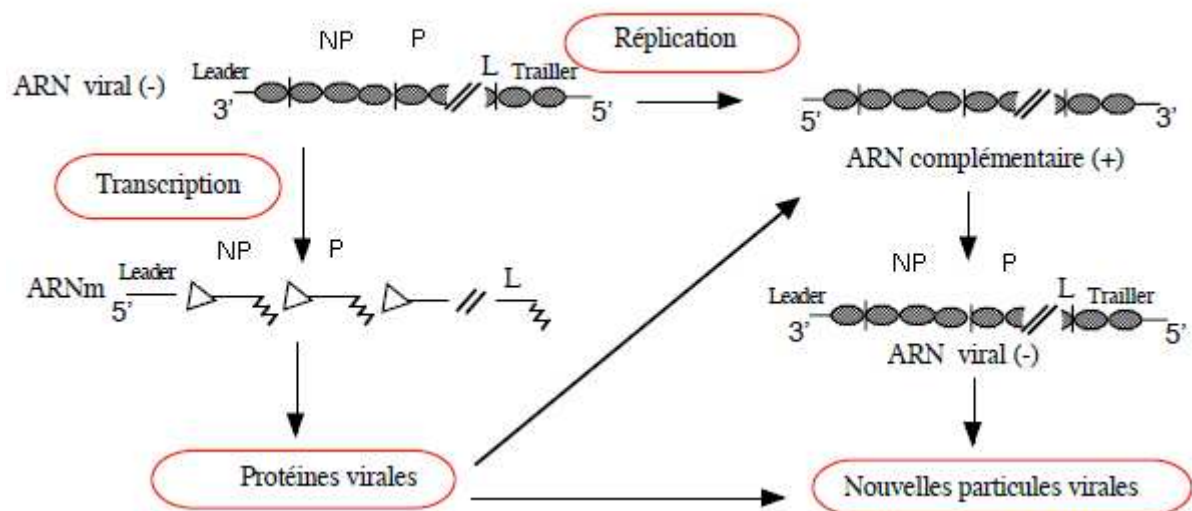


Figure 12 : Transcription et réplication du génome du virus de l'APMV-1 (Ninkam Nghemning, 2002).

c. Encapsidation, assemblage et bourgeonnement

Au fur et à mesure de sa synthèse, l'ARNv est encapsidé par les protéines N, P et L pour former le complexe RNP. Le complexe s'associe aux protéines M présentes à la face interne de la membrane plasmique où ont été dressées les glycoprotéines HN et F glycosylées et oligomérisées (Figure 13a). Cet assemblage se réalise principalement au niveau des rafts, régions riches en glycosphingolipides et cholestérol qui facilitent la formation de nouvelles particules virales (Dolganiuc *et al.*, 2003; Feusier, 2004 ; Manie *et al.*, 2000). Les forces d'interaction entre les protéines virales induisent la courbure et l'évagination de la

membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Figure 13b) ainsi qu'un début de bourgeonnement (Figure 13c). Durant le processus de bourgeonnement, une partie du cytosquelette cellulaire est incluse avec les glycoprotéines F et HN (Feusier, 2004). La polymérisation de filaments d'actine issus de ce cytosquelette cellulaire favorise la formation du virion pendant les étapes finales du bourgeonnement (Bohn *et al.*, 1986). A la fin du bourgeonnement, la particule virale finit par s'individualiser (Figure 13e). A ce stade, la particule virale peut de nouveau interagir par la HN avec le récepteur cellulaire (acide N-acétyl neuraminique (en rose - Figure 13d). Le clivage de ce récepteur par la neuraminidase virale (flèches vertes - Figure 13d), activité biologique présente sur HN, permet le détachement du virus de la cellule hôte (Figure 13e) qui peut alors infecter une autre cellule (Feusier, 2004).

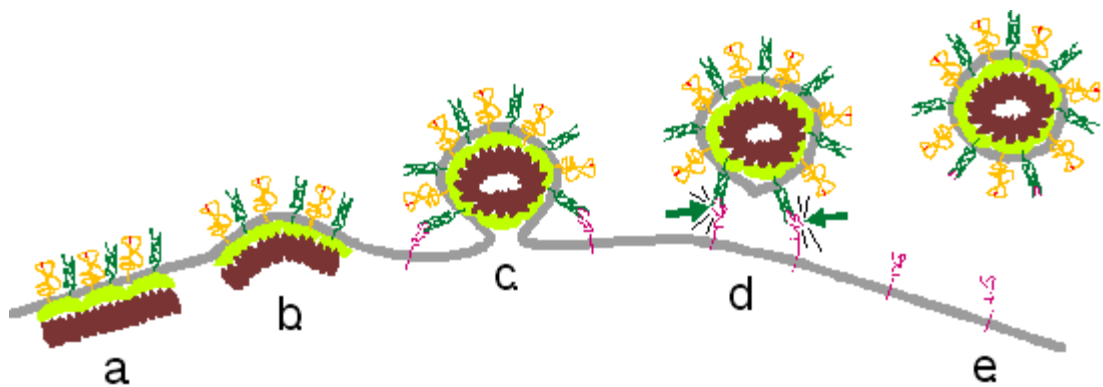


Figure 13 : Bourgeonnement des Paramyxovirus (Feusier, 2004).

3. Evolution et épidémiologie moléculaire des souches d'APMV-1

a. Génotypes et lignées des souches de l'APMV-1

L'étude préliminaire des APMV-1 avec l'analyse des profils de digestion enzymatique du gène F entre les positions 334 et 1682, en utilisant des enzymes de restriction, a initialement révélé l'existence de six géno-groupes ou génotypes (Ballagi-Pordany *et al.*, 1996). Basés sur l'analyse phylogénétique des 374 nucléotides du gène F, entre les positions 47 à 421, deux systèmes de classification des APMV-1 sont actuellement utilisés à travers le monde sans consensus clairement établi. Le premier système proposé en 1996 par Ballagi-Pordany *et al.*, classe l'APMV-1 en deux grandes classes I et II. Regroupant les souches apathogènes isolées

chez des oiseaux aquatiques sauvages, la classe I est divisée en neuf génotypes (1 à 9) (Kim *et al.*, 2007a). Dix génotypes ont été initialement décrits dans la classe II (I à X) qui englobe les virus pathogènes (Figure 14). Trois nouveaux génotypes (XI, XII et XIII) ont été récemment décrits par notre groupe (Hammoumi *et al.*, 2011; Maminiana *et al.*, 2010). Les génotypes VI et VII possèdent respectivement 6 (a-f) et 9 (a-i) sous-génotypes.

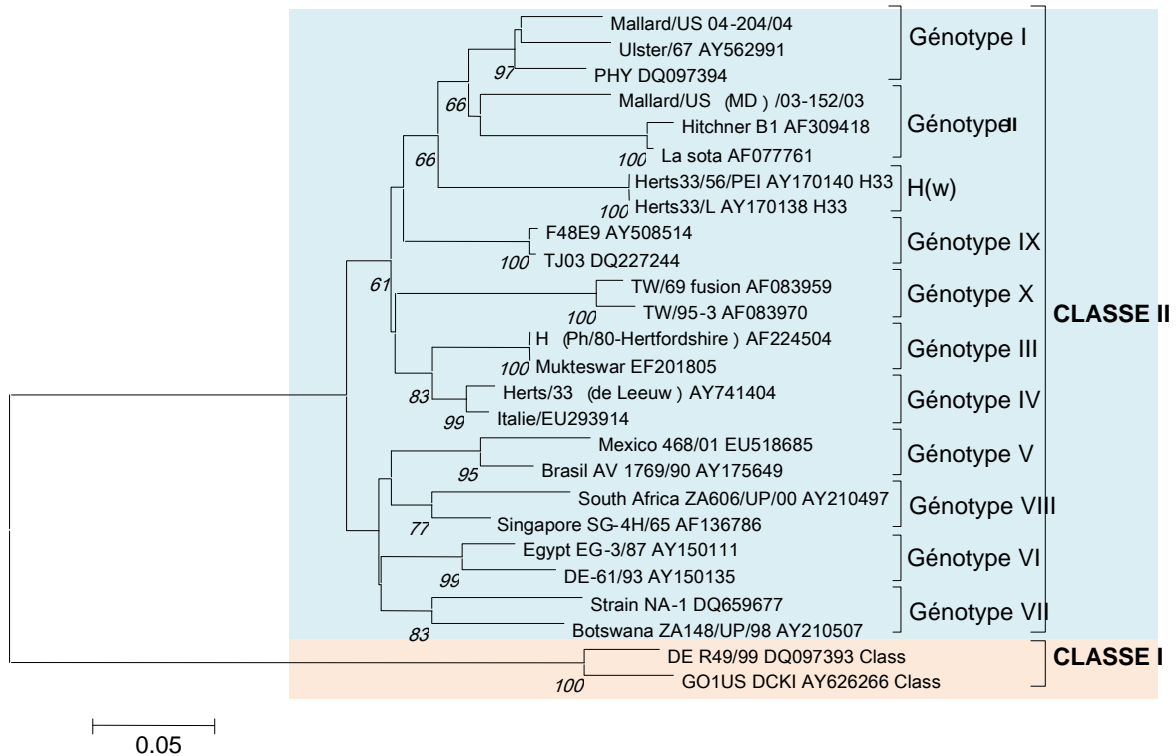


Figure 14: Arbre phylogénétique des APMV-1

Un deuxième système suggéré par Aldous groupe les APMV-1 en six lignées et treize sous-lignées. Trois sous-lignées supplémentaires ont été ultérieurement proposées par Snoeck *et al.*, (2009). Ces deux classifications sont basées sur l'analyse phylogénétique des 374 nucléotides du gène F. Les relations entre ces deux systèmes de groupage sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 4: *Génotype, lignée et pathogénicité des souches de l'APMV-1*

Classe	Génome (en nt)	Linéages	Génotypes	Sous-génotypes	Pathotype*	Hôtes	Références
I	15198	6	1 à 9	-	L	Oiseaux aquatiques sauvages	(Czeglédi <i>et al.</i> , 2006; Kim <i>et al.</i> , 2007; Zanetti <i>et al.</i> , 2005)
II		5	VII	VIIa – VIII (XII et XIII)	Vvi	Galliniformes et Palmipèdes domestiques	(Cattoli <i>et al.</i> , 2009; Czeglédi <i>et al.</i> , 2002; Hammoumi <i>et al.</i> , 2011; Servan de Almeida <i>et al.</i> , 2009; Snoeck <i>et al.</i> , 2009; Xu <i>et al.</i> , 2008; Zou <i>et al.</i> , 2005)
	15192	4	VI	VIa - VIh	Vvi	Galliniformes, Colombidae	(Aldous <i>et al.</i> , 2004; Aldous <i>et al.</i> , 2003; Ke <i>et al.</i> , 2001; Kwon <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2003; Lomniczi <i>et al.</i> , 1998; Otim <i>et al.</i> , 2004; Tsai <i>et al.</i> , 2004; Ujvari <i>et al.</i> , 2003)
		3d	VIII	-	Vvi	Galliniformes	(Abolnik <i>et al.</i> , 2004; Herczeg <i>et al.</i> , 1999; Maizan <i>et al.</i> , 2001)
	15186	3c	V	-	Vvi	Galliniformes	(Wehmann <i>et al.</i> , 2003a; Wehmann <i>et al.</i> , 2003b)
	ou	-	X	-	Vvi	Galliniformes	(Tsai <i>et al.</i> , 2004)
	15192	-	IX	-	Vvi	Galliniformes	(Liu <i>et al.</i> , 2003)
		3b	IV	-	Vvi	Galliniformes	(Czeglédi <i>et al.</i> , 2002; Czeglédi <i>et al.</i> , 2006; Czeglédi <i>et al.</i> , 2003; Wehmann <i>et al.</i> , 2003a)
		3a	III	-	M, Vvi	Galliniformes	(Aldous <i>et al.</i> , 2003; Liu <i>et al.</i> , 2007)
15186	2	II	-	L, M et Vne	Galliniformes, Phalacrocoracidae	(Heckert <i>et al.</i> , 1996; Kuiken <i>et al.</i> , 1998)	
	1	I	-	L	Galliniformes, Oiseaux aquatiques sauvages, Gallinacées et palmipède domestiques	(Kim <i>et al.</i> , 2007; Zanetti <i>et al.</i> , 2005; Zanetti <i>et al.</i> , 2009)	

*= L : Lentogène (apathogène et asymptomatique) ; M : Mesogène ; Vne : Vélogène neurotrope ;Vvi : Vélogène viscérotrope

a. Evolution des APMV-1

Sur la base de la substitution des résidus d'acides aminés (aa) observées dans les séquences protéiques, de la relation phylogénétique entre les génotypes ainsi que des données épidémiologiques sur les souches des APMV-1 isolées, Yu et al., (2001) et Czeglédi et al., (2006) ont proposé un modèle évolutif des souches de l'APMV-1 isolée à travers le monde au long des années. D'après ces auteurs, la plus ancienne division de l'APMV-1 a eu lieu chez les oiseaux sauvages aquatiques, considérés comme un réservoir ancestral (Figure 15).

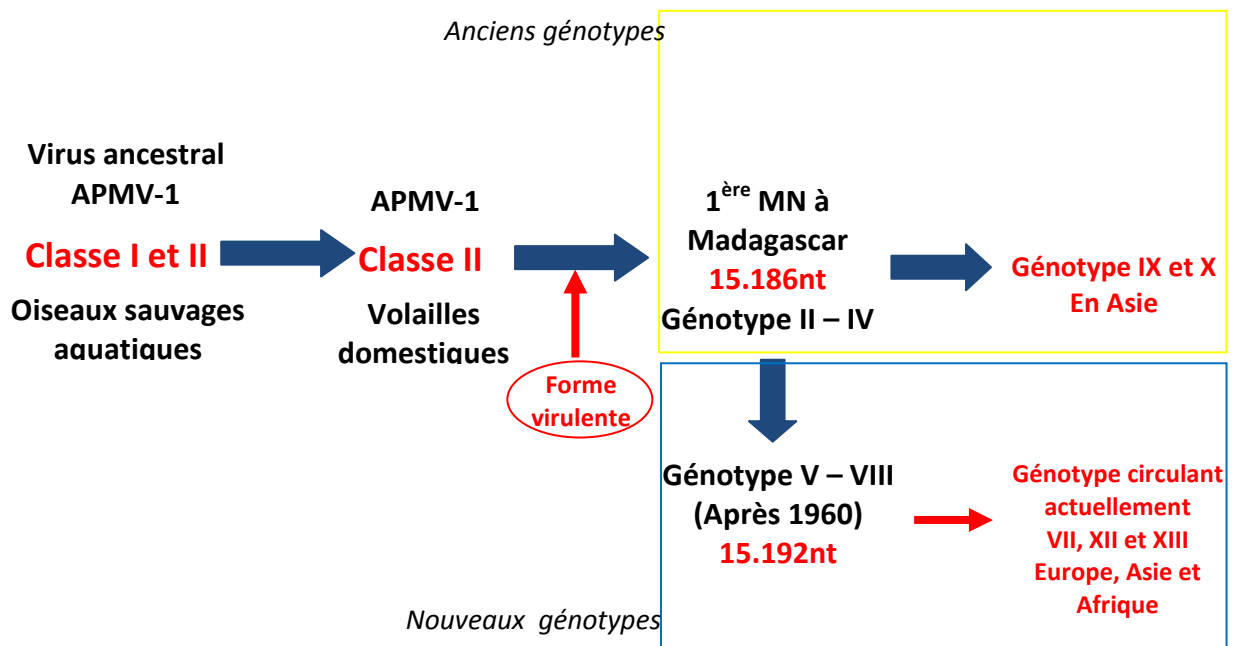


Figure 15: Evolution des APMV-1 d'après (Czeglédi et al., 2006; Servan de Almeida et al., 2009; Yu et al., 2001).

Cette ancienne division a donné naissance à deux clades: les APMV-1 de classe I et ceux de classe II (Figure 14). Seul les ancêtres d'APMV-1 de classe II ont colonisé les populations d'oiseaux domestiques (hôtes secondaires) et se sont convertis par la suite en des formes virulentes. Ces formes virulentes ont été responsables de plusieurs panzooties de MN dans le monde (Czeglédi et al., 2006). Les premières panzooties datant de 1926 à 1960 ont été causées par les anciens génotypes (I à IV). Selon Yu et al., (2001), la substitution $E^{104} \rightarrow G$ au niveau de la protéine F et l'insertion de 6 nt dans le génome ont entraîné l'évolution du génotype IV vers les sous-génotypes VIa et VIe (Figure 16).

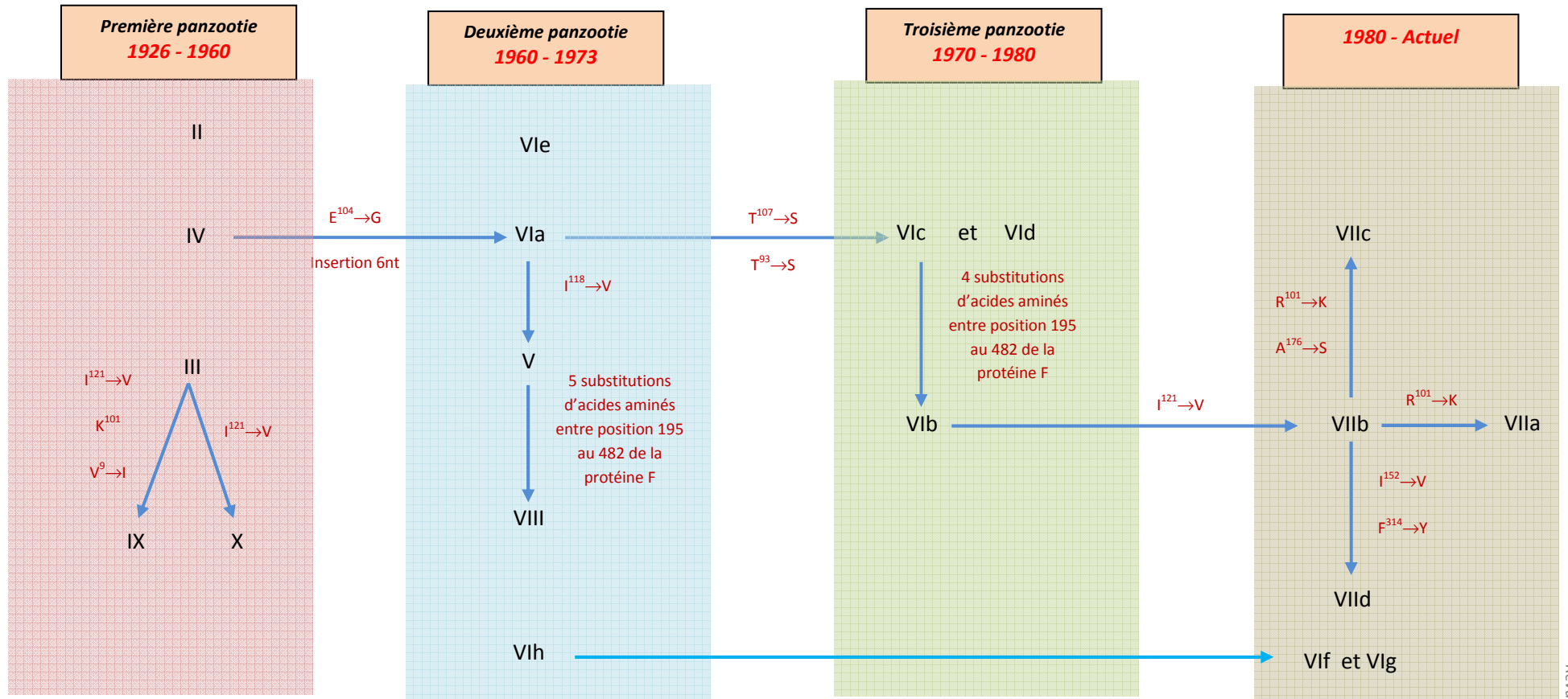


Figure 16 : Evolution des différents génotypes dans la classe II de l'APMV-1 au long de l'histoire (d'après Yu et al., 2001 ; Czégladi et al., 2006).

Ces deux sous-groupes forment les « anciennes » souches dans le génotype VI isolées au Moyen Orient (Kuwait 256, Iraq AG68), en Europe (Warwick/66) et en Asie (JP-Narashino/67, JP-Chiba/69), lors de la deuxième panzootie de MN (Figure 16). Seule la souche Warwick/66 isolée en Grande Bretagne en 1966 est membre du sous-génotype VIe. Le sous-génotype VIa aurait évolué en génotype V par substitution du résidu d'acide aminé en position I¹¹⁸ → V de la protéine F. Ce dernier aurait évolué en génotype VIII par cinq substitutions d'acides aminés entre les résidus 195 à 482 de la région conservée de la protéine F (Figure 16). Toutefois, ce génotype VIII a conservé un ancien résidu T¹⁰⁷ au niveau de la protéine F (Yu *et al.*, 2001). Le sous-génotype VIa aurait évolué en VIc et VIId par les substitutions cruciales T¹⁰⁷ → S et T⁹³ → S, respectivement. Par la suite, l'évolution vers les sous-génotypes VIc en VIb aurait eu lieu par la substitution de quatre acides aminés dans la région conservée de la protéine F (résidus 195 à 482). L'évolution du sous-génotype VIb vers le sous-génotype VIIb serait caractérisée par la substitution V¹²¹ → I dans la protéine F, spécifique du génotype VII. Le sous-génotype VIIb a donné naissance par la suite, aux sous-génotypes VIIa (R¹⁰¹ → K), VIIc (R¹⁰¹ → K, A¹⁷⁶ → S) et VIId (I⁵² → V, F³¹⁴ → Y). Ce sous-génotype VIId est l'ancêtre des sous génotypes VIIe, VIIf, VIIh et VIIi et ces sous-génotypes VII (b – i) sont à l'origine de la plupart des épizooties de MN depuis 1980 en Asie, en Europe et en Afrique (Cattoli *et al.*, 2009; Ke *et al.*, 2010; Krapez *et al.*, 2010; Servan de Almeida *et al.*, 2009; Snoeck *et al.*, 2009). Cependant, Hammoumi *et al.*, ont récemment proposé de réarranger ce génotype en génotype VII (VIIb), XII (VIIa, c, d et e), le dernier génotype XIII regroupant les souches isolées en Afrique de l'Ouest (VIIf, g et h).

Actuellement, des souches appartenant aux génotypes IX et X, qui ont vraisemblablement évolués à partir du génotype III, et au génotype XI issu du génotype IV, sont isolées respectivement en Asie depuis la première panzootie (Liu *et al.*, 2003b; Tsai *et al.*, 2004) et à Madagascar (Servan de Almeida *et al.*, 2009). Les génotypes IX-X se trouvent dans le clade des anciens génotypes (Figure 14). Cependant, les analyses moléculaires au niveau du gène F montrent que les souches dans ces deux génotypes possèdent à la fois des résidus caractéristiques des récents génotypes VII et VIII : I¹²¹ → V, T¹⁰⁷ → S pour le génotype X (Tsai *et al.*, 2004) et V⁹ → I, A¹⁰⁶ → V et I¹²¹ → V pour le génotype IX (Wang *et al.*, 2006).

Le génotype VI est apparu en trois vagues : d'abord pendant la deuxième panzootie avec les trois sous-génotypes VIa au Moyen Orient (Aldous *et al.*, 2003), VIe en Grande Bretagne (Aldous *et al.*, 2004) et VIh en Taiwan (Tsai *et al.*, 2004), ensuite, au cours de la troisième panzootie avec les sous-

génotypes VIb en Europe (Linde et al., 2010), VIc et VI d en Afrique, (Aldous et al., 2004; Aldous et al., 2003; Ujvari et al., 2003), et plus récemment depuis 1990, avec les sous-génotypes VIg en Chine et Taiwan et VI f en Corée (Ke et al., 2001; Kwon et al., 2003; Liu et al., 2003b).

1. Distribution des souches et les panzooties

a. Distribution

La MN est une infection enzootique dans de nombreux pays en développement, principalement en Asie et en Afrique (Alders & Spradbrow, 2000). En Europe et aux États-Unis, où la MN est contrôlée par des mesures de biosécurité et de vaccination, des épizooties occasionnelles de gravité variable sont encore observées (Barbezange & Jestin, 2005a; Barbezange & Jestin, 2005b; Czeglédi *et al.*, 2002; Herczeg *et al.*, 1999; Krapez *et al.*, 2010; Kuiken, 1998; Kuiken *et al.*, 1998; Kuiken *et al.*, 1999). Ces épizooties occasionnelles sont causées essentiellement par les génotypes V, VI et VII en Europe ; V et VI en Amérique (Kim *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2000). Actuellement, les génotypes VI et VII sont à l'origine de la majorité de la mortalité due à la MN en Asie, en Afrique et en Europe (Terregino *et al.*, 2003; Ujvari, 2006). Le génotype VIII a été trouvé en Asie et en Afrique australe (Abolnik *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2001).

Bien que certains génotypes soient localisés dans une région géographique déterminée (Figure 17), les génotypes I/II dans la classe II et les APMV-1 dans la classe I circulent partout dans le monde. Ces derniers sont généralement avirulents et/ou lentogènes. Ils ont une distribution mondiale chez les oiseaux aquatiques sauvages qui constituent leur réservoir (Kim *et al.*, 2007a). Les souches vaccinales les plus utilisées actuellement dans les différents continents sont des APMV-1 classe II lentogènes dans les génotypes I et II.

b. Les panzooties de la MN

Depuis la première description de la MN en 1926, trois panzooties se sont succédé. La première panzootie de 1926 à 1960 a été causée par les génotypes II, III et IV; la deuxième de 1960 à 1973 par les génotypes VIa, V et VIII et la troisième (1970-1980) par les sous-génotypes VIc, VIb et VI d. Depuis 1990, le génotype VII est prévalent en Asie, Europe et Afrique (Aldous *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003a; Mase *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2004).

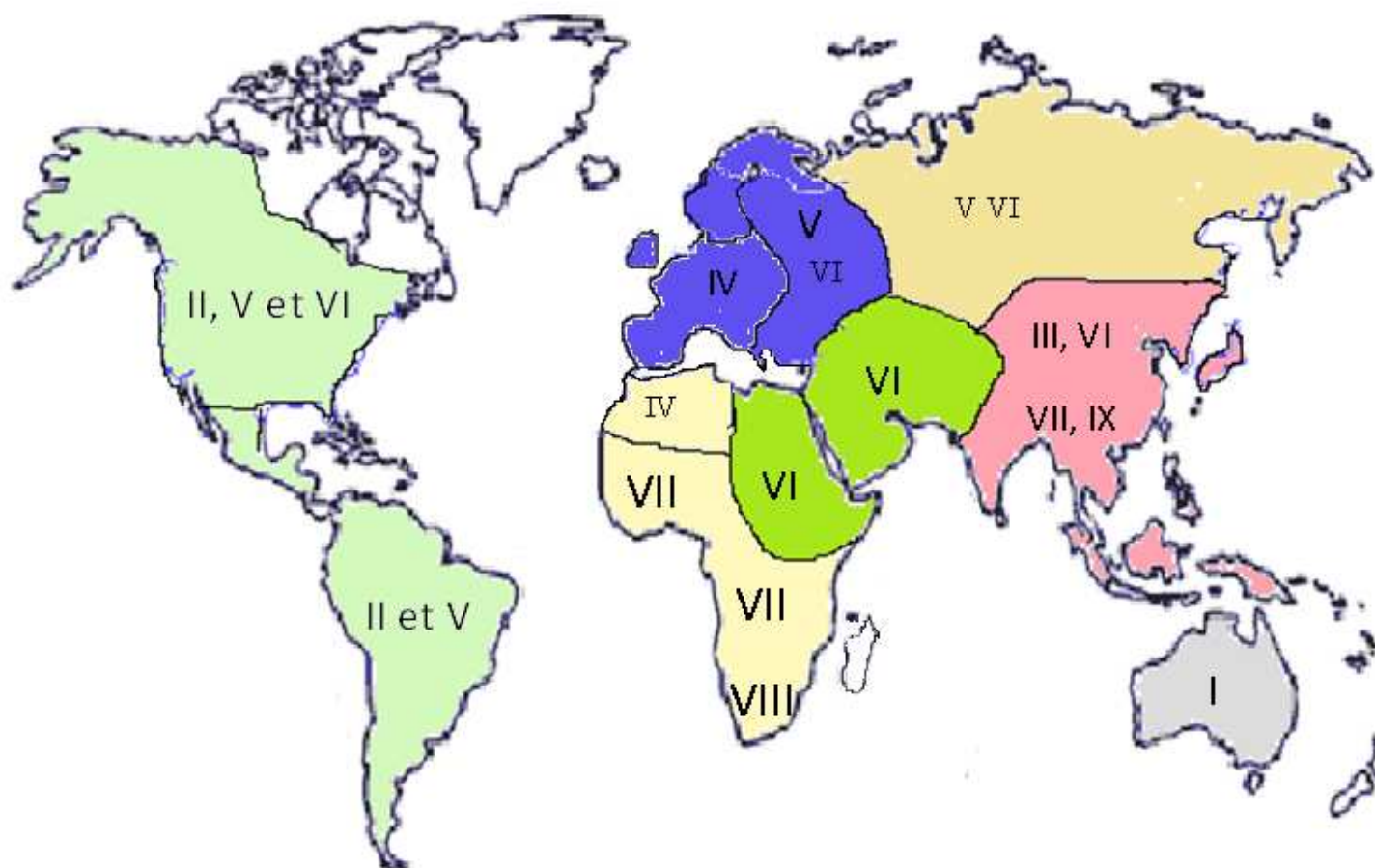


Figure 17 : Distribution mondiale depuis sa première apparition des virus de l'APMV-1 liés à des cas de la MN (Alexander et al., 1999; Barbezange & Jestin, 2003; Bogoyavlenskiy et al., 2009; Bogoyavlenskiy et al., 2005; Capua et al., 2002; Cattoli et al., 2009; Czeglédi et al., 2002; Kaleta & Baldauf, 1988; Ke et al., 2001; Kim et al., 2008; Meulemans et al., 2002; Otim et al., 2004; Schelling et al., 1999; Tan et al., 2008; Tsai et al., 2004; Ujvari et al., 2003).

1. **Epidémiologie**

a. Les hôtes

Les oiseaux constituent l'hôte principal du virus de la MN, mais d'autres animaux comme les reptiles et l'homme peuvent être infectés par ce virus (Lancaster, 1966). Selon Kaleta & Baldauf (1988b), au moins 241 espèces d'oiseaux peuvent être infectées par l'APMV-1, incluant 27 des 50 ordres. Tous les différents pathotypes des APMV-1 sont trouvés chez les volailles domestiques comme les poules (*Gallus gallus*), les oies (*Anser anser*) et les dindes (*Meleagris ocellata*). Par contre, des souches avirulentes sont les plus fréquemment trouvées chez les oiseaux sauvages (Kim *et al.*, 2007a). Les mortalités les plus élevées dues au virus de la MN chez les oiseaux sauvages ont été rencontrées chez les colombiformes (*Colomba sp.* et *Streptopelia decaocto*) au Moyen Orient, en Europe, en Asie, en Amérique du Nord (Kaleta & Baldauf, 1988a; Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006) et chez les cormorans à aigrettes (*Phalacrocorax auritus*) en Amérique du Nord durant les années 1990 (Wobeser *et al.*, 1993). Des isolats d'APMV-1 ont été obtenus à partir des Psittacidés (*Cacatua molucensis*, *Amazona ochracephala*) en captivité (Grund *et al.*, 2002) ou introduits illégalement aux États-Unis en 1991 (Panigrahy *et al.*, 1993). Des souches d'APMV-1 ont été également isolées chez les porcs, montrant que ce virus peut se répliquer dans le tractus respiratoire de cette espèce (Ding *et al.*, 2010).

Chez l'homme, la MN est considérée comme une zoonose mineure. La transmission à l'homme est anecdotique et se traduit par une infection oculaire : une conjonctivite, un œdème des paupières et des larmoiements (Csatary *et al.*, 1993; Rauw *et al.*, 2009c). En plus de ces infections oculaires, des maux de tête, des laryngites et de la fièvre sont aussi observés (Capua & Alexander, 2004).

b. Pouvoir antigénique et immunogène

Sur le plan antigénique, il n'existe que des variations mineures entre les différentes souches d'APMV-1. A l'aide d'anticorps monoclonaux, des variantes d'APMV-1 dénommées PPMV-1 (Pigeon paramyxovirus type 1) ont été mises en évidence en Europe, en Asie, en Afrique du Nord et en Amérique du Nord en 1970, affectant principalement les pigeons pendant la deuxième panzootie de la maladie de Newcastle (Alexander *et al.*, 1985; Kaleta & Baldauf,

1988b; Marlier & Vindevogel, 2006; Ujvari *et al.*, 2003). Depuis les années 1970, malgré les programmes stricts de vaccination en Europe, en Asie et en Amérique du Nord, des cas sporadiques de MN causant quelques mortalités dans les fermes de poulets ont été relatés (Cho *et al.*, 2007; Kapczynski & King, 2005; Servan de Almeida *et al.*, 2009; Snoeck *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2001). Ne présentent pas de manifestations cliniques et pathologiques, ces cas sporadiques sont appelés « maladies de Newcastle atypiques » et ont toujours lieu dans les fermes pratiquant la vaccination (Barbezange & Jestin, 2005a; Barbezange & Jestin, 2005b; Wei *et al.*, 1998). Des infections similaires ont été rencontrées chez les oies dans des fermes agricoles de Shanghai (Zou *et al.*, 2005). Dans ces fermes, l'incidence et le taux de mortalité chez les oies adultes ont été respectivement de 50-70% et 10-20% tandis que chez les juvéniles de moins de 15 jours d'âge, le taux de mortalité a atteint 100% (Zou *et al.*, 2005). Zou *et al.* (2005) ont appelé ce variant du virus de MN «goose paramyxovirus type 1 » ou GPMV-1.

L'infection par le virus APMV-1 entraîne à la fois une réponse immunitaire à médiation cellulaire et une réponse humorale (Rauw *et al.*, 2009b). La réponse immunitaire cellulaire est la première à être détectée bien avant la réponse humorale mise en évidence une semaine après l'infection (Timms & Alexander, 2003). La réponse cellulaire peut être mise en évidence deux à trois jours après l'infection avec des souches virales lentogènes. Toutefois, elle ne serait pas fortement protectrice et ne durerait que quatre semaines (Reynolds & Maraqa, 2000b; Timms & Alexander, 2003). Au contraire, l'immunité humorale dure longtemps après l'infection (3 à 12 mois) et les anticorps dirigés contre les deux glycoprotéines de l'enveloppe virale (F et HN) sont considérés comme neutralisants et protecteurs. Les anticorps anti-HN sont évalués lors des tests d'inhibition de l'hémagglutination ou IHA pour estimer le niveau d'immunité humorale (Allan & Gough, 1974). L'infection par l'APMV-1 produit aussi une immunité locale des voies respiratoires supérieures et de l'intestin (Rauw *et al.*, 2009b). Les oiseaux présentant des anticorps anti-APMV-1 transmettent ceux-ci à leur descendance via le vitellus. Les poussins issus de ces poules sont immunisés passivement et ils sont protégés des souches virulentes sauvages pendant trois à quatre semaines, selon le niveau initial des anticorps maternels (Reynolds & Maraqa, 2000a).

c. Introduction et transmission

-Transmission entre les oiseaux

Les principales voies de transmission de la MN entre les oiseaux sains et infectés sont les contacts directs, la nourriture et l'eau de boisson contaminées ainsi que toutes les parties de la carcasse des poulets infectés (Alexander, 2003a; Alexander, 1988; Guittet *et al.*, 1997). Les particules virales peuvent être transportées par l'air sur de faibles distances (Estola *et al.*, 1979; Lancaster & Alexander, 1975). Le succès de cette voie de transmission dépend de nombreux facteurs environnementaux comme la température, l'humidité et la densité du cheptel (Li *et al.*, 2009).

-Mouvement des oiseaux

Les oiseaux sauvages migrateurs peuvent être à l'origine de l'introduction de la MN (Kim *et al.*, 2007a) mais les APMV-1 isolés actuellement chez les oiseaux sauvages sont essentiellement des souches lentogènes ou apathogènes issues de la classe I ou de la classe II- génotype I (Kim *et al.*, 2007a; Kim *et al.*, 2008; Zanetti *et al.*, 2005; Zanetti *et al.*, 2009). Dans un pays où les infections ont déjà lieu, les mouvements d'oiseaux domestiques et sauvages peuvent jouer un rôle plus important dans la propagation des virus de la MN (Alexander *et al.*, 1985; O'Reilly, 1994).

-Mouvement des viandes des poulets

La viande de volaille a été considérée comme le principal vecteur de l'introduction et de la propagation des virus de la MN (Guittet *et al.*, 1997; Lancaster, 1981). Le mouvement des armées avec leurs nourritures pendant la deuxième guerre mondiale (Czeglédi *et al.*, 2002; Czeglédi *et al.*, 2006) et la diminution des contrôles aux frontières ont facilité l'introduction de la MN dans plusieurs pays dans le monde.

-Contamination des aliments

Les foyers de la MN dans les élevages commerciaux de volailles ont été souvent associés à des aliments contaminés par des matières fécales de pigeons sauvages infectés par le virus de la MN (Alexander *et al.*, 1985; O'Reilly, 1994). Les oiseaux prédateurs ou la pratique d'alimentation des volailles avec des eaux grasses non traitées contenant des viandes de volaille peuvent aussi être à l'origine de transmission de la MN (Alexander, 1988).

2. La vaccination

Différentes stratégies de prévention et de contrôle de la MN consistent d'une part, à empêcher l'infection des oiseaux sensibles et, d'autre part, à réduire le nombre d'oiseaux sensibles par la vaccination (Rauw *et al.*, 2009c). Ainsi, la vaccination des volailles contre la MN vise à limiter le risque d'infection des volailles par les APMV-1 virulents et à réduire la transmission virale, tout en prévenant les signes cliniques et la mortalité. Cependant la politique de vaccination varie selon le statut endémique et la perspective d'émergence de la MN ou selon la situation géographique.

a. Les différents types de vaccins utilisés contre la MN

-Les vaccins vivants

Les vaccins vivants peuvent être utilisés pendant la vaccination de masse dans les fermes commerciales de taille industrielle par inhalation ou dans l'eau de boisson. Les souches vaccinales les plus utilisées dans la vaccination de masse dans les fermes commerciales actuellement sont HB1/1947 (Hitchner & Johnson, 1948), PHY-LMV42, Queensland/V4 (Simmons, 1967) et Ulster/1967 (Alexander, 2003b; van Eck & Goren, 1991), La Sota (Goldhaft, 1980) and VG/VA (Perozo *et al.*, 2008a). Les souches mesogènes Mukteswar (Iyer & Hashmi, 1945), Roakim (Allan & Gough, 1974; Beaudette *et al.*, 1949), Komarov (Komarov & Goldsmit, 1946), Hertfordshire ou F (Dobson, 1952), Pigeon/1984, Alaska196/1998 (Kim *et al.*, 2007b), et CA02 (Wakamatsu *et al.*, 2006) sont souvent utilisées en Afrique et en Asie. En effet, le choix des souches vaccinales vivantes (lentogène ou mesogène) est variable en fonction de la situation de la maladie et des réglementations sanitaires de chaque pays.

Les vaccins vivants induisent une production élevée d'anticorps de la classe des IgA, IgY et IgM dans les sérums des poussins (Russell & Ezeifka, 1995). De plus, par inoculation intraoculaire, ces vaccins induisent aussi la production locale d'IgA au niveau de la glande de Harder (Russell & Koch, 1993) et d'IgM tout au long du canal lacrymal (Russell & Koch, 1993). Des récepteurs du virus de MN sont également présents dans le tractus digestif des poules (Rehmani & Spradbrow, 1995) et la vaccination par voie orale (vaporisation, eau de boisson ou boulette de grain) induit chez les poules vaccinées une immunité à médiation cellulaire au niveau des muqueuses de l'appareil digestif (Ilderis *et al.*, 1990; Jayawardane & Spradbrow, 1995; Rehmani *et al.*, 1995).

L'existence de flambées très virulentes de MN dans des fermes de volailles commerciales vaccinées contre cette maladie en Californie, Texas et Italie (Capua *et al.*, 2002; Chenault, 2003) a démontré la limite de l'utilisation des stratégies de vaccination universelle avec des virus vaccinaux vivants. En effet, la présence d'anticorps maternelle interfère avec l'établissement d'une immunité protectrice persistant après une seule vaccination à un jour d'âge (Czifra *et al.*, 1998; Westbury, 1984). Pour lutter contre la MN, la vaccination dans l'œuf (*in ovo*) à l'intérieur de la cavité amniotique comme la vaccination contre la maladie de Marek aux Etats Unis depuis 1982 (Haddad *et al.*, 2003), peut être utilisée pour éviter l'échec vaccinal dû à la présence d'anticorps maternel chez les poussins (Rauw *et al.*, 2009a).

-Les vaccins inactivés

Les vaccins inactivés anti-MN sont composés de virus vaccinaux inactivés mélangés à des adjuvants et à des conservateurs. Les adjuvants traditionnels utilisés dans les élevages de volailles commerciales sont le gel d'alumine (Al(OH)₃-gel) et l'huile minérale (Marcol 52) utilisée en émulsion (Degen *et al.*, 2005). L'immunisation avec les vaccins inactivés est faite par l'injection individuelle par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Plusieurs souches vaccinales ont été utilisées dans la fabrication de ces vaccins : la souche lentogène La Sota, les souches mesogènes Mukteswar, Roakim, Hertfordshire ou souche F. Les vaccins inactivés sont souvent utilisés pour les rappels de vaccination. L'inactivation des virus par le formaldéhyde ou la β-propiolactone est la plus courante actuellement.

-Les vaccins recombinants

Des vaccins recombinants contre l'APMV-1 ont été développés par l'insertion des deux glycoprotéines de surface F et HN dans un autre virus (herpesvirus, baculovirus et les rétrovirus) ou un ADN plasmidique (CAST, 2008). Le vaccin recombinant produit en insérant le gène de fusion (F) d'APMV-1 dans le virus d'herpes de dinde a démontré une bonne protection chez les oiseaux vaccinés expérimentalement et éprouvés avec les souches virulentes de MN (Morgan *et al.*, 1993; Perozo *et al.*, 2008b). Les avantages de cette approche reposent sur la stabilité du virus vecteur dans l'hôte et sur la possibilité de production de vaccins à valence multiple immunisant contre plusieurs maladies par l'insertion de différents gènes. En outre, la réponse anticorps post-vaccinale peut être

différenciée de celle induite par les souches sauvages (stratégie DIVA). Un des inconvénients de cette approche est le coût de mise au point des virus vecteurs.

-Les ISCOMs

Les ISCOMs (Immune-Stimulating Complex) sont constitués d'une matrice lipidique dans laquelle sont introduites des protéines membranaires. La matrice est composée d'un mélange de lipides tels que le QuilA qui est une saponine possédant des propriétés adjuvantes, de Triton X-100 et de cholestérol et d'autres lipides (Kersten & Crommelin, 2003). Après solubilisation par un détergent, les protéines membranaires, sont incorporées dans la matrice grâce à des interactions hydrophobes. L'utilisation des ISCOMs pour la présentation antigénique a été développée dans les années 1980 et elle est actuellement étendue à certains vaccins vétérinaires, en particulier dans le domaine de l'aviculture (Homhuan *et al.*, 2004; Morein *et al.*, 1984). L'application de ce procédé de vaccination contre la MN a été développée par l'équipe de Homhuan (Homhuan *et al.*, 2004) et a conféré un niveau élevé d'immunité et de protection *in vivo* (Kapczynski *et al.*, 2003). Bien que plus efficace que les précédents, ce type de vaccin est recommandé pour des cas exceptionnels seulement, à cause de leur coût de production élevé.

b. Les vaccins contre la MN et les souches vaccinales les plus utilisées à Madagascar

Plusieurs vaccins contre la MN sont commercialisés à Madagascar (Tableau 5). Ils sont fabriqués essentiellement à partir de trois souches : La Sota, Hitchner B1, et Mukteswar. Les deux premières sont des souches lentogènes appartenant au génotype II. La souche Mukteswar est une souche mesogène appartenant au génotype III. Le choix du vaccin par les éleveurs se fait en fonction du type d'élevage et de vaccins disponibles (monovalent ou polyvalent). Dans les fermes d'élevage du type commercial (compartiment II), les éleveurs utilisent les vaccins à base des souches La Sota ou Hitchner B1, déjà utilisés par les producteurs de poussins d'un jour (Tableau 6). En revanche, les éleveurs villageois (compartiment I) utilisent généralement le vaccin PESTAVIA® (souche Mukteswar).

Tableau 5: *Les vaccins anti-MN commercialisés à Madagascar*

Nom commerciale	Type de vaccin	Souche Vaccinale	Voie d'administration	Doses par flacon	Fabricant
PESTAVIA®	vivant et lyophilisé	Mukteswar	S/C	50	IMVAVET Madagascar
HIPRAVIAR-B1®	vivant et lyophilisé	Hitchner B1	Oculonasal, orale ou par nébulisation	1000 -5000	HYPRA Espagne
HIPRAVIAR-CLONE®	vivant et lyophilisé	Clone 79 (La sota)	Oculonasal, orale ou par nébulisation	1000 -5000	HYPRA Espagne
HIPRAVIAR-S®	vivant et lyophilisé	La Sota	Oculonasal, orale ou par nébulisation	1000 -5000	HYPRA Espagne
TAD® ND vac LaSota	vivant et lyophilisé	La Sota	Oculonasal, orale ou par nébulisation	1000 -5000	Lohman Animal Health Allemagne
TAD® ND vac HB 1	vivant et lyophilisé	Hitchner B1	Oculonasal, orale ou par nébulisation	1000 -5000	Lohman Animal Health Allemagne
TAD® IB/ND vac HB 1	vivant bivalent et lyophilisé	Hitchner B1/H120	Oculonasal, orale ou par nébulisation	1000 -5000	Lohman Animal Health Allemagne
ITANEW®	Inactivé huileux	La Sota inactivé	Injection intramusculaire	100 -500	Laprovét France
PESTOS®	Inactivé huileux	Hitchner B1 inactivé	Injection intramusculaire	100 -500	Merial France

Tableau 6: *Exemple de schéma de vaccination utilisé à Madagascar*

	Age de vaccination	Voie d'administration	Souche vaccinale
Poulet de chair	1 ^{er} jour	Trempage de bec	Hitchner B1
Poule pondeuse	1 ^{er} jour	Trempage de bec	Hitchner B1
	35 ^{ème} jour	Eau de boisson	La Sota (Clone 30)
	8 ^{ème} semaine	Injection intramusculaire ou sous cutané	La Sota inactivé
Poulet villageois	21 ^{ème} jour Rappel annuel	Injection sous cutané	Mukteswar

B. Contexte actuel de paramyxovirus aviaire type 1 (APMV-1) chez les oiseaux domestiques et sauvages aquatiques à Madagascar et objectifs de cette étude

1. Aviculture à Madagascar

En zone intertropicale, l'aviculture tient souvent une place de choix dans le développement des pays. Du point de vue économique, elle permet de diversifier le revenu des populations, d'économiser une partie des devises dépensées pour l'importation de produits alimentaires de haute valeur nutritive et de valoriser enfin les sous-produits agro-industriels en les transformant en produits nobles tels que la viande et les œufs (Doubia, 2002). En Afrique comme dans de nombreux pays en développement, deux types d'aviculture sont couramment distingués : l'aviculture traditionnelle constituée de poulaillers traditionnels et l'aviculture de type commercial. A Madagascar, le cheptel aviaire domestique est estimé à 33,9 millions de têtes (FAO, 2008). L'aviculture de type commercial (poule pondeuse et poulet de chair), représente 5% du cheptel national et est groupée dans des zones périurbaines, essentiellement autour d'Antananarivo (Mahitsy et Ivato). En revanche, les 95% restants représentent l'aviculture villageoise (Koko *et al.*, 2006a; Porphyre, 2000). La comparaison de ces deux systèmes d'élevage selon Alders et Spratbrow (2000) est donnée dans le Tableau 7.

Les fermes de type commercial suivent le calendrier vaccinal édicté par les fournisseurs de poussin d'un jour (SOPRAMAD, AVITECH et CERES). Comme dans l'aviculture commerciale en Asie et dans le reste de l'Afrique, les vaccins fabriqués avec les souches lentogènes Hitchner BI (HB1) et La Sota (vivant ou inactivé) sont encore les plus utilisés à Madagascar (Randriamanantena D., communication personnelle). Malgré l'application de la vaccination dans les fermes commerciales, la MN reste un problème important dans l'industrie avicole et des cas sporadiques de MN dans des fermes de volailles vaccinées sont enregistrés en Asie comme en Afrique (Cho *et al.*, 2007; Servan de Almeida *et al.*, 2009; Snoeck *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2001).

L'aviculture traditionnelle à Madagascar est un type d'élevage de races communes, pratiquée essentiellement en milieu rural, sous un mode extensif (Tadelle, 2003) où chaque famille possède entre sept et 20 têtes de volaille (Koko *et al.*, 2006b). Chez ces aviculteurs

villageois, le taux de vaccination contre la MN est très faible et ne dépasse pas 10% (Maminiaina et al., 2007) (ANNEXE 1).

Tableau 7: *Comparaison de l'aviculture de type villageois et de type commercial*

Caractéristiques	Type villageois	Type commercial
Apports de travail	Minimal	Considérable
Logement	Arbres; poulaillers faits en matériaux locaux; peu coûteux	Bâtiments utilisant des matériaux standards ; coûteux
Alimentation	Restes alimentaires, céréales, pas de complément ; peu coûteuse	Rations commerciales équilibrées; coûteuse
Eau	Eau de puits, eaux usées, sources naturelles	Réserve d'eau potable essentielle
Production	Faible ; peut augmenter avec une meilleure nutrition et le contrôle des maladies	Elevée ; mais demande beaucoup d'investissements
Qualité de la viande	Peu grasse ; saveur agréable	Plus grasse ; moins de saveur
Apports vétérinaires	Aucun, vaccinations occasionnelles	Contrôle de nombreuses maladies virales, bactériennes et parasitaires fondamental pour une production efficace
Impact sur l'environnement	Minimal : peut être positif par l'approvisionnement en fertilisateurs organiques et pour le contrôle des animaux nuisibles	Négatif : production intensive de céréales pour les rations ; utilisation abusive des antibiotiques occasionnelle
Système d'élevage	Complexe : système d'élevage intensif impliquant la culture extensive et la production de bétail	Habituellement une seule entreprise, intensive
Diversité génétique	Extensive	Limitée

Ces éleveurs traditionnels utilisent essentiellement le vaccin PESTAVIA® (souche mesogène Mukteswar) produit par l'Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires (IMVAVET). Ce faible taux de vaccination ne suffit à contrôler la MN qui reste le principal obstacle au développement de l'aviculture villageoise à Madagascar (Koko *et al.*, 2006a). Une enquête épidémiologique réalisée au niveau des élevages villageois en 1999 a démontrée l'existence de différentes formes cliniques de la MN, allant de la forme asymptomatique et enzootique à la forme épizootique (Maminiaina *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que les différents pathotypes viraux au sein de l'APMV-1 à l'origine de ces différentes manifestations cliniques

de la MN circulent en même temps aussi bien dans le secteur traditionnel que commercial (Couacy-Hymann *et al.*, 1991).

Plusieurs questions sur l'écologie des souches d'APMV-1 circulantes, à l'origine des cas annuels de MN dans l'aviculture villageoise et des cas sporadiques chez les volailles commerciales restent à éclaircir. Une meilleure connaissance sur les caractéristiques moléculaires, biologiques et épidémiologiques des souches d'APMV-1 responsables de ces foyers au niveau des fermes commerciales et villageoises est ainsi nécessaire.

2. Les oiseaux sauvages

En plus des oiseaux domestiques, Madagascar abrite également 294 espèces d'oiseaux sauvages dont 107 sont endémiques (Langrand, 1995; Pidgeon, 1996). La grande île constitue un site d'accueil pour de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs paléarctiques comme le chevalier aboyeur (*Tringa nebulari*), le bécasseau cocorli (*Calidris ferruginea*) et les limicoles de la famille des Scolopacidae (Langrand, 1995). La zone humide du lac Alaotra (zone conservée RAMSAR) qui constitue un des plus grands plans d'eau douce de Madagascar (Andrianandrasana *et al.*, 2005), abrite soixante douze espèces d'oiseaux dont cinquante espèces sont présentes en permanence (ANNEXE 5), notamment les Anatidés : *Dendrocygna viduata*, *Dendrocygna bicolor*, *Anas melleri*, *Anas erythrorhyncha*, *Anas hottentota* et *Sarkidiornis melanotos* (Langrand, 1995; Pidgeon, 1996). Au lac Alaotra, ces Anatidés sauvages vivent en promiscuité avec les palmipèdes domestiques (Minodier, 2010). Dans la nature, ces oiseaux sauvages aquatiques sont considérés comme des réservoirs de souches asymptomatiques d'APMV-1 appartenant essentiellement à la classe I et au génotype I de la classe II (Kim *et al.*, 2007c; Zanetti *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, aucune donnée sérologique ou virologique n'existait sur les oiseaux sauvages à Madagascar.

3. Projet GRIPAVI

Les questions que nous avons posées sur la caractérisation des souches circulantes des APMV-1 chez les oiseaux domestiques et sauvages sont incluses dans les objectifs principaux du projet «Fonds de solidarité prioritaire» ou FSP GRIPAVI. Ce projet instauré sur 3 ans a été financé par le Ministère Français des Affaires Etrangères. L'axe principal d'étude de ce projet tourne autour des « pestes aviaires » c'est-à-dire l'Influenza aviaire (IA) et la maladie de

Newcastle (MN). Les principaux objectifs de ce projet sont regroupés en trois points : (1) une meilleure connaissance du mode de transmission de ces virus faisant la part entre une diffusion virale entretenue par les oiseaux sauvages ou par les volailles domestiques, et précisant les modalités de leur persistance dans les pays infectés, (2) une analyse des méthodes de lutte actuelle et future reposant sur la modélisation de la diffusion des virus et (3) la déduction des méthodes de surveillance adaptées aux spécificités épidémiologiques de ces infections et aux méthodes de contrôle disponibles. Dans le cadre de ce projet, les trois objectifs du programme sont mis en œuvre par le CIRAD, associé à l'ANSES (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), l'ONCFS ou Office national de la chasse et de la faune sauvage (France), l'OVI ou *Onderstepoort Veterinary Institute* (Afrique du Sud) et l'ILRI ou *International Livestock Research Institute* (Kenya, Ethiopie). Madagascar par l'intermédiaire du FOFIFA-DRZV ou Département de Recherches Zootechniques et Vétérinaires à Antananarivo fait partie des 5 pays bénéficiaires de ce projet en tant qu'observatoire (Figure 18). Il intervient dans l'étude de la circulation virale dans les communautés d'oiseaux domestiques et sauvages, ainsi que dans l'analyse du risque lié aux mouvements commerciaux des volailles à Madagascar.

4. Les principaux objectifs de cette étude

Les objectifs principaux de cette thèse visent à répondre à certains des objectifs du projet GRIPAVI portant spécifiquement sur la MN. Ils consistent à : (i) répertorier les différentes souches circulantes de virus de la MN (APMV-1) chez les oiseaux domestiques (type villageois et type commercial) et sauvages à Madagascar, (ii) déterminer le rôle des oiseaux dans ces trois compartiments dans la persistance et transmission des virus de la MN, (iii) et essayer de comprendre l'origine des cas sporadiques de MN dans les élevages de poulets de type commercial qui ont suivi le calendrier vaccinal.

Dans le cadre de cette étude, les communautés d'oiseaux domestiques de type villageois et de type commercial ainsi que les oiseaux sauvages sont dénommés respectivement Compartiment I, II et III.

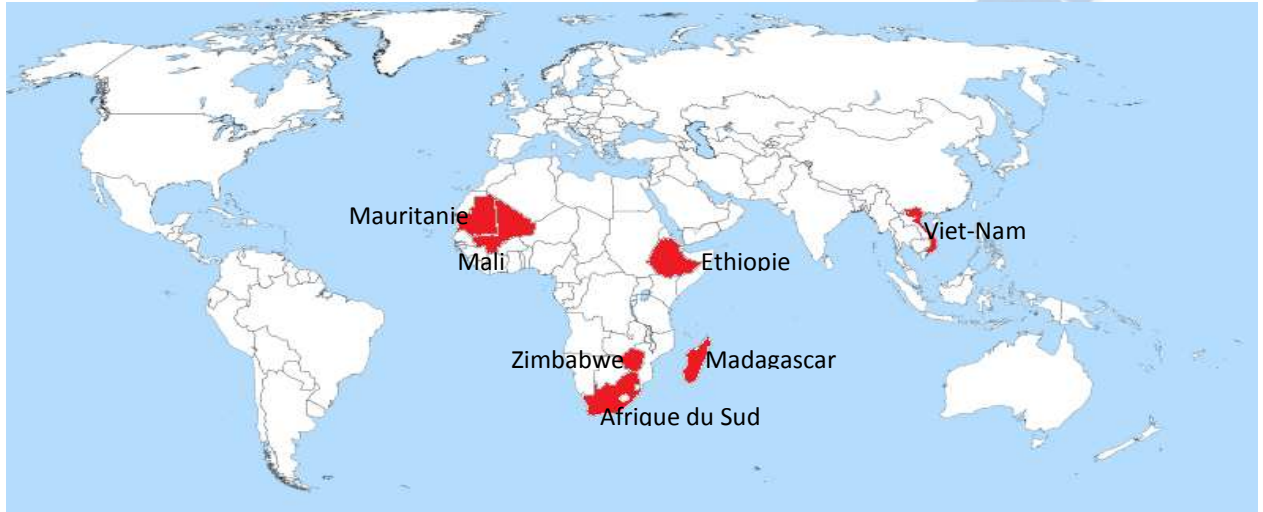


Figure 18: Les pays observatoires (en rouge) dans le projet FSP GRIPAVI

MATERIELS

ET

METHODES

CHAPITRE III: MATERIELS ET METHODES

A. Caractérisation des souches d'AMPV-1 circulantes

1. Zone d'étude

Dans le cadre de cette étude, deux sites ont été définis (Figure 19) : le site du lac Alaotra et le site d'Antananarivo et ses environs. Ces deux sites ont été choisis soit par l'importance de l'élevage de type commercial, soit par la possibilité de mixage entre les différentes espèces aviaires, domestiques et/ou sauvages.

- Sur le site Antananarivo se trouve, la quasi-totalité des élevages avicoles de type commercial. En effet, les zones autour d'Antananarivo sont réputées par leurs élevages de poules pondeuses, de poulets de chair et la production de foie gras. Les communes de Mahitsy et d'Antanetibe Mahazaza situées à environ 30 Km à l'ouest d'Antananarivo, sont reconnues comme étant la première zone de production d'œufs de consommation à Madagascar. Dans ces deux communes, plusieurs échelles d'intensification d'élevage de poules pondeuses et de poulets de chair sont rencontrées, allant de quelques centaines à des milliers. A côté de ces élevages de type commercial se trouvent des petits élevages de type villageois d'environ une dizaine d'oiseaux par famille (Koko *et al.*, 2006a). A une centaine de kilomètres de la capitale, bordant le lac Itasy, se trouvent les communes d'Ampefy, d'Analavory et de Manazary. Ces communes appartiennent au bassin de production agricole et d'élevage des hautes terres et possèdent le plus grand marché rural du moyen-ouest de l'île. A 50km environ au sud de la capitale, dans le district d'Andramasina, se trouvent plusieurs communes à la limite de la forêt humide de l'est : Ambohimadana, Alarobia Vatosola, Sabotsy Ambohitromby, Alatsinainy Bakaro et Tankafatra. Après la région de Fianarantsoa, ces communes sont les principaux pourvoyeurs de canards prêts à gaver pour la commune de Behenjy (capitale de la production de foie gras à Madagascar). Les canards et les poulets villageois de cette zone approvisionnent aussi les marchés d'Antananarivo.

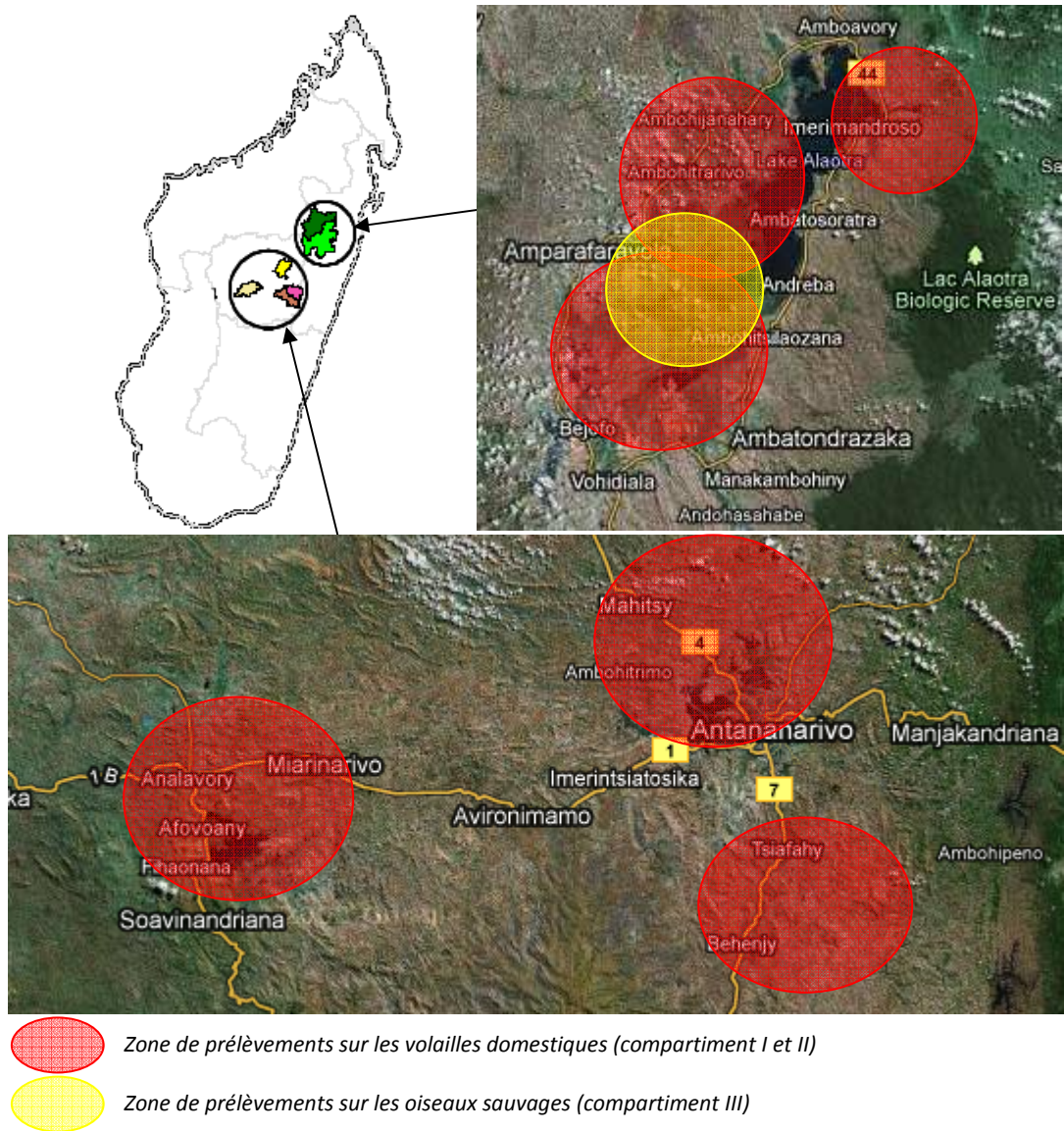


Figure 19: Les sites d'étude du lac Alaotra et d'Antananarivo et ses environs

- La zone humide du lac Alaotra est le grenier à riz de Madagascar. Elle abrite soixante douze espèces d'oiseaux dont une cinquantaine y vivent en permanence (Langrand, 1995; Pidgeon, 1996). En aviculture, cette zone est réputée pour l'élevage traditionnel d'oies en plus des poulets villageois. Elle approvisionne aussi les marchés de la capitale. Les villages à forte densité de palmipèdes ont été choisis au lac Alaotra : Anororo, Antsakoana et Ampilahona sur la rive ouest du lac Alaotra ;

Ampitatsimoà , l'extrême Sud du lac ; Imerimandroso et Andromba sur la rive Est du lac .

Ces communes et ces villages sont connus pour l'élevage des Anatidés domestiques : les oies (*Anser anser*) et les canards communs (*Anas platyrhynchos*). Ces canards vivent en promiscuité avec les oiseaux sauvages (Minodier, 2010). La commune d'Imerimandroso possède un grand marché drainant les volailles de cette zone avant leur exportation vers des marchés plus importants à Antananarivo et à Toamasina.

2. Locaux et types de prélèvement

Des prélèvements sanguins et des écouvillonnages (trachéaux « C » et cloacaux « T ») ont été effectués sur les volailles domestiques (compartiment I et II) dans les deux sites d'études pendant l'enquête de prévalence en 2008 (mai –juin), la surveillance épidémiologique en 2009 (juillet –août) et la surveillance des foyers (2010).

L'objectif de **l'enquête de prévalence en 2008** était de déterminer l'incidence de la MN et de l'influenza aviaire (IA) dans les deux zones d'étude. Cette enquête se déroulait dans les deux sites en mai et juin 2008. Le choix des fermes et des Fonkotany, une subdivision administrative de base malgache comprenant, des hameaux, des villages, des secteurs ou des quartiers a été effectué au hasard par tirage au sort au niveau de la commune à partir d'une liste fournie par le Maire. Pendant la campagne de 2008, au moins 385 fermes de volailles domestiques réparties dans 10 communes à l'intérieur de trois zones du grand Antananarivo et cinq communes de la région du lac Alaotra ont été sélectionnées (Rasamoelina Andriamanivo, 2011b). Pendant cette enquête, 1181 échantillons de sérum et 1094 écouvillons trachéaux et cloacaux ont été collectés. En 2009, au vu des résultats de séroprévalence de l'IA plus élevés au lac Alaotra (25%) qu'à Antananarivo (3%) (Rasamoelina Andriamanivo, 2011a; b) (ANNEXE 4), le projet GRIPAVI a limité au lac Alaotra la campagne de prélèvements sanguins et d'écouvillonnages sur les oiseaux domestiques et les oiseaux sauvages aquatiques (**surveillance épidémiologique de 2009**). Pendant cette surveillance en 2009, les prélèvements ont été effectués sur les oiseaux domestiques tous les trois mois dans les cinq communes dans les mêmes fermes. L'objectif de ce suivi longitudinal était de déterminer l'incidence de la MN au lac Alaotra.

Lors de la **surveillance des foyers** de décembre 2009 à novembre 2010, l'enquête a été menée avec l'approche participative incluant les agents communautaires en santé animale (ACSA) de la région et les chefs Fokontany. Après l'alerte téléphonique donnée par les ACSA sur l'existence d'un foyer de la MN, l'équipe de préleveurs basés au lac Alaotra effectuait des prélèvements sur les oiseaux malades et d'autres volailles en contact, apparemment sains ou en bonne santé. L'alerte est lancée lorsque au moins 2 fermes dans un Fokontany ont été atteintes simultanément avec plus de 30% de mortalité (Rasamoelina Andriamanivo, 2011a; b). Pendant les enquêtes de 2008 et 2009 des prélèvements ont été également effectués dans chaque foyer suspecté de MN. Au cours de cette étude, des échantillons d'organe (cerveau et viscère) ont été aussi prélevés sur les volailles morbides ou mortes dans les foyers suspectés de MN en 2008, 2009 et 2010 dans les deux zones d'étude.

L'ensemble des prélèvements effectués sur les oiseaux sauvages a été réalisé après piégeage au collet avec l'aide des villageois locaux et des agents de l'ONG Durrell Wildlife Conservation Trust (DWCT), du FOFIFA-DRZV et du CIRAD (2009). Tous les oiseaux capturés spécifiquement pour les besoins de cette étude ont été relâchés aussitôt après avoir été prélevés afin que ces activités de recherche n'entraient pas les exigences de conservation des espèces en vigueur dans le lac Alaotra depuis de nombreuses années. Toutes les séances de prélèvements sur oiseaux domestiques ont été effectuées conjointement par le FOFIFA-DRZV et le CIRAD (2008 – 2010).

Les différents échantillons analysés dans le cadre de cette étude (2008, 2009 et Juin 2010) sont résumés dans le Tableau 8. Les codes des échantillons malgaches sont précédés de MG (ex : MG-725/08).

Tableau 8 : Les différents échantillons analysés dans cette étude

Oiseaux	2008			2009			2010
	Sérum	écouvillons	cerveau	Sérum	écouvillons	cerveau	écouvillon
Domestiques	1181	1094*	2	-	180*	1	80
Sauvages	-	-	-	352	313*	-	-

* = N: N/2 écouvillons trachéaux et N/2 cloacaux sur N/2 oiseaux ; Exemple : N=1094 écouvillon dont 547 écouvillons trachéaux et 547 cloacaux sur 547 oiseaux

a. Prélèvement des sérums

La prise de sang a été faite au niveau de la veine alaire des oiseaux à l'aide d'une seringue selon la technique de Janeen et Rini (2000). Les sérums obtenus sont aliquotés, étiquetés puis conservés à -20°C au FOFIFA-DRZV jusqu'à l'utilisation.

b. Prélèvement des écouvillons

Des écouvillonnages trachéaux (T) et cloacaux (C) ont été effectués en même temps que les prises de sang sur chaque oiseau. Les écouvillons obtenus ont été placés séparément dans une solution saline (PBS) contenant des antibiotiques (pénicilline 10.000 UI/ml ; streptomycine 10 mg/ml ; gentamicine 0,25 mg/ml et nystatine 5.000 UI/ml), ajustée à pH 7.0-7.4, avant leur conservation dans de l'azote liquide. Pour les analyses ultérieures, les écouvillons ont été envoyés sous régime du froid au CIRAD-Montpellier (France) ou analysés sur place.

c. Prélèvement d'organe

Lors du suivi longitudinal ou de la surveillance des foyers et en cas d'une suspicion de maladie de Newcastle, les volailles malades ont fait l'objet d'une description clinique. Sur les animaux malades, une autopsie a été réalisée sur place ou au laboratoire pour une étude descriptive des lésions. Les lésions des différents organes ont été étudiées selon la méthode décrite par Alders et Spradbrow (2000). Après l'autopsie, des prélèvements d'organe (cerveau) ont été effectués dans le but de rechercher le virus par isolement. Tous les échantillons ont été placés au froid immédiatement après le prélèvement et congelés dans de l'azote liquide.

3. Analyse sérologique

L'infection par le virus de l'APMV-1 entraîne une réponse immunitaire humorale de l'hôte qui se traduit par la production d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines de surface du virus. La détection de ces anticorps spécifiques dans les prélèvements de sérums a été faite par le test sérologique ELISA de compétition en utilisant le kit SVANOVIR®NDV-Ab (LSI, France) selon les recommandations du fournisseur. Les sérums à analyser ont été dilués au demi avec du tampon de dilution et transférés dans la plaque pré-sensibilisée fournie dans le kit. Les anticorps spécifiques anti-APMV-1, lorsqu'ils sont

présents dans les échantillons, sont capturés par l'antigène fixé sur les micro-cupules. Après incubation et lavage, le conjugué formé par un anticorps monoclonal spécifique anti-APMV-1 marqué à la peroxydase a été distribué dans les plaques. Pour les échantillons séronégatifs, le conjugué forme un complexe avec l'antigène APMV-1 fixé dans les cupules de la microplaque et entraîne le développement d'une coloration. En revanche, pour les échantillons séropositifs les anticorps polyclonaux anti-APMV-1 présents dans le sérum se fixent sur l'antigène, empêchant la formation du complexe entre le conjugué et l'antigène et le développement de la coloration. Après incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. La solution composée de substrat (Peroxyde : H₂O₂) et de chromogène (TMB : 3.3',5.5' - Tetramethylbenzidine) est distribuée dans les micro-cupules. Le changement de couleur du chromogène, conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase du conjugué, indique la fixation du conjugué et signe une réaction négative. La lecture des résultats a été réalisée à 450 nm par un lecteur de microplaque ELISA (LABSYSTEMS MULTISCAN® Plus). La concentration est exprimée en pourcentage de compétition (PC) selon les méthodes recommandées par le fournisseur du kit (Czifra *et al.*, 1996).

Les résultats d'analyse sérologique sont utilisés pour déterminer une séoprévalence (p) dans le compartiment I et III et une séoprotection dans le compartiment II. Exprimées en pourcentage, séoprévalence et séoprotection sont calculées par un rapport entre le nombre de positifs (n) et l'effectif total de la population (N) et.

$$p = \frac{n}{N}$$

Pour tenir compte des fluctuations liées à l'échantillonnage, les résultats de prévalence sont affectés d'un intervalle de confiance à 95% ou IC₉₅.

$$IC_{95} = p \pm 2\sigma \text{ ou } [IC_{95} : p - \sigma ; p + \sigma]$$

$$\text{Avec } \sigma = \sqrt{\frac{pq}{n}} \text{ et } q = 1-p$$

4. Analyse virologique

L'analyse virologique a pour objectif de caractériser les souches isolées ou à défaut de générer des séquences qui ont permis une analyse phylogénétique sur une partie du génome. Cette analyse virologique comprend cinq étapes débutant par la détection moléculaire d'une partie du gène de fusion par la technique de transcription inverse suivie d'une amplification génique en temps réel (QRT-PCR). Les produits d'amplification (les amplicons) des échantillons positifs au criblage par PCR ont été séquencés pour déterminer le pathotype de la souche (lentogène, mesogène ou velogène). Les échantillons positifs ont également été soumis aux essais d'isolement viral sur œuf embryonné. Le séquençage des souches virales isolées a été fait sur une partie ou la quasi-totalité du génome. Les séquences obtenues ont été analysées dans le but de connaître l'appartenance à un génogroupe des APMV-1 et de déterminer les relations phylogénétiques avec les autres génotypes existants. Pour quelques souches virales isolées, la détermination de la virulence par des tests *in vivo* a été réalisée (Figure 20). Comme en sérologie, les résultats de viroprévalence sont affectés d'un intervalle de confiance (IC₉₅).

a. Extraction d'acide nucléique

La première étape de l'analyse moléculaire commence par l'extraction des acides nucléiques. Dans cette étude, nous avons utilisé le kit NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL™) pour l'extraction des ARN totaux selon deux versions : la version manuelle pour l'extraction au FOFIFA-DRZV et la version sur plaque 96 pour l'extraction à haut débit réalisée par un automate au CIRAD-Baillarguet (Montpellier-France). L'extraction de l'ARN avec ce kit comporte cinq étapes : lyse, précipitation, fixation, lavage et élution. Avant l'extraction proprement dite, les microtubes (2 ml) contenant l'écouvillon et la solution de transport doivent être bien homogénéisés à l'aide d'un « thermoshaker » pour libérer les cellules ou les tissus susceptibles de contenir les virus.

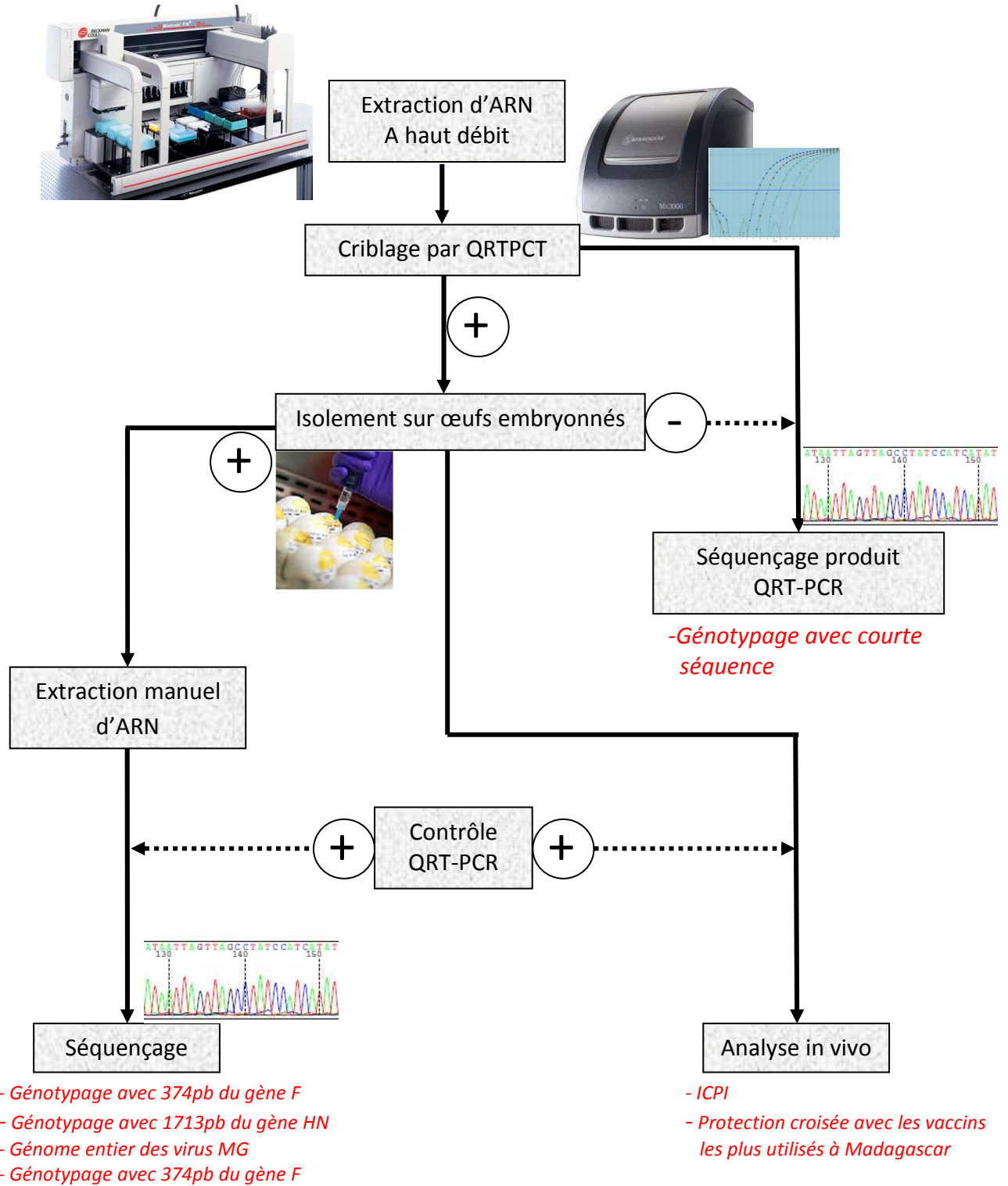


Figure 20: Procédure d'analyse virologique

b. Criblage par reverse transcriptase PCR en temps réel (QRT-PCR)

La technique de QRT-PCR a été utilisée dans cette étude pour la détection de l'APMV-1 dans les écouvillons. Elle est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode de QRT-PCR basée sur l'utilisation du fluorophore SYBR® Green I.

Le choix des primers utilisés ainsi que la technique pour le diagnostic de la MN ont été mis au point au laboratoire de virologie du CIRAD à Montpellier. Pour les réactions de QRT-PCR nous avons utilisé le «Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master mix Kit, STRATAGEN®». Les réactifs utilisés sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Préparation et composition des mix PCR avec le couple de primer (F+259 et F488rev)

Réactifs	Concentration finale par réaction	Volume nécessaire pour une réaction (en µl)
H ₂ O sans RNase	-	8,625
Master Mix 2X	1X	12,5
Rox ref diluted 1/500	30 nM	0,375
F+259 20µM	300 nM	0,375
F488rev 20µM	100 nM	0,125
Mix enzyme	-	1
ARN	-	2
Volume final		25

Les étapes et les paramètres des cycles de QRT-PCR sont les suivants :

- Une étape de reverse transcription (RT) : synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) à 50°C pendant 30 minutes.
- Une étape d'inactivation de l'enzyme reverse transcriptase et d'activation de l'enzyme polymérase à 95°C pendant 15 minutes.
- Une réaction de polymérisation en chaine pendant 40 cycles, chaque cycle comportant en trois étapes :
 - Dénaturation de la matrice d'ADN à 95°C pendant 15 secondes
 - Hybridation des amorces avec les matrices à 60°C pendant une minute, avec collecte de fluorescence.

- Phase d'élongation à 72°C pendant 30 sec
- Une série de réactions menées à la température de fusion ou T_m (*melting temperature*) comprenant :
 - La dénaturation de la matrice ADN à 95°C pendant une minute
 - L'hybridation des deux brins d'ADN à 55°C pendant 30 secondes
 - Une deuxième phase de dénaturation de la matrice ADN à 95°C pendant 30 secondes

En parallèle aux échantillons testés, chaque plaque de 96 puits comporte un témoin sans ARN (NTC, pour «*no template control*»), un contrôle négatif d'extraction (échantillon négatif extrait au même temps que les échantillons testés) et une gamme standard de 4 dilutions d'un APMV-1 connu (souche V4).

Dans la présente étude, le couple d'amorces utilisé pour le criblage initial a été le F259/F488rev, (Tableau 10) basé sur le gène F. Les échantillons possédant un seuil de coupure de fluorescence (Ct) inférieur à 39 cycles et une température de fusion ou T_m supérieure à 80°C ont été considérés comme positifs. Le séquençage d'un fragment du gène F a été systématiquement utilisé pour la confirmation des échantillons positifs en QRT-PCR.

La barre de seuil de fluorescence de chaque plaque a été positionnée en fonction des valeurs de Ct des 4 points de la gamme standard correspondant aux contrôles positifs de sorte à standardiser le seuil de coupure de positivité d'un test à l'autre : les deux premiers points doivent avoir des valeurs de Ct inférieures à 39, le 3^{ème} point doit être à la limite du seuil de détection et le dernier point doit rester négatif. Une tolérance de $\pm 1,5$ Ct dans ces valeurs a été appliquée. De plus l'efficacité de la réaction doit se situer entre 90 et 110%.

Tableau 10: *Les primers utilisés pour le screening virologique QRT-PCR/MN*

Nom des primers	Séquences (5' – 3')	Amplicon	Références
F259	ACAYTGACYACTTTGCTCA	239pb (4802 – 5040)*	-
F488rev	TGCACAGCYCATTGGTTGC		-

* : Position d'hybridation des amorces par rapport au génome de *La Sota* (AF077761)

-: Primers dessinés au CIRAD

c. Isolement viral

L'isolement des APMV-1 a été réalisé sur œufs embryonnés selon le protocole recommandé par l'OIE (OIE, 2009). Après clarification par centrifugation à 1000 g pendant environ 10 min

à température ambiante, les surnageants des écouvillons ou des organes positifs en APMV-1 par QRT-PCR ont été dilués au 1/3 dans une solution PBS additionnée d'antibiotiques (Pénicilline : 2.000 unités/ml, streptomycine : 2 mg/ml, gentamycine : 50 µg/ml, et mycostatine : 1.000 UI/ml). Deux cents microlitres de la dilution ont été inoculés dans la cavité allantoïque de 4 œufs embryonnés de poule, exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) et âgés de 9 à 11 jours (Figure 21). Après l'inoculation, les œufs ont été incubés à 37°C pendant 7 jours et mirés quotidiennement. A J+1, les œufs morts sont éliminés car la mortalité à ce stade est considérée comme non spécifique, résultant du traumatisme de l'inoculation. Dans les jours suivants, les liquides allantoïdiens des œufs contenant des embryons morts ont été récupérés et analysés. Les embryons restés vivants ont été sacrifiés au bout des 7 jours et le liquide allantoïdien prélevé pour un deuxième cycle d'amplification sur une nouvelle série d'œufs. Dans le cas de virus provenant de la faune sauvage, un troisième passage à l'aveugle a été réalisé pour favoriser l'adaptation du virus sur œuf de poule.

La confirmation de la présence de virus APMV-1 dans les liquides allantoïdiens provenant des embryons morts a été effectuée par QRT-PCR selon la technique décrite précédemment.



Figure 21: Inoculation dans la cavité allantoïdienne

d. Amplification et séquençage des gènes F et HN ou les six gènes N, P, M, F, HN et L

Après isolement, l'amplification de la totalité des gènes F, HN ou du génome a été faite en fonction des souches isolées afin de les caractériser.

L'amplification a été effectuée par reverse transcriptase PCR ou RT-PCR conventionnelle en utilisant un ou plusieurs des 23 couples d'amorce décrits dans le Tableau 11 pour le kit Qiagen OneStep RT-PCR (QIAGEN®). Les amorces ont été choisies de façon à avoir un chevauchement entre les différents fragments (Figure 22). Les résultats d'amplification ont été visualisés sur gel d'agarose à 1% ou 1,5% par la technique d'électrophorèse en utilisant le bromure d'éthidium (EtBr) ou le Gel Red comme révélateur. Les produits d'amplification bruts ont été envoyés pour séquençage à une société spécialisée (Cogenics Genome Express S.A. Meylan-France) avec les amorces respectives suivant leurs recommandations ou à l'Unité de Virologie, Immunologie, Parasitologie Aviaires et Cunicoles du laboratoire de l'Anses (Ploufragan-France) pour ce qui concerne le séquençage du génome entier (à exception des segments terminaux 5' et 3' de chaque gène).

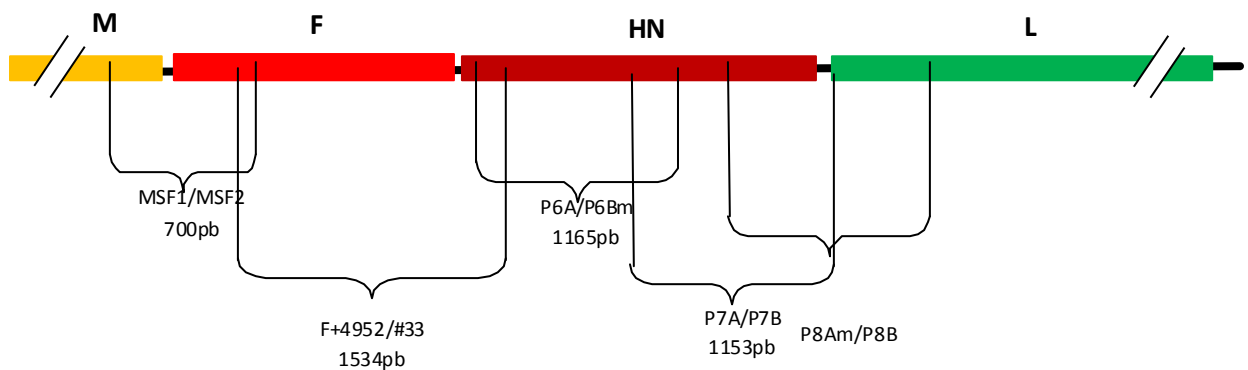


Figure 22: Exemple d'agencement schématique des séquences amplifiées pour la construction des gènes F et HN

Tableau 11: *Les primers utilisées pour générer la séquence génomique*

Nom des primers	Séquence 5'-3'	Taille d'amplicon	Référence
1U	AAGGCGAAGRAGCAATCGAA	520	-
1L	GGGTTCCGTTRCTGCATGC		
2U	CCCCAGTTCAACAAYAGGAG	637	-
2L	GGTGCAAAGCTCATCTGGTC		
3U	AAAAAATGAARCAGCTCATGCC	599	-
3L	TCGRTCAGTACCCCCAGTC		
4U	AGCGGTGGCAAAYAGCATG	587	-
4L	GGAYGCTCCCATGCTTCTC		
5U	TTGGAAGGAGYGCAATCCC	692	-
5L	GCTGATAGTCAACTTTAYTTAC		
6U	GCACCTGTGGATCATGTCCA	719	-
6L	GATGCAGCCGGRTCGATG		
7U	AGARAGACACTGTCCGTGC	721	-
7L	TRTTAGTTGCACTCTTCTTGCA		
8U	CRATGCTCTGCCTAGGRAG	564	-
8L	CACGGAAGGTCCGAGCAC		
9U	GAAGAAAGTGACATTTGACAAG	624	-
9L	AGCTGCAAGAGGCCTGCC		
10U	TAGAAAAAACACGGGTAGAAGA	594	-
10L	CCAACCTGCCACTGCTAGTTG		
MFS1	GACCGCTGACCACGAGGTTA	699	(Aldous et al., 2004)
MFS2	GCTGCCAACATCCTCCGACT	(4306-5005)	
F+4952	GCAGCCGCAGCTCTAATAC	1534	-
#33	AGTAAGATTGCGATCCGG	(4952-6486)	(Aldous et al., 2004)
P6A	ATCAGATGAGAGCCACTACA	1165	(Zou et al., 2005)
P6Bm	TAGACTGGGAACCATACGC	(6177-7342)	-
P7A	GGGTTTGACGCCAATACCA	1153	(Zou et al., 2005)
P7B	TCTGCCCTTTCAGGACCCGA	(7237-8390)	
17U	CATGTTTTAAAGTTGTCAAGAC	562	-
17L	GATTCAAGTATTTTTYTCCATTG		
18U	ACAAACTACTCTAYTACTGGAA	645	-
18L	TCCATCATATCYGCATACATC		
19U	TTGTTACTCCTGAGCTTGTC	591	-
19L	TTCTTTCTGTATCCRTTGATGA		
20U	GAGCCARATGTGCGCACC	543	-
20L	CTTAGCRAAAATCCGCCATT		
21U	TTGAGTACCTAAGAGATGACA	634	-
21L	TCTTGCTGCAGCAAGTTGGA		
22U	GATGAYATATATATGTCAAGTC	597	-
22L	CAAAAGAGATGTCYTCAATCCA		
23U	ACTTAAACTACCTAATGAGTTG	639	-
23L	ATCCGCATCAGCCTCTTGAT		
24U	AAGCAAGCTCTGTAGGTAGG	568	-
24L	GTTGTCCYCCATAAGCCCAG		
25U	TTGCAAAAATAGCYCATATGTC	590	-
25L	GCTCATAACTCTTRAAGATAGC		
26U	AATAAGTTTATGTATGATCCTAG	514	-
26L	GGAACAGCAGATCRTACTTATT		
27U	CGGATTTTATYGAAATGTCTGC	626	-
27L	CTCTGAACARGTAYCGTACTA		
28U	GATTTGAGTGCCYCCAGCAAG	603	-
28L	CTTCCCTTACAGARTGCATG		
29U	GACATTGARATTCCTCCAGG	566	-
29L	TCGAATGACTGTGTCAATGTG		
30U	GCCCGTCCGTCCATTCTG	698	-
30L	TACCAACAAGATTGGTGAA		

-: Primers utilisés dans cette étude à l'ANSES (Ploufragan-France) et au CIRAD (Montpellier-France)

5. Analyses Moléculaires

La bioinformatique est constituée par l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation informatique de l'information biologique (Claverie *et al.*, 1999). Dans cette étude, nous avons utilisé la bioinformatique (i) pour traiter les données (information génétique) contenues dans les séquences d'ARN viral par intermédiaire de son ADN complémentaire (ADNc) ou dans les séquences des protéines codées par les différents gènes analysés ; (ii) pour prédire ou analyser la structure 3D ou le repliement des macromolécules biologiques (protéines) ; et (iii) pour prédire les relations phylogénétiques des souches APMV-1 isolées à Madagascar.

Dans cette étude, les analyses bioinformatiques ont été effectuées avec cinq logiciels différents : Vector NTI 11™ ou VNTI (INVITROGEN®), BioEdit version 7.0.9.0 (06/27/07), RDP3 Beta 42 (*Recombination Detection Program version 3*), MEGA-4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0.1*) ainsi que le logiciel «Swiss-Pdb Viewer DeepView version 4.0».

a. Base de séquences et alignements

Vector NTI nous a servi à stocker et à aligner des séquences nucléotidiques de l'APMV-1 traitées dans cette étude. Une base de données principale a permis de gérer toutes les séquences qui ont été rapatriées de la base de données publique GenBank mais aussi nos propres séquences générées lors du séquençage. Le logiciel permet de corriger les électrophorégrammes obtenus lors du séquençage et d'effectuer des contigs de deux séquences. Les alignements multiples de séquences d'acides nucléiques protéiques ont aussi été effectués avec ce logiciel.

b. Détermination d'une éventuelle recombinaison

Le RDP3 Beta 42 ou « *Recombination detection program* » (Martin *et al.*, 2009) (http://www.bioinf.manchester.ac.uk/recombination/_programs.shtml) est un programme de détection et d'analyse de recombinaison entre une ou plusieurs séquences nucléotidiques déjà alignées. Les analyses ont été effectuées sur les alignements multiples à partir d'un fichier généré par MEGA4. Pour cela, 80 séquences de génomes complets des l'APMV-1 représentant les 10 génotypes existants ont été rapatriées de GenBank. Après

l'alignement des séquences, les segments terminaux 5' et 3' ont été exclus et les séquences de la souche MG-1992 et MG-725/08 ont été rajoutées. La détermination d'éventuelles recombinaisons génétiques a été en suite réalisée par logiciel RDP3.0b.

c. Analyse de la structure moléculaire des protéines F et HN

La forme tridimensionnelle (3D) des protéines est la forme active qui permet leur caractérisation fonctionnelle (Reynes *et al.*, 2009). La construction des structures 3D des protéines F et HN à partir des séquences d'acides aminés a été réalisée à l'aide du logiciel Swiss-Pdb Viewer DeepView v4.0. Ce logiciel est disponible sur le site de l'Institut Suisse de Bio-informatique (<http://www.expasy.org/spdbv/>). La méthode est basée sur la comparaison de la séquence d'acides aminés des protéines F et HN avec celles d'acides aminés des protéines de structure connues et disponibles dans « Protein Data Bank » (PDB), en utilisant les algorithmes inclus dans le logiciel «Swiss-Pdb Viewer DeepView v4.0 ». Nous avons utilisé les séquences modèles de protéine de fusion (PDB : IG5G) (Chen *et al.*, 2001) et de l'hémagglutinine-neuraminidase (PDB : 1e8t) (Crennell *et al.*, 2000). A partir de la forme 3D, il a été possible de localiser les positions des acides aminés substitués et susceptibles d'être à l'origine des variants antigéniques sur les souches d'APMV-1 malgaches.

d. Construction des arbres phylogénétiques

La détermination du génotype des souches malgaches a été effectuée avec le logiciel Méga 4 par analyse phylogénétique par comparaison avec les séquences de référence correspondant aux 10 génotypes (Tableau 12) déjà décrits dans la littérature et disponibles dans les banques de génomes (GenBank).

Des alignements multiples de nos séquences avec celles de GenBank ont été faits sur le gène de fusion ou F entre les positions 47 et 421 (374nt), sur le gène HN complet et sur les séquences du génome entier (Figure 23). Ils ont été exportés vers le logiciel MEGA-4 (Tamura *et al.*, 2007). Pour la construction des arbres phylogénétiques, nous avons utilisé la méthode de distance génétique qui estime le nombre de substitution nucléotidiques par site, entre les différentes séquences utilisées, en utilisant le modèle évolutif de Kimura à deux paramètres ou K2P (Kimura, 1980). L'arbre phylogénétique enraciné a été obtenu avec l'algorithme neighbor-joining ou NJ (Saitou and Nei, 1987), en utilisant la classe I de l'APMV-1 comme groupe externe. La robustesse de l'arbre a été évaluée avec la méthode de

bootstrapping (ré-échantillonnage) avec 1000 répétitions (Felsenstein, 1985). Le logiciel Mega4 ou Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4.0.1 est d'accès libre sur le site <http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html>.

Tableau 12: *Les séquences des souches avec leurs sites de clivage représentant les dix génotypes utilisés*

Souches			Site de clivage							
Identification	Numérod'Accession	Classe or Genogroupe ^a	←----- F ₂ →				← F ₁ -----→			
			112	113	114	115	116	*	117	118
			R	R	Q	R	R	*	F	I
DE R49/99	DQ097393	CI (6)	G	-	-	G	-	*	L	V
GO1US DCKI	AY626266	CI (6)	E	-	-	E	-	*	L	V
Herts33/56 (PEI)	AY170140	H33 (w) ^b	-	-	-	-	-	*	-	-
Herts33 (L)	AY170138	H33 (w) ^b	-	-	-	-	-	*	-	-
Ulster/67	AY562991	I (1)	G	K	-	G	-	*	L	-
Ethiopie Panvac (2/P2)	AY175720	I (1)	G	K	-	G	-	*	L	-
PHY-LMV42/66	DQ097394	I (1)	G	K	-	G	-	*	L	-
Hicthner B1	AF309418	II (2)	G	-	-	G	-	*	L	-
La Sota	AF077761	II (2)	G	-	-	G	-	*	L	-
Zimbabwe AV862/95	AY175710	II (2)	G	-	-	G	-	*	L	-
Zambie AV 72/95	AY175708	II (2)	G	-	-	G	-	*	L	-
Mukteswar	EF201805	III (3a)	-	-	-	-	-	*	-	-
Guangxi5/2000	DQ485259	III (3a)	-	-	-	-	-	*	-	-
Herts/33 (de Leeuw)	AY741404	IVea (3b)	-	-	-	-	-	*	-	-
BG 60-81	AF402129	IVea (3b)	-	-	-	-	-	*	-	-
BG 5-67	AF402104	IVbg (3b)	-	-	-	-	-	*	-	-
SIMF/64	AJ243390	IVbg (3b)	-	-	-	-	-	*	-	-
Soudan 72 AV 2203	AY135753	IVit (3b)	-	-	-	-	-	*	-	-
DE-191/77	AF525378	IVit (3b)	-	-	-	-	-	*	-	-
IT-48/68	AF297969	IVit (3b)	-	-	-	-	-	*	-	-
MA-307/77 ^c	EU604259	IV (3b)	-	-	-	-	-	*	-	V
MA-13/02 ^c	DQ096598	IV (3b)	-	-	-	-	-	*	-	V
Tanzania AV 1300/95	AY175687	V (3c)	-	-	-	K	-	*	-	V
Mexico468/01	EU518685	V (3c)	-	-	-	K	-	*	-	V
Brasil AV1769/90	AY175649	V (3c)	-	-	-	K	-	*	-	V
HR-111/01	AY150162	VI (4)	K	-	-	K	-	*	-	-
Soudan SD-4/75	AY151384	VI (4)	-	-	-	K	-	*	-	-
Egypte EG-3/87	AY150111	VI (4)	-	-	-	K	-	*	-	-
DE 61/93	AY150135	VI (4)	-	-	K	K	-	*	-	-
Strain NA	DQ659677	VII (5)	-	-	-	K	-	*	-	-
MZ 13/94	AF136775	VII (5)	-	-	-	K	-	*	-	-
Botswana ZA148/UP/98	AY210507	VII (5)	-	-	-	K	-	*	-	-
South Africa ZA606/UP/00	AY210497	VIII (3d)	-	-	-	K	-	*	-	-
Singapore SG-4H/65	AF136786	VIII (3d)	-	-	-	K	-	*	-	V
F48E9	AY508514	IX (3e)	-	-	-	-	-	*	-	-
SBD02	DQ227252	IX (3e)	-	-	-	-	-	*	-	-
TJ03	DQ227244	IX (3e)	-	-	-	-	-	*	-	-
TW/69	AF083959	X (3f)	-	-	-	K	-	*	-	-
TW/95-3	AF083970	X (3f)	-	-	-	K	-	*	-	-

^a: Génotype (linéage or sous-génotype) ; ^b : Souche de Weybridge (Czeglédi et al., 2003) ; ^c: (Czeglédi et al., 2006)

* : Site de clivage.

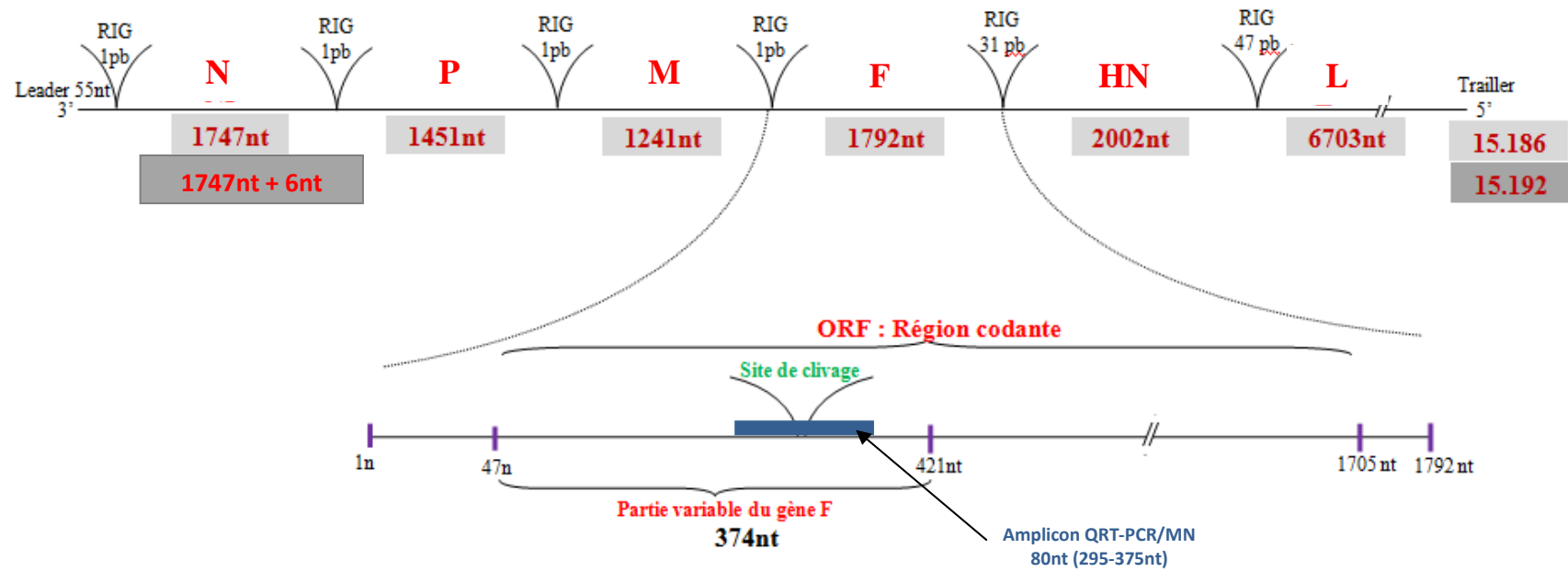


Figure 23: Partie variable du gène de fusion (F) et la courte séquence

A. Détermination de l'indice de pathogénicité intracérébrale ou IPIC

L'évaluation de la virulence d'un APMV-1 repose sur une ou plusieurs épreuves *in vivo* (OIE, 2009). L'index de pathogénicité intracérébrale (IPIC) ou ICPI (*Intracerebral Pathogenicity Index*) chez le poussin (*Gallus gallus*) d'un jour est l'un de ces tests officiels de mesure de virulence.

Dans le cadre de la présente étude, l'évaluation de la pathogénicité des souches a été réalisée à l'ANSES de Ploufragan (UVIPAC) suivant le protocole recommandé par l'OIE:

- i) Du liquide allantoïque infectieux frais présentant une activité hémagglutinante de titre $>2^4$ ($>1/16$) est dilué au $10^{\text{ème}}$ dans du soluté isotonique de chlorure de sodium stérile.
- ii) Un volume de 0,05 ml de la dilution virale est injecté par voie intracérébrale à 10 poussins issus d'œufs provenant d'un élevage exempté d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Les poussins doivent avoir plus de 24 h et moins de 40 h de vie au moment de l'inoculation.
- iii) Les poussins sont ensuite examinés toutes les 24 h pendant 8 jours.
- iv) A chaque observation, le score clinique suivant est attribué : 0 si l'état est normal, 1 si le poussin est malade et 2 s'il est mort. Pour les poussins morts, le chiffre 2 doit être réattribué lors de chacune des cotations quotidiennes restantes.
- v) L'IPIC est le score moyen obtenu par poussin et par observation sur la période de huit jours. Pour 10 poussins suivis sur 8 jours, il y aura donc 80 observations au total. L'IPIC correspondra à la somme des scores cliniques de tous les poussins divisée par 80.
- vi) Les APMV-1 les plus virulents donnent des IPIC qui approchent le score maximal de 2,0 alors que les souches lentogènes donnent des valeurs proches de zéro. Les souches possédant un IPIC moyen supérieur à 0,7 sont considérées comme virulentes.

B. Essai vaccinal avec une souche du génotype XI

Deux épreuves de virulence ont été réalisées en même temps dans le cadre de ce travail au FOFIFA-DRZV et à l'ANSES de Ploufragan (UVIPAC).

1. Essai vaccinal réalisé au FOFIFA-DRZV

a. Les animaux

Pour connaître l'efficacité des souches vaccinales La Sota, Hitchner B1 et Mukteswar, utilisées dans la prophylaxie de la MN à Madagascar, des épreuves de virulence *in vivo* sur des poulets (*Gallus gallus*) de race locale (gasy) ont été réalisées au FOFIFA-DRZV (Ampandrianomby-Madagascar) avec la souche virulente représentant le génotype XI. Cette partie de l'étude a eu comme objectif de connaître le niveau de protection de ces trois souches vaccinales par rapport à la souche MG-1992 appartenant au génotype XI, isolée au DRZV et titrant 10^7 DL₅₀/ml.

b. Les vaccins

Dans cette étude, nous avons choisi trois vaccins les plus utilisés à Madagascar. Les deux premiers vaccins HIPRAVIAR-S® et HIPRAVIAR-B1® sont produits par le laboratoire HIPRA S.A. (Girona, Espagne) et commercialisés par AVITECH S.A.R.L. (Tanambao Ivato, Madagascar). Le troisième vaccin PESTAVIA® est produit et commercialisé à Madagascar par l'IMVAVET. Les caractéristiques de ces vaccins sont présentées dans le Tableau 13. Les souches vaccinales La Sota (Goldhaft, 1980) et Hitchner B1 (Hitchner & Johnson, 1948) sont incluses dans le génotype II tandis que la souche Mukteswar dans le génotype III (Iyer & Hashmi, 1945).

Tableau 13: *Caractéristiques des vaccins et recommandations des fournisseurs*

Vaccin	HIPRAVIAR-S®	HIPRAVIAR-HB1®	PESTAVIA
Souche	La Sota	Hitchner B1	Mukteswar
Type	Vivant-lyophilisé	Vivant-lyophilisé	Vivant-lyophilisé
Titre/dose/ml	$10^{6,5}$ DIE ₅₀ /ml*	$10^{6,5}$ DIE ₅₀ /ml	$10^{4,3}$ DIE ₅₀ /ml
Voie d'administration	orale	orale	Sous-cutanée

* : DIE=Dose infectieuse sur embryon

c. Test de létalité de la souche MG-1992

Pour évaluer la létalité de la souche MG-1992 et la dose d'épreuve, la souche a été initialement inoculée par voie sous-cutanée à différentes dilutions (10^{-1} à 10^{-4}) à quatre lots

de cinq poulets en présence d'un lot témoin non inoculé. Après l'infection, un suivi quotidien a été effectué pour dénombrer les poulets malades, morts et en bonne santé. L'analyse *post mortem* a été faite sur les oiseaux morts.

d. Immunisation des poulets

Vingt poulets âgés de trois mois issus des poules non vaccinés (Ferme-IMVAVET), non immunisés et séronégatifs pour le virus de la MN ont été repartis aléatoirement dans quatre lots (cinq animaux/lot) et élevés dans quatre cages séparées. Les trois lots de poulets ont été immunisés selon la dose et la voie d'administration prescrites par les fabricants des vaccins utilisés.

e. Suivi sérologique

Le statut sérologique initial de quatre lots de poulets vis-à-vis de l'APMV-1 a été déterminé par la technique ELISA avant la vaccination ou S_0 (Figure 24). Après la vaccination, le niveau d'anticorps anti-APMV-1 a été mesuré de façon hebdomadaire sur les quatre lots (trois vaccinés et un témoin) par le test ELISA de compétition (SVANOVIR®NDV-Ab-LSI) pendant 4 semaines (S_1, S_2, S_3, S_4).

Un relevé de la morbidité et de la mortalité a été réalisé pendant toute la durée de l'essai. Les oiseaux vivants 15 jours après la mort du dernier poulet dans le lot témoin ont été euthanasiés.

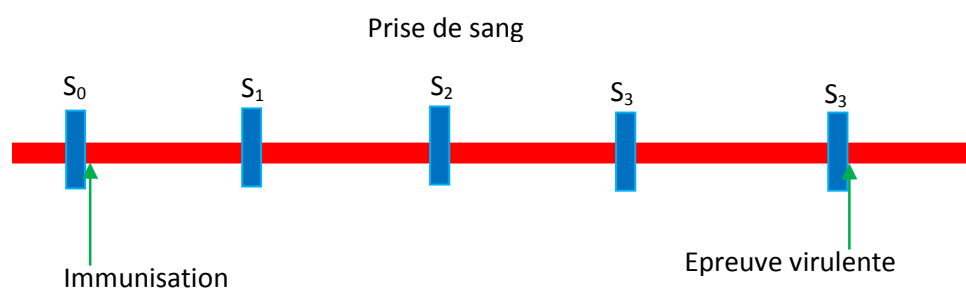


Figure 24 : Chronologie de l'expérience (FOFIFA-DRZV)

f. Epreuve de virulence

Un mois (S_4) après l'immunisation (Figure 24), l'épreuve de virulence a été effectuée par injection sous-cutanée d'une dose (titrant $10^5 DL_{50}/ml$) d'épreuve de la souche MG-1992 par

oiseau. Un suivi quotidien a été fait pour enregistrer les poulets malades, morts et en bonne santé.

g. Analyse de la protection vaccinale

L'analyse des résultats d'épreuve a été effectuée selon les recommandations de l'OIE (OIE, 2008). La protection est considérée comme satisfaisante lorsqu'à la fin des 10 jours, 90 % des poulets vaccinés survivent sans signe de maladie et tous les oiseaux témoins meurent dans les 6 jours après l'infection.

h. Biosécurité

Pendant toute l'expérimentation, le lieu d'élevage des poulets et le lieu de suivi après la vaccination se trouvent dans un bâtiment (Bâtiment A) physiquement différent de celui réservé pour les épreuves vaccinales (Bâtiment B). Pour minimiser le risque de dissémination vers l'extérieur du bâtiment, tous les déchets de la ferme confinée (Bâtiment B) ainsi que tous les poulets morts ou euthanasiés après l'expérimentation ont été incinérés dans un fût métallique. L'entrée et la sortie du bâtiment ont été contrôlées avec passage obligatoire dans un pédiluve. Les systèmes d'aération sont couverts par des grillages avec des mailles de 1 mm pour éviter le passage de petits oiseaux.

2. Essai vaccinal réalisé à l'UVIPAC (ANSES-Ploufragan)

L'essai effectué à l'ANSES de Ploufragan (UVIPAC) a eu comme objectifs de : (i) déterminer si la vaccination simultanée de poussin d'un jour avec un vaccin vivant HB1 et un vaccin inactivé huileux La Sota Clone 30 confère une protection suffisante vis-à-vis d'une infection par la souche malgache MG-725/08 (génotype XI) réalisée trois semaines après la vaccination ; (ii) comparer cette protection à celle observée suite à l'infection selon les mêmes modalités mais par la souche d'épreuve de référence Herts/33 (génotype IV); (iii) évaluer également le taux d'excrétion du virus d'épreuve après infection.

a. Les animaux

Les poussins (*Gallus gallus*) EOPS (exempte d'organisme pathogène spécifique) utilisés dans cette partie de l'étude sont issus de la ferme ANSES de Ploufragan (UVIPAC) à l'âge d'un jour.

b. Les vaccins

Les deux vaccins contre la MN (Nobilis® ND Hicthner et Nobilis® Newcavac) choisis dans le cadre de ce travail à l'ANSES, ont été produits par le laboratoire MSD unité santé animale de Merck (France). Les caractéristiques de ces deux vaccins sont résumées dans le Tableau 14.

Tableau 14: *Caractéristiques des vaccins utilisés à l'ANSES*

Vaccin	Nobilis® ND Hicthner	Nobilis® Newcavac
Souche	Hicthner B1	La Sota (clone 30)
Type	Vivant-lyophilisé	Inactivé huileux
Voie d'administration	Oculonasale	Intramusculaire (cuisse)
Dose	Une goutte l'œil et une goutte narine	0,5ml

c. Les souches d'épreuve

La souche représentant le génotype XI (MG-725/08) isolée dans le cadre de cette étude en 2008 à partir d'une poule apparemment en bonne santé a servi à l'épreuve de virulence. La souche Herts 33/VNHe/2.1 appartenant au génotype IV a été utilisée à l'ANSES comme souche de référence (Tableau 15).

Tableau 15: *Caractéristiques des souches d'épreuve utilisées à l'ANSES*

Souche	MG-725/08	Herts 33/VNHe/2.1
Titre	$10^{9,8}$ DEI ₅₀ /ml	$10^{9,4}$ DIE ₅₀ /ml
ICPI	1,9	1,9
Voie d'épreuve	intramusculaire	intramusculaire

d. Immunisation et épreuve virulentes des poussins

Cent poussins EOPS âgés de 2-3 jours ont été repartis aléatoirement en trois lots (Tableau 16). Chaque lot a de nouveau été subdivisé en deux sous-lots vacciné (V) et non vacciné (NV). Les poussins restants ont été saignés à blanc pour la récolte de sérum avant l'immunisation. L'immunisation des poussins vaccinés (V) a été réalisé simultanément en

utilisant les vaccins Nobilis® ND Hitchner et Nobilis® Newcavac. Le premier lot de poussin a été éprouvé avec la souche malgache MG-725/08 tandis que le deuxième lot avec la souche de référence Herts 33/VNHe/2.140 (Tableau 16). Le troisième lot constitue le groupe témoin non-évalué.

Tableau 16: *Protocole de l'essai à l'ANSES*

Lots	MG-725/08		Souche Herts 33/VNHe/2.1		Témoin	
	1	2	3	4	5	6
Souche	V*	NV**	V	NV	V	NV
Nombre de poussins utilisés	25	12	25	12	10	10

* : Vacciné simultanément avec HB1=Hitchner B1 ; CI-30= La Sota (clone 30) ; ** : NV=Non vacciné

Trois semaines (S_3) après l'immunisation des poussins (Figure 25), les deux premiers lots sont soumis à une injection intramusculaire d'une dose (titrant à 10^5 DI E_{50} /ml) par oiseau. Un suivi quotidien pendant 5 semaines a été effectué pour enregistrer les poulets malades, morts et en bonne santé. Tous les poulets morts sont autopsiés. Au cours de ce suivi, des prélèvements d'écouvillon ont été réalisés sur 20 poulets vaccinés de chaque lot éprouvé (lot 1 : Souche Herts 33/VNHe/2.1 et lot 2 : MG-725/08)

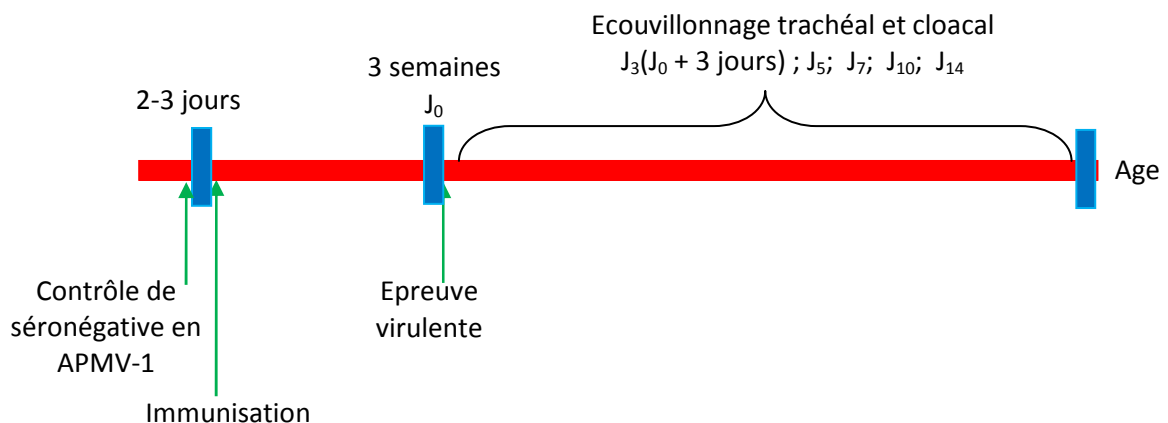


Figure 25: Chronologie de l'expérience (ANSES-Ploufragan France)

e. Analyse de la protection vaccinale

L'analyse des résultats d'épreuve a été effectuée selon les recommandations de l'OIE (OIE, 2009) et les standards de la pharmacopée Européenne pour un test d'immunogénicité reposant sur la protection clinique. La protection est considérée comme satisfaisante

lorsqu'au bout de 10 jours, 90 % des poulets vaccinés survivent sans signe de maladie et tous les oiseaux témoins meurent dans les 6 jours.

f. Analyse de l'excrétion virale

Pour évaluer une éventuelle excrétion virale, des prélèvements d'écouvillons (trachéal et cloacal) ont été effectués sur les poulets vaccinés (V) pendant 14 jours après l'épreuve de virulence à J₃ (J₀ + 3 jours), J₅, J₇, J₁₀, J₁₄ et J₁₇. Ces écouvillons ont été analysés par QRT-PCR/NDV en mélange de cinq par date, nature et lot d'origine selon la technique de Wise *et al.* (Wise *et al.*, 2004). Les produits de QRT-PCR positifs ont été envoyés pour séquençage pour différencier les types de site de clivage des échantillons APMV-1 positifs. Afin de transformer les Ct obtenus par QRT-PCR en équivalent (Eq) DIE₅₀/mL, une gamme de dilution réalisée à partir d'une production virale (MG-725/08) en liquide allantoïdien d'œufs embryonnés EOPS, préalablement titrée sur ce même support, a été testée en QRT-PCR NDV gène M. Les résultats d'excrétion virale sont exprimés en Eq DIE₅₀/mL.

3. Déclaration d'éthique

Toutes les expérimentations animales concernant les tests IPIC ont été réalisées selon les normes internationales approuvées par l'OIE, sous couvert d'autorisations délivrées par la Direction des services vétérinaires des Côtes d'Armor au nom de la préfecture des Côtes d'Armor (N° 22-18) et par la Direction des services vétérinaires de l'Hérault au nom de la Préfecture de Hérault (N° 34-114). L'essai vaccinal a été réalisé au FOFIFA avec l'autorisation du Chef du département du FOFIFA-DRZV.

RESULTATS

CHAPITRE IV: RESULTATS

Partie 1: Détermination de la circulation des souches d'APMV-1 par l'analyse sérologique et virologique

A. Analyses sérologiques

Dans cette étude, 1181 sérums de volailles domestiques et 313 sérums d'oiseaux sauvages aquatiques prélevés dans les deux sites d'étude ont été analysés par le test ELISA de compétition SVANOVIR® NDV-Ab (Tableau 17 et Tableau 18).

1. Résultats des analyses sérologiques dans les deux compartiments d'oiseaux domestiques (I et II)

Les résultats des analyses sérologiques effectués sur les 1181 sérums issus des volailles non vaccinées (compartiment I) et vaccinées (compartiment II) sont présentés dans le Tableau 17. Les palmipèdes et les poulets locaux prélevés en 2008 dans le compartiment I, ont montré respectivement une séroprévalence de 47,77% [IC₉₅ : 42,57% à 52,97%] et 70,94% [IC₉₅ : 67,44% à 74,44%].

Tableau 17 : *Résultats sérologiques effectués chez les oiseaux domestiques en 2008*

Compartiment	Espèces	Vaccination	Séroconversion				Statut
			Négatif	Positif	Total	% [IC ₉₅]*	
Domestique I	Palmipède**	Non	187	171	358	47.77 [±5,2]	Séroprévalence
	Poulet local		186	454	640	70.94 [±3,5]	
Domestique II	Poule pondeuse	Oui	12	171	183	93.44 [±3,6]	Séroprotection

[IC₉₅]* : Intervalle de confiance à 95%

Palmipède** : regroupe les oies (*Anser anser*), les canards communs (*Anas platyrhynchos*) et les canards de barbarie (*Cairina moschata*)

Pour les poules pondeuses issues de fermes de type commerciale (compartiment II) qui sont systématiquement vaccinées contre la maladie de Newcastle, la séroprévalence s'établit à 93,44% [IC₉₅ : 89,84% à 97,04%].

2. Résultats des analyses sérologiques chez les oiseaux sauvages aquatiques (compartiment III) en 2009

Les résultats des analyses sérologiques effectués avec le test ELISA de compétition sur les 313 sérums des oiseaux sauvages aquatiques appartenant à 15 espèces et sept familles, sont résumés dans le Tableau 18.

La séroprévalence instantanée en APMV-1 enregistrée chez les oiseaux sauvages aquatiques du lac Alaotra en 2009 est de 10,22% [IC₉₅ : 6,86% à 13,57%]. Cependant, ces oiseaux séropositifs sont classés uniquement dans la famille *Anatidae*. Parmi les six espèces de canards sauvages analysées, les canards à bosse (*Sarkidiornis melanotos*), les canards à bec rouge (*Anas erythrorhyncha*) et les canards de Meller (*Anas melleri*) présentent une séroprévalence instantanée respectivement de 50%, 48% et de 23%. Ces résultats indiquent une circulation importante de l'APMV-1 chez les oiseaux sauvages et surtout chez les anatidés du lac Alaotra (Tableau 18).

Tableau 18: Résultats sérologiques (ELISA compétition-MN) effectués sur les oiseaux sauvages aquatiques (année : 2009)

Famille	Espèce	Séroconversion			% [IC95%]
		Négatif	Positif	Total	
ANATIDAE	<i>Anas erythrorhyncha</i>	17	16	33	48.48
	<i>Anas hottentota</i>	29	2	31	6.45
	<i>Anas melleri</i>	10	3	13	23.08
	<i>Sarkidiornis melanotos</i>	1	1	2	50.00
	<i>Dendrocygna bicolor</i>	76	5	81	6.17
	<i>Dendrocygna viduata</i>	100	5	105	4.76
Sous-total ANATIDAE		233	32	265	12.08 [±3,6%]
ARDEIDAE	<i>Butorides striatus</i>	1	0	1	0.00
CHARADRIIDAE	<i>Charadrius pecuarius</i>	1	0	1	0.00
LARIDAE	<i>Larus cirrocephalus</i>	1	0	1	0.00
	<i>Dryolimnas cuvieri</i>	2	0	2	0.00
	<i>Gallinula chloropus</i>	20	0	20	0.00
	<i>Porphyryla alleni</i>	12	0	12	0.00
RALLIDAE	<i>Rallus madagascariensis</i>	1	0	1	0.00
ROSTRATULIDAE	<i>Rostratula benghalensis</i>	9	0	9	0.00
SCOLOPACIDAE	<i>Gallinago macrodactyla</i>	1	0	1	0.00
Sous-total des autres familles		44	0	48	0.00
Total		281	32	313	10.22 [±3,16%]

B. Analyses virologiques

1. Résultats d'analyse virologique dans les deux compartiments (I et II) des oiseaux domestiques

Les analyses de criblage virologique par QRT-PCR effectuées chez les oiseaux domestiques (n= 547) pendant l'enquête de prévalence de 2008, ont révélé 29 échantillons positifs, soit une prévalence virologique de 5,3% [IC₉₅ : 3,97% à 6,62%]. Parmi les positifs, six échantillons proviennent de palmipèdes (quatre canards communs et deux oies), soit une prévalence virologique de 1,1% [IC₉₅ : 0,22% à 1,98%]. Cependant 89% de ces échantillons positifs (soit 26/29) correspondent à des poules (*Gallus gallus*).

Sur les 180 oiseaux domestiques analysés pendant la surveillance épidémiologique réalisée en 2009 uniquement au lac Alaotra, 19 ont été APMV-1 positifs avec une prévalence virologique de 10,6% [IC₉₅ : 7,43% à 13,79%], soit deux fois plus élevée que celle de l'enquête précédente. Parmi ces 19 échantillons positifs, sept proviennent des palmipèdes (cinq canards communs et deux oies), ce qui correspond à une prévalence virologique de 3,8% [IC₉₅ : 1% à 6,6%], également plus élevée que celle de l'enquête de 2008.

2. Surveillance épidémiologique dans le compartiment III des oiseaux sauvages aquatiques

Parmi les 352 oiseaux sauvages analysés au lac Alaotra en 2009, trois ont été trouvés AMPV-1 positifs, ce qui correspond à une prévalence égale à 0,85% [IC₉₅ : 0,36% à 1,34%].

Partie 2: Caractérisations phylogénétiques des souches circulantes

A. Isolement viral et séquençage

1. Les isolats obtenus dans cette étude

Lors de cette étude, neuf souches d'APMV-1 ont été isolées d'oiseaux domestiques et sauvages entre 2008 et 2009. Ces neuf isolats ont été amplifiés (Tableau 26, Figure 27 et 28) et séquencés en partie ou en totalité. De plus, une souche ancienne isolée en 1992 au laboratoire de virologie du FOFIFA-DRZV a été entièrement séquencée. Les séquences du génome complet ou des gènes F et HN entier des souches MG-1992 (HQ266603), MG-725/08 (HQ266602), MG-39-04/08 (HQ266605) et MG-Meola/08 (HQ266604) générées dans cette étude sont déposées dans le GenBank (Tableau 19).

Tableau 19: *Les différentes souches isolées dans cette étude*

Souche	Espèces	Code	Région	Compartiment (I**, II*** et III****)	Statut		Séquence		
					Clinique	Vaccin utilisé	Gène	Taille (nt)	Numéro d'accession
APMV-1/ Chicken/MG-1992	<i>Gallus gallus</i>	MG-1992	Ivato Antananarivo	II	Poule pondeuse morte	La Sota	NP, P, M, F, HN et L	15 082	HQ266603
APMV-1/Chicken/MG-725/2008	<i>Gallus gallus</i>	MG-725/08*	Mahitsy Antananarivo	I	Poulet local sans signe clinique	NV	NP, P, M, F, HN et L	15 097	HQ266602
APMV-1/Chicken/MG-39-4/2008	<i>Gallus gallus</i>	MG-39-04/08	Ivato Antananarivo	II	Poulet de chair mort	La Sota	F et HN	4249	HQ266605
APMV-1/Chicken/MG-Meola/2008	<i>Gallus gallus</i>	MG-Meola/08	Tsarahonenana- Antananarivo	I	Poulet local de combat, malade (signe nerveux)	NV	F et HN	3966	HQ266604
APMV-1/Chicken/MG-BBS/2009	<i>Gallus gallus</i>	MG-BBs/09	Tsarahonenana - Antananarivo	I	Poulet local mort (signe nerveux)	Mukteswar	Une parti M et F	374	-
APMV-1/Duck/MG-168/2009	<i>Dendrocygna viduata</i>	MG-168/09	lac Alaotra	III	-	-	Une parti M et F	374	-
APMV-1/Anas/MG-057/2009	<i>Anas melleri</i>	MG-057/09	lac Alaotra	III	-	-	Une parti M et F	515	-
APMV-1/Chicken/MG-140/2009	<i>Gallus gallus</i>	MG-140/09	lac Alaotra	I	Poulet local sain	Mukteswar	Une parti M et F	533	-
APMV-1/Chicken/MG-101/2009	<i>Gallus gallus</i>	MG-101/09	lac Alaotra	I	Poulet local sain	Mukteswar	Une parti M et F	510	-
APMV-1/Chicken/MG-122/2014	<i>Gallus gallus</i>	MG-122/09	lac Alaotra	I	Poulet local sain	Mukteswar	Une parti M et F	874	-

NV: non vacciné

Surbrillance grise: souche ancienne isolée en 1992

* : Souche isolée à la fois trachéale et cloacal

** : Compartiment I : élevage de type villageois ; *** : élevage de type commerciale ; **** : Oiseaux sauvages

Tableau 20: *Les différents échantillons possédants des produits de QRT-PCR-NDV exploitables après séquençage*

Code	Année	Espèces	Région	Compartiment (I* ou II**)	Statut	
					Clinique	Vaccination
MGF-003C/10 ^a	2010	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I		NV ^c
MGF-003T/10	2010	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I		NV
MGF-068/10	2010	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I		NV
MGF-069/10	2010	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I	Malade avec suspicion de la MN	NV
MGF-074C/10	2010	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I		NV
MGF-074T/10	2010	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I		NV
MGF-082/10	2010	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I		NV
MGS-227/10 ^b	2009	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I	Poulet local sain	NV
MGS-271/10	2009	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I	Poulet local sain	NV
MGS-353/10	2009	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I	Poulet local sain	NV
71 MG-1511/08	2008	<i>Canard mullard</i> ^{***}	Behenjy-Antananarivo	II	Canard à gaver sain	-
MG-487/08	2008	<i>Gallus gallus</i>	Iac Alaotra	I	Poulet local sain	NV
MG-276/08	2008	<i>Anas sp</i>	Iac Alaotra	I	Canard commun sain	-
MG-686/08	2008	<i>Anas sp</i>	Ambatombohangy-Antananarivo	I	Canard commun sain	-
MG-1440/08	2008	<i>Gallus gallus</i>	Alatsinainy Bakaro-Antananarivo	I	Poulet local sain	NV
MG-1544/08	2008	<i>Gallus gallus</i>	Behenjy-Antananarivo	I	Poulet local sain	NV
MG-1200/08	2008	<i>Gallus gallus</i>	Manazary-Antananarivo	II	Poulet local sain	NV

* : Compartiment I : élevage de type villageois ; ** : élevage de type commerciale ; *** : Croisement entre canard commun (*Anas sp*) et canard de barbarie (*Cairina moschata*)

MGF^a : Surveillance de foyer de MN 2010; MGS^b : suivi longitudinal 2010; NV^c : non vacciné

1. Les produits de QRT-PCR

Parmi les échantillons positifs dans les deux compartiments d'oiseaux domestiques (I et II), 16 séquences entre les positions 295 et 375 du gène F issues du criblage initial par QRT-PCR ont été exploitables. Ces 16 séquences englobant le site de clivage du gène F ont été également analysées phylogénétiquement.

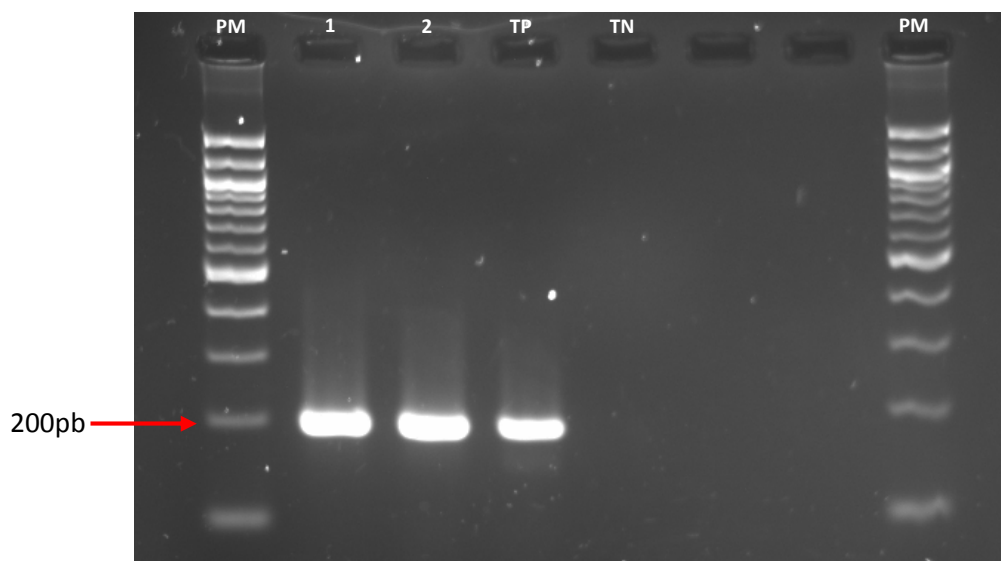


Figure 26: Migration sur gel d'agarose 1% coloré avec bromure d'éthidium. Amplicon (1 : MG-1992 ; 2 : MG-725/08) obtenu avec le couple de primer F2A/F2AS. TN : témoin négatif; TP : témoin positif (La Sota).

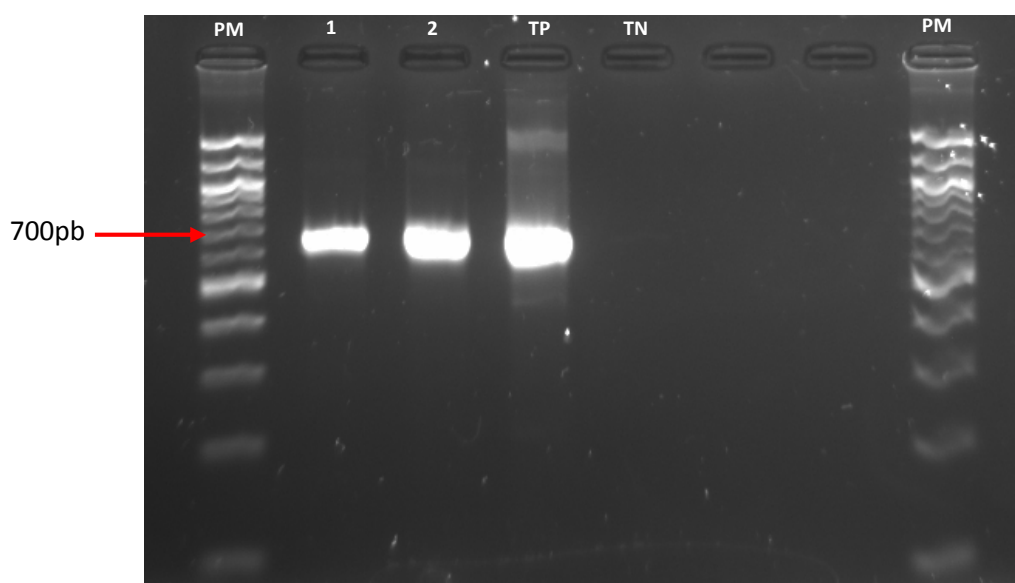


Figure 27: Migration sur gel d'agarose 1% coloré avec bromure d'éthidium. Amplicon (1 : MG-1992 ; 2 : MG-725/08) obtenu avec le couple de primer MFS1/MFS2 (une partie des gènes M et F). TN : témoin négatif ; TP : témoin positif (La Sota).

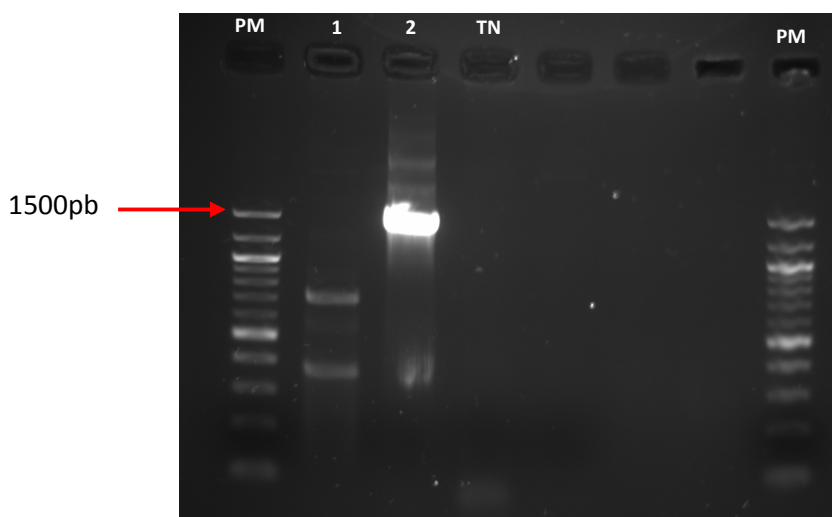


Figure 28: Migration sur gel d'agarose 1% coloré avec bromure d'éthidium des amplicons (1 et 2 : MG-1992) obtenus avec les couples de primer MFS1/MFS2 et F+4952/#33 (à l'intérieur du gène F). TN : témoin négatif ; TP : témoin positif (La Sota).

A. Analyses phylogénétiques des souches isolées au cours de cette étude (2008 – 2009)

1. Analyse basée sur les isolats

L'analyse phylogénétique des séquences basées sur 374 nt du gène de fusion (position 47 à 421) de neuf souches malgaches isolées dans le cadre de cette étude et de la souche MG-1992, a été faite avec les autres séquences disponibles dans le GenBank. Les résultats montrent que ces 10 souches malgaches sont toutes incluses dans la classe II des APMV-1 et sont groupées dans trois clusters différents (Figure 29). Les deux souches isolées à partir des oiseaux sauvages (MG-057/09 et MG-168/09) se trouvent dans le génotype I, spécifiquement dans le sous-génotype Ib. Les trois souches MG-140/09, MG-101/09 et MG-122/09 isolées au lac Alaotra à partir de volailles vaccinées provenant de l'élevage de type villageois (compartiment I), sont groupées dans le génotype III. En revanche, les trois souches MG-Meola/08, MG-39-04/08 et MG-BBS/09 isolées en 2008 et 2009 (compartiment I et II) à partir d'une suspicion de MN, l'ancienne souche MG-1992 isolée en 1992 (compartiment II) ainsi que la souche MG-725/08 isolée chez une poule apparemment saine (compartiment I), sont regroupées dans un autre cluster.

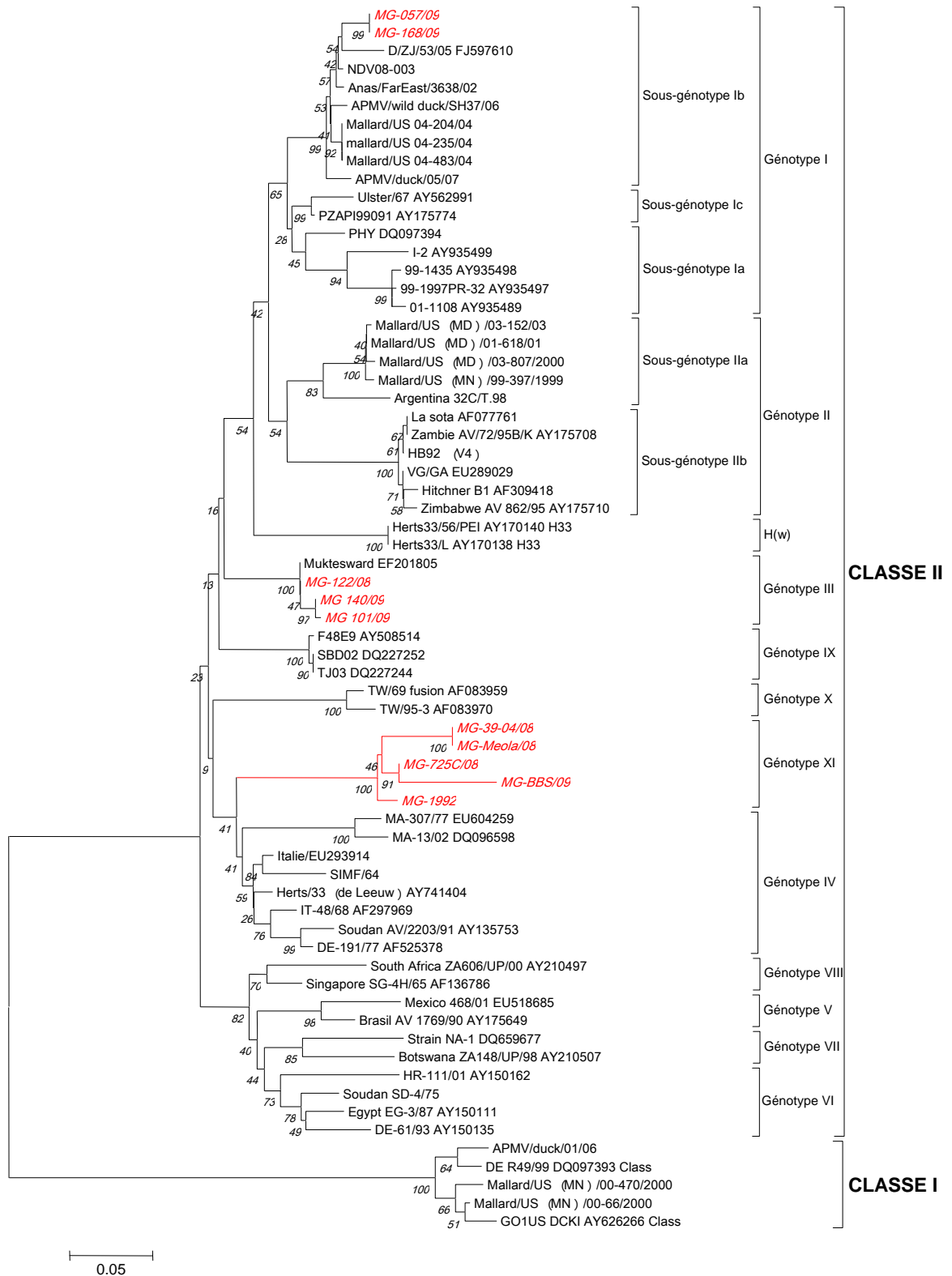


Figure 29: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en basant sur les 374 nucléotides (47-421nt) du gène F.

Les 10 séquences des souches Malgaches ont été comparées aux 44 souches de référence. L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de K2P avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). Toutes les séquences Malgache sont écrites en rouge. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

Des résultats identiques sont obtenus en effectuant l'analyse phylogénétique sur le gène HN (Figure 30) et le génome (Figure 31).

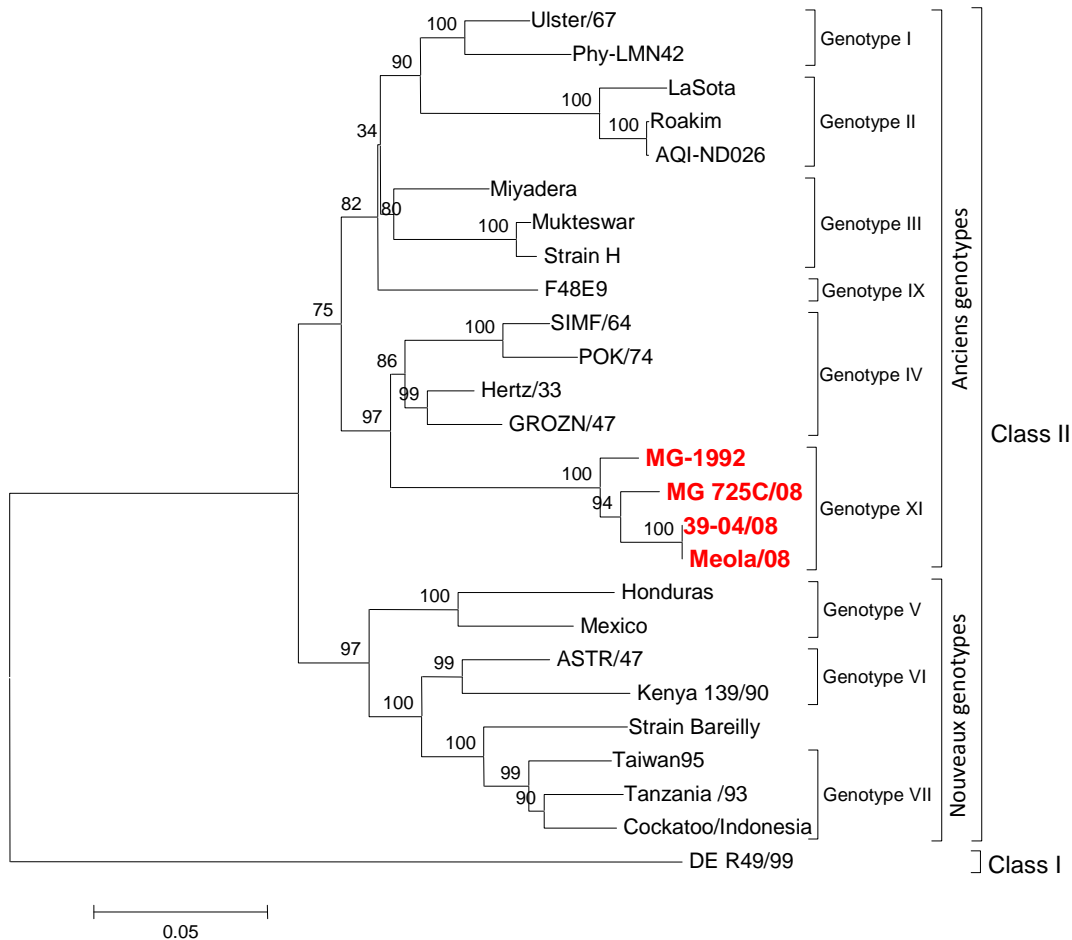


Figure 30: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en basant sur les 1713 nucléotides (92-1805nt) du gène HN. Les 4 séquences des souches Malgaches ont été comparées aux 22 souches de référence de chaque génotypes et classe. L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de K2P avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). Les séquences Malgache sont écrites en rouge et les séquences des oiseaux sauvages sont écrites en vert. L'échelle indique le nombre de substitutions

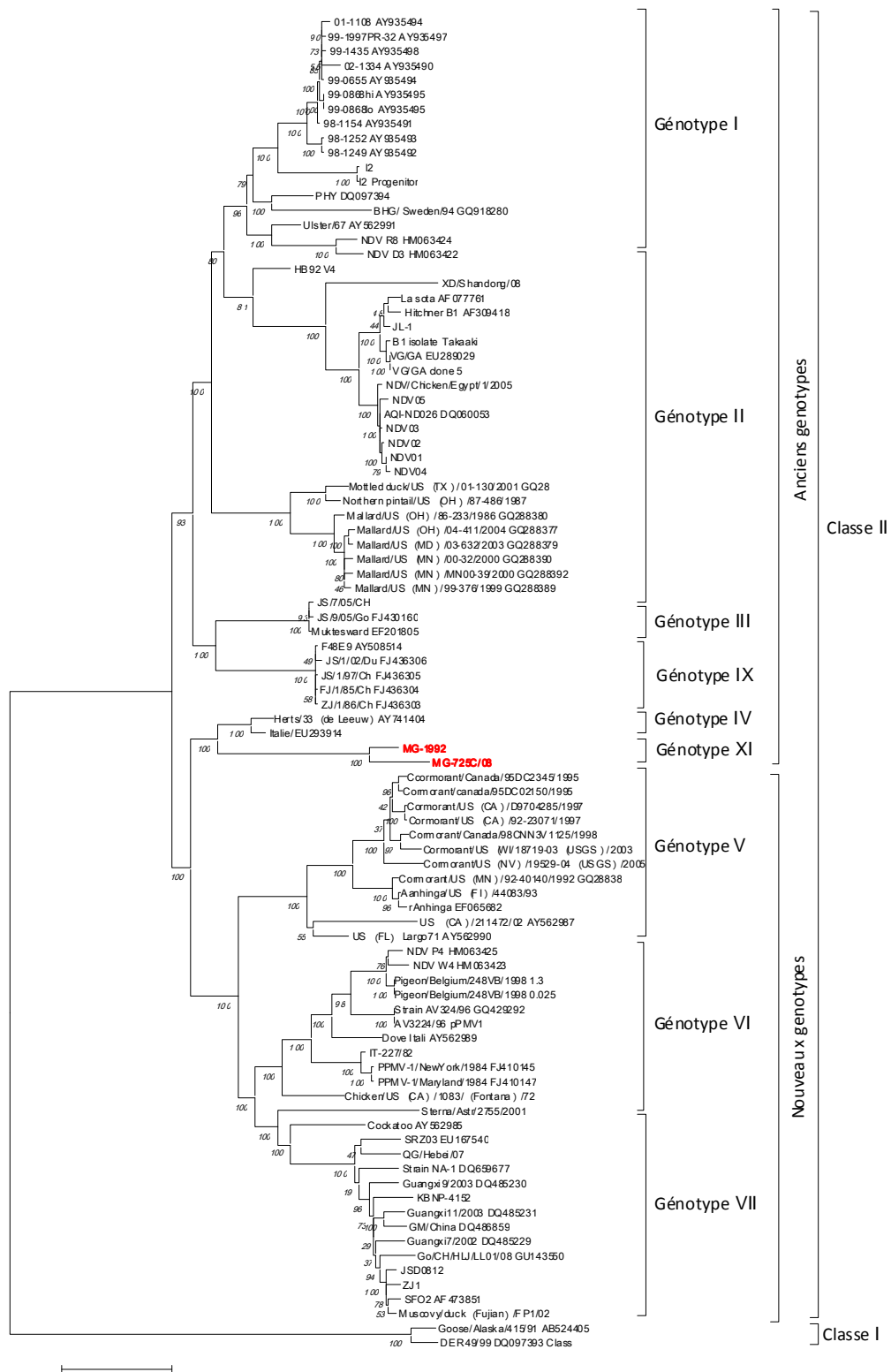


Figure 31: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 se basant sur les 14977nucléotides, encadrant les six gènes NP, P, M, F, HN et L. Les deux séquences des souches Malgaches ont été comparées aux 60 souches de référence. L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de K2P avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). Les deux séquences malgaches sont écrites en rouge. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

En tenant compte de la divergence inter-génotype sur le gène F (374 pb, Tableau 21), les génotypes les plus proches de ce nouveau cluster sont les génotypes III et IV avec respectivement 15% et 12% de divergence. Or, ces pourcentages de divergence sont supérieurs à la divergence maximale observée au sein de ces trois génotypes, soit respectivement 1%, 7% et 5% pour les génotypes III, IV et XI. De plus, quel que soit le génotype, le pourcentage de divergence ne dépasse jamais 9% (génotype VIII). Nous pouvons donc considérer le cluster phylogénétique contenant les souches malgaches comme un nouveau génotype, que nous avons dénommé génotype XI. La proposition de ce nouveau génotype a fait objet d'une publication dans le journal PLoS One (Maminiana et al., 2010) (ANNEXE 3).

Tableau 21: *Matrice de distance génétique (%) entre les différents génotypes de l'APMV-1*

Génotypes	XI	I	II	H(W)	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Cl 1
XI	5												
I	20	7											
II	25	12	2										
H(W)	21	15	16	0									
III	15	12	15	15	1								
IV	12	12	18	15	6	7							
V	19	16	18	18	14	11	6						
VI	18	16	21	18	14	11	11	7					
VII	21	18	20	21	17	14	14	3	7				
VIII	22	17	17	17	14	13	11	12	15	9			
IX	15	13	13	14	10	9	14	14	17	15	1		
X	15	18	18	21	15	13	19	19	19	19	15	3	
Cl 1	50	46	46	50	48	47	47	46	47	48	49	52	7

5 Intragénotype: Valeur maximale de divergence génétique

15 Intergénotype: Valeur minimale de divergence génétique

2. Analyse phylogénétique à partir des produits de QRT-PCR

Parmi les échantillons domestiques positifs, 16 séquences issues de la QRT-PCR envoyées pour séquençage ont été exploitables sur 80 pb entre les positions 295 et 375 du gène F. Ces 16 séquences, englobant le site de clivage, ont été également analysées dans cette étude. Les résultats d'analyse phylogénétique de ces séquences ont montré qu'elles sont incluses dans trois génotypes différents : six dans le génotype I, deux dans le génotype VII et huit dans le nouveau génotype XI (Figure 32). Les six séquences dans le génotype I sont encore subdivisées dans deux sous-génotypes Ib et Ic (Figure 32).

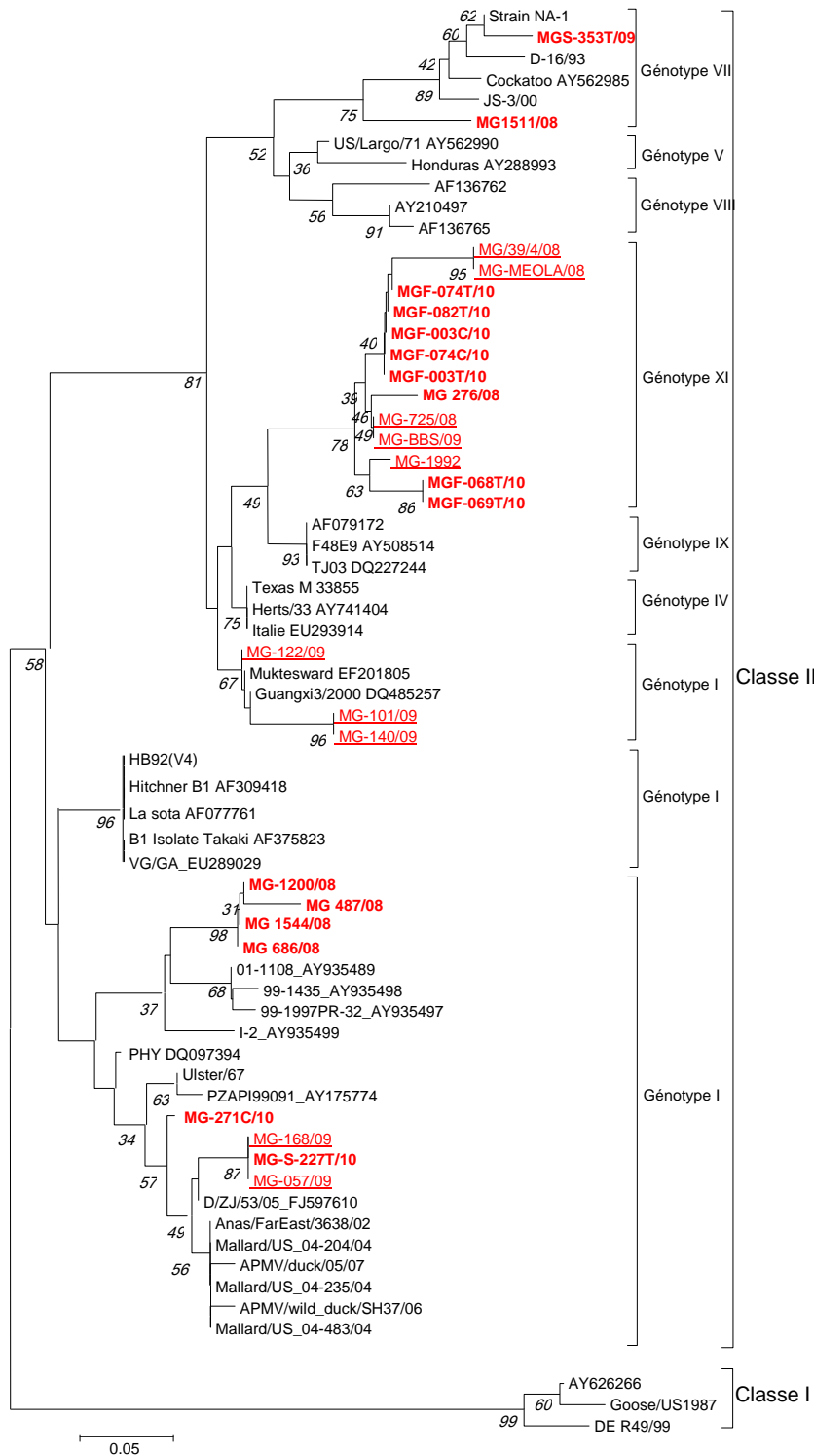


Figure 32: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en se basant sur les 80 nucléotides (295-374nt) du gène F. Les 16 séquences malgaches (produit de QRT-PCR NDV) ont été comparées aux autres souches représentantes de génotype I à IX déjà répertoriées et référencées. L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de K2P avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). Toutes les séquences malgaches (courtes séquences) sont écrites en rouge et celles isolées sont écrites en rouge et soulignées

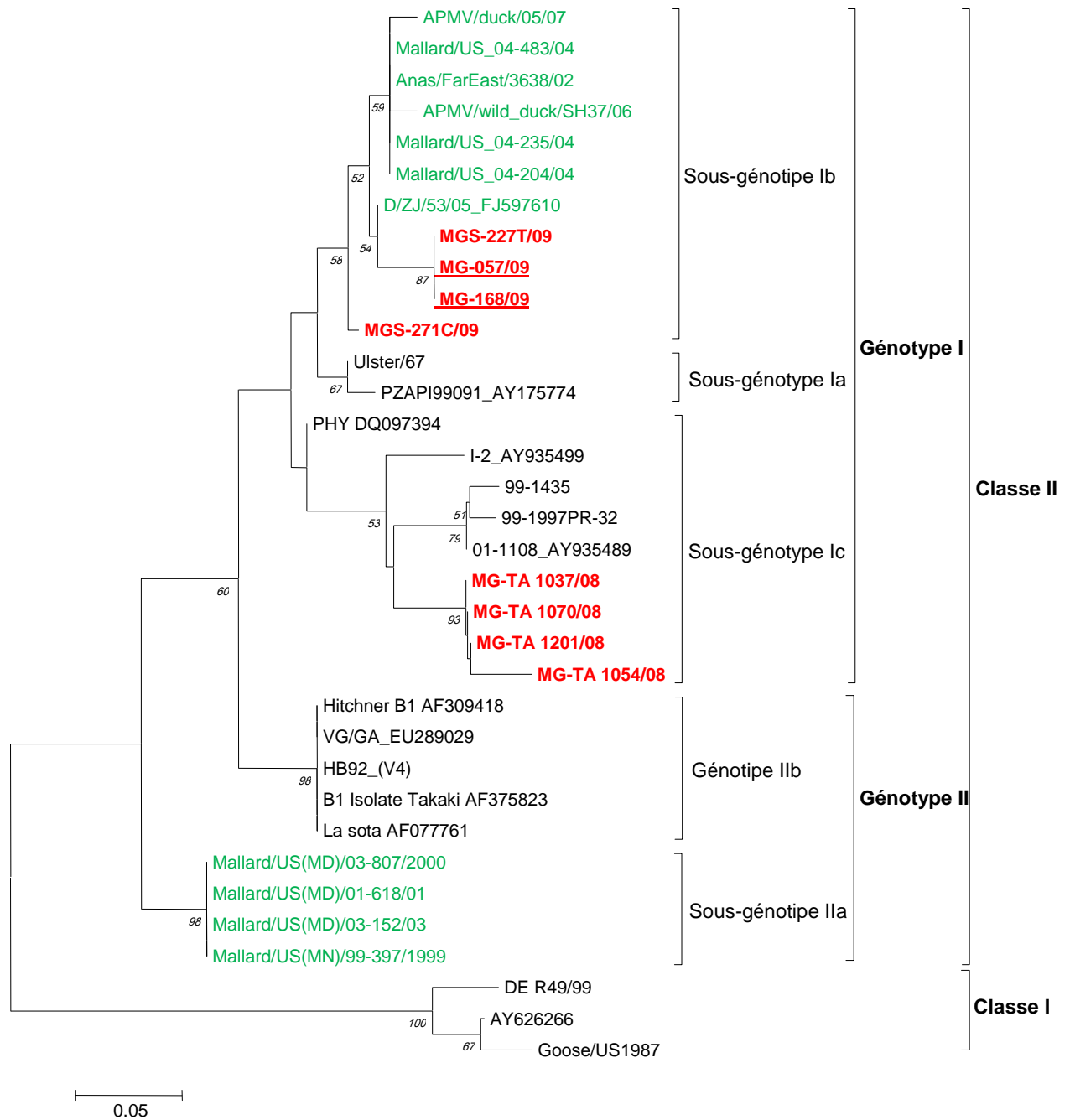


Figure 33: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en se basant sur les 80 nucléotides (295-374nt) du gène F (Génotype I et II).

Les 6 séquences MG (produit de QRT-PCR NDV), dans le génotype I ont été comparées aux 28 souches (génotype I et II) déjà répertoriées et référencées. L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de K2P avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). Toutes les séquences malgaches étudiées sont écrites en rouge et les séquences d'APMV-1 isolées à partir des oiseaux sauvages sont écrites en vert. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

Deux de ces séquences (MGS-271/09 et MGS-227/09) ont été obtenues à partir d'écouvillonnage d'oiseaux domestiques du compartiment I (volailles d'élevage de type villageois) au lac Alaotra en 2009. Ces deux séquences sont regroupées dans le sous-

génotype Ib avec les deux souches d'APMV-1 isolées chez les oiseaux sauvages aquatiques du lac Alaotra et d'autres pays. Par ailleurs, la MGS-227/09 présente 100% d'identité avec les deux souches d'APMV-1 isolées chez les oiseaux sauvages aquatiques du lac Alaotra (MG-058/09 et MG-168/09) en 2009. Ces résultats suggèrent une circulation des souches virales de l'APMV-1 entre le compartiment III (les oiseaux sauvages du lac Alaotra) et le compartiment I (les oiseaux domestiques) au fil des années. Les quatre séquences malgaches du génotype I restantes (TA-1037/08, MG TA-1037/08, MG TA-1201/08 et MG TA-1054/08) détectées en 2008 sont groupées dans le sous-génotype Ic avec les souches vaccinales (PHY I, I2) et les souches sauvages d'APMV-1 isolées chez les poulets.

Les deux séquences malgaches dans le génotype VII qui ont été prélevées à partir des poulets apparemment sains (compartiment I), sont groupées dans deux sous-génotypes différents. La première (MGS-353T/09) est incluse dans le sous-génotype VIId, récemment proposé comme génotype XII (Hammoumi *et al.*, 2011), prévalent depuis 1990 en Asie, en Afrique et en Europe à la fois chez les palmipèdes et les gallinacées. En revanche, la deuxième séquence (MG 1511/08) est intégrée dans le sous-génotype VIIg (Figure 34). Selon la nouvelle proposition de classification de l'équipe de virologie du CIRAD (Hammoumi *et al.*, 2011), ces deux sous-génotypes VIId et VIIg appartiendraient respectivement à deux nouveaux génotypes XII et XIII. Les sous-génotypes XIIIa (ex-VIIg) regroupent uniquement les souches isolées en Afrique de l'Ouest et Centrale (Cattoli *et al.*, 2009; Hammoumi *et al.*, 2011; Snoeck *et al.*, 2009).

Les huit séquences restantes provenant du lac Alaotra (compartiment I) sont groupées dans le nouveau génotype XI. Ces séquences ont été obtenues à la fois chez des poulets (*Gallus gallus*) morts avec suspicion de la MN mais aussi à partir d'un canard commun (*Anas sp*) apparemment sain.

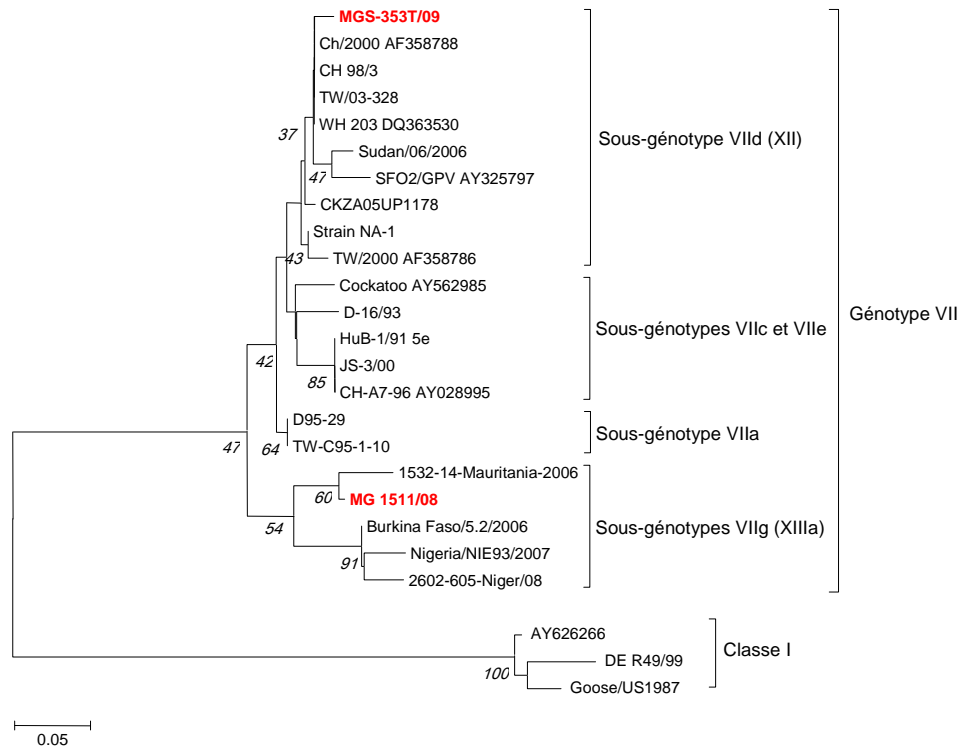


Figure 34: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en basant sur les 80 nucléotides (295-374nt) du gène F (Génotype VII).

Les 2 séquences MG (produit de QRT-PCR NDV), dans le génotype VII ont été comparées avec les autres souches déjà répertoriées et référencées dans ce génotype. L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de K2P avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). Toutes les séquences MG étudiées sont écrites en rouge et les séquences d'APMV-1 isolées à partir des oiseaux sauvages sont écrites en vert. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

3. Pathotypage moléculaire des souches circulantes

Les résultats de l'alignement des séquences protéiques des souches malgaches avec les autres séquences de référence sont présentés dans la Figure 35. Toutes les souches malgaches dans le nouveau cluster génotype XI possèdent un site de clivage de type virulent formé par cinq acides aminés basiques et de la phenylalanine en position 117 : $^{112}\text{RRRRR}\downarrow\text{F}^{117}$. Ce site de clivage formé de cinq acides aminés basiques est unique par rapport aux autres sites de clivage déjà décrits dans la littérature. Toutes les souches malgaches dans le nouveau génotype XI obtenu à partir de poulets morts ou malades ainsi que de palmipèdes, aussi bien dans le compartiment I que II, ont ce même site de clivage. Les deux séquences dans le génotype VII (VIIc ou XII et VIIg ou XIIIa) obtenues à partir de

poulet et canard apparemment sains dans les compartiments I et II, ont aussi un site de clivage de type virulent $^{112}\text{RRQKR}\downarrow\text{F}^{117}$. Le site de clivage des trois souches malgaches MG-122/09, MG-101/09 et le MG-140/09, dans le génotype III, est formé par quatre acides aminés basiques, ($^{112}\text{RRQRR}\downarrow\text{F}^{117}$) et une phénylalanine en position 117.

Toutes les souches malgaches dans les sous-génotypes Ib et Ic, obtenues à la fois dans les trois compartiments, possèdent un site de clivage de type lentogène ($^{112}\text{GKQGR}\downarrow\text{L}^{117}$), conformément à ce qui était attendu.

Ces résultats montrent que des souches d'APMV-1 virulentes circulent au sein des deux compartiments des oiseaux domestiques et entre les espèces de l'aviculture de type villageois. De plus, une circulation des souches apathogènes concerne les trois compartiments d'oiseaux évalués dans cette étude.

Partie 3: **Caractérisation moléculaire des souches circulantes**

A. Caractérisation moléculaire des souches malgaches dans le génotype XI

Pour l'analyse moléculaire des souches malgaches dans le génotype XI, les deux souches MG-1992 et MG-725/08 ont été séquencées sur la quasi-totalité du génome sauf dans les extrémités non codantes en 3' et 5'. De plus, les gènes qui codent pour les protéines F et HN ont été complètement séquencés pour les trois souches MG-39-04/08, MG-Meola/09 et MG-1992.

1. La protéine de fusion (F)

- La taille du gène F

Le gène F est formé de 1792 nucléotides (nt). La phase de lecture ouverte ou ORF (open reading frame) commence par le nucléotide du codon d'initiation en position 47 pour donner une protéine F1/F2 qui est composée de 553 acides aminés. Curieusement, les virus malgaches dans le génotype XI possèdent deux codons d'initiation appariés pour donner une protéine F1/F2 pouvant être composée de 554 acides aminés. Pour ces virus, l'ORF pourrait commencer au nucléotide 44 au lieu du nucléotide 47.

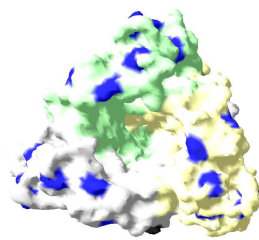
Désignation des souches	Séquence d'acides aminés de la protéine F des APMV-1 entre position 68 et 159
MG-057/09 (Ib)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGG GKQGR LIGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQANQNAANILRLKESIA
MG-168/09 (Ib)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGG GKQGR LIGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQANQNAANILRLKESIA
MG-101/09 (III)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSG RRQRRF IGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQANQNAANILRLKESIA
MG-122/09 (III)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSG RRQRRF IGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQANQNAANILRLKESIA
Herts/33 deLeeuw(IV)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSGRRRQRRF IGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQANQNAANILRLKESIA
Italie (IV)	PLEAYNRTLTTLLTPLGNSIRRIQESVTTSGRRRQRRF IGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQANQNAANILRLKESIA
MG-1992 (XI)	PVEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESATTS GGRRRRRF IGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QAKQNAANILRLKESIA
MG-39-04/08 (XI)	PVEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESATIS GGRRRRRF VGAIIGSVALGVATAAQITAAAALI QAKQNAANILRLKESIA
MG MEOLA/08 (XI)	PVEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESATIS GGRRRRRF VGAIIGSVALGVATAAQITAAAALI QAKQNAANILRLKESIA
MG-725C/08 (XI)	PVEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESATTS GGRRRRRF VGAIIGSVALGVATAAQITAAAALI QAKQNAANILRLKESIA
MG-BBS/09 (XI)	PVEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESATTS GGRRRRRF VGAIIGS-----
NA-1 (VII)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQ GS SVTSGRRRQRRF IGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRIKESIA
ZJ1 (VII) Argentina/Tigre6/99	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRKIQ GS SVTSGRRRQRRF IGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANRQNAANILRLKESIA
US(CA)/211472/02 (V)	PLEAYNRTLTTLLTPLG GS IRRIQ GS SVTSGRRRQRRF IGAVIGSVALGVATSAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIA
US(FL)Largo 71 (V)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQ GS ATTS GGRRRQRRF IGAVIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIA
MG 1511/08 (VIIg/h)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQ GS ATTSR GGRRRQRRF VGAIIGSIALGVATAAQVTAASALI QANQNAANILRLKESIA
MGS 353T/10 (VIIId)	PLEAYNRTLTTLLTPLGDSIRRIQESVTTSG RRQRRF IGAIIGSVALGVATAAQITAAAALI QANQNAANILRLKESIA
MGS 069T/10 (XI)	-----RRIQ AAIT SG GGRRRRRF VGAIIGS-----
MGF-068T/10 (XI)	-----RRIQ AAIT SG GGRRRRRF VGAIIGS-----
MGF-074T/10 (XI)	-----RRIQESATTS GGRRRRRF VGAIIGS-----
MGF-074C/10 (XI)	-----RRIQESATTS GGRRRRRF VGAIIGS-----
MGF-003T/10 (XI)	-----RRIQESATTS GGRRRRRF VGAIIGS-----
MGF-082T/10 (XI)	-----RRIQ GS ATTS GGRRRRRF VGAIIGS-----
MGF-003C/10 (XI)	-----RRIQESATTS GGRRRRRF VGAIIGS-----
MG 276/08 (XI)	-----RRIQESATTS GGRRRRRF VGAIIGS-----
MGS-271C/10 (Ib)	-----RRIQESVTTSG GKQGR LIGAIIG-----
MGS-227T/10 (Ib)	-----RRIQESVTTSG GKQGR LIGAIIG-----
MG TA 1087/08 (Ic)	-----RRIQESVTTSG GKQGR LIGAIIG-----
MG TA 1070/08 (Ic)	-----RRIQESVTTSG GKQGR LIGAIIG-----
MG 1201/08 (Ic)	-----RRIQGSVTTSG GKQGR LIGAIIG-----
MG TA 1054/08 (Ic)	-----RRIQ GS VTTSG GKQGR LIGAIIG-----
Mallard/US_04-204/04 (Ib)	-----RRIQ GS VTTSGGGKQGRHIGAIIG-----
mallard/US_04-235/04 (Ib)	-----RRIQESVTTSGGGKQGRHIGAIIG-----
APMV/duck/05/07 (Ib)	-----RRIQESVTTSGGGKQGRHIGAIIG-----
Mallard/US_04-483/04 (Ib)zu	-----RRIQESVTTSGRRRQRRLIGAIIG-----
01-1108_AY935489 (Ia)	-----RRIQESVTTSGRRRQRRLIGAIIG-----
D/ZJ/53/05_FJ597610 (Ia)	-----RRIQESVTTSGGGKQGRHIGAIIG-----
PZAPI99091_AY175774 (Ia)	-----RRIQESVTTSGRRRQRRLIGAIIG-----
VG/GA_EU289029 (Ia)	-----RRIQESVTTSGGEKQGRHIGAIIG-----
APMV/wild_duck/SH37/06	-----RRIQESVTTSGGGKQGRHIGAIIG-----
Anas/FarEast/3638/02	-----RRIQESVTTSGGGKQGRHIGAIIG-----

Figure 35: Alignement des séquences de la protéine F (souches : isolées 68 à 159aa et séquences : 88 à 113aa) montrant le site de clivage des APMV-1 malgaches (en rouge).

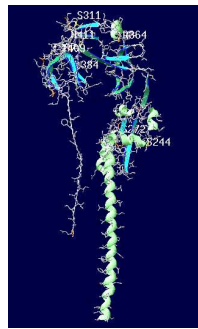
- Les substitutions d'acides aminés observées sur la protéine F

En regardant la structure monomérique du précurseur de la protéine de fusion (0 à 553 aa) dans le génotype XI par rapport aux autres génotypes, nous avons observé que les 7 résidus impliqués dans les épitopes de neutralisation identifiés jusqu'à présent (Toyoda *et al.*, 1987; Yusoff *et al.*, 1989) sont inchangés D⁷², E⁷⁴, A⁷⁵, K⁷⁸, A⁷⁹, ¹⁵⁷ILRLKESIAATNEAVHEVTDG¹⁷¹, L³⁴³. Les 12 résidus de cystéines en positions C²⁵, C⁷⁶, C¹⁹⁹, C³³⁸, C³⁴⁷, C³⁶², C³⁷⁰, C³⁹⁴, C³⁹⁹, C⁴⁰¹, C⁴²⁴, C⁵²³ (Chen *et al.*, 2001; Seal, 2004) sont conservés ainsi que tous les sites de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr or N-X-S/T) en position ⁸⁵N-R-T⁸⁷, ¹⁹¹N-K-T¹⁹³, ³⁶⁶N-T-S³⁶⁸, ⁴⁴⁷N-I-S⁴⁴⁹, ⁴⁷¹N-N-S⁴⁷³ et ⁵⁴¹N-N-T⁵⁴³ (Chen *et al.*, 2001; Panda *et al.*, 2004). Notons que ces résidus de cystéines et les sites de glycosylation interviennent dans la structure et la conformation de la protéine.

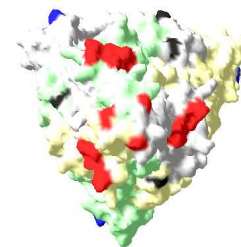
Les souches malgaches possèdent simultanément les substitutions caractéristiques des anciens génotypes (I à IV) comme T¹⁶→I, E¹⁰⁴→G, Q¹⁹⁵→R (Yu *et al.*, 2001) et des substitutions trouvées uniquement dans les nouveaux génotypes (V à VIII) comme V⁸¹→L, A¹⁰⁶→V, V¹¹⁸→I, V³⁵⁰→I et I³⁸⁴→L (Yu *et al.*, 2001). En revanche, ce génotype XI dispose de 13 substitutions d'acide aminé qui lui sont spécifiques. Huit de ces substitutions sont localisées sur la tête du monomère de la protéine de fusion P¹⁵→L, L¹⁸→R, S³¹¹→T, R³⁶⁴→S, S²⁷²→N, I³⁹⁷→T, T⁴⁰⁹→S et H⁴¹¹→N tandis que les cinq substitutions restantes S²⁴⁴→G, L³⁸⁴→M, K⁴⁷⁶→N, A⁴⁹⁶→T et I⁵²²→A, sont localisées sur la tige (Figure 36). En plus de ces 13 substitutions, un acide aminé supplémentaire est ajouté au début de l'ORF, suite à une mutation survenue au nucléotide A⁴⁵⁴²→T (ATG→AAG : M⁰→-). En considérant la structure trimérique en 3D de la protéine de fusion, l'acide aminé M⁰ se trouverait aussi sur la tête de protéine de fusion.



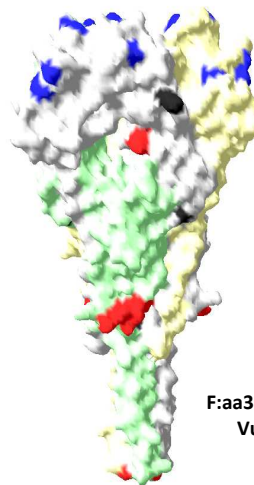
F:aa33-454 trimère
Vue de la tête
par le dessus



F:aa33-454 monomère



F:aa33-454 trimère
Vue de la protéine F
par le dessous



F:aa33-454 trimère
Vue latérale

Figure 36: Structure tridimensionnelle de la protéine F des souches malgaches du génotype XI. Les épitopes neutralisants sont colorés en rouge.

En bleu sont les substitutions spécifiques du génotype XI sur la tête de la protéine F et en noir, celles sur la tige. Les figures ont été générées par Swiss PDB-viewer, en utilisant un modèle de structure cristallographique de la protéine de fusion entre les positions 33 à 454 aa (PDB : IG5G) (Chen et al., 2001).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../.....
I PHY DQ097394 -MGRSRSTRIPAPMLMLTIRIVLALALSCVCTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
II La sota AF077761 -MGRSRSTRKNPAPMMLTIRIVALLSCICPANSIDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNLPKDKKEACAKAPLDAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
III Guangxi5/2000 -MGRSRSTRIPVPLMLTIRITLALSVVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
III_Muktesward EF201805 -MGRSRSTRIPVPLMLTIRITLALSVVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
IV Italie EU293914 -MGRSRSTRIPVPLMLTIRIVALLSCIRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGNSI
IV_Herts/33_AY741404 -MGRSRSTRIPVPLMLTIRIVLALALSCIRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
IX F48E9 AY508514a -MGRKSSTNVPAPMLMLTVRIVALALSCVRLTNSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
MG 1992 -MMGSKSSTNIPISFPMPTIIALALGCVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPVEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
MG 39-04/08 -MMGQSSTNIPISFPMPTIIALALGCVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKREACAKSPVEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
MG 725C/08 -MMGSKSSTNIPISFPMPTIIALALGCVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPVEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
MG MEOLA/09 -MMGQSSTNIPISFPMPTIIALALGCVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKREACAKSPVEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
VII NA-1 -MGSKSTRIPAPMLMLTIRITLALSCIRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACARAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI
V US(CA)/211472/02 AY562987 -MGSKSTRIPVPLMLTIRITLALSCICPANSIDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGESI
V US/Largo/71 AY562990 -MGSKSTRIPVPLMLTIRITLALSCICPANSIDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNMPKDKKEACAKAPLEAYNRRLTTLTLLTPLGDSI

```

```

      110      120      130      140      150      160      170      180      190
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....*
I PHY DQ097394 RRIQESVTTSGGKQRRLIGAIIGVALGVATAAQITAASALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
II La sota AF077761 RRIQESVTTSGGKQRRLIGAIIGVALGVATAAQITAASALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
III Guangxi5/2000 RRIQESVTTSGGRRQRFFIGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
III_Muktesward EF201805 RRIQESVTTSGGRRQRFFIGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
IV Italie EU293914 RRIQESVTTSGGRRQRFFIGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
IV_Herts/33_AY741404 RRIQESVTTSGGRRQRFFIGAIIGSVALGVATAAQITAASALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
IX F48E9 AY508514a RRIQESATTSGGRRQRFFIGAIIGSVALGVATDAQITAASALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
MG 1992 RRIQESATTSGGRRRRRFFVGAIIGSVALGVATAAQITAAALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
MG 39-04/08 RRIQESATTSGRRRRRFFVGAIIGSVALGVATAAQITAAALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
MG 725C/08 RRIQESATTSGRRRRRFFVGAIIGSVALGVATAAQITAAALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
MG MEOLA/09 RRIQESATTSGRRRRRFFVGAIIGSVALGVATAAQITAAALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
VII NA-1 RKIQSVSTSGGRRQRFFIGAVIGSVALGVATAAQITAAALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLSVAVGKMQQFVNDQFNNTARELDC
V US(CA)/211472/02 AY562987 RRIQESATTSGGRRQRFFVGAIIGSVALGVATAAQITAAALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTAQELDC
V US/Largo/71 AY562990 RRIQESATTSGGRRQRFFVGAIIGSVALGVATAAQITAAALIQAQNAANILRLKESIAATNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNNTARELDC

```

```

      210      220      230      240      250      260      270      280      290
...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../.....
I PHY DQ097394 VKITQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
II La sota AF077761 IKIAQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALNKLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
III Guangxi5/2000 IKITQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTVQALYNLAGGNVDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
III_Muktesward EF201805 IKIAQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTVQALYNLAGGNVDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
IV Italie EU293914 IKITQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
IV_Herts/33_AY741404 IKITQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
IX F48E9 AY508514a IKITQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
MG 1992 VKIAQQVGVELSLEYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGSNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGLNMMR
MG 39-04/08 VKVAQQVGVELSLEYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGSNMMDYLLTKLGVGNSQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGLNMMR
MG 725C/08 VKIAQQVGVELSLEYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGSNMMDYLLTKLGVGNSQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGLNMMR
MG MEOLA/09 VKVAQQVGVELSLEYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGSNMMDYLLTKLGVGNSQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGLNMMR
VII NA-1 IKITQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR
V US(CA)/211472/02 AY562987 IKIAQQVGVELNLYLTELTVFPGQITSPALTQTLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGLNMMR
V US/Largo/71 AY562990 IKITQQVGVELNLYLTELSTVFGPQITSPALTQTLTIQALYNLAGGNMMDYLLTKLGVGNNQLSSLIIGSLITGNPILYDSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMR

```

```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390
I PHY DQ097394  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMALKGSVIANCKMTTC
II La sota AF077761  ATYLETLVSSTTRGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMTIKGSVIANCKMTTC
III Guangxi5/2000  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMTLKGSVVANCQMTTC
III_Muktesward EF201805  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMTLKGSVVANCQMTTC
IV Italie EU293914  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMALKGSVIANCKMTTC
IV_Herts/33_AY741404  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMALKGSVIANCKMTTC
IX F48E9 AY508514a  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCVETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMTIKGSVIANCKMTTC
MG 1992  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMTIKGSVIANCKMTTC
MG 39-04/08  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACTYKTEGALTPPYLTLKGSVIANCKMTTC
MG 725C/08  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACTYKTEGALTPPYLTLKGSVIANCKMTTC
MG MEOLA/09  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACTYKTEGALTPPYLTLKGSVIANCKMTTC
VII NA-1  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMALKGSVIANCKMTTC
V US(CA)/211472/02 AY562987  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMALKGSVIANCKMTTC
V US/Largo/71 AY562990  ATYLETLVSSTTKGFASALVPKVVTVQVGSVIEEELDTSYCIETDLDLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTPPYMALKGSVIANCKMTTC

          410      420      430      440      450      460      470      480      490
I PHY DQ097394  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
II La sota AF077761  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
III Guangxi5/2000  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
III_Muktesward EF201805  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
IV Italie EU293914  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
IV_Herts/33_AY741404  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
IX F48E9 AY508514a  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
MG 1992  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
MG 39-04/08  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
MG 725C/08  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
MG MEOLA/09  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
VII NA-1  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
V US(CA)/211472/02 AY562987  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISSNALDKLEESNSKLDKVNKLTST
V US/Largo/71 AY562990  RCADPPGIISQNYGEAVSLIDRHSNVLSDGITLRLSGEFDATYQKNISILDSQVIVTGNLDISTELGNVNNSISSNALDKLEESNSKLDKVNKLTST

          510      520      530      540      550
I PHY DQ097394  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTKM
II La sota AF077761  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTKM
III Guangxi5/2000  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
III_Muktesward EF201805  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTKM
IV Italie EU293914  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTKI
IV_Herts/33_AY741404  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTKI
IX F48E9 AY508514a  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
MG 1992  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
MG 39-04/08  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
MG 725C/08  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
MG MEOLA/09  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
VII NA-1  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
V US(CA)/211472/02 AY562987  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI
V US/Largo/71 AY562990  ALITYIVLTVVSLVFGVLSLVLACYLMYKQKAQKQKTLWLGNNNTLDQMRATTRI

```

Figure 37: Aligement de la protéine F (0 à 553aa) montrant les substitutions d'acide aminés. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (0 à 553). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles(*). Les AA caractéristiques de génotype XI sont encadrés en rouge.

1. La protéine hémagglutinine-neuraminidase (HN)

L'alignement des séquences d'acides aminés de la protéine HN, en incluant les quatre souches du génotype XI est présenté dans la Figure 38.

- Taille de la protéine HN

La taille du gène codant la protéine HN des quatre souches malgaches appartenant au génotype XI est de 2002 nt. La longueur de la protéine traduite à partir de l'ORF est de 571 aa. Or, tous les APMV-1 possédant cette taille de protéine sont tous des souches virulentes.

- Les substitutions d'acides aminés observées sur la protéine HN

Nous avons observé que tous les 14 résidus de cystéines en positions C⁶, C¹²³, C¹⁷², C¹⁸⁶, C¹⁹⁶, C²³⁸, C²⁴⁷, C²⁵¹, C³⁴⁴, C⁴⁵⁵, C⁴⁶¹, C⁴⁶⁵, C⁵³¹, C⁵⁴² (McGinnes & Morrison, 1994; McGinnes, 1997; Pitt *et al.*, 2000) et les 11 sites formant le récepteur d'acide sialique R¹⁷⁴, I¹⁷⁵, E²⁵⁸, Y²⁹⁹, Y³¹⁷, E⁴⁰¹, R⁴¹⁶, R⁴⁹⁸, Y⁵²⁶, R⁵¹⁶ et E⁵⁴⁷ (Connaris *et al.*, 2002), ainsi que les six sites de N-glycosylation ¹¹⁹N-N-S¹²¹, ³⁴¹N-D-T³⁴³, ⁴³³N-K-T⁴³⁵, ⁴⁸¹N-H-T⁴⁸³, ⁵⁰⁸N-I-S⁵¹⁰, and ⁵³⁸N-R-T⁵⁴⁰ (Panda *et al.*, 2004) sont présents dans les quatre souches du génotype XI. Ces résidus sont essentiels pour la conformation et la structure de la protéine.

Cependant, les souches malgaches dans le génotype XI possèdent 15 résidus d'acides aminés spécifiques A²⁴→V, T³⁴→V, L³⁹→I, I⁴⁵→V, E⁶²→V/A, R⁶⁹→K, R⁷⁸→Q, M⁸¹→V, V⁸⁴→I, S⁹⁸→N, E¹⁴⁷→D, R²⁶³→N/K, G³¹⁰→N/D, I³²⁸→T et R⁵³⁹→K absents dans les autres génotypes (Figure 39).

En plus de ces 15 acides aminés spécifiques du génotype XI, la souche MG-725/08, isolée à partir d'une poule apparemment saine et non vaccinée (compartiment I), possède six autres substitutions spécifiques H³→R, S⁶⁴→T, V¹¹⁷→A, R³⁷⁷→K, A³⁸⁰→T et A⁵¹⁰→S. Il faut noter que la substitution en position A⁵¹⁰→S a eu lieu sur un site potentiel de N-glycosylation qui est une structure nécessaire pour le repliement de la protéine.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
I PHY-LMV42 MDRAVSQVALENDEREAKNTWRLVFRIALLLVVTLAISAAALAYSMEASTPDLVGIPTAISRAEEKITSALGSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
I Ulster 2C/67 MDRAVSQVALENDEREAKNTWRLVFRIALLLVVTLAISAAALAYSMEASTPDLIGIPTAISRAEEKITSALGSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
I AQI-ND026 AAY68573 MDRAVSQVALENDEREAKNTWRLVFRIALLLVVTLAISVASLVYSMGASTPDLVGIPTAISRAEEKITSALGSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
II La Sota AAK55551 MDRAVSQVALENDEREAKNTWRLVFRIALLLVVTLAISVASLLYSMGASTPDLVGIPTAISRAEEKITSALGSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
III Mukteswar MDRAVSQVALENDEREAKNTWRLVFRIALLLVVTLAISVAVALAYSMEASTPDLVGIPTAISRAEERITSALGSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
IV Hert33 AY741404 MDRAVSRVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVITLAIISAAALVYSMEASTPGDLVGIPTAISRAEEKITSALSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
IV ITA/45 MDRVVRVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVITLAIISAAALVYSMEASSPGDLVGIPTAISRAEEKITSALGSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
XI MG 39-4/08 MDRVVRVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVITLALSTAALAYSMEASTPGDLAGIPTAISRAEERITSALSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
XI MG Meola/08 MDRVVRVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVITLALSTAALAYSMEASTPGDLAGIPTAISRAEERITSALSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
XI MG-725/08 MDRVVRVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVITLALSTAALAYSMEASTPGDLAGIPTAISRAEERITSALSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
XI MG-NDV/92 MDRVVRVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVITLALSTAALAYSMEASTPGDLVGIPTAISRAEERITSALSSNQDVVDRYKQVALESPALLNTE
VII Cockatoo HN MDRAVNRVVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVMTLAIISAAALAYSMEASTPGDLAGIPTVISKIEDKVTSSALSSQDVIDRIYKQVALESPALLNTE
VII NA-1 MDRAVNRVVALENEEREAKNTWRLVFRIALLLVMTLAIISAAALAYSMEASTPGDLAGIPTVISKIEDKVTSSALSSQDVIDRIYKQVALESPALLNTE

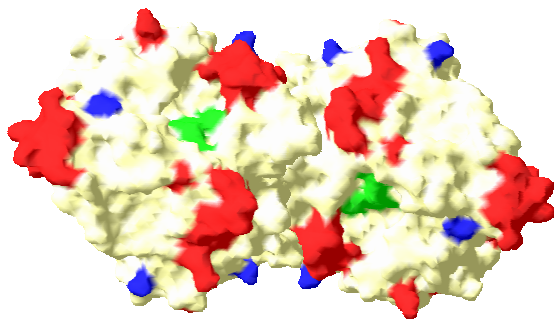
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
I PHY-LMV42 STIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPIHDPDYIGGIGKELIVDDANDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
I Ulster 2C/67 STIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPIHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
I AQI-ND026 AAY68573 STIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPIHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNIISGCRDHS
II La Sota AAK55551 STIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPIHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
III Mukteswar SIIMNAITSLSYQINGAANNSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
IV Hert33 AY741404 SVIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
IV ITA/45 SVIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
XI MG 39-4/08 SVIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
XI MG Meola/08 SVIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
XI MG-725/08 SVIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
XI MG-NDV/92 SVIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
VII Cockatoo HN SIIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAYQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS
VII NA-1 SIIMNAITSLSYQINGAANSSGCGAPVHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAYQEHLPAPTTGSGCTRIPSFMSATHYCYTHNVILSGCRDHS

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
I PHY-LMV42 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
I Ulster 2C/67 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFRDWVANYP
I AQI-ND026 AAY68573 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSAVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
II La Sota AAK55551 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSAVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
III Mukteswar HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSAVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
IV Hert33 AY741404 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
IV ITA/45 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
XI MG 39-4/08 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDILCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
XI MG Meola/08 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDILCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
XI MG-725/08 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDILCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
XI MG-NDV/92 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDILCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
VII Cockatoo HN HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP
VII NA-1 HSHQYLALGVLRTSATGRVFFSTLRSINLDDNQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKVTETEEDYKSVPTSMVHGRLGFDGQYHEKDLDTLFDWVANYP

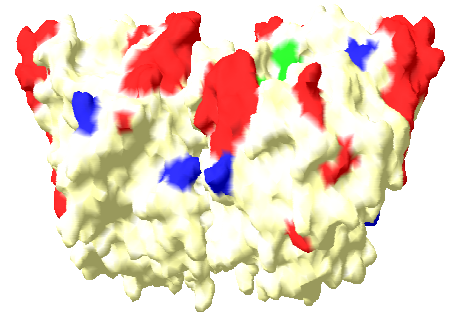
610
/...../...../.

I PHY-LMV42	QTEYRSMLESYAASWP
I Ulster 2C/67	QTEYRRELESYAASWP
I AQI-ND026 AAY68573	-----
II La Sota AAK55551	-----
III Mukteswar	-----
IV Hert33 AY741404	-----
IV ITA/45	-----
XI MG 39-4/08	-----
XI MG Meola/08	-----
XI MG-725/08	-----
XI MG-NDV/92	-----
VII Cockatoo HN	-----
VII NA-1	-----

Figure 38: Alignement de la protéine HN (1 à 571aa, 578aa et 616aa) montrant les substitutions d'acides aminés. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (1 à 616). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles. Les AA caractéristiques de génotype XI sont encadrés en rouge.



HN, vue de dessus (aa 124-569)



HN, vue latérale (aa 124-569)

Figure 39: Structure tridimensionnelle de la protéine HN des souches malgaches du génotype XI. Les épitopes neutralisants sont colorés en rouge, les substitutions spécifiques du génotype XI en bleu, et les motifs fonctionnels de la HN en vert. Les figures ont été générées par Swiss PDB-viewer, en utilisant la structure cristallographique de la protéine de fusion entre les positions 124 à 569 aa (PDB : 1e8t) (Crennell et al., 2000).

a. La taille du génome du nouveau génotype XI

D'après les résultats de séquençage et d'assemblage des différentes séquences des deux souches MG-1992 et MG-725/08, les séquences englobant les six gènes structuraux dans l'ordre 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' ont respectivement 15082 nt et 15097 nt. Les séquences des extrémités 3' (*leader*) et 5' (*trailer*) n'ont pas été déterminées. La taille du génome de ces deux souches sont en concordance avec la taille des autres souches d'APMV-1 de classe II, appartenant plus spécifiquement aux génotypes récents (V à VIII) : ce génome contient une insertion de 6nt dans la région non codante 5' du gène NP et renferme par conséquent 15192nt (Figure 40 ; Tableau 22).

Class I	DE R49/99 (DQ097393)	(1601)	CGCTCGGTGATGACCAG-ACCCTCCGCCCCCCATCGCAACTCA-----TCGCGGCACCACAC	Anciens génotype	
	Ulster 2C/67 (AY562991)	(1601)	CCCAGCTTGCCCTATGAAATCATCCCAACTCCCGCTCGCACCCC-----ACCTCCAGTCCGC		
Genotype I	PHY-LMV42 (DQ097394)	(1601)	CCCAGCCTGCCTCCATGAAATCATCCCAATTCTCTGCTCGCACCCC-----ACCTCTCAATCCGC		
	99-0655 (AY935494)	(1601)	CCCAGTTTGCTTCTATGAGATCATCCCAATTCTCCGCCACACCCC-----ACCCCTCAATCCGC		
	I-2 (AY935499)	(1601)	CCCAGCCTGCCTATATGAAACCATCCCAACCCTCCGCTCGCACCTC-----ACCACCCAATCCGC		
Genotype II	B1 (AF309418)	(1601)	CCCAGCCTGCTTCTACAAGAACATCCCAATGCTCTACCCGTAGTCG-----ACCCCTCGATTTGC		
	La Sota (AF077761)	(1601)	CCCAGCCTGCTTCCACAAAAACATCCCAATGCCCTACCCGTAGTCG-----ACCCCTCGATTTGC		
Genotype III	Mukteswar (EF201805)	(1601)	CTCAGCCTGCCTCCATCGAATCATCTCGATTCTTCTGCCTGTAACT-----AACCCCTGGTCCAC		
Genotype IV	Herts/33 (AY741404)	(1601)	CCCAGTCTGCCTCCACAGGACCACCCCAACCCTCTGCCCGCACCCC-----ACCCCTGATCCGC		
	Italie (EU293914)	(1601)	CCCAGCCTGCCTCCACAGGACCACCCCAACCCTCTGCCCGCACCCC-----ACCCCTGATCCGC		
Génotype XI	MG 725/08	(1544)	CCCAGCCTGTCCTTG CAGGACCGCCCAACTCCCCACCCAAAACCC CCCCAGACCCCCCAACAGGC		Nouveaux génotypes
	MG-1992	(1535)	CCCAGCCTGTCCTTG CAGGACCA CCCC AACTCCCTGCCAAAACCC CCCCATACCCCCGACCCGC		
Genotype V	US (FL) Largo71 (AY562990)	(1601)	CCCAGCCTGCCCCACAGGGTGC CCCC AATCCTCCGCCGAAACCCCTCCCTCACTCCCCGACCCAC		
Genotype VI	Dove Itali (AY562989)	(1601)	TTCAGCCTGCCTT CACAGGGCCATCCCAATCCTCCGCCGAAACCC CCAAAAATTCCCCGACCCAC		
	US(CA/1083/72 (AY562988)	(1601)	CCCAGCCGCCCCT CACAGGGTCA TCCCAACCTCCGCCGAAATCTCTCCCAA ACTCCCCGATTCAC		
Genotype VII	Guangxi9/2003 (DQ485230)	(1601)	CCCAGCCTGCCTT CACAGGATCATGTCAA ACTCTCCGCCAAAACCC TCCCAGACCCCTGACCCAC		
	SFO2 (AF473851)	(1601)	CCCAGCCTGCCTT CGCAGGATCA CACCAAACCTCCGCCAAAACCC TCCCAGACTCCCCGACCCAC		
	ZJ1 (AF431744)	(1601)	CCCAGCCCGCCTT CACAGGACCA CACCAAACCCCGCCAAAACCTCTCCCAGACTCCCCGACCCAC		

*Insertion de six nucléotides
entre position 1647 et 1648
(selon génome La Sota)*

Figure 40: Alignement montrant l'insertion de 6 nt dans la région non codante 5' du gène N.

Tableau 22: *La taille génomique, les gènes et les protéines correspondantes du génotype XI et les autres génotypes*

Région, Gène et génome	Classe	Génotypes	Total	Taille (nt)				Protéines
				3'RNC ^a	ORF ^b	5'RNC ^c	RIG ^d	
Leader	I	-	55	-	-	-	-	-
	II	I à X	55	-	-	-	-	-
		XI	pdcc		-	-	-	-
NP	I	-	1746			210	CA	
	II	I à IV / IX à XI	1747	66	1470	211		489
		XI	V à VIII	1753			217	A
P	I	-			1200			399
	II	I à X	1463	83	1188	180	A	395
M	I	-						
	II	I à X	1241	311	1095	112	G	364
F	I	-						
	II	I à X	1742	46	1662	112	31	553
HN	I	XI		43	1665			554
			2001	91	1719 - 1758	152 - 191	48	572 - 585
	II	I			1851	60		616
L	I	II	2002	91	1734	177	47	577 - 581
		III à X			1716	195		571
	II	XI						
Trailer	I	-						
	II	I à X	114					
Génome	I	XI	pdcc					
			15198					
	II	I à IV et X	15186					
		V à VIII et IX	15192					
		XI	15192					

3'RNC^a : région non codante 3' ; ORF^b : Open Reading Frame ou Région codante; 5'RNC^c : région non codante 5'; IGR^d : région inter-gène;
 pdcc : donnée incomplète

A. Caractérisation moléculaire des souches du génotype I issues des oiseaux sauvages

L'analyse phylogénétique de deux souches d'APMV-1, MG-057/09 et MG-168/09, isolées chez les oiseaux sauvages aquatiques (compartiment III) au lac Alaotra et de 25 autres souches de référence, est présentée dans la Figure 41. Les deux souches sont groupées dans le génotype I, précisément à l'intérieur du sous-génotype Ib. Dans ce sous-génotype se trouvent les souches d'APMV-1 isolées à partir d'oiseaux sauvages aquatiques provenant de différents continents. Par contre, toutes les souches vaccinales du génotype I, comme Ulster/67, PHY et I₂ sont classées dans les sous-génotypes Ia et Ic. La distance génétique maximale à l'intérieur de ce sous-génotype Ib est inférieure à 4% alors que la distance minimale séparant les deux sous-génotypes Ia et Ib est de 7% (Tableau 23).

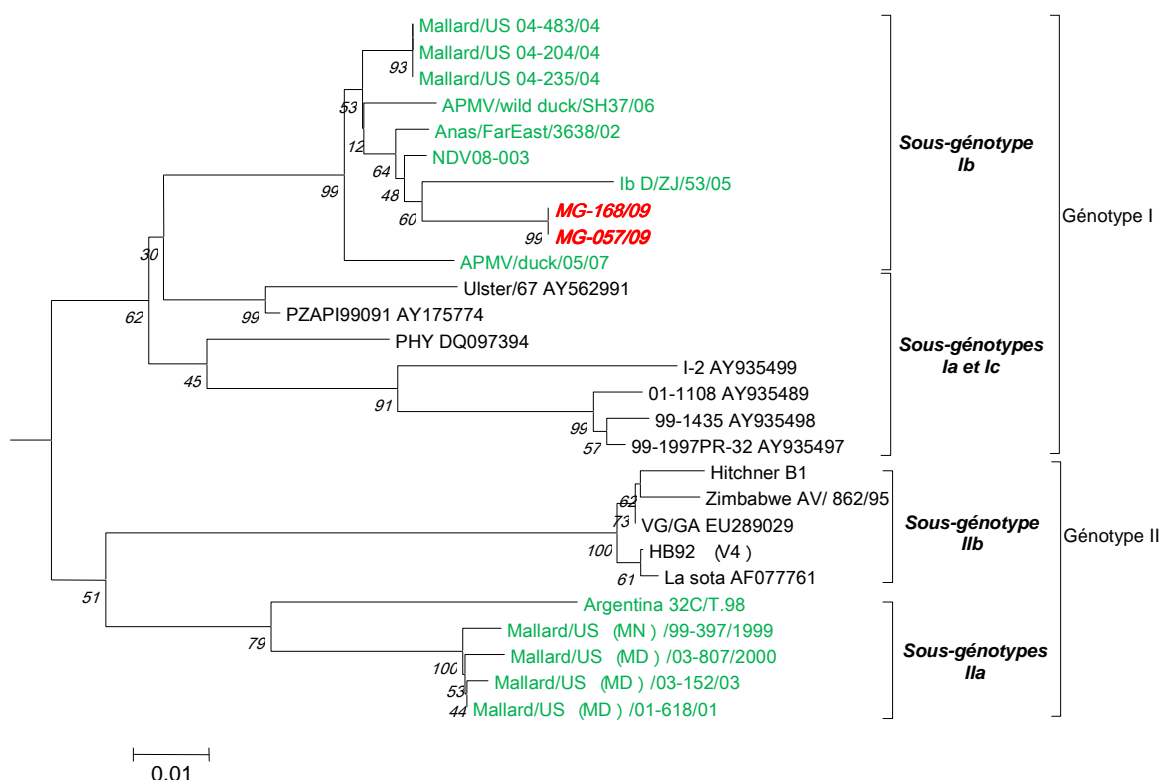


Figure 41: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 basé sur les 374 pb (position 47 – 421nt) du gène F montrant la position des deux souches MG dans le sous-génotype Ib par rapport aux autres souches classe II isolées dans avifaunes d'autres pays.

L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de Kimura à deux paramètres (K2P) avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). Toutes les séquences de référence issues des oiseaux sauvages dans la classe II sont marquées en vert et les 2 séquences MG en rouge. L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

Tableau 23: *Matrice de divergence génétique des deux souches malgaches par rapport aux autres séquences d'APMV-1 dans le génotype I et II.*

Souches	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]
Mallard/US_04-204/04	[1]																										
mallard/US_04-235/04	[2]																										
APMV/duck/05/07	[3]	2	2																								
Mallard/US_04-483/04	[4]	0	0	2																							
D/ZI/53/05_FJ597610	[5]	4	4	5	4																						
MG-057/09	[6]	3	3	4	3	4																					
MG-168/09	[7]	3	3	4	3	4																					
APMV/wild_duck/SH37/06	[8]	2	2	3	2	4	4	4																			
Anas/FarEast/3638/02	[9]	2	2	3	2	3	2	2	2																		
NDV08-003	[10]	1	1	2	1	3	2	2	2	1																	
Ulster/67_AY562991	[11]	7	7	8	7	10	9	9	7	7	7																
99-1435_AY935498	[12]	10	10	11	10	11	12	12	10	10	11																
99-1997PR-32_AY935497	[13]	10	10	11	10	11	12	12	10	10	11	1															
01-1108_AY935489	[14]	10	10	11	10	11	12	12	10	10	11	1	1														
PHY_DQ097394	[15]	7	7	7	7	9	8	8	7	7	7	6	8	8	9												
PZAPI99091_AY175774	[16]	5	5	5	5	8	7	7	5	5	3	9	8	8	4												
Hitchner_B1_AF309418	[17]	14	14	14	14	16	14	14	14	14	13	13	17	17	17	13	11										
I-2_AY935499	[18]	11	11	11	11	12	13	13	10	11	11	11	7	7	7	8	9	17									
HB92_(V4)	[19]	13	13	13	13	15	13	13	14	13	13	13	16	16	16	12	11	2	16								
La_sota_AF077761	[20]	13	13	14	13	15	14	14	14	13	13	13	17	16	16	12	11	1	16	0							
VG/GA_EU289029	[21]	13	13	13	13	15	13	13	13	13	12	12	16	16	16	12	10	1	16	1	1						
Zimbabwe_AV_862/95_AY175710	[22]	14	14	14	14	16	14	14	14	14	13	13	17	16	16	13	11	2	16	2	1	1					
Mallard/US(MD)/03-152/03	[23]	11	11	12	11	12	11	11	10	10	11	12	15	15	14	12	9	13	14	12	12	13					
Mallard/US(MD)/01-618/01	[24]	11	11	11	11	12	11	11	10	10	10	12	15	14	14	12	9	13	13	12	12	12	13	0			
Mallard/US(MN)/99-397/1999	[25]	11	11	12	11	13	12	12	11	11	11	12	15	15	14	12	9	14	13	12	13	13	14	1	1		
Mallard/US(MD)/03-807/2000	[26]	11	11	12	11	13	12	12	11	11	11	12	15	15	14	12	9	13	14	12	12	12	13	1	1	1	
Argentina_32C/T.98	[27]	12	12	13	12	13	13	13	12	12	12	16	16	16	16	13	9	14	15	13	13	13	14	7	7	7	7

La classification phylogénétique de ces deux souches malgaches dans le sous-génotype Ib a été renforcée par la présence d'une substitution d'acide aminé caractéristique de ce sous-génotype Ib ($R^{27} \rightarrow C$). Cette substitution est absente dans les souches appartenant aux sous-génotypes Ia et Ic (Figure 42).

A. Caractérisation moléculaire des souches malgaches du génotype III issues des oiseaux domestiques

L'analyse phylogénétique de trois souches d'APMV-1 isolées à partir d'oiseaux domestiques, MG-101/09, MG-140/09 et MG-122/09, et d'autres souches référencées dans le génotype III, est présentée dans la Figure 43. Les trois souches MG-101/09, MG-140/09 et MG-122/09 isolées à Madagascar (compartiment I) sont groupées dans le génotype III. Elles présentent une divergence génétique de 2% avec la souche vaccinale Mukteswar et les autres souches (velogènes ou mesogènes) considérées comme dérivées de la souche vaccinale Mukteswar (Tableau 24).

Les résultats d'alignement des séquences d'acide aminés de la protéine de fusion entre les positions 1 à 124 sont montrés dans la Figure 44. Ces résultats montrent que toutes les souches considérées comme issues de la souche vaccinale Mukteswar renferment la substitution de cystéine 25 en proline ($Y^{25} \rightarrow C$). En revanche, les deux souches MG-101/09, MG-140/09 possèdent des substitutions d'aa différentes de celles des autres souches issues de Mukteswar et de la troisième souche malgache (MG-122/09).

Ces résultats mettent en évidence la circulation des souches vaccinales dans la nature.

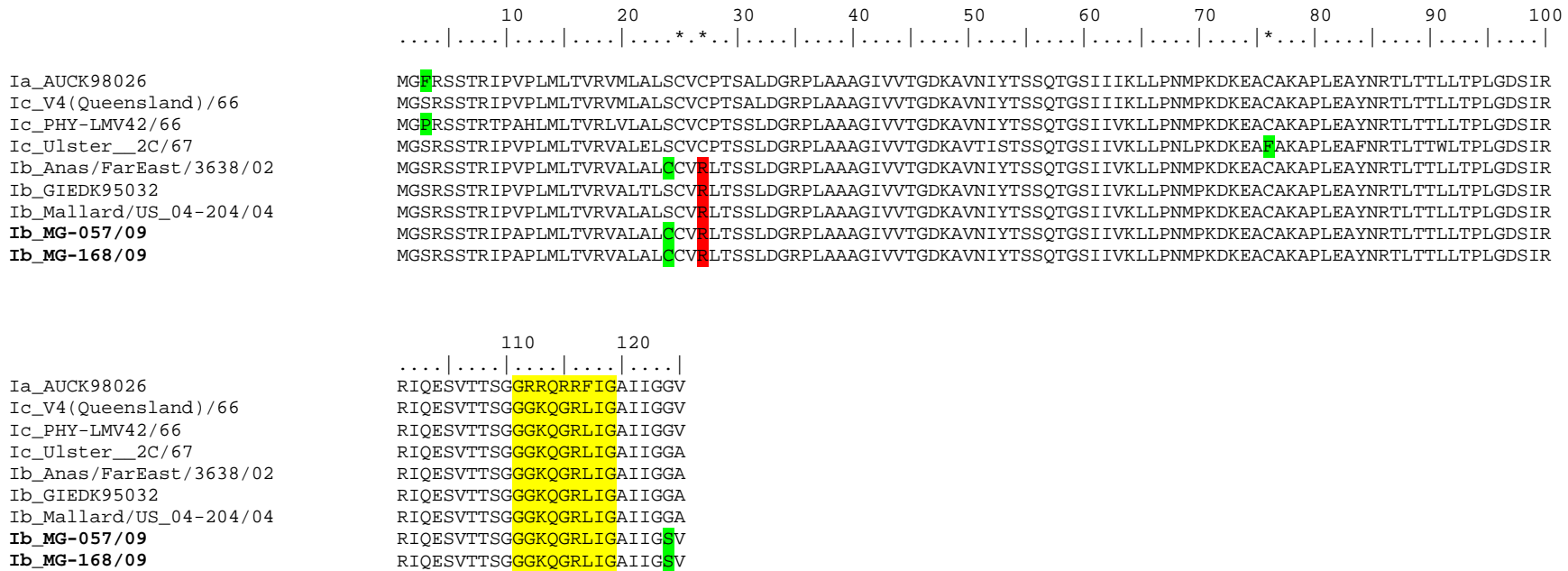


Figure 42: Alignement de la protéine F (1 à 125aa) montrant les substitutions d'AA. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (1 à 125). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles. Les AA caractéristiques de sous-génotype Ib sont encadrés en rouge.

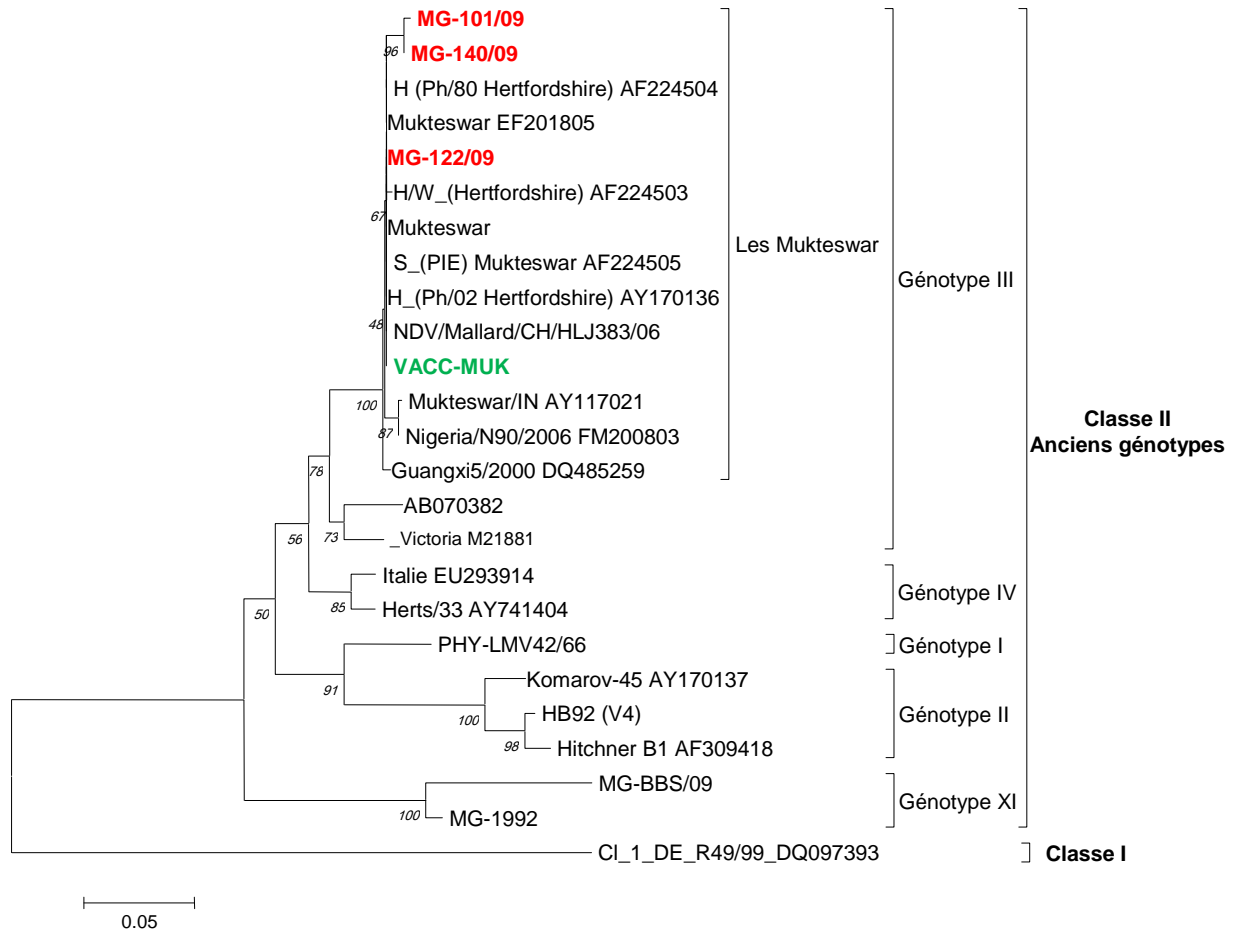


Figure 43: Arbre phylogénétique (enraciné) de l'APMV-1 en se basant sur les 374 pb (position 47 – 421nt) du gène F montrant la position des trois souches malgaches (écrites en rouge) dans le génotype III par rapport aux 23 séquences des génotypes I, II, III, IV et XI.

L'analyse a été effectuée avec l'algorithme Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) en utilisant la méthode de Kimura à deux paramètres (K2P) avec 1000 bootstraps (Felsenstein, 1985) dans le logiciel MEGA4 (Kimura et al., 2004; Tamura et al., 2007). L'échelle indique le nombre de substitutions par site.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

.....|.....|.....|.....|.....*..|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|*..|.....|.....|.....|.....|

Ib MG-57/09 MGRSSTRIPAPLMLTVRVALALCCVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

Ib MG-168/09 MGRSSTRIPAPLMLTVRVALALCCVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III Sato AB070382 MGRSSTRIPAPLMLTIWIALALGCVHLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III KR_1/49 AY117025 MGPRSSTKIPTPLMLTIRIALALSCVYPVSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III AUS Victoria M21881 MGPRSSTRIPVPLMLTIRIALALSCVHLASSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III JS/7/05/Ch MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III JS/9/05/Go MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III M21881 AY135745 MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III Vacc_MUK_Mada MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III **MG-101/09** MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTRDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III **MG-140/09** MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III **MG-122/09** MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

III Muktesward MGPRSSTRIPVPLMLTIRITLALSIVRLTSSLDGRPLAAAGIVVTGDKAVNIYTSSQTGSI IVKLLPNMPKDKEACAKAPLEAYNRTLTLTLLTPLGDSIR

110 120

.....|.....|.....|.....|.....

Ib MG-57/09 RIQESVTTSGGGKQGRFIGAIIGS

Ib MG-168/09 RIQESVTTSGGGKQGRFIGAIIGS

III Sato AB070382 RIQESVTTSGRRQRFIGAIIGS

III KR_1/49 AY117025 RIQESVTTSGRRQRKRFVFIGAIIGS

III AUS Victoria M21881 RIQESVTTSGRRQRKRFFIGAIIGS

III JS/7/05/Ch RIQESVTTSGRRQRFIGAIIGS

III JS/9/05/Go RIQESVTTSGRRQRFIGAIIGS

III M21881 AY135745 RIQESVTTSGRRQRKRFFIGAIIGS

III Vacc MUK Mada RIQESVTTSGRRQRKRFFIGAIIGS

III **MG-101/09** **RIQESVTTSGRRQRKRFFIGAIIGS**

III **MG-140/09** **RIQESVTTSGRRQRKRFFIGAIIGS**

III **MG-122/09** **RIQESVTTSGRRQRKRFFIGAIIGS**

III Muktesward RIQESVTTSGRRQRKRFFIGAIIGS

Figure 44: Alignement de la protéine F (1 à 124aa) montrant les substitutions d'AA. Les numéros au dessus des séquences sont les positions des AA (1 à 125). Les résidus de cystéine sont remplacés par des étoiles. Les AA caractéristiques des souches issues de Mukteswar sont encadrés en rouge. Les acides aminés caractéristiques des souches MG sont encadrés

Tableau 24: *Matrice de divergence génétique (%) entre les séquences d'APMV-1 dans le génotype III de la classe II*

Souches	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]
Cl_1_DE_R49/99_DQ097393	[1]																								
II_HB92_(V4)	[2]	48																							
II_Hitchner_B1_AF309418	[3]	47	2																						
XI_MG-BBS/09	[4]	51	30	31																					
XI_MG-DRZV/92_F_complete	[5]	47	24	25	8																				
I_PHY-LMV42/66	[6]	44	12	13	26	20																			
II_Komarov-45_AY170137	[7]	47	4	4	30	24	13																		
IV_Italie_EU293914	[8]	44	17	18	19	12	12	17																	
IV_Herts/33_AY741404	[9]	44	17	18	19	12	12	17	2																
III_Sato_AB070382	[10]	46	17	18	22	16	11	17	8	8															
III_AUS_Victoria_M21881	[11]	45	16	17	21	14	11	14	7	7	4														
III_Mukteswar/IN_AY117021	[12]	44	18	18	24	17	13	17	7	7	6														
III_Nigeria/N90/2006_FM200803	[13]	44	18	18	22	16	13	17	7	7	6	6	0												
III_H_(Ph/80_-_Hertfordshire)_AF224504	[14]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1											
III_S_(PIE)_Mukteswar_AF224505	[15]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1	0										
III_NDV/Mallard/CH/HLJ383/06_FJ480786	[16]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1	0	0									
III_H_(Ph/02_-_Hertfordshire)_AY170136	[17]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1	0	0	0								
III_Mukteswar_EF201805	[18]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1	0	0	0	0							
III_Guangxi5/2000_DQ485259	[19]	43	17	18	22	15	13	17	6	6	6	6	1	1	1	1	1	1							
III_MG-122/09	[20]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1	0	0	0	0	0	1					
III_H/W_(Hertfordshire)_AF224503	[21]	43	17	18	23	16	13	17	7	7	6	5	1	1	0	0	0	0	0	1	0				
III_MG-101/09	[22]	44	18	19	24	17	14	18	8	8	7	6	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1			
III_MG-140/09	[23]	43	18	19	24	17	13	17	7	7	7	6	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
VACC-MUK_MFS1_1762	[24]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
III_Mukteswar	[25]	43	17	18	23	16	12	16	7	6	6	5	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0

Partie 4: Analyses biologiques sur les poulets

A. Détermination de l'index de pathogénicité intra cérébrale ou ICPI des deux souches malgaches MG-1992 et MG-725/08

L'analyse de la pathogénicité des deux souches a été effectuée à l'Unité Virologie Immunologie et Parasitologie Aviaires et Cunicoles (UVIPAC - ANSES-Ploufragan France). Les valeurs d'ICPI des deux souches malgaches MG-1992 et MG-725/08 étaient de 1,9, ce qui correspond à une haute virulence. Ces résultats sont en concordance avec les données de séquence sur le site de clivage et de la taille de la protéine HN.

B. Protection issue des vaccins commercialisés à Madagascar contre la souche MG-1992 du génotype XI

1. Détermination de la létalité de la souche MG-1992 et du délai de survie

Tous les poulets des 4 lots infectés par la souche MG-1992 titrant 10^6 DL₅₀/ml à 10^3 DL₅₀/ml meurent 6 jours après l'infection (Tableau 25). En revanche, les cinq poulets non inoculés du lot témoin restent vivants et non malades pendant toute la durée de l'expérience.

Tableau 25: *Résultats de létalité de la souche MG-1992 titrant à 10^7 DL₅₀/ml à 4 dilutions*

Jour	Poulets morts par jour par lot				
	1	2	3	4	Témoins
	10^6 DL ₅₀ /ml	10^5 DL ₅₀ /ml	10^4 DL ₅₀ /ml	10^3 DL ₅₀ /ml	-
3 ^{ème}	3	0	0	0	0
4 ^{ème}	2	1	1	1	0
5 ^{ème}	-	4	3	2	0
6 ^{ème}	-	-	1	2	0
7 ^{ème}	-	-	-	-	0
8 ^{ème}	-	-	-	-	0
9 ^{ème}	-	-	-	-	0
10 ^{ème}	-	-	-	-	0
11 ^{ème}	-	-	-	-	0
13 ^{ème}	-	-	-	-	0
13 ^{ème}	-	-	-	-	0
14 ^{ème}	-	-	-	-	0
15 ^{ème}	-	-	-	-	0
Nombre poulets morts	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5

DL₅₀/ml : Dose létale à 50% par millilitre

L'analyse du temps de survie par la méthode de Kaplan-Meier (XLSTAT-2010) a montré que le temps de survie moyen des poulets inoculés par chaque dilution virale augmente de façon inversement proportionnelle au titre du virus. Entre le titre 10^6 DL₅₀/ml et 10^3 DL₅₀/ml, le temps de survie moyen passe de 3,571 à 5,515 (Tableau 26).

Tableau 26: *Temps de survie des poulets infectés par la souche MG-1992 de chaque groupe calculé par la méthode de Kaplan-Meier (XLSTAT-2010)*

Lot	Titre (xDL ₅₀ /ml)	Temps de survie (en jour)			
		moyenne	Ecart-type	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)
1	10 ⁶	3,571	0,209	3,162	3,981
2	10 ⁵	4,889	0,117	4,659	5,118
3	10 ⁴	5,260	0,266	4,739	5,781
4	10 ³	5,515	0,254	5,018	6,012

DL₅₀/ml : Dose létale à 50% par millilitre

2. Evaluation de la protection vaccinale contre la souche MG-1992

Dans cette étude, les tests d'épreuve des trois types de vaccins, fabriqués avec trois souches différentes, ont été réalisés au FOFIFA-DRZV. Les résultats de ces tests ont montré que les trois souches vaccinales, La Sota, Hichner B1 et Mukteswar, protègent les volailles en terme de morbidité et de mortalité confondues contre la souche d'épreuve MG-1992 titrant 10^5 DL₅₀/ml.

a. Evaluation de l'immunogénicité des souches vaccinales

La cinétique des anticorps obtenue avec les trois types de vaccins contre la MN utilisés dans cette étude est présentée dans le Tableau 27 et Figure 45. Le taux moyen de pourcentage d'inhibition en ELISA de compétition MN, juste avant la vaccination (S0), est de 10,99% [(n=20) : (8,82% – 13,16%) < 40%], confirmant ainsi le statut séronégatif des poulets avant l'expérimentation. Une semaine après la vaccination (S1), les trois lots de poulets vaccinés (La Sota, HB1 et Mukteswar) présentaient déjà une séroconversion. Quatre semaines après la vaccination (S4), par rapport au seuil de positivité (>40%) du test ELISA, les cinq individus dans chaque lot sont séropositifs en MN. Cependant, les 5 poulets dans le lot témoin non vaccinés et non infectés sont restés séronégatifs pendant quatre semaines avant l'épreuve de virulence (Tableau 27).

Tableau 27: Résultats des tests de détection d'anticorps par ELISA pendant quatre semaines (S0 à S4 et PC)

Souche Vaccinale	Moyenne des % de compétition en ELISA MN						Epreuve virulente	
	S0	S1	S2	S3	S4	PC	Signe clinique	Mortalité (%)
Hitchner B1		44,22 [±12,54]	55,09 [±10,56]	78,37 [±11,76]	88,9 [±4,58]	-	0/5	0
La Sota	10,99* [±2,17]	48,69 [±15,97]	61,01 [±26,14]	65,86 [±28,50]	80,96 [±19,09]	-	0/5	0
Mukteswar		54,06 [±26,24]	69,77 [±30,46]	84,99 [±8,14]	93,34 [±2,63]	94,45 [±3,45]	0/5	0
Témoins		13,16 [±4,63]	15,38 [±3,36]	13,73 [±9,34]	15,08 [±5,25]	60,49 [±6,02]	5/5	100

*Moyenne [± écart-type]

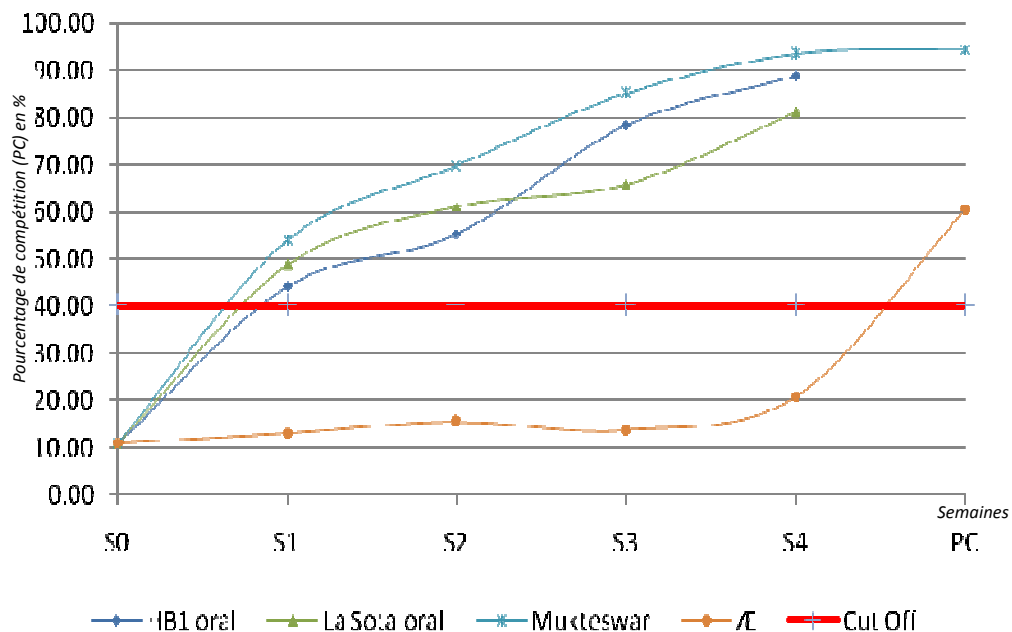


Figure 45: Courbe d'évolution des % de compétition en ELISA MN dans les 5 groupes (la ligne rouge représente le seuil de positivité)

b. Protection des poulets vaccinés contre le virus MG-1992

La suspension virale MG-1992 titrant 10^5 DL₅₀/ml par dose d'épreuve de 1 ml a été utilisée pour l'épreuve de virulence. La protection des volailles contre ce virus a été déterminée par l'absence de signes cliniques et de mortalité.

Au cours de cette épreuve de virulence, les 15 oiseaux vaccinés repartis dans les 3 lots ont été cliniquement normaux jusqu'à la fin de l'expérience (15 jours après la date d'épreuve). En revanche, les cinq oiseaux non vaccinés dans le lot témoin mourraient pendant les quatre premiers jours. Ils ont montré des signes cliniques tels que la prostration, l'inappétence, l'hérissément de plumes et la dépression ainsi que des lésions *post-mortem* comme les pétéchies sur la muqueuse du proventricule caractéristiques de la MN. Le taux de protection de 100% conféré par ces souches vaccinales La Sota, Hitchner B1 et Mukteswar est supérieur à celui de 90% considéré comme le seuil minimal de protection selon OIE (OIE, 2009).

C. Protection conférée au poussin EOPS par la vaccination HB1 vivant/La Sota-Clone 30 inactivé contre la souche malgache MG-725/08 du génotype XI

1. Protection clinique

Comme pour les résultats obtenus avec la souche MG-1992 au FOFIFA-DRZV sur les poulets locaux, la vaccination avec le virus vivant HB1 et avec le virus inactivé huileux La Sota Clone 30 confère en conditions expérimentales une protection contre la morbidité et la mortalité vis-à-vis de la souche malgache MG-725/08 et de la souche d'épreuve de référence Herts/33. Comme attendu, tous les poulets non vaccinés (NV) dans les deux premiers lots (1 et 2) mourraient trois jours (J₃) après l'épreuve de virulence (Tableau 28). L'examen *post mortem* de ces poulets a montré les lésions caractéristiques de la MN telles que hémorragies pulmonaires et hépatiques, pétéchies du proventricule, vascularisation externe du cerveau très marquée et néphrite ou présence de cristaux d'urate.

Tableau 28: Résultats de protection clinique avec les deux souches d'épreuve

Lots	1		2		Témoin	
Souche d'épreuve	MG-725/08		Souche Herts 33/VNHe/2.1		-	
Immunisation	V*	NV**	V	NV	V	NV
Nombre poussin	25	12	25	12	10	10
Nombre poulet Morts	0/25	12/12	0/25	12/12	10/10	10/10

* : Vacciné simultanément avec HB1=Hitchner B1 ; Cl-30= La Sota (clone 30) ; ** : NV=Non vacciné

2. Détermination de l'excrétion virale après l'épreuve de virulence

Les résultats d'analyse moléculaire QRT-PCR/NDV effectués sur les huit mélanges de cinq écouvillons cloacaux à J₃, J₅, J₇, J₁₀ et J₁₄ réalisés chez les poulets vaccinés et infectés sont négatifs en APMV-1. Ces résultats montrent que l'excrétion virale par voie cloacale après l'infection des poulets vaccinés apparaît négligeable. Pour les écouvillons trachéaux provenant des poulets vaccinés et infectés avec la souche de référence, seuls deux des quatre mélanges sont positifs en APMV-1 et uniquement au 3^{ème} jour. En revanche, des excréctions virales par voie oropharyngée (respiratoire) sont observées dans tous les mélanges provenant des poulets vaccinés de la même façon mais éprouvés par le virus MG-725/08 de J₃ à J₇ et dans deux mélanges sur quatre à J₁₀ (Tableau 29). L'excrétion virale par voie oropharyngée est maximale ($1,1 \times 10^5$ EqDIE₅₀) vers le 5^{ème} jour (Figure 46).

L'analyse des séquences de produits de QRT-PCR/NDV positifs a montré des séquences identiques entre elles et identiques à celle de la souche d'épreuve au niveau du site de clivage du gène F : ¹¹²RRQRR↓F¹¹⁷ pour la souche de référence et ¹¹²RRRRR↓F¹¹⁷ pour la souche MG-725/08.

Ces résultats montrent que les poulets vaccinés et infecté par la souche MG-725/08 sont protégés contre la morbidité et mortalité. Cependant, ces oiseaux excrètent encore par voie respiratoire la souche d'épreuve pendant 2 semaines (14j).

Tableau 29: *Résultats des analyses de détection des gènes M d'APMV-1 dans les écouvillons oropharyngiens*

Souches d'épreuve	Pool	Valeurs de Ct				
		J3	J5	J7	J10	J14
Herts/33	1	nd*	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd
	3	39,5	nd	nd	nd	nd
	4	34,5	nd	nd	nd	nd
MG-725/08	1	39,3	29,6	26,9	nd	nd
	2	37,8	25,2	25,2	36,3	nd
	3	39,5	33,2	32,2	nd	nd
	4	39	27,3	29,4	29,4	nd

nd* : non détecté

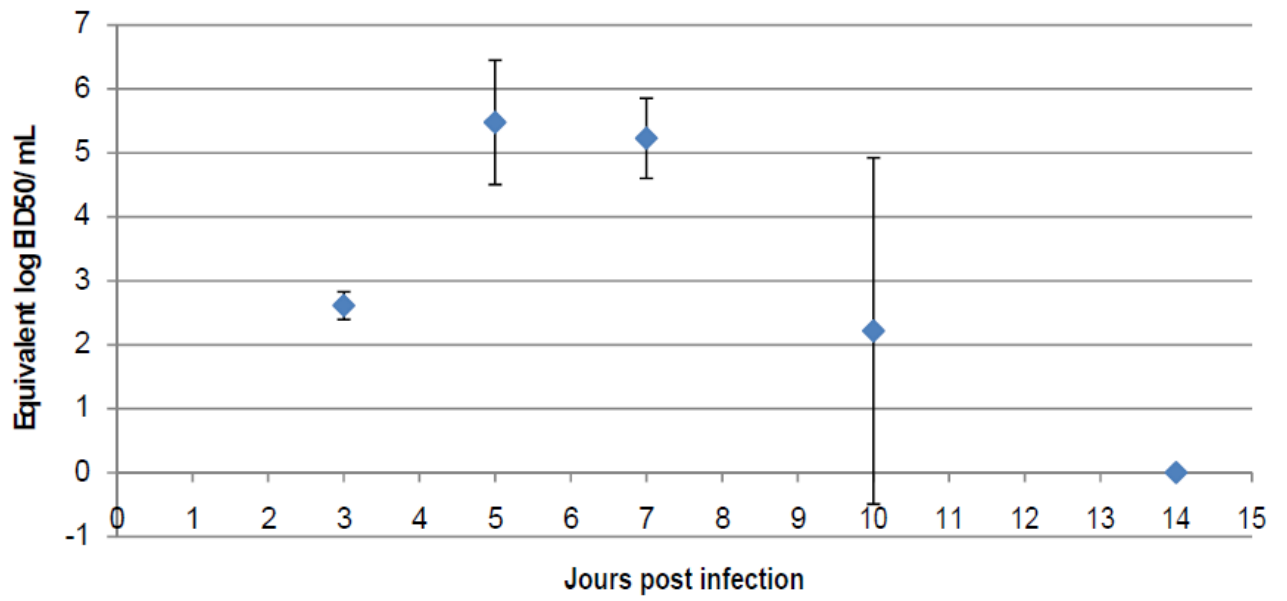


Figure 46: Graphique montrant la variation d'excrétion par voie oropharyngée virale jusqu'au 14^{ème} jour en équivalent DIE_{50} sur les poulets vaccinés et éprouvé avec la souche MG-725/08 (ANSES – Ploufragan)

DISCUSSION

CHAPITRE V: DISCUSSION

Partie 1: La maladie de Newcastle et les souches d'APMV-1 circulant à Madagascar

La maladie de Newcastle est bien connue des aviculteurs villageois dans de différents pays en développement (Alders & Spradbrow, 2001). Selon les pays, les éleveurs ont donné plusieurs appellations en langue locale à cette maladie comme «*konoku*», «*twase obgo*», «*nkoko yare*» au Ghana, «*muzungo*», «*mbendeni*», «*mte-éma*» «*chigubo-gubo*» au Mozambique, et «*ranikhet*» dans une bonne partie de l'Asie. A Madagascar, la MN est appelée par les éleveurs «*barika*», «*ramoletaka akoho*», «*moafon'akoho*», «*ramibomogno*» ou «*pesta akoho*». En général, ces appellations signalent la gravité et l'importance de la MN en aviculture villageoise (Maminiaina *et al.*, 2007). Comme dans les autres pays d'Afrique, d'Asie et d'Europe de l'Est, la MN constitue la première cause de mortalité des poulets (Alders & Spradbrow, 2000). Selon les études menées à Madagascar de 1999 à 2002, la MN constitue une des contraintes majeures de l'aviculture villageoise. Cette maladie est responsable de 44% de la mortalité des volailles (Koko *et al.*, 2006a; Koko *et al.*, 2006b; Maminiaina *et al.*, 2007).

Dans le cadre du présent travail, la séroprévalence instantanée de 70,94% [IC₉₅: 67,44% à 74,44%] enregistrée en juin 2008 chez les volailles adultes appartenant au compartiment I dans la région du lac Alaotra à Madagascar (poulets non vaccinés issus de l'aviculture villageoise) témoigne de cette forte pression infectieuse liée aux APMV-1. En outre, cette séroprévalence est proche de celle de 72,22% [IC₉₅: 62,01% à 82,43%] enregistrée chez des volailles adultes en juin 1999 dans d'autres régions de Madagascar comme Moramanga et Ambohimangakely (Maminiaina *et al.*, 2007). Il faut noter que ces fortes séroprévalences précèdent d'un mois l'apparition des premiers foyers de MN et de quatre mois environ, le pic traditionnel d'épizooties observé en octobre (ANNEXE 1) touchant jusqu'à 100 % des oiseaux. Cette apparition progressive puis massive de foyers dans un délai très court après nos enquêtes montrant qu'une large partie de la population de volailles adultes est immune s'explique par l'arrivée importante de poussins non protégés. Ces poussins sont issus de poules rescapées des foyers de l'année précédente et héritent des anticorps d'origine

maternelle dirigés contre cette maladie (Guève, 2002). Les éclosions ont lieu vers mai-juin. A l'éclosion, le taux d'anticorps hérités est proportionnel à celui de la mère poule. La persistance des anticorps maternels est alors variable d'un individu à l'autre mais ne dépasse pas généralement quatre semaines, période à l'issue de laquelle les anticorps maternels ont disparu, laissant ainsi les poussins sensibles à l'infection (Allan & Gough, 1974). Ainsi, des générations de poussins naïfs dépourvus d'anticorps se succèdent à partir de juin-juillet contribuant à l'émergence de foyers. A l'issue de la période où se développent les foyers, c'est-à-dire de juillet à février de l'année suivante, les volailles séronégatives ont disparu. Pour le cas de l'aviculture villageoise à Madagascar, les éleveurs reconstituent leur cheptel à partir des individus rescapés (Maminiana *et al.*, 2007). Ces éleveurs savent pertinemment que ces volailles sont devenues résistantes à la maladie et le repeuplement s'effectue majoritairement à partir de la reproduction interne du cheptel. C'est ainsi que l'incidence clinique de la maladie est la plus faible pendant la période d'accalmie située entre mars et mai (Maminiana *et al.*, 2007).

Le système d'élevage de type villageois (compartiment I) est caractérisé par des oiseaux en divagation, par la faible taille du cheptel (généralement 20 par famille) et par la mixité des espèces (Copland & Alders, 2009; dos Anjos, 2007; Koko *et al.*, 2006a). A Madagascar, ces petits élevages comprennent généralement des poules (*Gallus gallus*), quelques dindes (*Meleagris ocellata*) et des palmipèdes (regroupant les trois espèces domestiques de canard: canards communs (*Anas platyrhynchos*), canards de barbaries (*Cairina moschata*) et oies (*Anser anser*) (Koko *et al.*, 2006a). Les résultats de nos investigations sérologiques effectués chez ces palmipèdes ont donné une séroprévalence instantanée de 47,77% [IC₉₅ : 42,57% à 52,97%]. Ils révèlent la circulation de souches d'APMV-1 aussi bien chez les poules que chez les palmipèdes. Or, ces derniers ne sont pas considérés comme une espèce sensible à la MN mais réceptive puisque constituant un réservoir pour les APMV-1 (Munir *et al.*, 2010).

En ce qui concerne le compartiment II regroupant les volailles domestiques de type commercial (poulets de chair et poules pondeuses), l'analyse sérologique pendant l'enquête de 2008 montrent que plus de 90% de ces volailles sont séropositives en APMV-1. Cependant, le test sérologique ELISA de compétition utilisé (SVANOVIR®NDV-Ab / LSI - France), ne distingue les anticorps post-infectieux des anticorps post-vaccinaux. L'image de la circulation virale dans ce compartiment est donc masquée par l'application généralisée du

vaccin par les éleveurs de ce type d'élevage. Malgré une couverture vaccinale touchant 100% du cheptel, des cas sporadiques de MN sont encore enregistrés dans les élevages commerciaux à Madagascar. Dans le cadre de cette étude, la détection d'une partie (6%) des volailles vaccinées restées séronégatives pourrait expliquer ces cas sporadiques (Arbelot, 1997).

Quant à l'avifaune aquatique du lac Alaotra, les résultats de séroprévalence instantanée de 10,22% [IC₉₅ : 6,86% à 13,57%] obtenus en 2009 lors des analyses sérologiques de 15 espèces d'oiseaux sauvages aquatiques, indiquent une circulation modérée des APMV-1 dans ce compartiment III. De plus, les résultats positifs sont trouvés uniquement chez les anatidés sauvages. La séroprévalence moyenne des anatidés est de 12,02% d'avril à mai 2009 mais ce taux varie de 4,76 à 50% selon les espèces (Tableau 18). Il est possible que la variation de séroprévalence entre espèces soit liée à des différences de réceptivité par rapport à l'APMV-1 (Mendes, 2006). La proportion relative de chaque population et le niveau de contacts entre elles et avec les palmipèdes domestiques pourraient également jouer un rôle. Les populations les plus fortement séropositives en MN ont des contacts fréquents avec les oiseaux domestiques entretenant le cycle viral alors que les dendrocygnes restent plus isolés Figure 47. De plus, les trois populations palmipèdes sauvages, les canards à bosse (*Sarkidiornis melanotos*), les canards à bec rouge (*Anas erythrorhyncha*) et les canards de Meller (*Anas melleri*) ont un afflux de juvéniles à partir du mois de mars avec une nette augmentation de chaque population en avril et mai (Minodier, 2010), ce qui pourrait jouer dans le cycle épidémiologique de la MN un rôle identique à celui déjà décrit pour les poussins issus de volailles villageoises.

Les résultats sérologiques indiquent une circulation des APMV-1, qu'ils soient velogènes, mesogènes, lentogènes voire vaccinaux. Les informations sur la virulence des souches à l'origine de l'infection et la relation entre les différentes souches circulantes dans le temps et/ou dans l'espace ne peuvent alors être déterminées que par des approches en virologie. Les enquêtes virologiques au même titre que les enquêtes sérologiques ont montré que les APMV-1 circulent dans tous les compartiments étudiés à Madagascar. La prévalence virologique de 0,85% [IC₉₅ : 0,36% à 1,34%] enregistrée dans le compartiment III confirme la circulation de l'APMV-1 chez les oiseaux sauvages aquatiques du lac Alaotra déjà mise en évidence dans l'enquête sérologique.

Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres études qui ont montré que les oiseaux sauvages aquatiques constituent un réservoir d'APMV-1 (Kim *et al.*, 2007b; Zanetti *et al.*, 2005), (Takakuwa *et al.*, 1998; Weingartl *et al.*, 2003).

Pour que la MN existe à l'état enzootique à Madagascar, une source ou un réservoir doivent être maintenus et servir une origine aux différents foyers épisodiques. Il est possible que les poulets villageois dans le compartiment I jouent ce rôle de réservoir comme proposé par Verwoerd (1995) au même titre que les poules domestiques vaccinées, infectées par les souches sauvages.

Depuis la première description de la maladie à Madagascar en 1946 (Rajaonarison, 1991), aucune donnée sur les caractéristiques moléculaires des souches d'APMV-1 issues d'oiseaux domestiques ou sauvages n'est disponible. Pour comprendre les modalités de circulation au sein et entre compartiments (I, II et III), les virus isolés et les échantillons positifs ont été partiellement séquencés et les séquences comparées. Bénéficiant de l'amélioration des techniques d'extraction d'acide nucléique (Chirgwin *et al.*, 1979; Chomczynski & Sacchi, 1987; 2006) et de séquençage nucléotidique à haut débit (Ahmadian *et al.*, 2006; Csako, 2006) ainsi que du développement de bases de données de séquences informatisées à accès libre et de différents programmes bioinformatiques, nous avons pu conduire dans le cadre de cette thèse, une étude approfondie. L'analyse phylogénétique des APMV-1 s'est avérée être un outil puissant pour étudier les relations épidémiologiques entre souches d'APMV-1 présentes dans différentes parties du monde. La plupart des études sont basées sur l'analyse d'une séquence nucléotidique partielle du gène F située entre les positions 47 à 421 (Aldous *et al.*, 2003; Lomniczi *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2001). Elles ont permis le classement phylogénétique et le génotypage de différentes souches responsables de cas de MN en Europe (Lomniczi *et al.*, 1998; Munir *et al.*, 2010; Ujvari *et al.*, 2003; Wehmann *et al.*, 2003a), en Asie (Ke *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006) et en Afrique (Cattoli *et al.*, 2009; Mohamed *et al.*, 2009; Otim *et al.*, 2004; Servan de Almeida *et al.*, 2009; Snoeck *et al.*, 2009). Dans le cadre de nos travaux, les analyses ont porté sur 10 souches isolées et 17 produits de séquençages d'amplicons de QRT-PCR-NDV générés directement à partir d'échantillons positifs pour lesquels l'isolement viral n'a pas été possible.

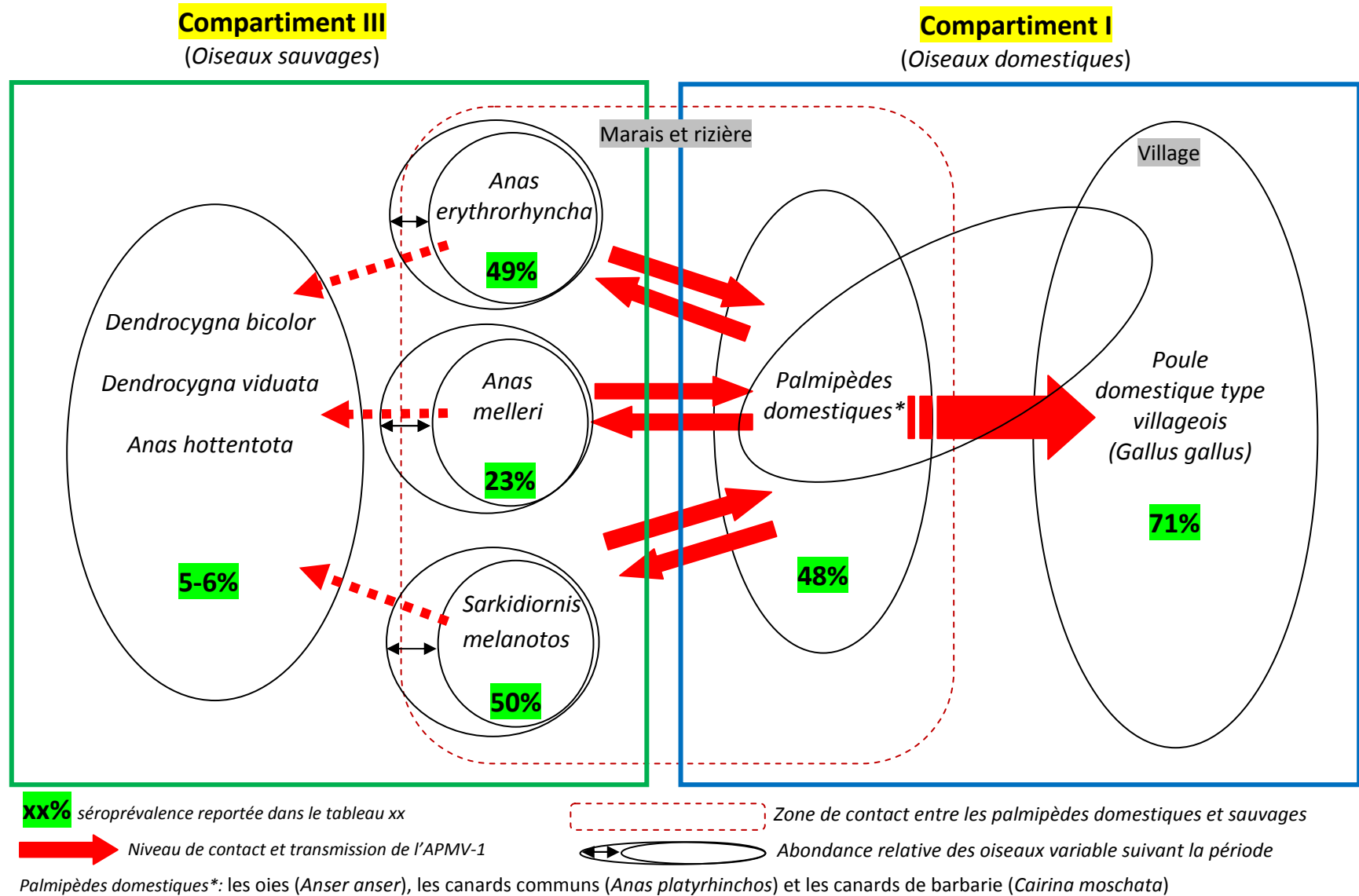


Figure47: Scénario possible de cycle viral entre les oiseaux domestiques (compartiment I) et les oiseaux sauvages (compartiment III).

Les 10 souches ont été regroupées dans la classe II et réparties dans quatre génotypes différents dont trois déjà décrits auparavant : génotypes I, III et VII. L'originalité de ce travail porte sur l'identification d'un nouveau cluster, proposé dans le cadre de cette étude comme le onzième cluster ou génotype XI (Maminiana et al., 2010; Servan de Almeida et al., 2009) (ANNEXE 3 ; ANNEXE 2). L'existence de ce onzième cluster est confirmée par l'analyse phylogénétique basée sur le gène HN (de Leeuw & Peeters, 1999; Gould *et al.*, 2003) et sur le génome viral complet (Wise *et al.*, 2004).

Les deux souches (MG-O57/09, MG-168/09) isolées à partir de *Dendrocygna viduata* (Tsiriry) et *Anas platyrhynchos* (Canard à bec rouge ou *Menamolotra*) sont classées dans le génotype I, plus précisément dans le sous génotype Ib où se trouvent la plupart des souches d'APMV-1 isolées à partir des oiseaux sauvages aquatiques migrateurs en Extrême-Orient (Sakai *et al.*, 2007), aux Etats-Unis (Kim *et al.*, 2007a) et en Europe (Jorgensen *et al.*, 2004). En revanche, toutes les souches vaccinales du génotype I/classe II comme Ulster/1967, V4 et I2 sont regroupées dans les deux autres sous-clusters Ia et Ic, suggérant que les deux souches que nous avons isolées ne dérivent pas de souches vaccinales. Cette hypothèse est renforcée par le fait que qu'une enquête réalisée en 2010 auprès des fournisseurs de vaccins aviaires a confirmé que tous les vaccins (inactivé ou vivant) utilisés à Madagascar étaient fabriqués uniquement avec les souches de génotype II (La Sota et ses clones et Hichthner B1) et III (Mukteswar). L'analyse moléculaire du site de clivage ($^{112}\text{GKQGR}\downarrow\text{L}^{117}$) du précurseur de la protéine de fusion (F) de ces deux souches a montré un profil avirulent. En outre, la divergence génétique maximale entre ces deux souches et d'autres souches isolées en Extrême-Orient en 2002 Anas/FarEast/3638/02 (Liu *et al.*, 2009) ou en Amérique du Nord en 2004 Mallard/US_04-204/04, Mallard/US_04-235/04 (Kim *et al.*, 2007a) n'est que 2%. Ces souches lentogènes isolées chez les oiseaux sauvages ne sont donc pas des souches vaccinales.

Le suivi longitudinal des anatidés sauvages aquatiques effectué au lac Alaotra en 2010 a montré que les canards sauvages vivent en promiscuité avec les palmipèdes domestiques (Minodier, 2010). Ces derniers pourraient constituer un relais pour la transmission des souches d'APMV-1 (génotype Ib) avirulentes ou asymptomatiques vers les poulets du compartiment I. En effet, l'analyse phylogénétique des séquences issues du criblage par

QRT-PCR lors des enquêtes de prévalence en 2010 montrent que la séquence MGS-227/09 obtenue à partir d'un poulet villageois (*Gallus gallus*) non vacciné est également classée dans le sous-génotype Ib. De plus, cette souche présente 100% d'identité sur 240 pb du gène F avec les séquences des deux souches isolées chez les oiseaux sauvages (MG-O57/09, MG-168/09). Ce résultat est fortement en faveur d'une circulation virale entre les palmipèdes domestiques du compartiment I et les oiseaux sauvages du compartiment III. Par ailleurs, nous avons aussi détecté la circulation d'APMV-1 avirulent (¹¹²GKQGR↓L¹¹⁷) de sous-génotype Ia et Ic dans cinq échantillons (MGS-271C/09, MG-TA 1037/08, MG-TA 1070/08 et MG-TA 1054/08), quatre d'entre eux provenant de poulets (*Gallus gallus*) et le cinquième isolé d'un palmipède domestique (*Anas sp.*). Bien qu'aucun virus commun aux oiseaux sauvages et aux palmipèdes domestiques n'ait été isolé, probablement en raison de la faiblesse de l'échantillonnage, les informations de virologie moléculaire et celles correspondant aux mouvements d'oiseaux telles que représentés sur la Figure 47, permettent cependant de suspecter que les palmipèdes domestiques jouent un rôle relais entre le compartiment III et les poulets du compartiment I. Une telle circulation virale d'APMV-1 entre oiseaux sauvages et domestiques a été montrée auparavant en Amérique du Nord (Kim *et al.*, 2007b), en Europe (Wehmann, 1999) et en Asie (Kim *et al.*, 2007b).

Depuis l'utilisation généralisée de la vaccination contre la MN, l'existence de souches vaccinales d'APMV-1 circulantes dans la nature a été démontrée à plusieurs reprises (Qiu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011). Ces souches sont des clones dérivés des souches vaccinales disséminées par la vaccination de masse (Miller *et al.*, 2009; Wehmann, 1999). Cependant, il est improbable que les cinq souches de génotype I détectées dans les compartiments domestiques et les deux souches avirulentes du compartiment sauvage proviennent de la vaccination dans la mesure où aucun vaccin utilisé n'est composé de souches de génotype I. Néanmoins, une utilisation ignorée de ce type de vaccin ne peut pas être écartée à Madagascar.

En conclusion, diverses souches d'APMV-1 avirulentes, probablement non dérivées de souches vaccinales, appartenant aux sous-génotypes Ia, Ib et Ic, co-circulent à l'intérieur du compartiment I, surtout dans les populations où le taux de vaccination est inférieur à 10%.

En plus de ces souches lentogènes de génotype I, trois souches d'APMV-1 (MG-140/09, MG-101/09 et MG-122/09) de génotype III ont été détectées chez des volailles du compartiment I. Ces souches présentent une identité de 99% sur 374 pb du gène F avec la souche vaccinale Mukteswar utilisée dans le vaccin PESTAVIA® produit par l'Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires (IMVAVET) à Madagascar. Ce résultat suggère une origine vaccinale liée à ces souches, hypothèse renforcée par le fait que les souches MG-140/09, MG-101/09 et MG-122/09 possèdent la même signature moléculaire au niveau de la protéine de fusion, représentée par la substitution d'une cystéine en proline en position 25 (Y²⁵→C), spécifique des souches vaccinales de génotype III (Wu *et al.*, 2011). La souche Mukteswar est une souche mesogène avec un ICPI égale à 1,4 et un site de clivage ¹¹²RRQRR↓F¹¹⁷ (OIE, 2009). Cette souche a entraîné un taux de mortalité élevé *in ovo* lors des inoculations que nous avons réalisées. Ce constat confirme que cette souche a un pouvoir infectieux résiduel non négligeable et que son excrétion par des animaux vaccinés est probable. Des études similaires ont montré l'existence d'une circulation de souches dérivées de Mukteswar utilisée comme vaccin. Ces souches ont été isolées au cours d'un foyer de MN chez les poulets (JS-7-05-Ch (ICPI=1,88)) et chez les oies (JS-9-05-Go (ICPI=1,61)) en Chine en 2005 (Qiu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011). Au regard de ces résultats, il est probable qu'en plus des APMV-1 avirulents circulant naturellement entre les compartiments domestique et sauvage, des souches vaccinales d'APMV-1, provenant des trois vaccins utilisés à Madagascar, La Sota, Hitchner B1 et Mukteswar, puissent circuler de façon silencieuse. Ce scénario pourrait favoriser des recombinaisons entre souches et l'émergence de nouvelles souches virulentes. La recombinaison d'une souche vaccinale avec une souche sauvage dans la nature a déjà été montrée par Han et al (Han *et al.*, 2008) et Zhang et al (Zhang *et al.*, 2010).

Outre la circulation silencieuse de souches avirulentes, des souches virulentes sont à l'origine de foyers de MN dans les deux zones d'études et dans les compartiments I et II. Cinq souches virales (MG-1992, MG-Meola/08, MG-BBS/09, MG-39-04/08, MG-725/08) ont été isolées en 1992, 2008 et 2009. Selon l'analyse phylogénétique, ces cinq souches sont regroupées dans un nouveau cluster que nous avons proposé comme génotype XI (Maminiaina *et al.*, 2010; Servan de Almeida *et al.*, 2009). Elles possèdent un site de clivage ¹¹²RRRRR↓F¹¹⁷ de type virulent. Ce type de site de clivage, formé uniquement par cinq

arginine (R) est unique. En plus de ce site de clivage inédit, plusieurs marqueurs de virulence sont aussi observés dans ces cinq souches. Parmi ces marqueurs, la longueur de la protéine HN fait partie d'un déterminant de virulence majeur (de Leeuw *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2004b; Römer-Oberdörfer *et al.*, 2006; Romer-Oberdorfer *et al.*, 2003). Les APMV-1 ont une protéine HN qui peut varier de 571 aa à 577 ou 616 aa (Alexander, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1989). Seules les souches velogènes, dont celles de génotype XI isolées dans ce travail, possèdent une protéine HN plus courte (571 aa). En outre, les essais *in vivo* sur poulets (*Gallus gallus*) ont montré que ces souches ont un IPIC égal à 1,9 proche de la valeur maximale de 2,0, confirmant leur caractère très virulent. La circulation de souches virulentes de génotype XI a été détectée dans des foyers de MN en 2010 (Rasamoelina Andriamanivo, 2011). Ces souches sont toutes apparentées, ce qui nous permet de considérer que seul le génotype XI est actuellement responsable de foyers de MN à Madagascar au moins depuis 1992.

Des souches de type velogène de génotype VII ont été également détectées chez un canard (MG 1511/08 sous-génotype VIIg ou XIIIa) lors de l'enquête épidémiologique de 2008 et chez un poulet (MGS 353T/09 sous-génotype VIId ou XII) lors de la surveillance de 2010. Ces deux échantillons ont été prélevés dans le cadre d'enquêtes de surveillance active à partir d'animaux apparemment sains dans le compartiment I et II malgré le caractère velogène de leur site de clivage ($^{112}\text{RRQKR}\downarrow\text{F}^{117}$) et leur classement phylogénétique dans un cluster velogène (génotype VII). Curieusement ce génotype VII virulent n'a jamais été mis en évidence dans un foyer. Une de ces souches de génotype VII (MGS-353T/09) est incluse dans le sous-génotype VIId, prévalent depuis 1990 en Asie, en Afrique et en Europe et isolé à la fois chez des palmipèdes et des gallinacées (Abolnik *et al.*, 2004; Herczeg *et al.*, 2001; Herczeg *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2004a; Ke *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2011; Rui *et al.*, 2009). En revanche, la deuxième séquence (MG 1511/08), se trouve dans le sous-génotype ex-VIIh ou XIII qui regroupe uniquement les souches isolées en Afrique de l'Ouest et Centrale (Cattoli *et al.*, 2009; Hammoumi *et al.*, 2011).

Partie 2: **Caractéristiques des APMV-1 dans le génotype XI et leur évolution**

Au cours de cette étude, les analyses phylogénétiques basées sur le gène F (374 nt), le gène HN (1713 nt) et le génome viral ont montré que le génotype XI est génétiquement plus proche du génotype IV. La divergence génétique entre ces deux génotypes est de 12%. Il faut noter que le génotype IV comme les génotypes I, II, III, fait partie des anciens génotypes responsables des premières épizooties de MN dans le monde (Czeglédi *et al.*, 2006). Un des caractères qui différencient les anciens et les nouveaux génotypes (V, VI, VII et VIII) est l'insertion de six nucléotides (6 nt) au niveau de la région non codante (5'NCR) du gène de la nucléoprotéine ou N (Wang *et al.*, 2006). Le génotype XI, malgré sa proximité phylogénétique avec le génotype IV possède aussi cette insertion de 6 nt, ce qui suggère une évolution particulière de ce génotype, parallèle mais indépendante par rapport aux autres (Figure 48). En effet, une éventuelle recombinaison de l'ancêtre de ce génotype XI avec une souche d'un nouveau génotype au niveau de cette région 5'NCR n'a pas été mise en évidence par le logiciel RDP3. En outre, le génotype XI partage des caractéristiques moléculaires uniques, non retrouvées dans d'autres génotypes (Maminaiina *et al.*, 2010).

En se référant à une vitesse d'évolution génétique de 1% par décennie en période d'épizootie (APMV-1 virulent) et dans les conditions naturelles (Czeglédi *et al.*, 2002; Wehmann *et al.*, 2003), la divergence maximale de 5% observée entre souches du génotype XI impliquerait au moins une durée de 50 ans (5 décennies) pour être acquise. Ces résultats s'accordent bien avec la date d'introduction suspectée de cette maladie à Madagascar, soit vers 1946, date de la première détection décrite de la maladie dans l'île. Cependant, en se référant toujours à la même vitesse d'évolution génétique de 1% par décennie, la divergence génétique de 12% entre génotypes XI et IV suppose que l'ancêtre commun de ces deux génotypes ait émergé plusieurs décennies avant l'introduction de la MN à Madagascar. Il est possible que cette divergence ait davantage été induite par la pression du système immunitaire et l'accumulation adaptative de mutations dans les protéines de structure du virus correspondant à un phénomène de sélection positive (Suzuki, 1999).

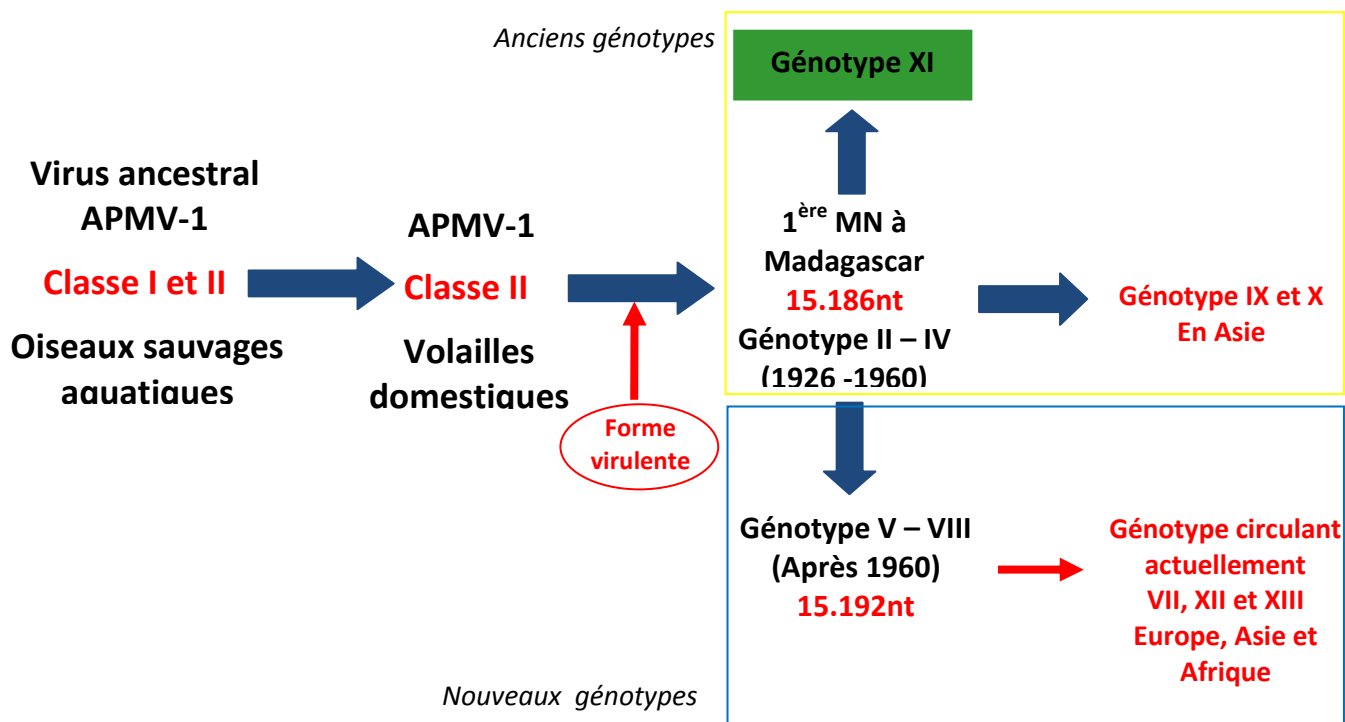


Figure48: Proposition d'évolution des APMV-1 et l'origine de génotype XI basé sur l'étude de l'équipe de Yu en 2001 (Yu et al., 2001).

Partie 3: Protection croisée entre les souches vaccinales et les souches du génotype XI

Dans le compartiment I, la circulation des APMV-1 peut être expliquée par la faible couverture vaccinale qui ne dépasse pas 10% (Koko *et al.*, 2006; Maminiana *et al.*, 2007). En revanche, dans le compartiment II la vaccination est très répandue. Des cas sporadiques de MN ont cependant été rencontrés au cours de cette étude, aussi bien dans les fermes de poules pondeuses que de poulets de chair. Toutes les souches d'APMV-1 isolées dans des foyers et caractérisées jusqu'à présent appartiennent au seul génotype XI. Les vaccins utilisés à Madagascar sont de génotype II ou III. L'hypothèse d'un échappement partiel du génotype XI à la protection conférée par d'autres génotypes a donc été émise et vérifiée sur le plan expérimental. Deux expérimentations différentes ont été menées, une au FOFIFA-DRZV (Antananarivo-Madagascar) et une à l'UVIPAC (ANSES-Ploufragan-France). La première a été effectuée avec la souche d'épreuve MG-1992 (génotype XI) sur des poulets de race locale vaccinés avec trois vaccins vivants à base des souches La Sota, Hitchner B1 et

Mukteswar. La deuxième expérimentation a utilisé une vaccination mixte (HB1-vivant /La Sota Clone-30-inactivé huileux) sur des poussins EOPS d'un jour d'âge et la souche d'épreuve MG-725/08 (génotype XI). Ces expérimentations ont montré une protection contre la morbidité et la mortalité induite par la vaccination. Toutes les autres études ont également montré des résultats d'efficacité des vaccins commerciaux contre différents génotypes de virus de la MN : génotype III (Jeon *et al.*, 2008), génotypes V et VI (Kapczynski & King, 2005; Kapczynski *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007), génotype VIIId (Abbas *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 2007; Bwala *et al.*, 2009; Ezema, 2009; Jeon *et al.*, 2008; Rauw *et al.*, 2009). Toutefois, malgré la protection clinique conférée par les vaccins contre la MN, l'excrétion virale par les animaux vaccinés avec un génotype et infectés par un autre génotype a déjà été démontrée (Ahmad *et al.*, 2007; Bwala *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2008; Kapczynski & King, 2005). Les travaux effectués par Li *et al.*, (2010) ont récemment montré que des vaccins phylogénétiquement proches des souches d'épreuve offrent une meilleure réduction du niveau d'excrétion virale par rapport aux vaccins classiques. Dans notre étude, les poulets vaccinés avec le génotype II et infectés avec la souche virulente MG-725/08 (ICPI=1,9) excrètent ce virus pendant deux semaines (14 jours), alors que la souche d'épreuve de référence Herts 33/VNHe/2.1 n'est excrétée que 3 jours. Ces différences de durée d'excrétion pourraient résulter de l'accumulation dans le génotype XI de mutations sur les deux protéines d'enveloppe. Les cas sporadiques de MN observés dans le compartiment II comprenant des volailles régulièrement et systématiquement vaccinées pourraient être expliqués par ces variations antigéniques du génotype XI. En effet, les quelques volailles mal vaccinées sont maintenues au contact de volailles cliniquement protégées mais capables d'excréter jusqu'à $1,1 \times 10^5$ EqDIE₅₀.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

CHAPITRE VI: PERSPECTIVES ET CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ces quatre années de thèse et de recherche ont permis de mieux connaître les caractéristiques virologiques et épidémiologiques des différentes souches avirulentes et virulentes de paramyxovirus aviaire de type 1 circulant dans les deux sites d'étude à Madagascar et dans différents compartiments impliquant oiseaux domestiques et sauvages. Cette étude a montré l'existence d'un nouveau génotype (nommé ici génotype XI) spécifique à Madagascar, responsable de tous les foyers cliniques de MN analysés jusqu'à présent. Ce nouveau génotype est dérivé d'une souche responsable d'une panzootie apparue dans les années 1950-60, qui s'est depuis lors éteinte à l'échelle mondiale. L'analyse de protection croisée entre les vaccins contre la MN pratiqués actuellement et les souches appartenant à ce génotype montre que les vaccins, utilisés à Madagascar, protègent les volailles contre la morbidité et la mortalité mais n'empêchent pas l'excrétion virale.

L'ensemble de ces travaux ont également contribué à la mise en place d'un laboratoire de biologie moléculaire pour le diagnostic des pestes aviaires au FOFIFA-DRZV à Madagascar. Ils permettent aussi de répondre en partie aux questions du projet GRIPAVI et en particulier d'améliorer la connaissance des interactions entre communautés d'oiseaux domestiques et sauvages.

Afin de compléter ces études, il serait intéressant (i) de poursuivre les activités de recherche sur l'identification et la caractérisation des APMV-1 circulant dans les bassins avicoles de Madagascar et provoquant des foyers de MN dans les élevages de volailles domestiques, (ii) de décrire précisément les foyers de MN survenant dans des systèmes contrastés sur le plan du peuplement aviaire (dominance de poulets gasy ou de palmipèdes, environnement sec ou humide) et (iii) de vérifier l'excrétion virale après vaccination contre la MN avec les vaccins utilisés à Madagascar avec les souches de génotype XI sur les races locales de poulets. L'utilisation de volailles sentinelles au contact d'animaux vaccinés permettrait d'évaluer le pouvoir de transmission des virus excrétés.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, T., Muneer. M. A., Ahmed. M. D., Khan. M. A., Younus. M. & Khan. I. (2006).** Comparative efficacy of five different brands of commercial newcastle disease La Sota vaccine vaccines in broilers. *Pakistan Vet J* **26(2)**, 55-58.
- Abolnik, C., Horner RF, Bisschop SP, Parker ME, Romito M & GJ, V. (2004a).** A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. . *Archives of Virology* **149**, 603-619.
- Abolnik, C., Horner, R. F., Maharaj, R. & Viljoen, G. J. (2004b).** Characterization of a pigeon paramyxovirus (PPMV-1) isolated from chickens in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* **71**, 157-160.
- Adi, A. A., Astawa, N. M., Putra, K. S., Hayashi, Y. & Matsumoto, Y. (2009).** Isolation and Characterization of a Pathogenic Newcastle Disease Virus from a Natural Case in Indonesia. *J Vet Med Sci* **8**, 8.
- Ahamed, T., Hossain, K. M., Billah, M. M., Islam, K. M. D., Ahasan, M. M. & Islam, M. E. (2004).** Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) on Vero Cell Line. *International Journal of Poultry Science* : **3 (2)**, 153-156.
- Ahmad, M. D., Chaudhry, M., Rai, M. F. & Rashd, H. B. (2007).** Evaluation of Two Vaccination Schemes Using Live Vaccines against Newcastle Disease in Chickens. *Turk J Vet Anim Sci* **31(3)**, 165-169.
- Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S. (2006).** Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* **363**, 83-94.
- Alders, R. & Spradbrow, P. (2000).** Newcastle disease in village chickens. In *SADC planning workshop on Newcastle disease control in village chickens*, p. 45 pp. 6-9 March - Maputo – Mozambique.
- Alders, R. & Spradbrow, P. B. (2001).** Controlling Newcastle Disease in Village Chickens: a field manual. Canberra. *Australian Centre for International Agricultural Research Monograph*, 82 - 112.
- Aldous, E. W., Fuller, C. M., Mynn, J. K. & Alexander, D. J. (2004).** A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. *Avian Pathology* **33**, 258-269.
- Aldous, E. W., Mynn, J. K., Banks, J. & Alexander, D. J. (2003).** A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology* **32**, 239 - 257.
- Alexander, D. (1988a).** Newcastle disease diagnosis. *Newcastle disease*, 147 - 160.
- Alexander, D. (2003a).** Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. *Diseases of Poultry*.
- Alexander, D. J. (1988b).** Preface in Newcastle Disease. *Boston MA, Kluwer Academic Publishers*, xi
- Alexander, D. J. (1997).** Newcastle disease and avian paramyxovirus infections, In B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, and L. R. McDou McDougald (ed.) *Diseases of poultry. Iowa State University Press ed, 10th*, 541–569.
- Alexander, D. J. (2000).** Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* **19**, 443-462.
- Alexander, D. J. (2003b).** Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In:editors. . In *Diseases of poultry 11th ed*, pp. 63–99. Ames: Iowa State University Press.
- Alexander, D. J., Banks, J., Collins, M. S., Manvell, R. J., Frost, K. M., Speidel, E. C. & Aldous, E. W. (1999).** Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. In *Veterinary Record*, pp. 417-421.
- Alexander, D. J., Russell, P. H., Parsons, G., Elzein, E. M. E. A., Ballouh, A., Cernik, K., Engstrom, B., Fevereiro, M., Fleury, H. J. A., Guittet, M., Kaleta, E. F., Kihm, U., Kosters, J., Lomniczi, B.,**

- Meister, J., Meulemans, G., Nerome, K., Petek, M., Pokomunski, S., Polten, B., Prip, M., Richter, R., Saghy, E., Samberg, Y., Spanoghe, L. & Tumova, B. (1985). Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons - an international collaborative study. *Avian Pathology* **14**, 365 - 376.
- Allan, W. H. & Gough, R. E. (1974). A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. A comparison of macro and micro methods. *Vet Rec* **95**, 120-123.
- Andrianandrasana, H. T., Randriamahefasoa, J., Durbin, J., Lewis, R. E. & Ratsimbazafy J.H. (2005). Participatory ecological monitoring of the Alaotra wetlands in Madagascar. *Biodiversity and Conservation* **14**, 2757-2774.
- Arbelot, B., Dayon, J.F., Mérouani, N., Kaboré, Y., (1997). Eude des programmes vaccinaux réalisés en aviculture au Sénégal: 2ème journées; de la Recherche Avicole; Tours, 8-10 avril ; p77-81.
- Ballagi-Pordany, A., Wehmann, E., Herczeg, J., Belak, S. & Lomniczi, B. (1996). Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Archives of Virology* **141**, 243 - 261.
- Barbezange, C. & Jestin, V. (2003). Molecular characterisation of three avian paramyxovirus type 1 isolated from pigeons in France. *Virus Genes* **26**, 175-183.
- Barbezange, C. & Jestin, V. (2005a). Molecular study of the quasispecies evolution of a typical pigeon paramyxovirus type 1 after serial passages in pigeons by contact. *Avian Pathol* **34**, 111-122.
- Barbezange, C. & Jestin, V. (2005b). Quasispecies Nature of an Unusual Avian Paramyxovirus Type-1 Isolated from Pigeons. *Virus Genes* **30**, 363-370.
- Barlič-Maganja, D., Krapež, U., Mankoč, S., Toplak, I. & Rojs, O. (2005). Fusion and Matrix Protein Gene Sequence Analysis of Paramyxoviruses of Type 1(PMV-1) Isolated from Pigeons in Slovenia. *Virus Genes* **31**, 265-273.
- Beaudette, F. R., Bivins, J. A. & Miller B. R. (1949). Newcastle disease immunisation with live virus. *Cornell Vett* **39**, 302-334.
- Bellini, W. J., Englund, G., Richardson, C. D., Rozenblatt, S. & Lazzarini, R. A. (1986). Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *J Virol May*: **58(2)**, 408-416.
- Bogoyavlenskiy, A., Berezin, V., Prilipov, A., Usachev, E., Lyapina, O., Korotetskiy, I., Zaitceva, I., Asanova, S., Kydyrmanov, A., Daulbaeva, K., Shakhvorostova, L., Sayatov, M. & King, D. (2009). Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIIb and VIId. *Virus Genes*.
- Bogoyavlenskiy, A., Berezin, V., Prilipov, A., Usachev, E., Lyapina, O., Levandovskaya, S., Korotetskiy, I., Tolmacheva, V., Makhmudova, N., Khudyakova, S., Tustikbaeva, G., Zaitseva, I., Omirtaeva, E., Ermakova, O., Daulbaeva, K., Asanova, S., Kydyrmanov, A., Sayatov, M. & King, D. (2005). Molecular Characterization of Virulent Newcastle Disease Virus Isolates from Chickens during the 1998 NDV Outbreak in Kazakhstan. *Virus Genes* **31**, 13-20.
- Bohn, W., Rutter, G., Hohenberg, H., Mannweiler, K. & Nobis, P. (1986). Involvement of actin filaments in budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology* **149**, 91-106.
- Bose, S. & Banerjee, A. K. (2004). Beta-catenin associates with human parainfluenza virus type 3 ribonucleoprotein complex and activates transcription of viral genome RNA in vitro. *Gene Expr* **11**, 241-249.
- Bossart, K. N. & Broder, C. C. (2007). Paramyxovirus entry. in Viral entry into host cells. In *Landes Bioscience*. Edited by P. a. G. Simmons. Georgetown TX.
- Bwala, D. G., Abolnik, C., van Wyk, A., Cornelius, E. & Bisschop, S. P. (2009). Efficacy of a genotype 2 Newcastle disease vaccine (Avinew) against challenge with highly virulent genotypes 5d and 3d. *J S Afr Vet Assoc* **80**, 174-178.
- Capua, I. & Alexander, D. (2004). Human health implications of avian influenza viruses and paramyxoviruses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**, 1-6.

- Capua, I., Terregino, C., Pozza, M. D., Marangon, S. & Mutinelli, F. (2002). Newcastle disease outbreaks in Italy during 2000. *Vet Rec* **150**, 565-568.
- CAST (2008). Vaccine Development Using Recombinant DNA Technology. *Council for Agricultural Science and Technology: CAST, Ames, Iowa Mai 2008*, **38**
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V. & Billeter, M. A. (1987). Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* **6**, 681-688.
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Molia, S., Le Menach, A., Maregeya, B., Nchare, A., Bangana, I., Maina, A. G., N'Goran, K. J. N., Thiam, H., Bezeid, O. E. M. A., Salviato, A., Nisi, R., Terregino, C. & Capua, I. (2009). Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in west and central Africa-Implications for diagnosis and control. *Veterinary Microbiology*, doi:101016/jvetmic200909063.
- Centanni, E. (1902). Die Vogelpest. *Zentbl Bakt Parasitkd Abt I* **31**:145–152. *Zentbl Bakt Parasitkd*, 182-201.
- Chambers, P., Millar, N. S. & Emmerson, P. T. (1986a). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* **67 (Pt 12)**, 2685-2694.
- Chambers, P., Millar, N. S., Platt, S. G. & Emmerson, P. T. (1986b). Nucleotide sequence of the gene encoding the matrix protein of Newcastle disease virus. *Nucl Acids Res* **14**, 9051-9061.
- Chen, L., Gorman, J. J., McKimm-Breschkin, J., Lawrence, L. J., Tulloch, P. A., Smith, B. J., Colman, P. M. & Lawrence, M. C. (2001). The Structure of the Fusion Glycoprotein of Newcastle Disease Virus Suggests a Novel Paradigm for the Molecular Mechanism of Membrane Fusion. **9**, 255-266.
- Chenault, E. A. (2003). Exotic Newcastle disease confirmed in Texas poultry flock. In *Agricultural Communications Texas A & M University*, pp. 28–30.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
- Cho, S.-H., Kim, S.-J. & Kwon, H.-J. (2007). Genomic sequence of an antigenic variant Newcastle disease virus isolated in Korea. *Virus Genes* **35**, 293-302.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protocols* **1**, 581-585.
- Choppin, P. W. & Scheid, A. (1980). The role of viral glycoproteins in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. *Rev Infect Dis* **2**, 40-61.
- Claverie, J., Audic, S. & Abergel, C. (1999). La bioinformatique : une discipline stratégique pour l'analyse et la valorisation des génomes. *IGS-CNRS-MRS*.
- Connaris, H., Takimoto, T., Russell, R., Crennell, S., Moustafa, I., Portner, A. & Taylor, G. (2002). Probing the Sialic Acid Binding Site of the Hemagglutinin-Neuraminidase of Newcastle Disease Virus: Identification of Key Amino Acids Involved in Cell Binding, Catalysis, and Fusion. *J Virol* **76**, 1816-1824.
- Copland, J. W. & Alders, R. G. (2009). The Comparative Advantages of Village or Smallholder Poultry in Rural Development. In *Village Chickens, Poverty Alleviation and the Sustainable Control of Newcastle Disease*. Proceedings of an international conference, Dar es Salaam, Tanzania, October 5-7, 2005. Proceedings No 131. 11-14: Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Couacy-Hymann, E., Sanogo, B. & Domenech, J. (1991). Épidémiologie de la maladie de Newcastle en Côte d'Ivoire. In *In Proc Workshop on Newcastle Disease Vaccines for Rural Africa*, pp. 65-68. 22-26 avril - Debre Zeit, Addis Ababa Pan-African Veterinary Vaccine Centre (PANVAC)
- Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A. & Taylor, G. (2000). Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Mol Biol* **7**, 1068-1074.

- Csako, G. (2006).** Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. *Clinica Chimica Acta* **363**, 6-31.
- Csatary, L. K., Eckhardt, S., Bukosza, I., Czegledi, F., Fenyvesi, C. & Gergely, P. (1993).** Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detect Prev* **17**, 619-627.
- Czeglédi, A., Eacute, Di, A., Herczeg, J., Hadjiev, G., Dumanova, L., Wehmann, E. & Lomniczi, B. (2002).** The occurrence of five major Newcastle disease virus genotypes (II, IV, V, VI and VIIIb) in Bulgaria between 1959 and 1996. *Epidemiology and Infection* **129**, 679-688.
- Czeglédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O. & Lomniczi, B. (2006).** Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research* **120**, 36-48.
- Czeglédi, A., Wehmann, E. & Lomniczi, B. (2003).** On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33. *Avian Pathology* **32**, 271-276.
- Czifra, G., Meszaros, J., Horvath, E., Moving, V. & Engstrom, B. E. (1998).** Detection of NDV-specific antibodies and the level of protection provided by a single vaccination in young chickens. *Avian Pathol* **27**, 562-565.
- Czifra, G., Nilsson, M., Alexander, D. J., Manvell, R., Kecskemeti, S. & Engström, B. E. (1996).** Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Path* **25**, 691-703.
- Dankwa, D., Nelson, F. S., Mzamo, K. B. & Oddoye, E. O. K. (2000).** A survey of rural poultry management in the West Mamprusi District and the Ga Rural District of Ghana. *Ghana J Agric Sci* **33(1)**, 71-77.
- de Leeuw, O. & Peeters, B. (1999).** Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* **80**, 131-136.
- de Leeuw, O. S., Koch, G., Hartog, L., Ravenshorst, N. & Peeters, B. P. H. (2005).** Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol* **86**, 1759-1769.
- Degen, W. G., van Zuilekom, H. I., Scholtes, N. C., van Daal, N. & Schijns, V. E. (2005).** Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). *Vaccine* **23**, 4212-4218.
- Deng, R., Wang, Z., Mahon, P. J., Marinello, M., Mirza, A. & Iorio, R. M. (1999).** Mutations in the Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein That Interfere with Its Ability to Interact with the Homologous F Protein in the Promotion of Fusion. *Virology* **253**, 43-54.
- Ding, Z., Cong, Y. L., Chang, S., Wang, G. M., Wang, Z., Zhang, Q. P., Wu, H. & Sun, Y. Z. (2010).** Genetic analysis of avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from swine populations in China related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Virus Genes* **41**, 369-376.
- Dobson, N., (1952).** Newcastle disease. *World's poultry Sciences Journal* **8**, 107-113.
- Dolganiuc, V., McGinnes, L., Luna, E. J. & Morrison, T. G. (2003).** Role of the Cytoplasmic Domain of the Newcastle Disease Virus Fusion Protein in Association with Lipid Rafts. *J Virol* **77**, 12968-12979.
- dos Anjos, F. (2007).** The Epidemiology of Poultry Diseases, Structure and Importance of Commercial and Village Based Poultry Industry in Mozambique. *FAO report (2007)*.
- Doubia, F. (2002).** L'approvisionnement en intrants de la filière avicole moderne au Sénégal. In *Thèse : Méd Vét : Dakar* **27**.
- Doyle, T. M. (1927).** A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus. *J Comp Pathol* **40**, 144-169.
- Errington, W. & Emmerson, P. T. (1997).** Assembly of recombinant Newcastle disease virus nucleocapsid protein into nucleocapsid-like structures is inhibited by the phosphoprotein. *J Gen Virol* **78 (Pt 9)**, 2335-2339.

- Estola, T., Makela, P. & Hovi, T. (1979).** The effect of air ionization on the air-borne transmission of experimental Newcastle disease virus infections in chickens. *J Hyg (Lond)* **83**, 59-67.
- Ezema, W. S., Okoye, J. O. A., Nwanta, J. A., (2009).** LaSota vaccination may not protect against the lesions of velogenic newcastle disease in chickens. *Trop Anim Health Prod* **41**, 477-484.
- FAO (2008).** FAO Division Statistique. *FAOSTAT*.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Feusier, M. (2004).** Paramyxovirus. *Edition printemps*, 14p.
- Finke, S., Cox, J. H. & Conzelmann, K.-K. (2000).** Differential Transcription Attenuation of Rabies Virus Genes by Intergenic Regions: Generation of Recombinant Viruses Overexpressing the Polymerase Gene. *J Virol* **74**, 7261-7269.
- Garcia-Sastre, A., Cabezas J. A. & Villar, E. (1989).** Proteins of Newcastle disease virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochim Biophys Acta* **999 (2)**, 171-175.
- Gardès, J., Poli, J. & Corbin, A. (2009).** Mécanismes d'actions des glycoprotéines des Paramyxoviridae. In *L'ordre des Mononegavirales regroupe les virus à ARN de polarité négative non ségmentés Il contient quatre familles : les Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Filoviridae et Bornaviridae p1-14* Site du département de Biologie de l'ENS Lyon. <http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/virologie/mononegavirales>.
- Goldhaft, T. M. (1980).** Historical note on the origin of the La Sota strain of Newcastle disease virus. In *Avian Dis*, pp. 297-301.
- Gopinath, M. & Shaila, M. S. (2009).** RNA triphosphatase and guanylyl transferase activities are associated with the RNA polymerase protein L of rinderpest virus. *J Gen Virol* **90**, 1748-1756.
- Gotoh, B., Komatsu, T., Takeuchi, K. & Yokoo, J. (2001).** Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists. *Microbiol Immunol* **45**, 787-800.
- Gotoh, B., Ohnishi, Y., Inocencio, N. M., Esaki, E., Nakayama, K., Barr, P. J., Thomas, G. & Nagai, Y. (1992).** Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. *J Virol* **66**, 6391-6397.
- Gould, A. R., Hansson, E., Selleck, K., Kattenbelt, J. A., Mackenzie, M. & Della-Porta, A. J. (2003).** Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage. *Avian Pathol* **32**, 361-373.
- Gravel, K. A. & Morrison, T. G. (2003).** Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus. *J Virol* **77**, 11040-11049.
- Griffin, D. E. (2001).** Measles virus. *Fieds Virology, Inknipe D,M and Howley P,M* **1**, 1401 - 1441.
- Grund, C. H., Werner, O., Gelderblom, H. R., Grimm, F. & Kusters, J. (2002).** Avian paramyxovirus serotype 1 isolates from the spinal cord of parrots display a very low virulence. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**, 445-451.
- Gubareva, L. V., Penn, C. R. & Webster, R. G. (1995).** Inhibition of replication of avian influenza viruses by the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid. *Virology* **212**, 323-330.
- Guèye, E. F. (2002).** Family poultry research and development in low-income food-deficit countries: approaches and prospects. In *Outlook Agric*, pp. 13-21.
- Guittet, M., Le Coq, H. & Picault, J. P. (1997).** [Risk for the transmission of Newcastle disease by contaminated poultry products]. *Rev Sci Tech* **16**, 79-82.
- Haddad, E. E., Martin, M., Schaeffer, J., Burnes, K. & Whitfill, C. (2003).** In ovo vaccination against Newcastle disease: field safety evaluation. In *In: Proceedings of the Western Poultry Conference*, pp. 34-36.
- Hamaguchi, M., Nishikawa, K., Toyoda, T., Yoshida, T., Hanaichi, T. & Nagai, Y. (1985).** Transcriptive complex of Newcastle disease virus. II. Structural and functional assembly associated with the cytoskeletal framework. *Virology* **147**, 295-308.

- Hamaguchi, M., Yoshida, T., Nishikawa, K., Naruse, H. & Nagai, Y. (1983a).** Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology* **128**, 105-117.
- Hamaguchi, M., Yoshida, T., Nishikawa, K., Naruse, H. & Nagai, Y. (1983b).** Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. . In *Virology*, pp. 105–117.
- Hammoumi, S., Servan de Almeida, R., Gil, P., Briand, F. X., Molia, S., Gaidet, N., Cappelle, C., Chevalier, V., Balança, G., Traoré, A., Grillet, C., Samaké, K., Bezeid, O. E. M. A., Diarra, A., Martinez, D., Jestin, V. & Emmanuel Albina. (2011).** New genotypes of avian paramyxoviruses type I identified in West-Africa provide new outcomes for phylogeny reconstruction.
- Han, G.-Z., He, C.-Q., Ding, N.-Z. & Ma, L.-Y. (2008).** Identification of a natural multi-recombinant of Newcastle disease virus. *Virology* **371**, 54-60.
- Hausmann, S., Jacques, J. P. & Kolakofsky, D. (1996).** Paramyxovirus RNA editing and the requirement for hexamer genome length. *Rna* **2**, 1033-1045.
- Heckert, R. A., Collins, M. S., Manvell, R. J., Strong, I., Pearson, J. E. & Alexander, D. J. (1996).** Comparison of Newcastle disease viruses isolated from cormorants in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. *Can J Vet Res* **60**, 50-54.
- Her, L.-S., Lund, E. & Dahlberg, J. E. (1997).** Inhibition of Ran Guanosine Triphosphatase-Dependent Nuclear Transport by the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus. *Science* **276**, 1845-1848.
- Herczeg, J., Pascucci, S., Massi, P., Luini, M., Selli, L., Capua, I. & Lomniczi, B. (2001).** A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathology* **30**, 163-168.
- Herczeg, J., Wehmann, E., Bragg, R. R., Travassos Dias, P. M., Hadjiev, G., Werner, O. & Lomniczi, B. (1999).** Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Archives of Virology* **144**, 2087-2099.
- Hernandez, L. D., Hoffman, L. R., Wolfsberg, T. G. & White, J. M. (1996).** Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 627-661.
- Hitchner, S. B. & Johnson, E. P. (1948).** A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease (avian pneumoencephalitis). In *Vet Med*, pp. 525-530.
- Homhuan, A., Prakongpan, S., Poomvises, P., Maas, R. A., Crommelin, D. J. A., Kersten, G. F. A. & Jiskoot, W. (2004).** Virosome and ISCOM vaccines against Newcastle disease: preparation, characterization and immunogenicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **22**, 459-468.
- Huang, Y., Wan, H. Q., Liu, H. Q., Wu, Y. T. & Liu, X. F. (2004a).** Genomic sequence of an isolate of Newcastle disease virus isolated from an outbreak in geese: a novel six nucleotide insertion in the non-coding region of the nucleoprotein gene. Brief report. In *Archives of Virology*, pp. 1445–1457.
- Huang, Z., Panda, A., Elankumaran, S., Govindarajan, D., Rockemann, D. D. & Samal, S. K. (2004b).** The Hemagglutinin-Neuraminidase Protein of Newcastle Disease Virus Determines Tropism and Virulence. *J Virol* **78**, 4176-4184.
- Ideris, A., Ibrahim, A. L. & Spradbrow, P. B. (1990).** Vaccination of chickens against Newcastle disease with a food pellet vaccine. In *Avian Path*, pp. 371-384.
- Iorio, R. M., Field, G. M., Sauvron, J. M., Mirza, A. M., Deng, R., Mahon, P. J. & Langedijk, J. P. (2001).** Structural and Functional Relationship between the Receptor Recognition and Neuraminidase Activities of the Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein: Receptor Recognition Is Dependent on Neuraminidase Activity. *J Virol* **75**, 1918-1927.

- Izeni, F., Barge, A., Baudin, F., Blondel, D. & Ruigrok, R. W. (1998).** Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* **79** (Pt 12), 2909-2919.
- Iwasaki, M., Takeda, M., Shirogane, Y., Nakatsu, Y., Nakamura, T. & Yanagi, Y. (2009).** The Matrix Protein of Measles Virus Regulates Viral RNA Synthesis and Assembly by Interacting with the Nucleocapsid Protein.
- Iyer, G. S. & Hashmi, Z. A. (1945).** Studies on Newcastle (Ranikhet) disease virus. Strain differences in amenability to attenuations. In *Indian journal of veterinary Sciences*, pp. 155-157.
- Jang, J., Hong, S. H., Choi, D., Choi, K. S., Kang, S. & Kim, I. H. (2010).** Overexpression of Newcastle disease virus (NDV) V protein enhances NDV production kinetics in chicken embryo fibroblasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1509-1520.
- Jayawardane, G. W. & Spradbrow, P. B. (1995).** Mucosal immunity in chickens vaccinated with the V4 strain of Newcastle disease virus. In *Vet Microbiol*, pp. 69-77.
- Jeon, W. J., Lee, E. K., Lee, Y. J., Jeong, O. M., Kim, Y. J., Kwon, J. H. & Choi, K. S. (2008).** Protective efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines in chickens against a recent Korean epizootic strain. *J Vet Sci* **9**, 295-300.
- Jorgensen, P., Handberg, K., Ahrens, P., Therkildsen, O., Manvell, R. & Alexander, D. (2004).** Strains of avian paramyxovirus type 1 of low pathogenicity for chickens isolated from poultry and wild birds in Denmark. *Vet Rec* **154**, 497 - 500.
- Kaleta, F. E. & Baldauf, C. (1988a).** Newcastle disease in free-living and pet birds. In *Newcastle Disease* pp. 197-246. Edited by D. J. Alexander. Boston: Kluwer Academic Publishers
- Kaleta, F. E. & Baldauf, C. (1988b).** Newcastle disease in free-living and pet birds in *Newcastle Disease* D.J. Alexander. éd Kluwer Academic Publishers, Boston, 197-246.
- Kapczynski, D. R. & King, D. J. (2005).** Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* **23**, 3424-3433.
- Kapczynski, D. R., Tumpey, T. M., Ganapathy, K., Cox, W. J., Gough, R. E., Cargill, P., Montiel, E., Jones, R. C., Veits, J., Romer-Oberdorfer, A., Helferich, D., Durban, M., Suezter, Y., Sutter, G., Mettenleiter, T. C., Gelb, J., Jr., Ladman, B. S., Licata, M. J., Shapiro, M. H., Campion, L. R., Miller, P. J., King, D. J., Afonso, C. L., Suarez, D. L., DiNapoli, J. M., Yang, L., Suguitan, A., Jr., Elankumaran, S., Dorward, D. W., Murphy, B. R., Samal, S. K., Collins, P. L., Bukreyev, A., Ward, J. M., Cheng, L., Kotelkin, A., Huang, Z. & St Claire, M. (2003).** Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Dis* **47**, 578-587.
- Kapczynski, D. R., Wise, M. G. & King, D. J. (2006).** Susceptibility and protection of naive and vaccinated racing pigeons (*Columba livia*) against exotic Newcastle disease virus from the California 2002-2003 outbreak. *Avian Dis* **50**, 336-341.
- Kattenbelt, J. A., Stevens, M. P. & Gould, A. R. (2006).** Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Res* **116**, 168-184.
- Kawano, M., Bando, H., Yuasa, T., Kondo, K., Tsurudome, M., Komada, H., Nishio, M. & Ito, Y. (1990).** Sequence determination of the hemagglutinin-neuraminidase (HN) gene of human parainfluenza type 2 virus and the construction of a phylogenetic tree for HN proteins of all the paramyxoviruses that are infectious to humans. *Virology* **174**, 308-313.
- Ke, G. M., Liu, H. J., Lin, M. Y., Chen, J. H., Tsai, S. S. & Chang, P. C. (2001).** Molecular characterization of Newcastle disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. *Journal of Virological Methods* **97**, 1-11.
- Ke, G. M., Yu, S. W., Ho, C. H., Chu, P. Y., Ke, L. Y., Lin, K. H., Tsai, Y. C., Liu, H. J. & Lin, M. Y. (2010).** Characterization of newly emerging Newcastle disease viruses isolated during 2002-2008 in Taiwan. *Virus Res* **147**, 247-257.
- Kersten, G. F. A. & Crommelin, D. J. A. (2003).** Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* **21**, 915-920.
- Kho, C. L., Tan, W. S., Tey, B. T. & Yusoff, K. (2003).** Newcastle disease virus nucleocapsid protein: self-assembly and length-determination domains. *J Gen Virol* **84**, 2163-2168.

- Kho, C. L., Tan, W. S. & Yusoff, K. (2001).** Production of the nucleocapsid protein of Newcastle disease virus in *Escherichia coli* and its assembly into ring- and nucleocapsid-like particles. *J Microbiol Immunol Infect* **39**, 293-299.
- Kim, L., King, D., Curry, P., Suarez, D., Swayne, D., Stallknecht, D., Slemmons, R., Pedersen, J., Senne, D., Winker, K. & Afonso, C. (2007a).** Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol* **81**, 12641 - 12653.
- Kim, L. M., King, D. J., Curry, P. E., Suarez, D. L., Swayne, D. E., Stallknecht, D. E., Slemmons, R. D., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Winker, K. & Afonso, C. L. (2007b).** Phylogenetic Diversity among Low-Virulence Newcastle Disease Viruses from Waterfowl and Shorebirds and Comparison of Genotype Distributions to Those of Poultry-Origin Isolates. *J Virol* **81**, 12641-12653.
- Kim, L. M., King, D. J., Guzman, H., Tesh, R. B., da Rosa, A. P. A. T., Bueno, R., Jr., Dennett, J. A. & Afonso, C. L. (2008).** Biological and Phylogenetic Characterization of Pigeon Paramyxovirus Serotype 1 Circulating in Wild North American Pigeons and Doves. *J Clin Microbiol* **46**, 3303-3310.
- Kim, L. M., King, D. J., Suarez, D. L., Wong, C. W. & Afonso, C. L. (2007c).** Characterization of Class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong bird markets and detection using real-time reverse transcription PCR. *J Clin Microbiol* ;, pp. 1310–1314.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- Kimura, S., Hatakeyama, M. & Konagaya, A. (2004).** Inference of S-system Models of Genetic Networks from Noisy Time-series Data. *Chem-Bio Informatics Journal* **4**, 1-14.
- Koko, M., Maminaiaina, O. F., Ravaomanana, J. & Rakotonindrina, S. (2006a).** Aviculture villageoise à Madagascar : enquête épidémiologique. In *Improving farmyard poultry production in Africa: interventions and their economic assessment*. **TECDOC-1489**. AIEA, Vienne, 157-163.
- Koko, M., Maminaiaina, O. F., Ravaomanana, J. & Rakotonindrina, S. J. (2006b).** Impacts de la vaccination anti-maladie de Newcastle et du déparasitage des poussins sous mère sur la productivité de l'aviculture villageoise à Madagascar. In *Improving farmyard poultry production in Africa: Interventions and their economic assessment*, pp. 125-136. Proceedings of a final research coordination meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in , Vienna 24-28 May 2004: IAEA-TECDOC-1489.
- Kolakofsky, D. & Bruschi, A. (1975).** Antigenomes in Sendai virions and Sendai virus-infected cells. *Virology* **66**, 185-191.
- Kolakofsky, D., Pelet, T., Garcin, D., Hausmann, S., Curran, J. & Roux, L. (1998).** Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. In *J Virol*, pp. 891–899.
- Kolakofsky, D., Roux, L., Garcin, D. & Ruigrok, R. W. (2005).** Paramyxovirus mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol* **86**, 1869-1877.
- Komarov, A. & Goldsmit, L. (1946).** Preliminary observation on the modification of a strain of NDV by intra cerebral passage through ducklings. *British Veterinary Journal*, **102**, 212- 218.
- Konno, T., Ochi, Y. & Hashimoto, K. (1929).** New poultry disease in Korea (in German). In *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, pp. 515-517.
- Kopecky, S. A. & Lyles, D. S. (2003).** Contrasting Effects of Matrix Protein on Apoptosis in HeLa and BHK Cells Infected with Vesicular Stomatitis Virus Are due to Inhibition of Host Gene Expression. *J Virol* **77**, 4658-4669.
- Kraneveld, F. C. (1926).** A poultry disease in the Dutch East Indies. In *Nederlands-Indische Bladen voor Diergeneeskunde*, pp. 448-450.
- Krapez, U., Steyer, A. F., Slavec, B., Barlic-Maganja, D., Dovc, A., Racnik, J. & Rojs, O. Z. (2010).** Molecular characterization of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease) viruses isolated from pigeons between 2000 and 2008 in Slovenia. *Avian Dis* **54**, 1075-1080.

- Krishnamurthy, S. & Samal, S. (1998).** Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J Gen Virol* **79**, 2419-2424.
- Kuiken, T. (1998).** Newcastle disease and other causes of mortality in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). In *PhD Thesis University of Saskatchewan*, p. 174 pp.
- Kuiken, T., Leighton, F., Wobeser, G., Danesik, K., Riva, J. & Heckert, R. (1998).** An epidemic of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan. *J Wildl Dis* **34**, 457-471.
- Kuiken, T., Wobeser, G., Leighton, F., Haines, D., Chelack, B., Bogdan, J., Hassard, L., Heckert, R. & Riva, J. (1999).** Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan, with comparison of diagnostic methods. *J Wildl Dis* **35**, 8-23.
- Kurilla, M. G., Stone, H. O. & Keene, J. D. (1985).** RNA sequence and transcriptional properties of the 3' end of the Newcastle disease virus genome. *Virology* **145**, 203-212.
- Kwon, H.-J., Cho, S.-H., Ahn, Y.-J., Seo, S.-H., Choi, K.-S. & Kim, S.-J. (2003).** Molecular epidemiology of Newcastle disease in Republic of Korea. *Veterinary Microbiology* **95**, 39-48.
- Lamb, R. A. & Kolakofsky, D. (1996).** Paramyxoviridae: the viruses and their replication. :. In *In Fundamental Virology*, pp. 1177–1204. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia:Lipincott–Raven.
- Lamb, R. A. & Kolakofsky, D. (2001a).** Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In *Lippincott William, Wilkins*, pp. Vol 1: 689-724. Edited by D. M. Knipe, Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.). Lippincott-Raven, Philadelphia: Fields Virology.
- Lamb, R. A. & Kolakofsky, D. (2001b).** Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds) *Fields Virology, 4th edR Lippincott, Williams and Wilkins, PA*, 1305-1340.
- Lamb, R. A. & Parks, G. D. (2007).** Paramyxoviridae: the viruses and their replication In *Howley, D M, Wolters, P M, Fields virology 5th Knipe, Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, PA Philadelphia*, pp. 1449-1496.
- Lancaster, J. (1981).** The control of Newcastle disease. *World's Poult Sci J* **37**, 84 - 96.
- Lancaster, J. E. (1966).** Newcastle disease - a review. In *Monograph No 3 Canada Department of Agriculture, Ottawa*, pp. 1926-1964.
- Lancaster, J. E. & Alexander, D. J. (1975).** Newcastle disease: virus and spread. In *Monograph No 11, Canada Department of Agriculture, . Ottawa*.
- Langrand, O. (1995).** *Guide des oiseaux de Madagascar*.
- Lee, Y. J., Sung, H. W., Choi, J. G., Kim, J. H. & Song, C. S. (2004).** Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. *Avian Pathology* **33**, 482-491.
- Leighton, F. A. & Heckert, R. A. (2007).** Newcastle disease and related avian Paramyxoviruses. In *Infectious diseases of wild birds*. Edited by N. J. Thomas, Hunter, D.B., Atkinson, C.T., . Oxford: Blackwell Publishing. pp 3-16.
- Li, X., Chai, T., Wangb, Z., Song, C., Cao, H., Liu, J., Zhang, X., Wanga, W., Yao, M. & Miao, Z. (2009).** Occurrence and transmission of Newcastle disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions. *Veterinary Microbiology* **136** 226-232.
- Li, Z. J., Li, Y., Chang, S., Ding, Z., Mu, L. Z. & Cong, Y. L. (2010).** Antigenic variation between Newcastle disease viruses of goose and chicken origin. *Archives of Virology* **155**, 499-505.
- Linde, A. M., Munir, M., Zohari, S., Stahl, K., Baule, C., Renstrom, L. & Berg, M. (2010).** Complete genome characterisation of a Newcastle disease virus isolated during an outbreak in Sweden in 1997. *Virus Genes* **41**, 165-173.
- Lister, S. A., Alexander, D. J. & Hogg, R. A. (1986).** Evidence for the presence of avian paramyxovirus type 1 in feral pigeons in England and Wales *Vet Rec* **118**, 476-479.
- Liu, H., Wang, Z., Son, C., Wang, Y., Yu, B., Zheng, D., Sun, C. & Wu, Y. (2006).** Characterization of pigeon-origin Newcastle disease virus isolated in China. *Avian Dis* **50**, 636-640.

- Liu, H., Wang, Z., Wu, Y., Zheng, D., Sun, C., Bi, D., Zuo, Y. & Xu, T. (2007).** Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. *Journal of Virological Methods* **140**, 206-211.
- Liu, M., Guan, Y., Peiris, M., He, S., Webby, R., Perez, D. & Webster, R. (2003a).** The quest of influenza A viruses for new hosts. *Avian Dis* **47**, 849 - 856.
- Liu, X., Wang, X., Wu, S., Hu, S., Peng, Y. & Xue, F. (2009).** Surveillance for avirulent Newcastle disease viruses in domestic ducks (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*) at live bird markets in Eastern China and characterization of the viruses isolated. *Avian Pathol* **38**, 377-391.
- Liu, X. F., Wan, H. Q., Ni, X. X., Wu, Y. T. & Liu, W. B. (2003b).** Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Archives of Virology* **148**, 1387-1403.
- Lomniczi, B., Wehman, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordany, A., Kaleta, E. F., Werner, O., Meulemans, G., Jorgensen, P. H., Mant' e, A. P., Gielkens, A. L. J., Capua, I. & Damoser, J. (1998a).** Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by old (VI) and a novel genotype (VII). In *Archives of Virology*, pp. 49-64.
- Lomniczi, B., Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A., Kaleta, E. F., Werner, O., Meulemans, G., Jorgensen, P. H., Manté, A. P., Gielkens, A. L. J., Capua, I. & Damoser, J. (1998b).** Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology* **143**, 49-64.
- Longhi, S. & Canard, B. (1999).** Mécanismes de transcription et de réplication des Paramyxoviridae. *Virologie* **3(3)**, 227-240.
- Luque, L. E. & Russell, C. J. (2007).** Spring-loaded heptad repeat residues regulate the expression and activation of paramyxovirus fusion protein. *J Virol* **81**, 3130-3141.
- Maho, A., Ndeledje Gondje, N., Mopate, L. Y. & Ganda, K. (2004).** La maladie de Newcastle au sud du Tchad : périodes de pic épidémique et impact de la vaccination. *Rev sci tech Off int Epiz* **23(3)**, 777-782.
- Mahon, P. J., Mirza, A. M., Musich, T. A. & Iorio, R. M. (2008).** Engineered Intermonomeric Disulfide Bonds in the Globular Domain of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein: Implications for the Mechanism of Fusion Promotion. *J Virol* **82**, 10386-10396.
- Maizan, M., Sharifah, S., Ong, G. H., Fuad, R. & Suriani, M. N. (2001).** Genetic and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. In *International congress/13th VAM congress and CVA-Australasia/oceania regional symposium*, pp. 67-69. Edited by P. o. t. 2nd. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Malvoisin, E. & Wild, T. F. (1993).** Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *J Gen Virol* **74 (Pt 11)**, 2365-2372.
- Maminiaina, O. F., Gil, P., Briand, F. o.-X., Albina, E., Keita, D. n. b., Andriamanivo, H. R., Chevalier, V. r., Lancelot, R., Martinez, D., Rakotondraivo, R., Rajaonarison, J.-J., Koko, M., Andriantsimahavandy, A. A., Jestin, V. r. & Servan de Almeida, R. (2010).** Newcastle Disease Virus in Madagascar: Identification of an Original Genotype Possibly Deriving from a Died Out Ancestor of Genotype IV. *PLoS One* **5**, e13987.
- Maminiaina, O. F., Koko, Ravaomanana, J. & Rakotonindrina, S. J. (2007).** Epidémiologie de la maladie de Newcastle en aviculture villageoise à Madagascar. *Rev Sci Tech Off Int Epi* **26**.
- Mamis, D. (1995).** Enquête sérologique concernant les principales maladies infectieuses des volailles (maladie de Newcastle, maladie de Gumboro, bronchite infectieuse, mycoplasmoses, salmonellose) dans la région de Dakar au Sénégal. *Mémoire de DESS - Productions animales en régions chaudes, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD-EMVT), Montpellier*.
- Manie, S. N., de Breynne, S., Vincent, S. & Gerlier, D. (2000).** Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* **74**, 305-311.
- Marlier, D. & Vindevoegel, H. (2006).** Viral infections in pigeons. *The Veterinary Journal* **172**, 40-51.

- Martin, S., Sambade, A., Rubio, L., Vives, M. C., Moya, P., Guerri, J., Elena, S. F. & Moreno, P. (2009).** Contribution of recombination and selection to molecular evolution of Citrus tristeza virus. *J Gen Virol* **90**, 1527-1538.
- Mase, M., Imai, K., Sanada, Y., Sanada, N., Yuasa, N., Imada, T., Tsukamoto, K. & Yamaguchi, S. (2002).** Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Genotypes Isolated in Japan. *J Clin Microbiol* **40**, 3826-3830.
- McGinnes, L. W. & Morrison, T. G. (1994).** The role of the individual cysteine residues in the formation of the mature, antigenic HN protein of Newcastle disease virus. *Virology* **200**, 470-483.
- McGinnes, L. W., Morrison, T.G., (1997).** Disulfide Bond Formation Is a Determinant of Glycosylation Site Usage in the Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein of Newcastle Disease Virus. *Journal of Virology* **71(4)**, 3083-3089.
- Mebatsion, T., Verstegen, S., De Vaan, L. T. C., Romer-Oberdorfer, A. & Schrier, C. C. (2001).** A Recombinant Newcastle Disease Virus with Low-Level V Protein Expression Is Immunogenic and Lacks Pathogenicity for Chicken Embryos. *J Virol* **75**, 420-428.
- Meulemans, G., Berg, T. P. v. d., Decaesstecker, M. & Boschmans, M. (2002).** Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathology* **31**, 515-519.
- Millar, N. S., Chambers, P. & Emmerson, P. T. (1986).** Nucleotide sequence analysis of the haemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* **67 (Pt 9)**, 1917-1927.
- Miller, P. J., Estevez, C., Yu, Q., Suarez, D. L. & King, D. J. (2009).** Comparison of Viral Shedding Following Vaccination with Inactivated and Live Newcastle Disease Vaccines Formulated with Wild-Type and Recombinant Viruses. *Avian Diseases Digest* **4**, e11-e11.
- Miller, P. J., King, D. J., Afonso, C. L. & Suarez, D. L. (2007).** Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* **25**, 7238-7246.
- Minodier, L. (2010).** Distribution et Abondance Relative de la Communauté d'Anatidés Sauvages du lac Alaotra à Madagascar : Risques Epidémiologiques Associés. In *Mémoire 1ère année de master: Réalisé dans le cadre du projet GRIPAVI : Recherche sur l'écologie et l'épidémiologie de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle dans les pays du Sud UPR AGIRs « Animal et Gestion Intégrée des Risques », CIRAD France & Département de Recherches Zootechniques et Vétérinaires, FOFIFA Madagascar.*
- Mirza, A., Sheehan, J., Hardy, L., Glickman, R. & Iorio, R. (1993).** Structure and function of a membrane anchor-less form of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus. *J Biol Chem* **268**, 21425-21431.
- Mohamed, M., Kumar, S., Paldurai, A., Megahed, M., Ghanem, I., Lebdah, M. & Samal, S. (2009).** Complete genome sequence of a virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in chickens in Egypt. *Virus Genes*.
- Mohamed, M. H., Kumar, S., Paldurai, A. & Samal, S. K. (2011).** Sequence analysis of fusion protein gene of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in Egypt during 2006. *Virology* **8**, 237.
- Monne, I., Beato, M. S., Capua, I. & Mandola, M. (2006).** Pigeon paramyxovirus isolated from a robin in Italy. *Vet Rec* **158**:384.
- Morein, B., Sundquist, B., Hoglund, S., Dalsgaard, K. & Osterhaus, A. (1984).** Morein, B., Sundquist, B., Hoglund, S., Dalsgaard, K. & Osterhaus, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. In *Nature*, pp. 457-460.
- Morgan, R. W., Gelb, J., Pope, C. R. & Sondermeijer, P. J. (1993).** Efficacy in chickens of a herpes virus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset of protection and effect of maternal antibodies. In *Avian Diseases*, pp. 1032-1040.
- Morrison, T. G. (2003).** Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1614**, 73-84.
- Munir, M., Linde, A. M., Zohari, S., Stahl, K., Baule, C., Holm, K., Engstrom, B. & Berg, M. (2010).** Complete genome analysis of an avian paramyxovirus type 1 strain isolated in 1994 from an

- asymptomatic black-headed gull (*Larus ridibundus*) in southern Sweden. *Avian Dis* **54**, 923-930.
- Nagai, Y., Klenk, H.-D. & Rott, R. (1976).** Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* **72**, 494-508.
- Ninkam Nghemning, D. (2002).** Souche africaine du virus de la rougeole: étude de l'interaction virus-cellule et analyse phylogénétique. In *SCIENCES & GEOGRAPHIE*, p. 181. GRENOBLE: UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-1.
- O'Reilly, P. J., McCullough, S., Alexander, D.J. & de Burca, M., (1994).** Recent avian paramyxovirus infections on the island of Ireland. Proceedings of the Commission of the European Communities meeting on Virus Diseases of Poultry. *New and Evolving Pathogens, Brussels, 1992*, 47-63.
- Ogasawara, T., B., Gotoh, H., Suzuki, J., Asaka, K., Shimokata, R., Rott & Nagai (1992).** Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *EMBO J* **11**, 467-472.
- OIE (2008).** Newcastle disease. Chapter 2.3.14. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees. In *Office International des Epizooties, Paris*, pp. 629-644.
- OIE (2009).** Newcastle disease. Chapter 2.3.14. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees. *Office International des Epizooties, Paris (May 2009)* 576-589.
- Oliveira, B. O., Belluci, M. S. P., Portz, C., Oliveira, J. R. J. G., Doretto, J. L., Orsi, M. A., Mazur, C. & Andrade, C. M. (2000).** Biological characterization of M33 field isolate of Newcastle Disease virus. *Virus Res* **05 (2)**, 56.
- Otim, M. O., Christensen, H., Jorgensen, P. H., Handberg, K. J. & Bisgaard, M. (2004).** Molecular Characterization and Phylogenetic Study of Newcastle Disease Virus Isolates from Recent Outbreaks in Eastern Uganda. *J Clin Microbiol* **42**, 2802-2805.
- Panda, A., Elankumaran, S., Krishnamurthy, S., Huang, Z. & Samal, S. K. (2004).** Loss of N-Linked Glycosylation from the Hemagglutinin- Neuraminidase Protein Alters Virulence of Newcastle Disease Virus. *J Virol* **78**, 4965-4975.
- Panigrahy, B., Senne, D. A., Pearson, J. E., Mixson, M. A. & Cassidy, D. R. (1993).** Panigrahy, B., Senne, D.A., Pearson, J.E., Mixson, M.A. & Cassidy, D.R. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. In *Avian Diseases*, pp. 254-258.
- Panshin, A., Shihmanter, E., Weisman, Y., Örvell, C. & Lipkind, M. (1999).** Comparative characteristics of the Israeli Newcastle disease virus field strains by means of a wide panel of monoclonal antibodies against hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **22**, 103-124.
- Peeters, B., Verbruggen, P., Nelissen, F. & de Leeuw, O. (2004).** The P gene of Newcastle disease virus does not encode an accessory X protein. *J Gen Virol* **85**, 2375-2378.
- Peeters, B. P., de Leeuw, O. S., Koch, G. & Gielkens, A. L. (1999).** Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* **73**, 5001-5009.
- Perozo, F., Villegas, P. & Afonso, C. L. (2008a).** Genomic comparison of the complete coding and intergenic regions of the VG/GA Newcastle disease virus and its respirotropic clone 5. *Virus Genes* **37**, 161-167.
- Perozo, F., Villegas, P., Estevez, C., Alvarado, I. R., Purvis, L. B. & Saume, E. (2008b).** Avian Adeno-Associated Virus-Based Expression of Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Protein for Poultry Vaccination. *Avian Diseases* **52**, 253-259.
- Perroncito, E., . (1878).** Epizoozia tifoide nei gallinacei. *Annali Accad Agri Torino* **21**, 87-126.
- Phillips, R. J., Samson, A. C. R. & Emmerson, P. T. (1998).** Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six". *Archives of Virology* **143**, 1993-2002.

- Pidgeon, M. (1996).** An ecological survey of Lake Alaotra and selected wetlands of central and eastern Madagascar in analysing the demise of Madagascar pochard *Aythya innotata*. Antananarivo, Madagascar: Rapport non publié du WWF-Madagascar et du Missouri Botanical Garden.
- Pitt, J. J., Da Silva, E. & Gorman, J. J. (2000).** Determination of the disulfide bond arrangement of Newcastle disease virus hemagglutinin neuraminidase. Correlation with a beta-sheet propeller structural fold predicted for paramyxoviridae attachment proteins. *J Biol Chem* **275**, 6469-6478.
- Poch, O., Blumberg, B., M., Bouguelared, L. & Tordo, N. (1990).** Sequence comparison of five polymerase (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* **71**, 1153-1162.
- Porphyre, V. (2000).** Enquête séro-épidémiologique sur les principales maladies infectieuses des volailles à Madagascar. *Mémoire de DESS - Productions animales en régions chaudes, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD-EMVT), Montpellier*
- Qiu, X., Sun, Q., Yao, C., Dong, L., Wu, Y., Hu, S. & Liu, X. (2009).** Full-length genome analysis of two genotype III velogenic Newcastle diseases virus strains reveals their close relationship with vaccine Mukteswar. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **49**, 302-308.
- Rajaonarison, J. J. (1991).** Note sur la maladie des volailles tout nouvellement observé à Madagascar Buck. G., 1947. In Production de vaccin contre la maladie de Newcastle à Madagascar. In *PANVAC, Debre Zeit, FAO*, pp. 135-137. Debre Zeit, Addis Ababa, 22 - 26 April, .
- Randriamanantena D. (communication personnelle).** Efficacité des vaccins contre le virus de la maladie de Newcastle (souches La Sota, Hitschner B1 et Mukteswar). *Thèse vétérinaire (en cours)*.
- Rasamoelina Andriamanivo, H., Duboz, R., Lancelot, R., Maminiana, O.F., Jourdan, M., Rakotondramaro, T. M. C., Rakotonjanahary, S. N., Servan de Almeida, R., Gil, P., Albina, E., Martinez, D., Rakotondraivo, R., Chevalier, V., (2011a).** Role of the trading network in the diffusion of Newcastle disease in the lake Alaotra region, Madagascar: a social network analysis. In *Proceedings : Society for veterinary epidemiology and preventive medicine*, pp. 193-204. 23rd - 25th March 2011 - Leipzig - Germany: Fourichon C., Pfeiffer D.U. and the SVEPM Executive Committee.
- Rasamoelina Andriamanivo, H., Lancelot, R., Maminiana, O.F., Rakotondrafara, T.F., Jourdan, M., Renard J, F., Gil, P., Servan de Almeida, R., Albina, E., Martinez, D., Tillard, E., Rakotondraivo, R., Chevalier, V., (2011b).** Risk factors for avian pests in smallholder farming systems, Madagascar highlands. *Pre Vet Med*.
- Rauw, F., Gardin, Y., Palya, V., Anbari, S., Lemaire, S., Boschmans, M., van den Berg, T. & Lambrecht, B. (2009a).** Improved vaccination against Newcastle disease by an in ovo recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old. *Vaccine* **28**, 823-833.
- Rauw, F., Gardin, Y., Palya, V., van Borm, S., Gonze, M., Lemaire, S., Van den Berg, T. & Lambrecht, B. (2009b).** Humoral, cell mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle Disease vaccines. *Vaccine* **27**, 3631-3642.
- Rauw, F., Gardin, Y., Van den Berg, T. & Lambrecht, L. (2009c).** La vaccination contre la maladie de Newcastle chez le poulet (*Gallus gallus*). *Biotechnol Agron Soc Environ* **13**, 587-596.
- Rehmani, S. F. & Spradbrow, P. B. (1995).** Receptors for the V4 strain of Newcastle disease virus in the digestive tract of chickens. In *Vet Microbiol*, pp. 43-46.
- Rehmani, S. F., Spradbrow, P. B. & West, R. (1995).** Lactose pellets a new approach to oral vaccination of village chickens against Newcastle disease. *Vet Microbiol* ;, pp. 47-53.

- Ren, G., Wang, Z., Wang, G., Song, Y., Yao, P., Xu, H., Wen, H. & Zhang, W. (2006).** Effects of heptad repeat regions of F protein on the specific membrane fusion in paramyxoviruses. *Intervirology* **49**, 299-306.
- Reynes, C., Regard, L., Sabatier, R. & Camproux, A. (2009).** Prédiction de la structure 3D des boucles protéiques. In *41èmes Journées de Statistique, SFdS*, p. 6. Bordeaux.
- Reynolds, D. L. & Maraqa, A. D. (2000a).** Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Dis* **44**, 138-144.
- Reynolds, D. L. & Maraqa, A. D. (2000b).** Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. *Avian Dis* **44**, 145-154.
- Rivolta, S. & Delprato, P. (1880).** L'ornitologia o la medicina degli uccelli domestici e semidomestici *Pisa*.
- Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U. J. & Mettenleiter, T. C. (1999).** Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol* **80**, 2987-2995.
- Römer-Oberdörfer, A., Veits, J., Werner, O. & Mettenleiter, T. C. (2006).** Enhancement of Pathogenicity of Newcastle Disease Virus by Alteration of Specific Amino Acid Residues in the Surface Glycoproteins F and HN. *Avian Diseases* **50**, 259-263.
- Romer-Oberdorfer, A., Werner, O., Veits, J., Mebatsion, T. & Mettenleiter, T. C. (2003).** Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* **84**, 3121-3129.
- Rout, S. N. & Samal, S. K. (2008).** The Large Polymerase Protein Is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus. *J Virol* **82**, 7828-7836.
- Roux, L. (2005).** Dans le génome des Paramyxovirinae, les promoteurs et leurs activités sont façonnés par la « règle de six ». *Virologie* **9** (1), 19-34.
- Rui, Z., Juan, P., Jingliang, S., Jixun, Z., Xiaoting, W., Shouping, Z., Xiaojiao, L. & Guozhong, Z. (2009).** Phylogenetic characterization of Newcastle disease virus isolated in the mainland of China during 2001-2009. *Veterinary Microbiology* doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.020 **In Press, Corrected Proof**.
- Russell, P. & Koch, G. (1993).** Local antibody forming cell responses to the Hitchner B1 and Ulster strains of Newcastle disease virus. In *Vet Immun Immunopath*, pp. 165-180.
- Russell, P. H. & Ezeifka, G. O. (1995).** The Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus induces high levels of IgA, IgG and IgM in newly hatched chicks. In *Vaccine*, pp. 61-66.
- Saitou and Nei (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sakaguchi, T., Toyoda, T., Gotoh, B., Inocencio, N. M., Kuma, K., Miyata, T. & Nagai, Y. (1989).** Newcastle disease virus evolution : I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* **169**, 260-272.
- Sakai, K., Sakabe, G., Tani, O., Watanabe, Y., Jahangir, A., Nakamura, M. & Takehara, K. (2007).** Characterization of Newcastle disease virus isolated from Northern Pintail (*Anas acuta*) in Japan. *J Vet Med Sci* **69**, 1307 - 1311.
- Scheid, A. & Choppin, P. W. (1974).** The hemagglutinating and neuraminidase protein of a paramyxovirus: Interaction with neuraminic acid in affinity chromatography. *Virology* **62**, 125-133.
- Schelling, E., Thür, B., Griot, C. & Audige, L. (1999).** Epidemiological study of Newcastle disease in backyard poultry and wild bird populations in Switzerland. *Avian Pathology* **28**, 263-272.
- Seal, B. S. (2004).** Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Functional & Integrative Genomics* **4**, 246-257.
- Seal, B. S., Wise, M. G., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Alvarez, R., Scott, M. S., King, D. J., Yu, Q. & Kapczynski, D. R. (2005).** Genomic sequences of low-virulence avian paramyxovirus-1

- (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-bird markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Veterinary Microbiology* **106**, 7-16.
- Servan de Almeida, R., Maminaiana, O. F., Gil, P., Hammoumi, S., Molia, S., Chevalier, V., Koko, M., Andriamanivo, H. R., Traoré, A., Samaké, K., Diarra, A., Grillet, C., Martinez, D. & Albina, E. (2009).** Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus? *Vaccine* **27**, 3127-3129.
- Seth, S., Skountzou, I., Gernert, K. M. & Compans, R. W. (2007).** Fusogenic Variants of a Noncytopathic Paramyxovirus. *J Virol* **81**, 4286-4297.
- Sheehan, J. P. & Iorio, R. M. (1992).** A single amino acid substitution in the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus results in a protein deficient in both functions. *Virology* **189**, 778-781.
- Simmons, G. C. (1967).** The isolation of Newcastle disease virus in Queensland. In *Aust Vet J*, pp. 29-30.
- Smallwood, S., Hovel, T., Neubert, W. J. & Moyer, S. A. (2002).** Different substitutions at conserved amino acids in domains II and III in the Sendai L RNA polymerase protein inactivate viral RNA synthesis. *Virology* **304**, 135-145.
- Smallwood, S., Ryan, K. W. & Moyer, S. A. (1994).** Deletion Analysis Defines a Carboxyl-Proximal Region of Sendai Virus P Protein That Binds to the Polymerase L Protein. *Virology* **202**, 154-163.
- Snoeck, C., Ducatez, M., Owoade, A., Faleke, O., Alkali, B., Tahita, M., Tarnagda, Z., Ouedraogo, J.-B., Maikano, I., Mbah, P., Kremer, J. & Muller, C. (2009).** Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Archives of Virology* **154**, 47-54.
- Squarzoni, C., Bastiaensen, P., Plante, C., Denormandie, N., Boubacar, S., (2006).** La grippe aviaire en Afrique subsaharienne: un premier bilan. *AEEMA/AESA(Liege) Epidemiol et Santé animal* **50**, 57-69.
- Steward, M., Vipond, I. B., Millar, N. S. & Emmerson, P. T. (1993).** RNA editing in Newcastle disease virus. *J Gen Virol* **74**, 2539-2547.
- Stone-Hulslander, J. & Morrison, T. G. (1999).** Mutational Analysis of Heptad Repeats in the Membrane-Proximal Region of Newcastle Disease Virus HN Protein. *J Virol* **73**, 3630-3637.
- Suzuki, M., Suzuki, A., Yamakawa, T. & Matsunaga, E. (1985).** Characterization of 2,7-anhydro-N-acetylneuraminic acid in human wet cerumen. *J Biochem* **97**, 509-515.
- Suzuki, Y., Gojobori, T., (1999).** A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol Biol Evol* **16**, 1315-1328.
- Swanson, K., Wen, X., Leser, G. P., Paterson, R. G., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2010).** Structure of the Newcastle disease virus F protein in the post-fusion conformation. *Virology* **402**, 372-379.
- Tadelle, D., Million, Y., Alemu, Y., Peters, K.J., . (2003).** Village chicken production systems in Ethiopie: 1. Flock characteristics and performance,. *Livestock Research for Rural Deveelopment* **15 (1)**.
- Takakuwa, H., Ito, T., Takada, A., Okazaki, K. & Kida, H. (1998).** Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. *Jpn J Vet Res* **45**, 207 - 215.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Tan, L. T., Xu, H. Y., Wang, Y. L., Qin, Z. M., Sun, L., Liu, W. J. & Cui, Z. Z. (2008).** Molecular characterization of three new virulent Newcastle disease virus variants isolated in China. *J Clin Microbiol* **46**, 750-753.
- Tashiro, M., Yokogoshi, Y., Tobita, K., Seto, J. T., Rott, R. & Kido, H. (1992).** Tryptase Clara, an Activating Protease for Sendai Virus in Rat Lungs, Is Involved in Pneumopathogenicity. *JVirol* **66(12)**, 7211-7216.

- Terregino, C., Cattoli, G., Grossele, B., Bertoli, E., Tisato, E. & Capua, I. (2003).** Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Avian Pathology* **32**, 63-68.
- Terrier, O., Cartet, G. & Lina, B. (2008).** La génétique inverse chez les paramyxovirus : applications et perspectives. *Virologie* **12** (1), 15-25.
- Timms, L. & Alexander, D. J. (2003).** Cell-mediated immune-response of chickens to Newcastle-Disease vaccines. *Avian Pathol* **6**(1), 51-59.
- Toyoda, T., Sakaguchi, T., Imai, K., Inocencio, N. M., Gotoh, B., Hamaguchi, M. & Nagai, Y. (1987).** Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* **158**, 242-247.
- Tsai, H.-J., Chang, K.-H., Tseng, C.-H., Frost, K. M., Manvell, R. J. & Alexander, D. J. (2004).** Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Veterinary Microbiology* **104**, 19-30.
- Ujvari, D. (2006).** Complete nucleotide sequence of IT-227/82, an avian paramyxovirus type-1 strain of pigeons (*Columba livia*). *Virus Genes* **32**, 49-57.
- Ujvari, D., Wehmann, E., Kaleta, E., Werner, O., Savic, V., Nagy, E., Czifra, G. & Lomniczi, B. (2003).** Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. *Virus Res* **96**, 63 - 73.
- van Eck, J. & Goren, E. (1991).** An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: Vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol* **20**, 497 - 507.
- Verwoerd, D. J. (1995).** Velogenic Newcastle disease epidemic in South Africa II. Ostriches, waterfowl, exotic bird collections and wild birds. *South African Vetmed* **8**, 44-49.
- von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M. L., White, H. F., Oliver, S. W. & et al. (1993).** Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**, 418-423.
- Wakamatsu, N., King, D. J., Kapczynski, D. R., Seal, B. S. & Brown, C. C. (2006).** Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002–2003. In *Vet Pathol*, pp. 925–933.
- Wang, Z., Liu H, Xu J, Bao J, Zheng D, Sun C, Wei R, Song C & Chen J (2006).** Genotyping of Newcastle Disease Viruses Isolated from 2002 to 2004 in China. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1081**, 228-239.
- Wehmann, E., Czeplédi, A., Werner, O., Kaleta, E. & Lomniczi, B. (2003a).** Occurrence of genotypes IV, V, VI and VIIa in Newcastle disease outbreaks in Germany between 1939 and 1995. . In *Avian Pathol*, pp. 157– 163.
- Wehmann, E., Herczeg, J., Tanyi, J., Eva Nagy, Lomniczi, B., (1999).** Lentogenic field isolates of Newcastle disease virus isolated in Canada and Hungary are identical with the vaccine type used in the region. *Avian Pathology* **28**, 6-12.
- Wehmann, E., Ujvári, D., Mazija, H., Velhner, M., Cigliar-Grozdanic, I., Savic, V., Jermolenko, G., Cac, Z., Prukner-Radovic, E. & Lomniczi, B. (2003b).** Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia, reveals the presence of only a single genotype, V, between 1979 and 2002. *Veterinary Microbiology* **94**, 269-281.
- Wei, J., Shen, Y., Xie, S., Chu, F. & Wu, Y. (1998).** Atypical Newcastle disease. In *Chin J Anim Poult Infect Dis*, pp. 31–38.
- Weingartl, H. M., Riva, J. & Kumthekar, P. (2003).** Molecular Characterization of Avian Paramyxovirus 1 Isolates Collected from Cormorants in Canada from 1995 to 2000. *J Clin Microbiol* **41**, 1280-1284.
- Werner, O., Römer-Oberdörfer, A., Köllner, B., Manvell, R. J. & Alexander, D. J. (1999).** Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during 1992 to 1996. . *Avian Pathol* **28**, 79-88.
- Westbury, H. A. (1984).** Comparison of the immunogenicity of Newcastle disease virus strains V4, B1 and La Sota in chickens. 1. Tests in susceptible chickens. *Aust Vet J* **61**, 5-9.

- Wise, M., Suarez, D., Seal, B., Pedersen, J., Senne, D., King, D., Kapczynski, D. & Spackman, E. (2004a). Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* **42**, 329 - 338.
- Wise, M. G., Sellers, H. S., Alvarez, R. & Seal, B. S. (2004b). RNA-dependent RNA polymerase gene analysis of worldwide Newcastle disease virus isolates representing different virulence types and their phylogenetic relationship with other members of the paramyxoviridae. *Virus Research* **104**, 71-80.
- Wobeser, G., Leighton, F. A., Norman, R. & Myers, D. J. (1993). Newcastle disease in wild water birds in western Canada. In *Canadian Veterinary Journal*, pp. 353-359.
- Wu, S., Wang, W., Yao, C., Wang, X., Hu, S., Cao, J., Wu, Y., Liu, W. & Liu, X. (2011). Genetic diversity of Newcastle disease viruses isolated from domestic poultry species in Eastern China during 2005–2008. *Archives of Virology* **156**, 253-261.
- Xu, M., Chang, S., Ding, Z., Gao, H. W., Wan, J. Y., Liu, W. S., Liu, L. N., Gao, Y. & Xu, J. (2008). Genomic analysis of Newcastle disease virus strain NA-1 isolated from geese in China. *Archives of Virology* **153**, 1281-1289.
- Yamakawa, I., Tsurudome, M., Kawano, M., Nishio, M., Komada, H., Ito, M., Uji, Y. & Ito, Y. (2007). Failure of multinucleated giant cell formation in k562 cells infected with newcastle disease virus and human parainfluenza type 2 virus. *Microbiol Immunol* **51**, 601-608.
- Yang, C. Y., Shieh, H. K., Lin, Y.L. & Chang, P.C. (1999). Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in western Europe. *Avian Dis* **43**(1), 125-130.
- Yu, L., Wang, Z., Jiang, Y., Chang, L. & Kwang, J. (2001). Characterization of Newly Emerging Newcastle Disease Virus Isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J Clin Microbiol* **39**, 3512-3519.
- Yuan, H., Puckett, S. & Lyles, D. S. (2001). Inhibition of Host Transcription by Vesicular Stomatitis Virus Involves a Novel Mechanism That Is Independent of Phosphorylation of TATA-Binding Protein (TBP) or Association of TBP with TBP-Associated Factor Subunits. *J Virol* **75**, 4453-4458.
- Yusoff and Tan (2001). Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology* **30**, 439-455.
- Yusoff, K., Millar, N. S., Chambers, P. & Emmerson, P. T. (1987). Nucleotide sequence analysis of the L gene of Newcastle disease virus: homologies with Sendai and vesicular stomatitis viruses. *Nucleic Acids Res* **15**, 3961-3976.
- Yusoff, K., Nesbit, M., McCartney, H., Meulemans, G., Alexander, D. J., Collins, M. S., Emmerson, P. T. & Samson, A. C. R. (1989). Location of Neutralizing Epitopes on the Fusion Protein of Newcastle Disease Virus Strain Beaudette C. *J Gen Virol* **70**, 3105-3109.
- Yusoff, K. & Tan, W. S. (2001). Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathology* **30**, 439-455.
- Zaitsev, V., von Itzstein, M., Groves, D., Kiefel, M., Takimoto, T., Portner, A. & Taylor, G. (2004). Second Sialic Acid Binding Site in Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase: Implications for Fusion. *J Virol* **78**, 3733-3741.
- Zanetti, F., Berinstein, A., Pereda, A., Taboga, O. & Carrillo, E. (2005). Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. *Avian Dis* **49**, 546-550.
- Zanetti, F., Berinstein, A. a., Pereda, A., Taboga, O. & Carrillo, E. (2009). Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolates from Healthy Wild Birds. *Avian Diseases* **49**, 546-550.
- Zhang, R., Wang, X., Su, J., Zhao, J. & Zhang, G. (2010). Isolation and analysis of two naturally-occurring multi-recombination Newcastle disease viruses in China. *Virus Res* **151**, 45-53.
- Zou, J., Shan, S., Yao, N. & Gong, Z. (2005). Complete Genome Sequence and Biological Characterizations of A Novel Goose Paramyxovirus-SF02 Isolated in China. *Virus Genes* **30**, 13-21.

ANNEXE 1

Épidémiologie de la maladie de Newcastle en aviculture villageoise à Madagascar

O.F. Maminiana⁽¹⁾, M. Koko⁽²⁾, J. Ravaomanana⁽¹⁾ & S.J. Rakotonindrina⁽¹⁾

(1) Département de recherches zootechniques et vétérinaires, Centre national de la recherche appliquée au développement rural (FOFIFA), ministère de l'Éducation nationale et de la recherche scientifique, B.P. 04, Antananarivo, Madagascar

(2) Faculté de Médecine (filiale vétérinaire), ministère de l'Éducation nationale et de la recherche scientifique, B.P. 04, Antananarivo, Madagascar

Date de soumission : 11 juillet 2006

Date d'acceptation : 28 mai 2007

Résumé

Une enquête épidémiologique sur la maladie de Newcastle en aviculture villageoise a été conduite pendant douze mois (de mai 1999 à juin 2000), aux environs d'Ambohimangakely et de Moramanga, deux zones agro-écologiques de Madagascar. Les trente familles ayant participé à l'enquête ont affirmé avoir été victimes d'une épizootie avec une forte mortalité au moins une fois avant l'enquête. Les résultats de la recherche sérologique et l'isolement de l'agent pathogène ont confirmé que cette épizootie, responsable de 44,3 % de toute la mortalité enregistrée pendant douze mois, est bien la maladie de Newcastle. L'incidence maximale (71 %) de la maladie affectant 75 % des élevages de basse-cour a eu lieu au mois d'octobre 1999, avec une séroprévalence atteignant souvent les 100 % après le passage de l'épizootie. Dans les villages, l'infection est apportée soit par les poules nouvellement introduites, soit par les oiseaux guéris. Toutes les formes de la maladie de Newcastle (épizootique, enzootique et asymptomatique) ont été rencontrées. Les comportements des éleveurs favorisent la généralisation de l'infection au sein d'un même village et dans les villages environnants.

Mots-clés

Aviculture villageoise – Épidémiologie – Madagascar – Maladie de Newcastle – Sérologie – Volaille.

Introduction

La maladie de Newcastle ou pseudo-peste aviaire est une virose aviaire hautement contagieuse affectant fréquemment les poules et les dindes. L'agent causal est le paramyxovirus aviaire 1 (APMV 1) du genre *Avulavirus* (14), appartenant à la famille des Paramyxoviridae (18). Depuis son apparition pour la première fois en 1946 à Madagascar (17), sa présence est régulièrement signalée sur tout le territoire. Cette maladie est le principal obstacle au développement de l'aviculture villageoise en Afrique et sur d'autres continents (13). À Madagascar, le cheptel

aviaire est actuellement estimé à 26 millions de têtes (11) se répartissant entre deux sous-secteurs, le sous-secteur commercial, développé autour des zones urbaines et périurbaines, et le sous-secteur traditionnel ou aviculture villageoise, présent dans tout le territoire national, jusque dans les régions les plus enclavées. La répartition des effectifs aviaires entre les deux sous-secteurs reste variable selon les sources et les années. Plus de 83 % des volailles environ (Maison des petits élevages, communication personnelle, 2004) évoluent dans le sous-secteur traditionnel.

Dans le secteur avicole commercial, contrairement au secteur traditionnel, l'épidémiologie et le contrôle de la

maladie de Newcastle ont été intensivement étudiés et largement documentés ; ainsi, en élevage industriel, la maladie de Newcastle n'apparaît, sous sa forme typique (paralysie des membres, torticolis, diarrhée verdâtre, etc.) que lorsqu'il y a une mauvaise application du programme de vaccination (9). En conséquence, elle a perdu sa première place comme pathologie dominante et est devenue très secondaire dans les fermes modernes malgaches par rapport aux autres viroses aviaires nouvellement introduites à Madagascar comme la maladie de Marek, la bronchite infectieuse et la maladie de Gumboro.

Néanmoins, au niveau de la production de volailles rurales ou de poulets villageois, dans la plupart des pays en développement, la maladie de Newcastle est considérée comme la pathologie la plus importante (2). Pour certains auteurs comme Porphyre (16) et Khalafalla (8), ce type d'aviculture constitue une menace sanitaire pour le sous-secteur commercial. Aussi, le contrôle de la maladie de Newcastle figure-t-il parmi les priorités pour l'amélioration du système dans les guides d'inclusion de la poule villageoise élaborés par le Programme spécial pour la sécurité alimentaire (PSSA) de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Pour Madagascar, la connaissance des facteurs intervenant dans l'épidémiologie de la maladie de Newcastle est une étape à franchir avant d'apporter les solutions. Les données présentées dans cet article ont été obtenues à partir d'un suivi épidémiologique réalisé dans le cadre du contrat de recherche (Projet MAG 10 185) entre la division conjointe FAO/Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) et le Centre national de la recherche appliquée au développement rural – Département de recherches zootechniques et vétérinaires (FOFIFA-DRZV).

Matériels et méthodes

Description des zones d'étude

Une enquête épidémiologique a été réalisée sur deux zones pendant une période de douze mois (de mai 1999 à juin 2000). La zone 1, Ambohimangakely (longitude 47° 36' E ; latitude 18° 54' S ; altitude 1 310 m), correspond à un rayon de 5 km et comprend les trois villages numérotés 11, 12 et 13 (Ambohimangakely, Betsizaraina et Alatsinainy). La zone 2, Moramanga (longitude 48° 13' E ; latitude 18° 57' S ; altitude 912 m) correspond à un rayon de 7,5 km et comprend trois villages numérotés 21, 22 et 23 (Mangoro-Ankarahara, Ankarefo et Ambodin'Ifody Gara). Dans chaque village, trois à sept ménages d'éleveurs de volailles ont été choisis en fonction de leur disponibilité à recevoir la visite des techniciens tous les quinze jours et à mettre à leur disposition leurs volailles.

Enquête

Les trente éleveurs qui ont participé à l'enquête ont été identifiés par des numéros à trois chiffres incluant la zone et le village auxquels ils appartiennent : 111 à 115 pour le village 11 ; 121, 123 et 125 pour le village 12 ; 131 à 134 pour le village 13 ; 213, 214, 215, 218 et 219 pour le village 21 ; 221 à 227 pour le village 22 et enfin, 231 à 236 pour le village 23. La connaissance qu'ont les éleveurs de la maladie de Newcastle a été évaluée au début de l'enquête. L'enregistrement des différents événements survenant dans chaque cheptel de poule (*Gallus gallus*) a été réalisé sur des fiches par les équipes de techniciens. Les fiches comportaient le recensement des effectifs avec une indication de l'évolution du cheptel à partir de l'effectif de départ, à savoir les nouveaux poussins, les décès classés selon leurs causes, les ventes et la consommation, les dons, les mouvements d'entrée et de sortie, les changements de catégorie. Ces données ont été collectées au cours de visites effectuées tous les quinze jours.

Diagnostic clinique et post-mortem

Des descriptions symptomatologiques des oiseaux malades ont été réalisées. À chaque apparition d'épizootie, deux oiseaux malades ont été emportés, avec la permission des éleveurs, et autopsiés au laboratoire de diagnostic du DRZV d'Antananarivo. Les lésions des différents organes ont été étudiées selon la méthode décrite par Alders et Spradbrow (1).

Sérologie

Des prises de sang, à la veine alaire des volailles, ont été effectuées au début de l'enquête et après chaque épizootie sur les oiseaux malades, en utilisant la technique de Janeen et Rini (1). Le titrage des anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle, par le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) a été réalisé sur microplaque à fond U et à antigène constant possédant un titre de 4 unités hémagglutinantes (UHA) et dilution de sérum de log 2, selon la procédure décrite par Allan et Gough (3) : la souche Mukteswar du virus de la maladie de Newcastle de pathotype mésogène, produit sur œufs embryonnés, a été utilisée comme antigène pour ce test. Le titre d'anticorps vis-à-vis de la maladie de Newcastle était considéré comme positif, avec la technique IHA, s'il était supérieur ou égal à log 2³ (4).

Résultats

Connaissance de la maladie de Newcastle par les villageois

Tous les éleveurs ont signalé le passage cyclique d'une épizootie meurtrière au moins une fois avant le début de

l'enquête (mai et juin 1999). Cette épizootie est appelée par plusieurs noms vernaculaires tels que « *barika* », « *ramoletaka akoho* » ou « *moafon'akoho* ». L'appellation « *ramoletaka akoho* » désigne plutôt la maladie qui frappe spécialement les poules (*Gallus*) alors que le terme « *barika* » désigne, dans les deux zones, la maladie spécifique du genre *Gallus*, ou bien celle qui affecte en même temps les palmipèdes. Malgré le passage annuel de *ramoletaka*, aucun éleveur ne vaccine ses poules. Par ailleurs, les éleveurs savent que les oiseaux rescapés ne seront plus atteints par cette maladie. Il a été précisé qu'aucune mesure de décontamination n'est prise pour les oiseaux morts.

Suivi des mouvements du cheptel aviaire

En douze mois de suivi, 2 236 oiseaux ont été examinés chez les trente éleveurs des deux zones d'étude. L'augmentation du cheptel provient des poussins nouvellement éclos et des nouveaux individus introduits ou achetés à l'extérieur et enregistrés dans la colonne « entrée ». À l'inverse, la diminution du cheptel est due à la sortie des volailles, qu'il s'agisse d'individus exploités (volailles vendues, consommées ou données), morts ou perdus, ou d'individus transférés hors du cheptel (Tableau I).

Diagnostic clinique de la maladie de Newcastle et examen post-mortem

Au cours des épizooties successives, 51 volailles malades ont pu être identifiées. Tous les cas analysés, quelle que soit leur classe d'âge, ont présenté de la prostration et de la diarrhée. Des troubles nerveux ont également été observés (torticolis chez la classe poulette et paralysie des ailes et des pattes chez le poussin). Des pétéchies sur la muqueuse intestinale et sur le proventricule ont été observées sur la plupart des individus malades suspectés de maladie de Newcastle.

Cependant, chez l'éleveur 131, l'examen post-mortem effectué sur les cadavres de quatre oiseaux, lors d'une épizootie très meurtrière dont l'allure symptomatologique était similaire à celle de la maladie de Newcastle, n'a pas révélé de lésions attribuables à cette maladie.

Sérologie

Au début de l'enquête, la séroprévalence de la maladie de Newcastle était de 20,58 % alors que plus de 72 % des échantillons prélevés dans les quatre villages (21, 22, 23 et 12) pendant la période épizootique se sont révélés positifs (Tableau II). Dans le village 11, les sérums des

Tableau I

Les mouvements rencontrés dans le cheptel pendant la période de l'enquête (mai 1999 à juin 2000)

Zone	Nombre d'éleveurs	Effectif initial	Entrées	Mortalité totale	Sorties		Autres sorties ^(a)	Effectif final	Total effectif suivi
					Mortalité due à la maladie de Newcastle				
1	12	83	668	443	218 (49,20 %) ^(b)		126	182	751
2	18	280	1 205	777	323 (41,57 %) ^(b)		443	265	1 485
1 et 2				1 220	541 (44,34 %) ^(b)		569		
Total	30	363	1 873		1 789			447	2 236

a) Autres sorties : vente, consommation, perte, vol et transfert à l'extérieur

b) Taux de mortalité due au virus de la maladie de Newcastle par rapport à la mortalité totale

Tableau II

Variation de la séroprévalence (titres ≥ 3 log 2) de la maladie de Newcastle déterminée par la technique d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) à divers moments de l'étude conduite dans deux zones de Madagascar

Classe d'âge	Prévalence sérologique (pourcentage)			
	Début de l'enquête (juin 1999) (n = 68)	Périodes de pic (octobre 1999 et février 2000) (n = 74)		Rescapés dans le village 11 (n = 7)
		Village 13 indemne (septembre 1999) (n = 40)		
Poussin	–	0/2		–
Poulet	0/25	20/37 (54,05 %)		3/3
Adulte	14/43 (32,55 %)	32/35 (91,42 %)		4/4
Total	14/68 (20,58 %)	52/74 (72,22 %)		7/7 (100 %)

– : pas de données

Tableau IV
Taux de mortalité due aux épizooties de maladie de Newcastle dans la zone 2

Éleveurs	Année 1999							Année 2000					
	mai	juil.	août	sept.	oct.	nov.	déc.	janv.	fév.	mars	avril	mai	juin
213													
214					65,96	50,00	5,88						
215													
218													
219													
221								12,73	40,00				
222								7,14	79,41				
223								7,89	90,63				
224								90,91					
225								94,44					
226								21,88					
227													
231					6,90								
232					100,00								
233					27,27								
234					60,00	25,00							
235					59,46	7,14							
236	2,44								58,33	6,67			

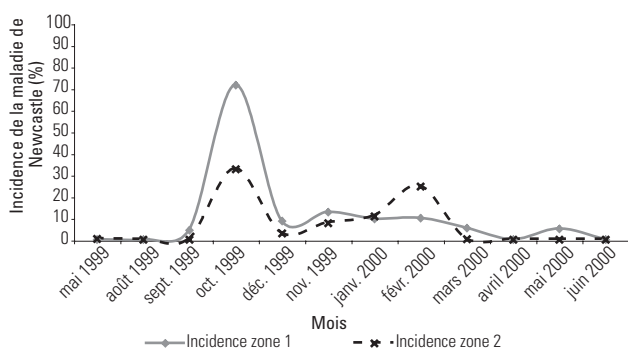


Fig. 1
Évolution de l'incidence de la maladie de Newcastle dans les deux zones de l'enquête (mai 1999 à juin 2000)

élevages d'Ambodin'Ifody ont été touchés à l'exception de celui de l'éleveur 236. Du côté du village 21, seul l'éleveur 214 du quartier d'Ankarahara a été concerné par l'épizootie ; les autres, situés dans le quartier de Mangoro sont restés indemnes et cela, jusqu'à la fin du suivi. Le troisième village (Ankarefo) a connu la maladie à partir du mois de décembre. L'allure épidémiologique de la maladie de Newcastle a été semblable à celle de la zone 1. Si la maladie n'a duré que quelques semaines dans les villages 21 et 23 (épizootie d'octobre), en revanche elle a persisté pendant quatre mois (de décembre 1999 à mars 2000) dans le village 22 et trois mois chez l'éleveur 236 (de

janvier à mars 2000) lors de la deuxième épizootie, sous forme de cas isolés. L'incidence de la maladie de Newcastle dans la zone 2 présente deux pics (Fig. 1), le premier à 33 % au mois d'octobre 1999 et le deuxième au mois de février 2000 à 26 %. En analysant ensemble les résultats de l'enquête obtenus dans les deux zones, il apparaît clairement que la période d'accalmie pour la maladie de Newcastle correspond aux mois d'avril, de juin et de juillet, pendant lesquels aucun cas n'a été signalé l'année de suivi.

Discussion et conclusion

L'enquête a permis de connaître les observations des trente familles d'éleveurs sur une épizootie cyclique très meurtrière, appelée par les éleveurs « *barika* », « *ramoletaka* », « *moafon'akoho* » ou « *pesta akoho* » avant juin 1999. La présence de cette maladie a été constatée lors du suivi épidémiologique. Les diagnostics clinique, post-mortem et sérologique conduisaient à une forte suspicion de la maladie de Newcastle. L'isolement virologique d'une souche sauvage du virus de la maladie de Newcastle à partir d'un cerveau de poulet malade confirme que l'épizootie décrite par les éleveurs correspond, pour la majorité des cas, à la maladie de Newcastle (11).

La maladie de Newcastle est bien connue des éleveurs de l'aviculture villageoise de différents pays en

développement, comme le prouve l'existence des noms en langues locales pour la désigner, variant selon les localités (1). Ces appellations dénotent la gravité et l'importance de cette maladie. Dans la partie Nord de Madagascar, englobant les régions d'Analanjirifo, de Sofia et d'Antsiranana par exemple, la maladie de Newcastle est désignée sous le terme de « *Ramibomogno* » (traduit littéralement : « qui explose »), maladie d'évolution extrêmement rapide avec un taux de mortalité très élevé, anéantissant le cheptel en un laps de temps très court. Une terminologie similaire (« *the bomb* ») a été retrouvée en Afrique, chez les éleveurs de la région ouest de la République démocratique du Congo (6). Si la maladie est bien connue des éleveurs, la vaccination par contre est totalement ignorée en milieu villageois. Contrairement à l'aviculture commerciale où la maladie de Newcastle a été contrôlée par la vaccination et la biosécurité (19), chez les poulets villageois cette maladie est très importante. Elle est responsable de 49,20 % et de 41,57 % de la mortalité totale enregistrée pendant les douze mois de suivi, respectivement dans les zones 1 et 2 (44,34 % dans les deux zones confondues) (Tableau I). Ce résultat, similaire à ceux obtenus par des auteurs comme Alexander (2) confirme que la maladie de Newcastle constitue réellement la menace principale de la production de volailles en milieu rural à Madagascar. Il semblait démontré que la maladie a plus d'impact dans la zone 1 que dans la zone 2. Cette situation pourrait être due à l'existence d'un environnement favorable à la dissémination de la maladie de Newcastle dans la zone 1, à savoir la situation périurbaine, de gros villages ayant des marchés quotidiens (village 12), des achats fréquents de volailles de race exotique aux marchés de la capitale et de la zone périurbaine pour amélioration génétique, et des mouvements spéciaux de volailles tels que les échanges de coqs de combat et les combats eux-mêmes (cas de l'éleveur 121, valable pour l'éleveur 214). Dans la zone 2, en revanche, les villages sont de petite taille, il n'existe pas de marché quotidien à proximité et les éleveurs sont davantage isolés. La situation d'isolement a également épargné certains éleveurs de la zone 1 (cas des éleveurs 132 et 133).

Après chaque épizootie, les sujets séronégatifs ont disparu, laissant derrière eux des oiseaux guéris séropositifs ayant survécu aux foyers. En se référant au village 11, la séroprévalence de la maladie de Newcastle du cheptel rescapé est maximale : 100 % des volailles testées sont séropositives après le passage de l'épizootie. Pour le cas de Madagascar, les éleveurs reconstituent leur cheptel à partir des individus rescapés car ils savent pertinemment que ces volailles sont devenues résistantes à la maladie. Le repeuplement s'effectue donc majoritairement à partir de la reproduction interne du cheptel (10). Or, selon Guèye (6), les poussins issus de poules rescapées d'une infection due au virus de la maladie de Newcastle héritent tous des anticorps d'origine maternelle dirigés contre cette maladie.

Le taux d'anticorps hérités est proportionnel à celui de la mère poule. Le temps d'écoulement, variable d'un individu à l'autre, s'étale de trois à quatre semaines, période à l'issue de laquelle les anticorps maternels ont disparu, laissant ainsi les poussins séronégatifs (3). En l'absence d'une nouvelle infection, pendant la période d'accalmie allant du mois d'avril au mois d'août, des générations de poussins se sont succédé, générant ainsi une nouvelle population de poulets naifs dépourvus d'anticorps. L'enquête sérologique menée dans le village 13 au mois de septembre montre que la baisse de la séroprévalence de la maladie de Newcastle au niveau de la population aviaire villageoise continue à s'intensifier (2,5 %), jusqu'à devenir nulle. En effet, les individus séropositifs appartenant pour la plupart à la classe adulte perdent leurs anticorps au fil des mois pendant toute la période d'accalmie. L'arrivée de la nouvelle génération de poulettes séronégatives ayant atteint l'âge adulte ne fait que rabaisser encore plus le taux de séroprévalence de la maladie de Newcastle. Il en résulte une forte augmentation d'individus séronégatifs à partir du mois de juin, au point de rendre le cheptel vulnérable et totalement réceptif à l'égard d'une nouvelle épizootie vers le mois de septembre, période pendant laquelle la densité de population des volailles dans les villages étudiés était maximale (10). Alders et Spradbrow (1) observent que, dans les élevages aviaires villageois, la maladie de Newcastle présentait trois aspects épidémiologiques caractéristiques, à savoir la forme épizootique, la forme enzootique et le caractère saisonnier des épizooties. Les résultats de cette enquête illustrent bien les trois aspects décrits ci-dessus.

Pour la forme épizootique, Alders et Spradbrow soulignent que la source habituelle du virus de la maladie de Newcastle est la volaille infectée et que la dissémination est souvent due aux mouvements des volailles liés à leur collecte et à leur vente aux marchés. Un poulet en incubation de la maladie de Newcastle peut introduire le virus dans une bande isolée, très sensible, et provoquer jusqu'à 100 % de mortalité. En effet, l'introduction d'un tel individu vers les mois d'août ou de septembre, au sein de la population hautement réceptive des deux zones pourrait avoir été à l'origine de l'épizootie dont le pic s'est situé au mois d'octobre. L'augmentation du nombre de sujets séronégatifs dans le cheptel et les mouvements dans les marchés de volailles entraînent des foyers de maladie de Newcastle (12).

Pour la forme enzootique, le virus pourrait être entretenu au sein de la population des oiseaux infectés ayant survécu à un foyer. Ces volailles constituent probablement le réservoir de virus qui passe d'un oiseau sensible à un autre sensible au milieu d'une population de volailles majoritairement immunisées (15). Cette forme conduit à une mortalité occasionnelle, relativement faible, n'attirant même pas l'attention des éleveurs (1). Cette possibilité constitue une hypothèse pour expliquer à la fois la

situation d'endémicité vécue par les éleveurs 121 et 123, chez qui la maladie causait des pertes pendant six mois, principalement chez les juvéniles, et l'explosion de la forme épizootique du mois d'octobre. Le cas illustré par l'éleveur 115, chez qui la poulette *Volontsipoy* a pu échapper à la maladie de Newcastle pourrait s'expliquer par la forme asymptomatique, c'est-à-dire une circulation d'une souche du virus de la maladie de Newcastle avirulente. Cette poulette n'a présenté aucun signe de la maladie de Newcastle. Cependant, selon Alders et Spradbrow (1), son organisme permet, bien que de façon limitée, la réplication du virus sauvage, dont l'excrétion entretient à la fois la persistance des anticorps pendant neuf mois chez la poulette et chez sa progéniture.

Enfin, en ce qui concerne la saisonnalité, la fin de la saison sèche (octobre) semble réunir toutes les conditions (effectif aviaire maximal et population séronégative nombreuse) propres à la période d'explosion dans les deux localités de l'étude, attribuée par les éleveurs aux conditions climatiques saisonnières (1, 12). Quatre villages sur six ont connu des épizooties simultanément en cette fin de saison. Les deux autres ont connu des épizooties soit en pleine saison humide (cas du village 22), soit à la fin de la saison humide (cas du village 13). Ces épizooties de saison humide peuvent être interprétées comme étant le prolongement de celles du mois d'octobre. Dans tous les cas, la plupart des éleveurs n'ont connu qu'une seule épizootie pendant l'année, à l'exception de ceux qui ont observé la forme enzootique, d'une part, et de l'éleveur 236, d'autre part. Il faut remarquer toutefois que six éleveurs restaient épargnés, bénéficiant d'une situation d'isolement : aire de divagation isolée, pas d'introduction de volaille infectée de l'extérieur ou situation préservée de toute contamination par voie aérienne (20).

Après son explosion, la diffusion de la maladie se fait de diverses manières, en fonction du comportement des éleveurs. Au premier signe de l'infection dans la basse-cour, les éleveurs se débarrassent des poulets apparemment en bonne santé. Ces poulets sont soit amenés au marché pour être vendus, soit transférés dans un autre endroit jugé encore indemne. Le lieu de transfert peut appartenir à l'éleveur lui-même ou bien à un éleveur parent habitant un autre village. Les volailles malades, parfois même les volailles trouvées mortes sont consommées et partagées entre la grande famille. Les restes de ces volailles consommées ne subissent aucun traitement particulier. Toutes ces pratiques contribuent à la diffusion rapide du virus, qui passe facilement du premier élevage atteint aux autres élevages, dans le même village ou dans les villages voisins, entraînant l'extension de la maladie vers des nouveaux foyers.

S'agissant de la contagion dans les basses-cours, la dissémination au sein de la bande se fait principalement par les fientes des volailles infectées et les viscères des volailles que les éleveurs ont sacrifiées, ou par aérosol

pendant la nuit (7). Les volailles qui nichent sur les arbres (20) sont davantage épargnées par l'épizootie. La maladie de Newcastle peut être également transmise d'un village à l'autre par l'homme, les animaux, les objets contaminés (21). D'autres activités, dont celle liée à un petit restaurant peuvent également être invoquées pour expliquer l'origine de l'infection, en particulier chez les éleveurs isolés (cas de l'éleveur 236).

Si l'espèce *Gallus gallus* est reconnue comme étant la principale victime de la maladie, d'autres espèces d'oiseaux domestiques ou sauvages peuvent être infectées par le virus de la maladie de Newcastle, développer une forme inapparente de maladie, jouer ainsi un rôle de réservoir et intervenir dans sa propagation (22). Cependant, l'analyse sérologique par le test IHA réalisée sur d'autres espèces (canards, oies et pigeons) vivant avec les poulets villageois n'a révélé aucune trace de passage du virus de la maladie de Newcastle. Or Villate (21) a précisé que des résultats négatifs au test IHA n'excluent pas l'excrétion virale chez des sujets naturellement peu sensibles.

Il est tout à fait possible que toutes les formes de virus de la maladie de Newcastle circulent en même temps dans l'aviculture villageoise malgache, comme dans beaucoup d'autres pays, aussi bien dans le secteur traditionnel que commercial (5). Pourtant, bien de points restent à éclaircir et nécessitent des études complémentaires, en particulier pour déterminer l'origine du virus et isoler toutes les souches existantes, suivies par une analyse génétique et phylogénétique afin de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie de Newcastle dans la filière avicole traditionnelle. Une investigation simultanée de la présence des souches circulantes de virus de l'influenza aviaire dans ces populations s'avère également souhaitable compte tenu du contexte mondial.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement la division conjointe FAO/AIEA pour avoir financé ce projet MAG 10185. Leurs remerciements vont également au FOFIFA-DRZV pour son soutien logistique et institutionnel, et au projet du Fonds de solidarité prioritaire « Projet d'appui institutionnel à la recherche agronomique et environnementale » (FSP-Forma) de l'Ambassade de France par l'intermédiaire du Centre de ressources scientifiques pour l'agriculture et l'environnement (CeRSAE) pour la formation et la réalisation de cet article. Enfin, les auteurs adressent leurs sincères remerciements aux éleveurs de volailles qui ont participé à la réalisation de cette enquête.



Epidemiology of Newcastle disease in village poultry farming in Madagascar

O.F. Maminaiaina, M. Koko, J. Ravaomanana & S.J. Rakotonindrina

Summary

An epidemiological investigation into Newcastle disease in village poultry farming was carried out for 12 months (from May 1999 to June 2000) in Ambohimangakely and Moramanga, two agro-ecologic zones of Madagascar. The thirty families that were surveyed stated that they had incurred losses from an epizootic with high mortality rates at least once prior to the investigation. The results of serological tests and virus isolation showed that the disease, responsible for 44.3% of all the mortality recorded during the twelve-month period, was Newcastle disease. Maximum incidence of the disease (71%), affecting 75% of the families, occurred in October 1999, and seroprevalence often reached 100% after the outbreak had ended. The infection was brought to the villages either by newly introduced hens or recovered birds. All forms of Newcastle disease (epidemic, endemic and asymptomatic) were observed. The way farmers reacted contributed to the spread of the virus within a village and to neighbouring locations.

Keywords

Backyard poultry – Epidemiology – Madagascar – Newcastle disease – Poultry – Serology.



Epidemiología de la enfermedad de Newcastle en la avicultura tradicional de Madagascar

O.F. Maminaiaina, M. Koko, J. Ravaomanana & S.J. Rakotonindrina

Resumen

En los alrededores de Ambohimangakely y Moramanga, dos zonas de agricultura ecológica de Madagascar, se llevó a cabo durante doce meses (de mayo de 1999 a junio de 2000) una investigación epidemiológica sobre la enfermedad de Newcastle en la avicultura tradicional. Las treinta familias estudiadas afirmaron haber sufrido una epizootia con una elevada tasa de mortalidad por lo menos una vez con anterioridad a la investigación. Los resultados del estudio serológico y de los intentos de aislamiento del agente patógeno confirmaron que esa epizootia, responsable de un 44,3% del total de mortalidad registrada en doce meses, era en efecto la enfermedad de Newcastle. La incidencia máxima (71%) de la enfermedad, que afectó a un 75% de las gallináceas, se alcanzó en el mes de octubre de 1999, con una seroprevalencia que a menudo llegaba al 100% después de la epizootia. La infección penetra en las aldeas a través de gallinas recién introducidas o de pájaros que se han curado. Se observaron todas las formas de la enfermedad de Newcastle (epizoótica, enzoótica y asintomática). La conducta de los avicultores favorece la extensión de la infección dentro de una misma aldea y en los pueblos aledaños.

Palabras clave

Ave de corral – Avicultura tradicional – Enfermedad de Newcastle – Epidemiología – Madagascar – Serología.



Bibliographie

1. Alders R. & Spradbrow P. (2001). – Appendix 2: Collection of blood from the wing vein of chickens. *In* Controlling Newcastle disease in village chickens: a field manual. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Monograph no. 82. ACIAR, Canberra, 78-80.
2. Alexander D.J. (1991). – Newcastle disease and other paramyxovirus infections. *In* Diseases of poultry, 9^e éd. (B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid & H.W. Yoder, édit.). Iowa State University Press, Ames, 496-519.
3. Allan W.H. & Gough R.E. (1974). – A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. A comparison of macro and micro methods. *Vet. Rec.*, **95**, 120-123.
4. Allan W.H., Lancaster J.E. & Toth B. (1973). – The production and use of Newcastle disease vaccines. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Rome.
5. Couacy-Hymann E., Sanogo B. & Domenech J. (1991). – Épidémiologie de la maladie de Newcastle en Côte d'Ivoire. *In* Proc. Workshop on Newcastle Disease Vaccines for Rural Africa. Pan-African Veterinary Vaccine Centre (PANVAC), Debre Zeit, Addis Ababa, 22-26 avril, 65-68.
6. Guèye E.F. (2002). – Family poultry research and development in low-income food-deficit countries: approaches and prospects. *Outlook Agric.*, **31** (1), 13-21.
7. Huchzermeyer F.W. (1993). – Why is velogenic Newcastle disease endemic in some countries and not in others? *Zimbabwe vet. J.*, **24**, 111-113.
8. Khalafalla A.I. & Awad S. (2001). – Epidemiology of Newcastle disease in village chickens in the Sudan. *In* Livestock Community and Environment, Proc. of the 10th Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine, Copenhagen, Danemark (Page web : http://www.aitvm.kvl.dk/C_poultry/C7Khalafalla.htm, consultée le 10 septembre 2007).
9. Kichou F., El Youssoufi G., Bikour H., Jaouzi T. & Benaazzou H. (1999). – Isolation, identification and pathogenicity of Moroccan field isolates of infectious bursal disease virus. *In* Proc. 41st Western Poultry Disease Conference, 24-27 avril, Vancouver, Canada, 119-121.
10. Koko M., Maminaiaina O.F., Ravaomanana J. & Rakotonindrina S.J. (2002). – Aviculture villageoise : productivité et situation épidémiologique. *In* Characteristics and parameters of family poultry production in Africa. Programme de recherche de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)/Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA). AIEA, Vienne, 47-63.
11. Koko M., Maminaiaina O.F., Ravaomanana J. & Rakotonindrina S.J. (2006). – Aviculture villageoise à Madagascar : enquête épidémiologique. *In* Improving farmyard poultry production in Africa: interventions and their economic assessment. Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA), TECDOC-1489. AIEA, Vienne, 157-163.
12. Maho A., Ndeledje Gondje N., Mopate L.Y. & Ganda K. (2004). – La maladie de Newcastle au sud du Tchad : périodes de pic épidémique et impact de la vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **23** (3), 777-782.
13. Mamis D. (1995). – Enquête sérologique concernant les principales maladies infectieuses des volailles (maladie de Newcastle, maladie de Gumboro, bronchite infectieuse, mycoplasmoses, salmonellose) dans la région de Dakar au Sénégal. Mémoire de DESS – Productions animales en régions chaudes, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD-EMVT), Montpellier.
14. Mayo M.A. (2002). – Virus taxonomy – Houston 2002. *Arch. Virol.*, **147**, 1071-1076.
15. Njue S.W., Kasiiti J.L., Macharia J.M., Gacheru S.G. & Mbugua H.C.W. (2002). – Epidemiology of Newcastle disease in local chicken in Kenya. *In* Proc. XII International Congress of the World Veterinary Poultry Association, 28 janvier-2 février, Le Caire, Égypte.
16. Porphyre V. (2000). – Enquête séro-épidémiologique sur les principales maladies infectieuses des volailles à Madagascar. Mémoire de DESS – Productions animales en régions chaudes, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD-EMVT), Montpellier.
17. Rajaonarison J.J. (1991). – Production de vaccin contre la maladie de Newcastle à Madagascar. *In* Proc. Workshop on Newcastle Disease Vaccines for Rural Africa. Pan-African Veterinary Vaccine Centre (PANVAC), Debre Zeit, Addis Ababa, 22-26 avril, 135-137.
18. Rima B., Alexander D.J., Billeter M.A., Collins P.L., Kingsbury D.W., Lipkind M.A., Nagai Y., Örvell C., Pringle C.R. & ter Meulen V. (2002). – Family Paramyxoviridae. *In* Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (F.A. Murphy, C.M. Fauquet, D.H. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo & M.D. Summers, édit.). Springer-Verlag, Vienne & New York, 268-274.
19. Spradbrow P.B. (1993). – Newcastle disease in village chickens. *Poult. Sci.*, **5** (4), 57-96.
20. Spradbrow P.B. (2000). – Epidemiology of Newcastle disease and the economics of its control. *In* Proc. Workshop on Poultry as a tool in poverty eradication and promotion of gender equality (F. Dolberg & P.H. Petersen, édit.). Tune, Danemark, 165-173.

21. Villate D. (2001). – Les paramyxoviroses. In Manuel pratique. Maladie des volailles, 2^e éd. Éditions France Agricole, Paris, 148-161.
 22. Weingartl H.M., Riva J. & Kumthekar P. (2003). – Molecular characterization of avian Paramyxovirus 1 isolates collected from cormorants in Canada from 1995 to 2000. *J. clin. Microbiol.*, **41** (3), 1280-1284.
-

ANNEXE 2



Letter to the Editor

Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus?

ARTICLE INFO

Keywords:

Newcastle disease virus
African strains
Genotypes
Phylogenetic analysis

To the Editor,

Although Newcastle disease (ND) is endemic in Africa, little is known about the molecular epidemiology and genotype distribution of Newcastle disease virus (NDV) strains or the protection conferred by vaccination. This letter reports on original NDV isolates detected in the wetlands of Madagascar and Mali, which may constitute new genotypes or subgenotypes.

NDV, the avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1), is the causal agent of a fatal respiratory and neurological disease that can result in 100% morbidity and mortality in chicken flocks [1]. This disease is still one of the most important in poultry production worldwide, although vaccination measures have been applied more than 50 years.

In rural Africa, the predominant chicken production systems (backyard farms) are based on indigenous domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*), and ND is rated as the most devastating disease in these farms [2]. In Madagascar, for example, ND was observed first in 1946 [3], and it is currently responsible for 44% of the mortality in backyard farms, which represent more than 83% of the avian production [4]. Likewise, ND is endemic in Mali, where prevalence rates reach more than 60% depending on the region and season [5]. ND causes high mortality in Malian backyard farms, which represent more than 90% of the avian production [5].

This study deals with the detection of original NDV strains in Africa. One and six isolates were collected respectively, in Madagascar and Mali, during a surveillance programme in 2007 and 2008 in African wetlands by the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier, France. Virus detection was performed by RRT-PCR and, after sequencing of a fragment of 356 nucleotides corresponding to position 48–422 of the fusion gene (including the cleavage site), phylogenetic analyses were carried out using the neighbor-joining method.

Concerning Mali, five out of the six isolates originated from the area surrounding the city of Mopti and one isolate was from the Sikasso region (Table 1). The Mopti region constitutes most of the inner delta of the Niger River and is an important port for cargo and passengers. The city of Mopti is a central market town where the various tribes go to trade for fish, salt, living animals, fruit, veg-

etables, and crafts. Sikasso is the South-Western region of Mali and encompasses the major trade roads with Ivory Coast and Burkina Faso. Consequently, Mopti and Sikasso represent ideal sites to study the interaction between domestic and wild bird populations and between bird populations from different West African countries.

The sequences of the six Malian isolates correspond to virulent cleavage sites ($^{112}\text{RRRKR}^{\downarrow}\text{FV}^{118}$ and $^{112}\text{RRQKR}^{\downarrow}\text{FI}^{118}$) with at least three basic amino acids. It is rare to find V_{118} associated with the cleavage site $^{112}\text{RRRKR}^{\downarrow}\text{FV}^{118}$, as in two of these isolates. This association was only recently reported in the neighboring country Burkina Faso (more than 2000 sequences from Genbank were analysed). Sequence alignment shows that the strains isolated from the same site (Mopti market for example), the same bird species (chicken), and in the same year are identical but different from the strains isolated from another site (Sikasso) in the following year. Moreover, the strains isolated from the same site and in the same year but from different species (chicken and guinea fowl) are also different. Phylogenetic analysis (Fig. 1) of four out of the six isolates (two were not analysed because they were identical to two sequences included in the analysis) showed all in genotype VII (or lineage 5 proposed by Aldous et al. [6]), which is the currently circulating genotype in Europe, Asia, and Africa but the two sequences with cleavage site $^{112}\text{RRRKR}^{\downarrow}\text{FV}^{118}$ had some motifs pertaining to other genotypes like V_{118} , characteristic of genotype V (lineage 3). In a recent article, Snoeck et al. [7] suggested that NDV isolates from West Africa, genetically distant from all known sublineages, represent three new ones (tentatively named by the authors 5f, 5g, and 5h). It is possible that our Malian NDV isolates are clustered in one or more of these putative new sublineages, supporting the notion that these sublineages represent the NDV variants indigenous to West Africa. However, two of them seem to represent an additional new subgenotype (suggested as VIII) never encountered before (more than 3000 sequences from Genbank were checked, Fig. 1). The analysis of other genome sequences is in process. It is surprising that these six virulent strains were isolated from poultry apparently not vaccinated and in good health. The question of the real virulence of these strains needs to be verified experimentally.

In a second approach, we also did the molecular characterization of a Madagascar NDV isolate (chicken/MG/725T/2008), obtained from an apparently healthy chicken. The sequence of the cleavage

Table 1
African NDV isolates used in this study.

Isolate	Specie	Country/region	Cleavage site
Chicken/Mali/029/2007	Chicken	Mali/Mopti	112 ^R RRRR ^R FV ¹¹⁸
Guinea fowl/Mali/038/2007	Guinea fowl	Mali/Mopti	112 ^R RRQKR ^R FV ¹¹⁸
Chicken/Mali/225/2008	Chicken	Mali/Mopti	112 ^R RRQKR ^R FV ¹¹⁸
Chicken/Mali/007/2008	Chicken	Mali/Sikasso	112 ^R RRQKR ^R FV ¹¹⁸
Chicken/MG/725T/2008	Chicken	Madagascar/Antananarivo	112 ^R RRRRR ^R FV ¹¹⁸
Chicken/MG/1992	Chicken	Madagascar/Antananarivo	112 ^R RRRRR ^R FV ¹¹⁸

site of the F protein (112^RRRRRR^RFV¹¹⁸) showed five basic amino acids (R) at positions 112–116, representing a virulent motif. In addition, the presence of the phenylalanine (F) residue at position 117, always associated with virulent cleavage sites, was already described as being a possible contributor to the neurological effects [8]. To our knowledge, the cleavage site of this isolate has never been reported. Phylogenetic analysis showed that this isolate is closer to genotype IV but may be distant enough to constitute a new genotype (genotype XI? Fig. 1). The maximum percentage of identity of this strain was 88% with Herts/33 strain, pertaining to genotype IV (AY741404). Genotypes III and IV were responsible for the first panzootic of ND in 1926 to 1960, and genotype IV has never been isolated after 1987. Madagascar was infected for the first time in 1946 during World War II. As expected, the NDV strains that infected Madagascar at that time belonged to genotypes III and IV. Consequently, whether the chicken/MG/725T/2008 virus isolated is a genetic variant of the initial genotype III or IV

or another genotype introduced in Madagascar after 1960 requires further analyses. We found also the same original cleavage site in an older strain isolated in Madagascar in 1992 (chicken/MG/1992) after suspicion of ND in a NDV-vaccinated layer farm where the animals showed, among others, severe neurological signs. This isolate clearly forms a phylogenetic cluster with chicken/MG/725T/2008 (Fig. 1), thus reinforcing the hypothesis of the circulation of particular NDV strains in Madagascar. Complete sequencing of these viruses and the analysis of more recent isolates from poultry and wild birds in Madagascar are ongoing. It is interesting to consider that Madagascar may be an exclusive natural reservoir for this new specific genotype.

Another important point to consider is that the chicken/MG/1992 was isolated from a vaccinated layer hen in a commercial farm in Antananarivo. The vaccine used to control ND in this farm was an inactivated vaccine (ITA-NEW[®], Laprovect) containing the LaSota strain, the same as the one used in Mali

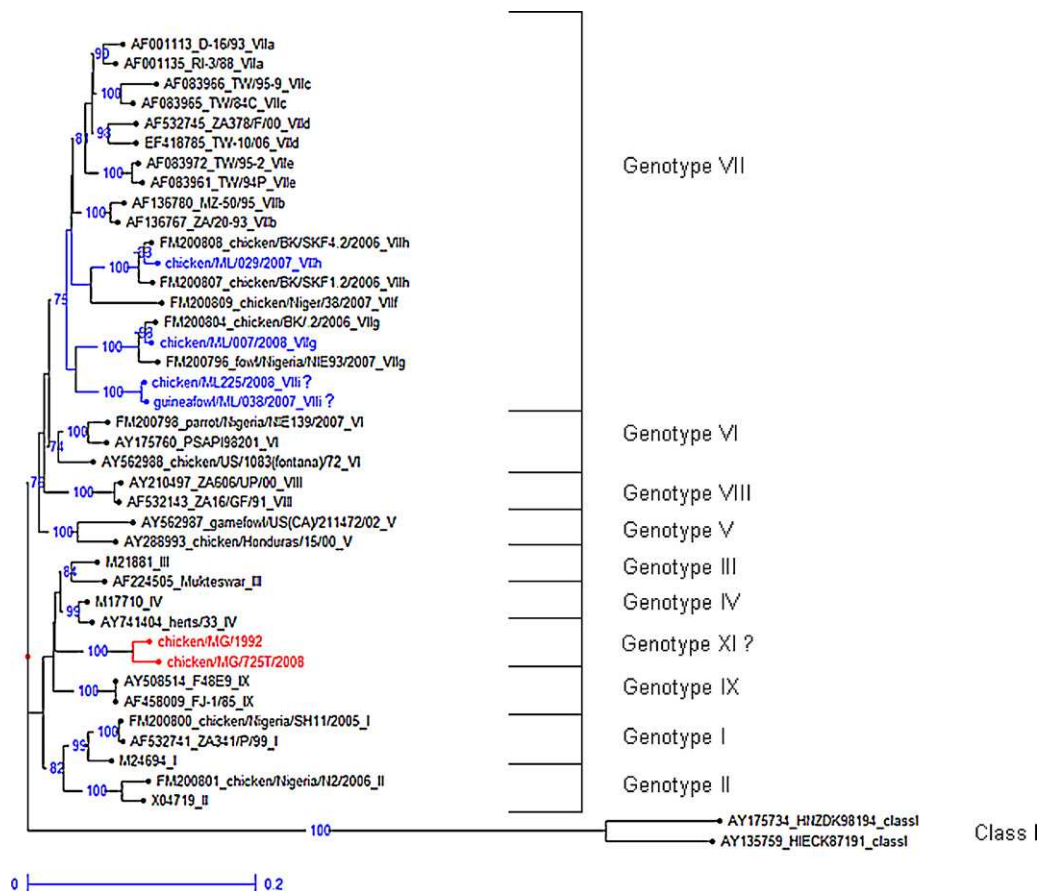


Fig. 1. Phylogenetic analysis of representative sublineages of NDV strains based on comparison of practical F gene sequence (positions 21–377 nt). The Malian sequences obtained in the present study are in blue and the sequences from Madagascar are in red. Accession numbers of the sequences from GenBank are shown. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

for several decades. The LaSota strain belongs to genotype II and, then, differs from the chicken/MG/1992 strain and genotype VII, now prevalent in West Africa. Although the relationship between genotype and antigenicity remains debated [9], different levels of cross-protection have been observed in chickens vaccinated with LaSota and challenged with other strains [9]. A partial protection conferred by vaccination can promote the emergence of immune-escape mutants responsible for ND outbreaks as described in China [9].

Together, our results emphasise the importance of NDV surveillance and re-assessment of vaccination programmes to control ND in Africa, since new genotypes or subgenotypes with panzootic potential may arise in the future.

Acknowledgements

This study was mainly funded by the French Ministry of Foreign Affairs (MAE) via the FSP project [GRIPAVI 2006-26] and partly by the EU network of excellence project [EPIZONE (016236, 01/06/2006–31/05/2011)].

References

- [1] Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AD, McDougald LR, Swayne DE, editors. *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University Press; 2003. p. 64–87.
- [2] Kitalyi A. Village chicken production systems in rural Africa—household food security and gender issues. *Animal health and production paper*, vol. 142. Rome: FAO 81; 1998.
- [3] Rajaonarison JJ. Production de vaccin contre la maladie de Newcastle à Madagascar. Workshop on Newcastle disease vaccines for rural Africa. Debre Zeit, Addis Ababa: Pan-African Veterinary Vaccine Centre (PANVAC); 1991.
- [4] Maminiana OF, Koko M, Ravaomanana J, Rakotonindrana SJ. Epidemiology of Newcastle disease in village poultry farming in Madagascar. *Rev Sci Technol* 2007;26(3):691–700.
- [5] Sylla M, Traoré B, Sidibé S, Keita S, Diallo FC, Koné B, et al. Epidémiologie de la maladie de Newcastle en milieu rural au Mali. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 2003;56(1–2):7–12.
- [6] Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol* 2003;32(3):239–56.
- [7] Snoeck CJ, Ducatez MF, Owoade AA, Faleke OO, Alkali BR, Tahita MC, et al. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Arch Virol* 2009;154(1):47–54.
- [8] Kattenbelt JA, Stevens MP, Gould AR. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Res* 2006;116(1–2):168–84.
- [9] Tsai H-J, Chang K-H, Tseng C-H, Frost KM, Manvell RJ, Alexander DJ. Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Vet Microbiol* 2004;104(1–2):19–30.

Renata Servan de Almeida^{a,*}, Olivier Fridolin Maminiana^b, Patricia Gil^a, Saliha Hammoumi^a, Sophie Molia^a, Véronique Chevalier^a, M. Koko^b, Harentsoaniaina Rasamoelina Andriamanivo^b, Abdallah Traoré^c, Kassim Samaké^c, Abbas Diarra^c, Colette Grillet^a, Dominique Martinez^a, Emmanuel Albina^a
^a CIRAD, Montpellier F-34398, France
^b FOFIFA-DRZV, B.P. 04 Antananarivo 101, Madagascar
^c LCV, Km 8, route de Koulikoro, BP 2295, Bamako, Mali

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 59 37 24;
 fax: +33 4 67 59 37 98.
 E-mail address: renata.almeida@cirad.fr
 (R. Servan de Almeida)

20 March 2009
 Available online 15 April 2009

ANNEXE 3

Newcastle Disease Virus in Madagascar: Identification of an Original Genotype Possibly Deriving from a Died Out Ancestor of Genotype IV

Olivier F. Maminiaina¹, Patricia Gil², François-Xavier Briand³, Emmanuel Albina², Djénéba Keita², Harentsoaniaina Rasamoelina Andriamanivo¹, Véronique Chevalier⁴, Renaud Lancelot², Dominique Martinez², R. Rakotondravao¹, Jean-Joseph Rajaonarison⁵, M. Koko⁵, Abel A. Andriantsimahavandy⁵, Véronique Jestin³, Renata Servan de Almeida^{2*}

1 FOFIFA-DRZV, Antananarivo, Madagascar, **2** CIRAD, BIOS Department, UMR CMAEE, Montpellier, France, **3** Anses-Ploufragan Plouzané Laboratory, VIPAC Unit, Ploufragan, France, **4** CIRAD, ES Department, UPR AGIRS, Montpellier, France, **5** Antananarivo University Madagascar, Antananarivo, Madagascar

Abstract

In Madagascar, Newcastle disease (ND) has become enzootic after the first documented epizootics in 1946, with recurrent annual outbreaks causing mortality up to 40%. Four ND viruses recently isolated in Madagascar were genotypically and pathotypically characterised. By phylogenetic inference based on the F and HN genes, and also full-genome sequence analyses, the NDV Malagasy isolates form a cluster distant enough to constitute a new genotype hereby proposed as genotype XI. This new genotype is presumably deriving from an ancestor close to genotype IV introduced in the island probably more than 50 years ago. Our data show also that all the previously described neutralising epitopes are conserved between Malagasy and vaccine strains. However, the potential implication in vaccination failures of specific amino acid substitutions predominantly found on surface-exposed epitopes of F and HN proteins is discussed.

Citation: Maminiaina OF, Gil P, Briand F-X, Albina E, Keita D, et al. (2010) Newcastle Disease Virus in Madagascar: Identification of an Original Genotype Possibly Deriving from a Died Out Ancestor of Genotype IV. PLoS ONE 5(11): e13987. doi:10.1371/journal.pone.0013987

Editor: Anthony R. Fooks, Veterinary Laboratories Agency, United Kingdom

Received: June 22, 2010; **Accepted:** October 17, 2010; **Published:** November 15, 2010

Copyright: © 2010 Maminiaina et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was mainly funded by the French Ministry of Foreign Affairs (MAE) via the FSP project [GRIPAVI 2006-26] and partly by the EU network of excellence project [EPIZONE (016236, 01/06/2006–31/05/2011, <http://www.epizone-eu.net/default.aspx>)]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: renata.almeida@cirad.fr

Introduction

Newcastle disease (ND) is a highly contagious and widespread disease which causes severe economic losses in domestic poultry, especially in chickens [1,2]. In Africa, ND is the major constraint to rural chicken development. This disease is listed as a notifiable disease by the World Organisation for Animal Health (OIE) [3]. The causative agent of the disease is Newcastle disease virus (NDV), also designated avian paramyxovirus serotype 1 (APMV-1), which belongs to the genus *Auulavirus* within the family *Paramyxoviridae* [4,5]. The genome comprises a single stranded negative sense RNA that encodes the RNA-dependent RNA polymerase (L gene), the haemagglutinin-neuraminidase (HN gene), the fusion (F gene) and matrix (M gene) proteins, the phosphoprotein (P gene) and the nucleoprotein (NP gene). The genome is predicted to be 15186, 15192 or 15198 nucleotides (nt) in length, always a multiple of six nt, which fulfils the so-called 'rule of six' for optimised replication [6,7,8,9,10]. Based on the analysis of nucleotide sequence of the F protein gene, 10 different genotypes (I–X) or 6 different lineages (1–6) of NDV have been identified so far. The genotypes VI (lineage 4) and VII (lineage 5) are further divided into eight (a–h) and five (a–e) subgenotypes/sublineages, respectively [11,12,13,14,15,16,17,18,19]. APMV-1 strains can be categorised according to their virulence into highly (velogenic), intermediate (mesogenic) or non virulent (lentogenic).

The pathogenicity of APMV-1 isolates is assessed on the basis of *in vivo* tests including the intracerebral pathogenicity index (ICPI) in 1-day-old chickens, the mean time of death (MDT) of embryonated specific-pathogen-free hen's eggs after inoculation and the intravenous pathogenicity index (IVPI) in 6-week-old chickens [3]. The molecular basis for these different levels of pathogenicity is known to be linked to the sequence of cleavage site of the precursor fusion protein (F₀). At this position, a pathogenic NDV strain (velogenic and mesogenic) has at least one extra pair of basic amino acids motif ¹¹²X-R-X-R/K-R-F¹¹⁷ [20] and can be cleaved by a wide range of proteases of the furin family in different host cells [21].

Since ND was first described in 1926, three worldwide panzootics have occurred [20]. The first panzootic (1926 to 1960) was caused by viruses belonging to genotypes II–III–IV and the second (1960 to 1973) and third (1970–1980) ones by genotypes V–VI. Moreover, severe outbreaks in Western and Southern Europe [22], [23], South Africa [24] and Taiwan [25] in the 90's were caused by genotype VII, the currently circulating genotype in Asia, Africa and Europe. In Madagascar, ND was firstly described in 1946 [26] and since then, outbreaks were regularly reported on the whole island mainly in the rural poultry sector [27]. While the vaccination rate is estimated to reach 100% in commercial farms in Madagascar, probably less than 10% of the free-range poultries are duly vaccinated. ND is considered to

induce more than 40% of mortality in such non protected poultries [28]. In spite of the importance and endemicity of ND in Madagascar, no data is available about the virus variants involved in clinical cases and/or maintenance of this disease in the island. In this study, four APMV-1 strains from Madagascar (named here MG group) were isolated in 1992 and 2008 and were molecularly characterised. Two of these strains were fully sequenced while the two other ones had only F and HN genes sequenced. Phylogenetic analyses showed that the MG group strains clustered within a new distinct genotype, closer to old genotypes. This study represents the first molecular characterisation of APMV-1 circulating in Madagascar and provides evidence on the existence of a new genotype close to an old died out genotype.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal experiments (ICPI tests) were conducted according to internationally approved OIE standards, under authorizations set forth by the director of the veterinary services of Côtes d'Armor on behalf of the Prefect of Côtes d'Armor (N° 22-18) and the Director of the veterinary services of Hérault on behalf of the Prefect of Hérault (N° 34-114). Certificates of authorization are available from the authors upon request.

Origin and isolation of virus strains

Synthetic information about the Madagascar isolates is provided in Table 1. An "old" strain (MG-1992) was first isolated by the *Centre National de Recherche Appliquée au Développement Rural* (FOFIFA-DRZV) in 1992, after suspicion of avian influenza or ND in a dead fowl assumed to be vaccinated against ND (La Sota vaccine). The three other isolates were collected in Madagascar during a surveillance programme in African wetlands led in 2007 and 2008 by the *Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD), Montpellier, France and the FOFIFA-DRZV, Antananarivo, Madagascar. The MG-725/08 strain was recovered both from cloacal and tracheal swabs from an unvaccinated apparently healthy chicken. Another strain (MG39-04/08) was isolated from a dead chicken in a commercial farm: this chicken was initially vaccinated with the HB1 strain and boosted with the La Sota vaccine. The last isolate (MG-Meola/08) was recovered from a non vaccinated backyard poultry.

Samples of brain tissues or cloacal/tracheal swabs positives in the APMV-1 specific PCR (protocol based on M gene recommended by the reference laboratory of the OIE) were further processed for virus isolation by inoculation into 9-day old chicken embryonated eggs. All isolates were grown in less than 3 passages on eggs and tested by PCR before molecular sequencing.

In vivo assay

The intracerebral pathogenicity index (ICPI) was determined according to international OIE standards (OIE, 2009) for two isolates of the MG group (MG-1992 and MG-725/08). Briefly, fresh allantoic fluid with a HA titre $>1/16$ was diluted 10^{-1} in sterile isotonic saline buffer. Following filtration through 0.22 or 0.45 μm filters this diluted virus was injected intracerebrally (0.05 ml) into 10 one day-old chick hatched from embryonated SPF hens' eggs. Whereas each inoculum was checked for lack of bacterial and fungal contamination following culture on trypto casein soja and sabouraud media, the birds were examined at 24h intervals for 8 days and given a score (0, 1 or 2) according to their status (respectively healthy, sick or dead). The ICPI was calculated as the total of individual scores during 8 days divided by 80 (the number of days x the number of chickens).

RNA isolation, cDNA synthesis and nucleotide sequencing

For reverse transcription and PCR reactions, RNA was extracted from allantoic fluids by using the Nucleospin[®] RNA Virus kit (MachereyNagel) following the manufacturer's instructions. The cDNA transcriptions were carried out by using the First-strand cDNA synthesis kit (GE Healthcare). Six pairs of oligonucleotide primers previously published [13,29] or designed in this study (Table S1 in supporting material), using BioEdit version 7.0.9.0 and Vector NTI software version 11.0 (©2008 Invitrogen Corporation), were used to amplify six overlapping DNA fragments to generate the complete sequences of F and HN protein genes. All DNA fragments were sequenced in both directions by Cogenics Genome Express S.A. (Meylan-France). For the rest of the genome, 23 overlapping PCR were realized with Platinum Taq DNA polymerase (Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen). The DNA sequences were determined in both senses using the Big dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions and using the same primers as to PCR reactions.

Alignment of the F and HN predicted amino acid sequences and phylogenetic analyses

The sequences of the four isolates were compared with previously reported NDV sequences representative of different genotypes available in GenBank. A 374 nucleotide (nt) fragment of a variable portion of the F protein gene (47 to 421), including the F₀ cleavage site and a 1713 nt (92 to 1805) of HN gene were processed by Clustal W [30] in alignX program included into Vector NTI software suite (version 11.0). The nucleotide sequence databank accession numbers of ND viruses used in this study are shown in supporting Table S2 of supporting material. Alignment of complete amino acid sequences of F and HN was processed by

Table 1. NDV isolates from Madagascar used in this study.

Strain	Code	Region/Country	Statut		Sequence	
			Clinic	Vaccine	size (nt)	Covering full genes
APMV1/Chicken/MG/1992	MG-1992	Ivato-Madagascar	Dead laying chicken	La Sota	15082	NP, P, M, F, HN and L
APMV1/Chicken/MG/725/2008	MG-725/08	Mahitsy-Madagascar	Healthy rural poultry	NV ^a	15097	NP, P, M, F, HN and L
APMV1/Chicken/MG/39-4/2008	MG-39-04/08	Ivato-Madagascar	Dead broiler chicken	La Sota	4249	F and HN
APMV1/Chicken/MG/Meola/2008	MG-Meola/08	Tsarahonenana-Madagascar	Sick grower fighter cock	NV	3966	F and HN

^a: not vaccinated.

doi:10.1371/journal.pone.0013987.t001

alignX program in Vector NTI software and finalised using MEGA4 software (version 4.1). Phylogenetic relationships and nucleotide divergence analysis (intra and inter genotype) were established with MEGA4 [31] using the Kimura 2-parameter correction in which the transition/transversion ratio was estimated from the data [32]. The statistical significance of the tree topology generated with the neighbor-joining algorithm was evaluated by 1,000 bootstrap resamplings of the data [33]. To confirm the robustness of the genetic groupings obtained by the phylogenetic analysis on the partial fragment (374 nt) a phylogenetic tree based on full-genome sequences of two isolates of the MG group (MG-1992 and MG-725/08) and 86 other full-genome sequences belonging to different genotypes were further carried out using the same parameters used for F and HN analyses. Putative recombination events in the two full-genomes of MG isolates were examined using the recombination detection program RDP 3.0b [34].

Results

Determination of *in vivo* pathogenicity (ICPI test)

ICPI values were determined for the isolates MG-1992 and MG-725/08. These isolates showed a very high ICPI of 1.9 being classified into a velogen-type NDV (Table 2).

Sequencing MG, genome organisation and phylogenetic analyses

The sequence covering the six open reading frames (ORFs: NP, P, M, F, HN, L), without the complete sequence of the 3'-leader/5'-trailer of two MG strains, MG-725/08 and MG-1992, and the complete nucleotide sequence covering the F and HN genes of two other strains, MG-39-04/08 and MG-Meola/08, obtained in this work were analysed along with those of reference strains retrieved from GenBank.

Class II APMV-1 isolates have two genome lengths. The genotypes considered as "early" (1930–1960; genotypes I to IV, IX and H33(W)) contain 15,186 nt and recent genotypes (that emerged after 1960, genotypes V–VIII and X) contain 15,192 nt (15,186 nt+6 nt in the 5' non-coding region or NCR of NP gene) [12]. As seen in recent genotypes, the MG group has six nucleotides insertion in the 5' non-coding region (NCR) of the nucleoprotein gene between nucleotides 1647 and 1648 increasing its genome size to 15,192 nt (Figure 1).

The phylogenetic analysis of F gene (Figure 2) shows that the MG strains are grouped together. They are closer to the "old" genotype IV but may be distant enough to constitute a new genotype, proposed here as genotype XI or lineage 3g. This phylogenetic topology created using 374 nt fusion gene fragments was confirmed by phylogenetic analyses based on the full NH gene (data not shown) and on the full-genome sequences of two isolates of the MG group (MG-1992 and MG-725/08) and 86 other full-genome sequences belonging to different genotypes (Figure 3).

Based on a partial fragment of F gene (374nt), genetic divergences between the MG group and the other ten genotypes (I to X) are presented in Table 3. The F nucleotide sequences divergence within the MG group was 5%. The maximum intra-genotype divergence in old genotypes was 7% (genotypes I and IV) whereas the maximum intra-genotype divergence in recent genotypes was 9% (genotype VIII). The lower genetic divergence found between the MG group and another genotype (genotype IV) was 12%. In contrast, the higher divergence (25%) was observed with the genotype II that includes the La Sota vaccine strain. Since the maximal intra-genotype divergence ever observed does not exceed the minimal divergence of the MG group with other

genotypes, our data support the hypothesis that MG group constitutes a distinct new genotype. This new genotype is further confirmed by the phylogenetic analysis of the full-genome sequences (Figure 3). Surprisingly, the phylogenetic analysis of whole genome sequences also show that the genotype IV does not cluster with the "old genotypes" (I, II, III, IX), as suggested before (Czegledi et al., 2006), but rather with "recent genotypes" (V,VI,VII).

The analysis of the F₁/F₂ protein cleavage site sequence of the four MG isolates showed that they share an original cleavage site motif formed by five arginines (R) ¹¹²R-R-R-R-R¹¹⁶ at the C terminus of F₂ exhibiting an atypical Q/R substitution at position 114 followed by a phenylalanine (↓F¹¹⁷) at position 117 of the F₁ amino terminus (Table 2). This motif is considered as a velogenic motif according to OIE [3]. Other virulent-like cleavage motifs with five basic amino acids have been described for genotypes VI, VII and VIII that are formed by a combination of arginine (R) and lysine (K) residues like ¹¹²R-R-K-K-R¹¹⁶*F¹¹⁷ or ¹¹²R-R-R-K-R¹¹⁶*F¹¹⁷ [35,36,37,38,39]. The substitution of a glutamine residue by a basic amino acid (R or K), corresponding to nucleotide mutation at positions 4885 or 4886 (CAG→CGG or AAG) is only found in some strains pertaining to the "recent" genotypes VI or VIII.

Like other NDV strains, the complete length of F and HN genes of MG group viruses were 1792 nt and 2002 nt, respectively. The F gene of all MG group isolates showed a single open reading frame (ORF) beginning with a unique double start codons ⁴⁴AUGAUG⁴⁹ and ending at position 1705 followed by the UGA stop codon. Consequently, the open reading frame of the F gene may extend to 1665 nt rather than 1662 nt usually found in other reference strains.

The predicted amino acid sequences of the complete F gene of the four MG isolates was analysed and compared with different strains pertaining to genotypes I to IX (Table 4). This analysis showed that all seven neutralising epitopes critical for both structure and function of the protein positioned at individual residues D⁷², E⁷⁴, A⁷⁵, K⁷⁸, A⁷⁹, L³⁴³ and the stretch of amino acids ¹⁵⁷ILRLKESIAATNEAV-HEVTDG¹⁷¹, are conserved [40,41,42]. The twelve cysteines residues placed at positions 25, 76, 199, 338, 347, 362, 370, 394, 399, 401, 424 and 523 [43] and the predicted N-glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr or N-X-S/T) where X is any amino acid except aspartic acid or proline, located at positions ⁸⁵N-R-T⁸⁷ ¹⁹¹N-K-T¹⁹³, ³⁶⁶N-T-S³⁶⁸, ⁴⁴⁷N-I-S⁴⁴⁹, ⁴⁷¹N-N-S⁴⁷³ and ⁵⁴¹N-N-T⁵⁴³ [44,45] are also conserved in the MG group. However, the analysis of predicted amino acid sequence of a F protein fragment (residues 0–553 for MG isolates or 1–553 for the other strains) revealed substitutions in the MG isolates found also in other strains clustered in the old genotypes (I–IV and IX) like T¹⁶→I, E¹⁰⁴→G, Q¹⁹⁵→R as well as substitutions found in recent genotypes (V to VIII) like V⁸¹→L, A¹⁰⁶→V, V¹¹⁸→I and V³⁵⁰→I. In addition, the MG group has fifteen specific amino acid residues in F protein which are not found in any other genotype (Table 4). Twelve (80%) of these amino acids are located in the head of trimeric NDV-F protein M⁰→-, W⁸→R, P¹⁵→L, S²⁷²→N, M²⁸⁹→L, S³¹¹→T, R³⁶⁴→S, T³⁷¹→M, L³⁸⁴→M, I³⁹⁷→T, T⁴⁰⁹→S and H⁴¹¹→N. The three remaining substitutions S²⁴⁴→G, K⁴⁷⁶→N, and I⁵²²→A are located in the stalk of the F-trimeric structure (Figure 3). Interestingly, the three MG strains recently isolated in 2008 share eight additional amino acids (Q⁴→K, F¹²→P, S²⁸→L, R⁷³→K, S⁷⁹→A, E¹¹⁰→G, V²⁰²→I, S²⁵⁸→N and H³³⁷→Y) compared with the strain isolated in 1992.

According to the virulence of NDV strains, HN monomeric protein sequences possess different amino acid sequence lengths: 571, 577, 581 and 616 [46]. The ORF of HN gene of MG group strains begins at position 92 and ends at position 1714. This HN

Table 2. F gene referential NDV strains used in this study.

Strain	Class or Genogroup	ICPI ^a value	Cleavage site								
Identification	Accession number		←-----F ₂ →					*	←F ₁ -----→		
			112	113	114	115	116		117	118	
			R	R	Q	R	R	*	F	I	
DE R49/99	DQ097393	CI I (6)	nd	G	-	-	G	-	*	L	V
GO1US DCKI	AY626266	CI I (6)	nd	E	-	-	E	-	*	L	V
Herts33/56 (PEI)	AY170140	H33 (w) ^b	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
Herts33 (L)	AY170138	H33 (w) ^c	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
Ulster/67	AY562991	I (1)	0,0	G	K	-	G	-	*	L	-
Ethiopie Panvac (2/P2)	AY175720	I (1)	0,0	G	K	-	G	-	*	L	-
PHY-LMV42/66	DQ097394	I (1)	0,0	G	K	-	G	-	*	L	-
Hitchner B1	AF309418	II (2)	0,2–0,5	G	-	-	G	-	*	L	-
La Sota	AF077761	II (2)	0,2–0,5	G	-	-	G	-	*	L	-
Zimbabwe AV862/95	AY175710	II (2)	nd	G	-	-	G	-	*	L	-
Zambia AV 72/95	AY175708	II (2)	nd	G	-	-	G	-	*	L	-
Mukteswar	EF201805	III (3a)	1,4	-	-	-	-	-	*	-	-
Guangxi5/2000	DQ485259	III (3a)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
Herts/33 (de Leeuw)	AY741404	IVea (3b)	1,99	-	-	-	-	-	*	-	-
BG 60–81	AF402129	IVea (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
BG 5–67	AF402104	IVbg (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
SIMF/64	AJ243390	IVbg (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
Soudan 72 AV 2203	AY135753	IVit (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
DE-191/77	AF525378	IVit (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
IT-48/68	AF297969	IVit (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
MA-307/77 ^c	EU604259	IV (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	V
MA-13/02 ^c	DQ096598	IV (3b)	nd	-	-	-	-	-	*	-	V
Tanzania AV 1300/95	AY175687	V (3c)	nd	-	-	-	K	-	*	-	V
Mexico468/01	EU518685	V (3c)	nd	-	-	-	K	-	*	-	V
Brasil AV1769/90	AY175649	V (3c)	nd	-	-	-	K	-	*	-	V
HR-111/01	AY150162	VI (4)	nd	K	-	-	K	-	*	-	-
Soudan SD-4/75	AY151384	VI (4)	nd	-	-	-	K	-	-	-	-
Egypte EG-3/87	AY150111	VI (4)	nd	-	-	-	K	-	-	-	-
DE 61/93	AY150135	VI (4)	nd	-	-	K	K	-	*	-	-
Strain NA	DQ659677	VII (5)	nd	-	-	-	K	-	*	-	-
MZ 13/94	AF136775	VII (5)	nd	-	-	-	K	-	*	-	-
Botswana ZA148/UP/98	AY210507	VII (5)	nd	-	-	-	K	-	*	-	-
South Africa ZA606/UP/00	AY210497	VIII (3d)	nd	-	-	-	K	-	*	-	-
Singapore SG-4H/65	AF136786	VIII (3d)	nd	-	-	-	K	-	*	-	V
F48E9	AY508514	IX (3e)	1,89	-	-	-	-	-	*	-	-
SBD02	DQ227252	IX (3e)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
TJ03	DQ227244	IX (3e)	nd	-	-	-	-	-	*	-	-
TW/69	AF083959	X (3f)	nd	-	-	-	K	-	*	-	-
TW/95-3	AF083970	X (3f)	1,68	-	-	-	K	-	*	-	-
MG-1992	HQ266603	XI (3g)	1,9	-	-	R	-	-	*	-	V
MG-725/2008	HQ266602	XI (3g)	1,9	-	-	R	-	-	*	-	V
MG-39-4/2008	HQ266605	XI (3g)	nd	-	-	R	-	-	*	-	V
MG-Meola/2008	HQ266604	XI (3g)	nd	-	-	R	-	-	*	-	V

^a: ICPI intracerebral pathogenicity index;

^b: Weybridge line [77];

^c: [8]. The isolates from Madagascar that were subjected to analysis in this work are in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0013987.t002

Class I	DE R49/99 (DQ097393)	(1601)	CGCTCGGTGATGACCCAG-ACCCTCCGCCCCCCATCGCAACTCA-----TCGCCGCACCAACAC	Old genotype	
	Ulster 2C/67 (AY562991)	(1601)	CCCAGCTTGCCCTCTATGAAATCATCCCAAATCCCCCGCTCGCACCC-----ACCCCTCCAGTCCGC		
	PHY-LM42 (DQ097394)	(1601)	CCAGCCTGCCCTCATGAAATCATCCCAAATTCCTGCTCGCACCC-----ACCTCTCAATTCGC		
Genotype I	99-0655 (AY935494)	(1601)	CCCAGTTTGTCTCTATGATATCATCCCAATTCTCCGCCACACCC-----ACCCCTCAATTCGC		
	I-2 (AY935499)	(1601)	CCAGCCTGCCCTATGAAATCCAACTCCCGTCTGCACCTC-----ACCACCGAATTCGC		
Genotype II	B1 (AF309418)	(1601)	CCAGCCTGCTTCTACAGAACATCCCAATGCTCTCACCCGTAGTGG-----ACCCCTCGAATTGC		
	La Sota (AF077761)	(1601)	CCAGCCTGCTTCCACAAAACATCCCAATGCTCTCACCCGTAGTGG-----ACCCCTCGAATTGC		
Genotype III	Mukteswar (EF201805)	(1601)	CTCAGCCTGCCCTCCATCGAATCATCTCGATTCTTCTGCCTGTAACT-----AACCCCTGGTCCAC		
Genotype IV	Herts/33 (AY741404)	(1601)	CCAGCTTGCCCTCCACAGGACCCACCCAACTCCCTGCCCCAACCCCCCATACCCCCCGACCCGC		
	Italie (EU293914)	(1601)	CCAGCCTGCCCTCCACAGGACCCACCCAACTCCCTGCCCCAACCC-----ACCCCTGATTCGC		
MG group	MG 725/08	(1544)	CCAGCCTGCCCTCCAGGACCCGCCAACTCCCCACCCAAACCCCCCCACACCCCCCAACACGC		Recent genotype
	MG-1992	(1535)	CCAGCCTGCCCTCCAGGACCCGCCAACTCCCTGCCCCAACCCCCCATACCCCCCGACCCGC		
Genotype V	US (FL) Largo71 (AY562990)	(1601)	CCAGCCTGCCCTCCACAGGACCCGCCAACTCCCGCCGGAACCCCTCCCTCACTCCCCGACCCAC		
Genotype VI	Dove Itali (AY562989)	(1601)	TTAGCCTGCCCTTCCACAGGACCCGCCAACTCCCGCCGGAACCCCTCCCAAAAATTCCCGGACCCAC		
	US(CA/1083/72 (AY562988)	(1601)	CCAGCCTGCCCTTCCACAGGACCCGCCAACTCCCGCCGGAATCTCCCAAACTCCCGGATTCAC		
Genotype VII	Guangxi9/2003 (DQ485230)	(1601)	CCAGCCTGCCCTTCCACAGGATCATGTCAAACCTCCCGCCAAACCCCTCCACACCCCTGACCCAC		
	SFO2 (AF473851)	(1601)	CCAGCCTGCCCTTCCACAGGATCAACAACCCCTCCCGCCAAACCCCTCCACACTCCCGGACCCAC		
	ZJ1 (AF431744)	(1601)	CCAGCCTGCCCTTCCACAGGACCCGCCAAACCCCGCCAAACCTCCCCACACTCCCGGACCCAC		

Figure 1. Alignment showing the inserted sequence at in the position 1647 in 5' non-coding region of NP gene.
doi:10.1371/journal.pone.0013987.g001

protein is composed of 571 aa and has the feature of virulent NDV strains [14,42,46,47]. In this study, different HN sequence strains pertaining to genotypes or subgenotypes available in Genbank (I to VII and IX) with different lengths were aligned with the MG group sequences (data not shown). The results showed that all the previously described neutralising epitopes ¹⁹³LSGCRDHS²⁰¹, R²⁶³, D²⁸⁷, K³²¹, GR³³³, DEQDYQIR³⁵³, K³⁵⁶, N⁴⁸¹, D⁴⁹⁴, ⁵¹³RITRVSSSS⁵²¹, G/D⁵⁶⁹ [48,49,50] are not modified in MG group strains. The three amino acid E⁴⁰¹, R⁴¹⁶, Y⁵²⁶ essential for receptor binding site [51,52] and the neuraminidase activity site represented by functional triarginyl cluster at positions ¹⁷⁴RI¹⁷⁵, R⁴¹⁶, R⁴⁹⁸, the amino acid sequence in region ²³⁴NRKSCSI/V/L²⁴⁰ [53] as well as the regions ³¹⁴FXXYGGV/L/M³²⁰ - ³⁹⁹GA/SEGRI/V/L⁴⁰⁵ involved in hemagglutinating activity [54], were likewise conserved in the MG strains. In addition, the MG strains have preserved the thirteen cysteines residues in the linear sequence of the ectodomain 123, 172, 186, 196, 238, 247, 251, 344, 455, 461, 465, 531, 542 [43] and the eleven sialic acid receptor binding sites R¹⁷⁴, I¹⁷⁵, E²⁵⁸, Y²⁹⁹, Y³¹⁷, E⁴⁰¹, R⁴¹⁶, R⁴⁹⁸, Y⁵²⁶, R⁵¹⁶, E⁵⁴⁷ [52]. Except the cysteine residue at position 123, all these amino acid cited before are located in the globular head on the HN spike. Otherwise, the analysis of HN amino acid sequences showed that the four MG strains contain also eleven specific amino acid residues that are different from those of any other NDV strain (Table 4). Seven of these A²⁴→V, T³⁴→V, L³⁹→I, E→V⁶², R→Q⁷⁸, M⁸¹→V and S⁹⁸→N are located in the 124 first N-terminal amino acids, including the cytomere (position 1 to 20), the transmembrane region (position 21 to 49) and the stalk (position 50 to 124) of HN protein. The four last characteristic amino acids E¹⁴⁷→D, R²⁶³→N, I³²⁸→T, R⁵³⁹→K are localized on the globular head of the protein (Figure 4). In addition, the MG-725/08 strain has six additional specific substitutions H³→R, T⁶⁴→S, V¹¹⁷→A, R³⁷⁷→K, A³⁸⁰→T and A⁵¹⁰→S when compared with the three other MG strains (Meola/08 MG 39-04/08 and MG-1992).

The analysis of recombination events by the RDP 3.0b software [34] was performed among Malagasy strains and other full sequences of APMV-1 of class II (genotypes I, II, III, IV, V, VI, VII and XI) and one strain of class I. No recombination events were detected in the Malagasy strains.

Discussion

In this study, complete genome or complete genes of F and HN proteins of four NDV strains isolated in Madagascar (MG group strains) were sequenced and analysed. These strains are the first

Madagascar isolates characterised at the molecular level. Among them, the strains MG 1992 and MG39-04/08, isolated in 1992 and 2008 respectively, were recovered from vaccinated chickens.

The salient findings of this work are the strong evidence that MG isolates constitute a new genotype closer to the old genotypes that were circulating 50 years ago and responsible for the first pandemic of ND in the world. The MG group strains are branched to the genotype IV cluster from which strains have never been detected since 2002. [12]. The partial sequence of the F gene (374 nt at positions 47 to 420) is regarded as a standard criterion for NDV genotyping of isolates present in various parts of the world [55]. Based on percentage of genetic divergence of this F gene fragment, the maximum intra-genotype nucleotide variations within any old genotype (below 7%) is lower than the minimum nucleotide distance found between these genotypes and the MG group (12% to 25%). This is clearly supporting that MG isolates are closely related to genotype IV but distant enough to constitute a new genotype or lineage, named here genotype XI or lineage 3g in reference to the two last genotypes IX [42] and X [14] (lineages 3e and 3f, respectively) identified in Asia. The cluster topology of the MG group strains based on the F gene was confirmed by the phylogenetic analysis based on full-genome sequences of two isolates of the MG group (MG-1992 and MG-725/08) and 86 other full-genome sequences belonging to different genotypes.

Whole genome sequencing of two MG strains revealed a genome size of 15,192 nucleotides meaning that this group has an insertion of six nucleotides into the 5' NCR of the nucleoprotein gene, characteristic of recent genotype strains. In addition, MG isolates have an arginine at position 114 (R¹¹⁴) of the F protein cleavage site found in some recent isolates but never in old strains. MG viruses have also a substitution V¹¹⁸→I, which is considered to be a feature of the genotype V [56,57] that belongs to the recent genotypes cluster. In contrast, MG isolates share a molecular substitution characteristic of old genotypes as E¹⁰⁴→G, in F protein [42,58]. Although Yu et al [58] claimed that E¹⁰⁴→G substitution caused a dramatic change responsible for the evolution of the old genotypes towards the recent genotypes, we do not found such mutation in the MG strains nor in the strains of genotypes IX and X, phylogenetically closer to the old genotypes. Moreover, the phylogenetic analysis based on full-genome sequences unexpectedly showed that the genotype IV, and the newly proposed genotype XI as well, are not branched in the "old genotypes" cluster (I, II, III, IX), as observed in phylogenetic trees constructed based on the 374 nt fragment of F gene. All together, our results can suggest that genotypes IV and XI are intermediates

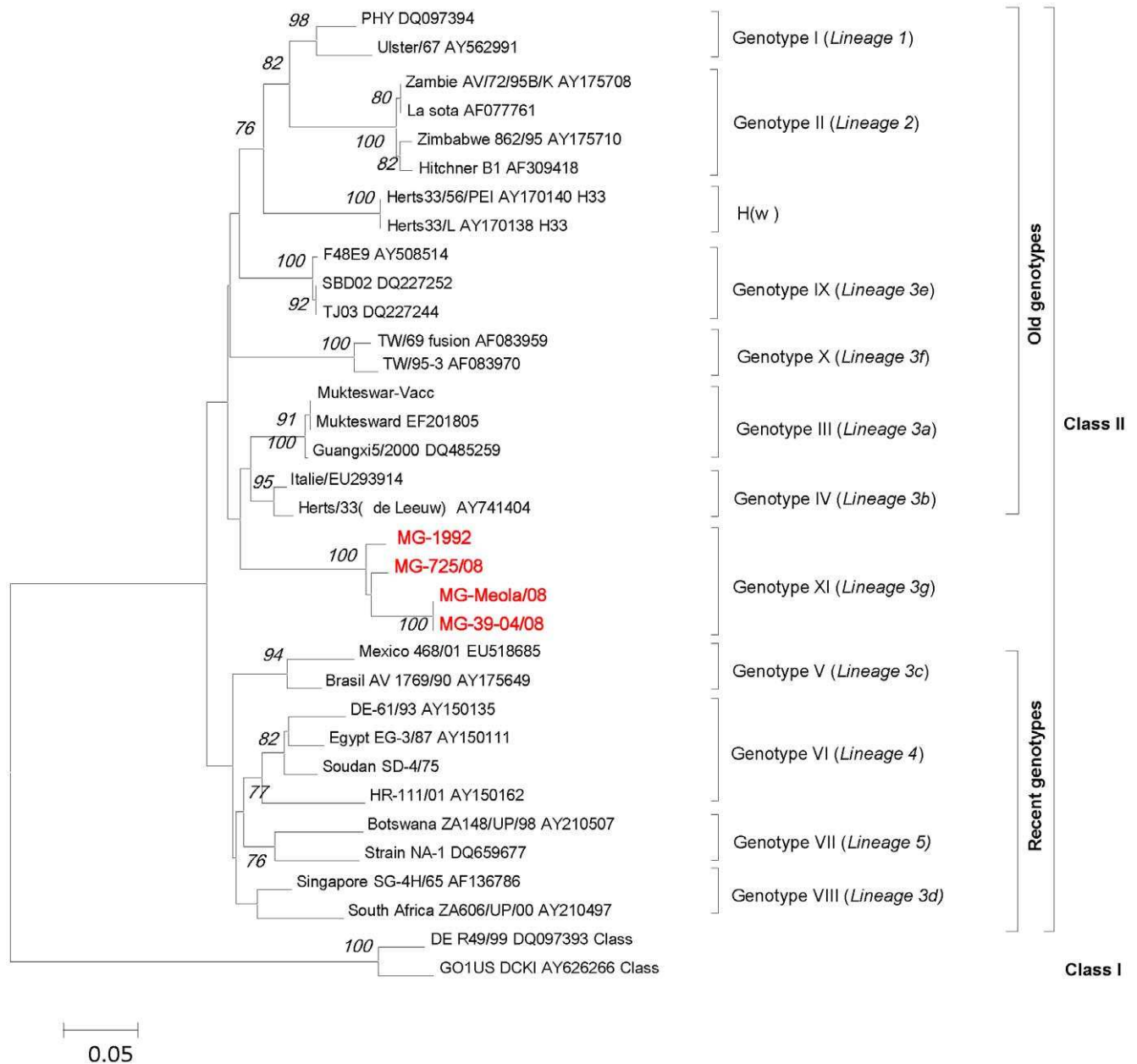


Figure 2. Phylogenetic tree (unrooted) of nucleotide sequences based on a 374-nt sequence (position 47–421 nt) of the F gene. Phylogenetic relationships of MG group strains with previously published sequences in Genbank. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [33]. All results are based on the pairwise analysis. Analyses were conducted using the Kimura 2-parameter method in MEGA4 [31,32] with 1,000 bootstraps [76]. The isolates from Madagascar that were subjected to analysis in this work are in bold and red. Genotype or lineage groupings are indicated on the right. doi:10.1371/journal.pone.0013987.g002

between old and new genotypes or that the current system of genotypes or lineages clustering based on the 374 nt fragment of F gene is probably inadequate to classify NDV isolates.

All MG isolates show the same fusion protein cleavage motif $^{112}\text{R-R-R-R-R}^*\text{F}^{117}$. To our knowledge, this atypical virulent-like cleavage site has never been reported before in APMV-1 strains. However, it is found in other paramyxoviruses (*Rubulavirus*) like the simian virus type 5 [45,59]. In addition, the presence of a phenylalanine at position 117 ($\downarrow\text{F}^{117}$) in the MG isolates was previously described as being a possible contributor to neurological effects [10]. Thereafter, the length of amino acid sequence of the

haemagglutinin-neuraminidase protein (571 aa) is also characteristic of virulent strains [46,60,61]. The prediction of virulence based on the F cleavage site pattern was confirmed by *in vivo* tests that has resulted in a high ICPI value (1.9), close to the maximum of 2, with the two strains tested (MG-1992 and MG-725/08). In spite of the established virulence of the MG-725/08 strain, it was recovered both from cloacal and tracheal swabs from an unvaccinated and apparently healthy chicken. However, the possibility that this chicken was sampled during the incubation period of the infection or was partially protected by a previous infection with an avirulent or vaccine strain that circulate in the field cannot be ruled out.

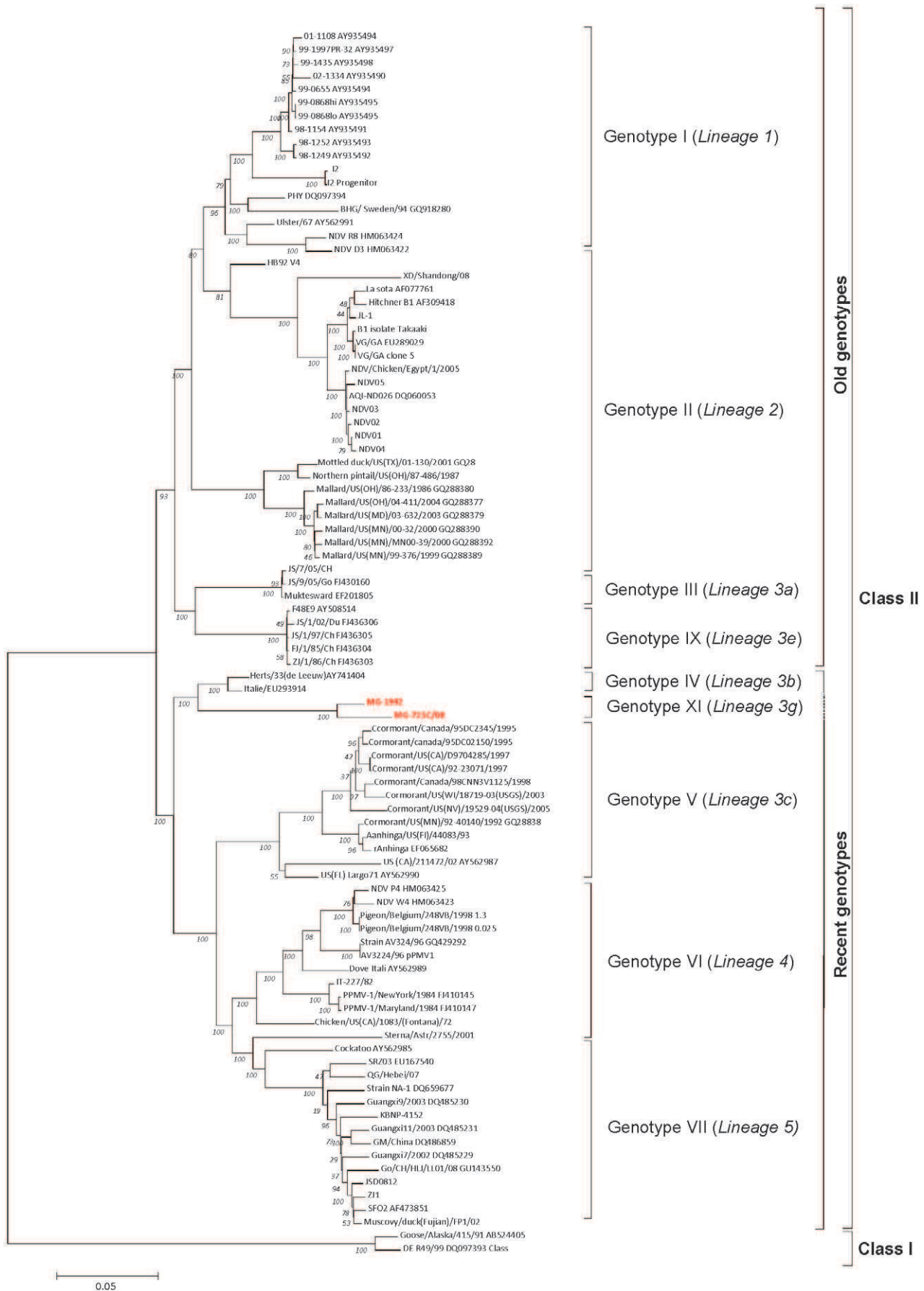


Figure 3. Phylogenetic tree of the nucleotide sequences based on a 14977nt (NP/P/M/F/HN/L genes). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [33]. All results are based on the pairwise analysis. Analyses were conducted using the Kimura 2-parameter method in MEGA4 [31,32] with 1,000 bootstraps [76]. The isolates from Madagascar that were subjected to analysis in this work are in blue [22]. Genotype and the lineage groupings are indicated on the right. doi:10.1371/journal.pone.0013987.g003

Based on neutralising tests and cross-protective analyses, it is accepted that APMV-1 exists as a single serotype [62]. Therefore, the genetic variations of the virus are not expected to result in vaccination failure. However, different levels of cross-protection have been observed in chickens vaccinated with the vaccine strain La Sota belonging to the genotype II and challenged with different wild-type strains [55]. Sporadic cases of ND in commercial farms vaccinated with this vaccine were previously reported in China [7,58], in southern California and adjacent states [63], in Mali [64], Cameroon, Nigeria and Burkina Faso [65]. Whether these observations are related to a reduction of vaccine efficacy or an improper vaccine use in the field remains unclear. It is however possible that NDV strains responsible for ND sporadic outbreaks in vaccinated chickens can escape the immune responses [16,18,66] and thus contribute to the emergence of new genotypes [42]. This vaccine failure has been announced by Alexander et al., [67] during the third panzootic of ND (1981–1983) in Europe in which the pigeons immunized with live NDV B1 vaccine were not well protected against pigeon paramyxovirus isolates (genotype VI). It is also known that the immune pressure imposed by the vaccination may be selecting virulent variant forms of NDV [68]. Many authors have demonstrated that current vaccines prevent disease but cannot stop viral shedding [47,63]. The NDV strains currently circulating (subgenotype VIIId prevalent in Asia, Europe and Africa) and the genotype XI predominant in Madagascar have a significant genetic distance (21% to 25%, respectively), with the widely used vaccine strain La Sota pertaining to the genotype II. These genetic differences and a consequent suboptimal vaccination may be responsible for sporadic cases of ND in vaccinated poultry flocks in Madagascar. In contradiction with

this, multiple sequence alignments of the four MG isolates made with several published sequences including the La Sota strains and HB1, members of genotype II (data not shown) revealed that all the neutralising epitopes identified so far and the predicted attachment receptor sites in the F and HN glycoproteins are conserved. However, all MG group strains possess fifteen and eleven original amino acid substitutions on F and HN proteins, respectively. Some of these substitutions occurred in the globular head of the proteins. Furthermore, 5 out of the 8 mutations in the head of the F protein are concentrated in a short invariable region at position 364–411, suggesting that the observed mutations are actually selected over time by the host immune responses. It is supposed that these substitutions should have resulted in antigenic drift and major changes in the protein conformation [69], particularly the changes in amino acid polarity as T³⁴→V, E⁶²→V in HN protein and S²⁴⁴→G in F protein. The HN/F protein interaction for fusion promotion involves the HN head region (aa 124 to 151) and the F protein heptad repeat 2 (HR2) at position 454 to 492 [70,71]. In these regions, the MG strains show amino acids substitutions at position E¹⁴⁷→D, K⁴⁷⁶→N of HN and F proteins, respectively. Morrison and Gravel [72] have demonstrated that amino acid substitutions in the head region domain of HN protein as L¹³³→I or A¹⁴⁰→L were responsible for an enhanced or diminished virus attachment activity, respectively. The possibility that other mutations like E¹⁴⁷→D e/or K⁴⁷⁶→N in the same or related functional region may also contribute to virulence or immune evasion cannot be ruled out. In addition, the MG isolates display other specific mutations, some of them affecting the head of HN. It is tempting to postulate that these modifications (F or HN genes) may play a role in virulence or

Table 3. Matrix estimate of genetic divergence (%) between nucleotide sequences (374 nt) of NDV strains.

Genotypes	XI	I	II	H(w)	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	CI***
XI	5*												
I	20**	7											
II	25	12	2										
H(w)	21	15	16	0									
III	15	12	17	15	1								
IV	12	12	17	15	6	7							
V	19	16	19	18	14	11	5						
VI	18	16	19	18	14	11	11	7					
VII	21	18	21	21	17	14	14	3	7				
VIII	22	17	20	17	14	13	11	12	15	9			
IX	15	13	17	14	10	9	14	14	17	16	1		
X	15	18	19	21	15	13	19	19	19	19	15	3	
CI	50	46	51	50	48	47	47	46	47	48	49	52	7

*Intragenotype or intrasubgenotype: Maximal value of Nucleotide genetic divergence.

**Intergenotype: Minimal value of genetic divergence.

***Class I.

All results are based on the pairwise analysis of 61 NDV sequences including the 4 MG isolates (genotype XI). The nucleic acid analyse were conducted using Kimura 2-parameter method in MEGA4 [31,78]. All positions containing alignment gaps and missing data were eliminated only in pairwise sequence comparisons (Pairwise deletion option). There were a total of 374 nt positions in the final dataset.

doi:10.1371/journal.pone.0013987.t003



Table 4. Residue substitutions specific in deduced F₀ protein and HN protein sequence of the MG group.

		<i>Consensus residue and its position</i>																								
		<i>In deduced F₀ protein sequence</i>												<i>in deduced HN protein sequence</i>												
		0	8	15	244	271	311	364	371	384	397	409	411	522	24	34	39	62	78	81	98	147	263	328	430	539
		-	R	L	G	M	T	S	M	M	T	S	N	A	V	V	I	V	Q	V	N	D	N	T	T	K
MG-1992		M	W	P	S	T	S	R	T	L	I	T	H	I	A	T	L	E	R	M	S	E	R	I	I	R
MG-Meola/08		M	W	P	S	T	S	R	T	L	I	T	H	I	A	T	L	E	R	M	S	E	R	I	I	R
MG-725/08		M	W	P	S	T	S	R	T	L	I	T	H	I	A	T	L	E	R	M	S	E	R	I	I	R
MG-39-04/08		M	W	P	S	T	S	R	T	L	I	T	H	I	A	T	L	E	R	M	S	E	R	I	I	R
<i>Old genotype</i>	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	A	-	-	-	-	-	-	-	
	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/I	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	
	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/I	-	-	A	-	-	-	-	-/k	-	-	
	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/I	-	-	-	-	-	-	-	G/S	-	-	
	IX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	
	X	-	-	L/Q	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
<i>Recent genotype</i>	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-/I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	
	VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/V	-	-/I	-	-	-	-/I	-	-	K	-	-		
	VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/G	-/I	-	-	-	-	-	-	K	-	-			
	VIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?		

? : Sequence not available.
doi:10.1371/journal.pone.0013987.t004

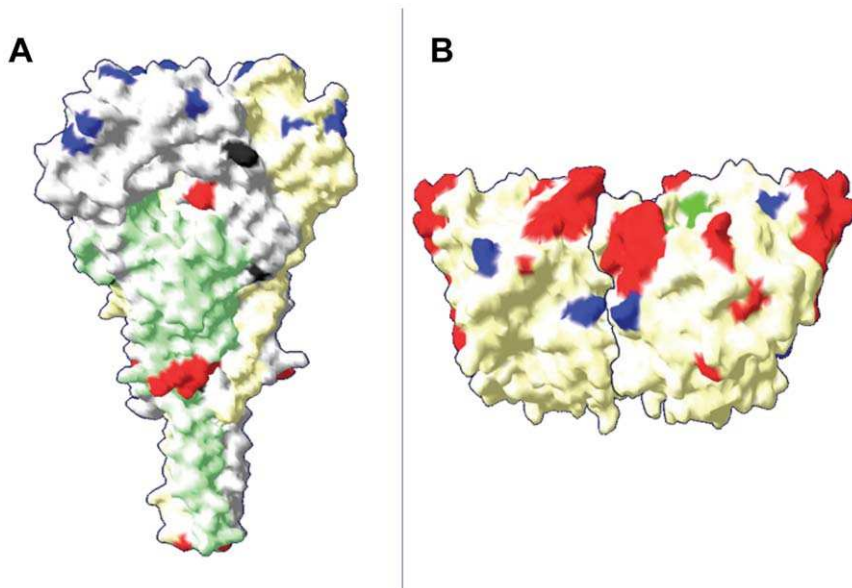


Figure 4. F-NDV trimer (a) and HN-NDV dimer (b) surface representations of the MG strains. The location of neutralising epitopes is shown in red, the amino acid substitutions specific to the MG group are in blue in the globular head and in black in the stalk region. The figures were generated by Swiss PDB-viewer, using the X-ray structure of NDV F protein, position 33aa to 454aa for F protein [45] and 124aa to 569aa for HN protein [51].

doi:10.1371/journal.pone.0013987.g004

emergence of escape mutants and finally the apparent lack of vaccine efficacy observed in the field.

The number of unique motifs found in all MG isolates, including the atypical F protein cleavage site R-R-R-R-R*F-V, also suggests a monophyletic origin of these viruses. Under this hypothesis, the maximum genetic variation observed within MG isolates (5%) is compatible with a divergence from a common ancestor over 50 years, considering that the rate of nucleotide change is approximately 1% per decade under natural field conditions in epizootic periods [12,57]. This scenario is in agreement with the first introduction of an old genotype of NDV in Madagascar in 1946. However, the higher genetic variation (12%) observed between the genotype XI and its closely related genotype IV suggests that the common ancestor of these two genotypes may have emerged several decades before the introduction of its virus progeny in Madagascar. As mentioned before, the accumulation of multiple aa substitutions in F or HN proteins may also result from the immune pressure that can contribute to increase the phylogenetic distance between the MG group and its progenitor genotype. The presence of this selection pressure at specific amino acid sites are recognised as adaptive evolution [47,73]. This abnormal evolution rate of genotype XI with regard to genotype IV may originate from combined characteristics of current poultry production systems including the commercial farm with host genetic homogeneity, intensive and/or improperly executed vaccination programs and backyard poultry breeding with high density of birds (allowing close animal-to-animal contact, and favouring transmission of highly virulent virus over milder forms) [74]. Moreover, high phylogenetic and antigenic distances between vaccines and circulating strains may facilitate the evolution of virulent NDV [75].

References

- Alexander D (2000) A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74: 3–13.
- Sinkovics JG, Horvath JC (2000) Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *Journal of Clinical Virology* 16: 1–15.

In conclusion, all four isolates from Madagascar were clustered in a new genotype XI, presumably deriving from an ancestor close to genotype IV introduced in the 50's and possibly resulting from a self-contained evolution due to geographical and ecological characteristics of this island. The particular evolution of genotype XI in Madagascar reinforces the idea that this island, known for its outstanding flora and fauna biodiversity, is also a unique “natural ecosystem” for micro-organisms. Other genotypes like genotypes I, II, III and VII were also detected in the island (data not shown). These genotypes may have been introduced more recently in the island, probably as a consequence of poultry import or use of live vaccine strains. The co-circulation of different genotypes at the same time and other introductions of new viruses in relation with the worldwide intensification of animal movements, may contribute in the future to dramatically increase the complexity of the situation.

Supporting Information

Table S1 Primers used in this study.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013987.s001 (0.07 MB DOC)

Table S2 Accession numbers of the sequences used in this study.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013987.s002 (0.12 MB DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OFM PG EA RSdA. Performed the experiments: OFM PG FXB DK RSdA. Analyzed the data: OFM PG FXB EA DK RL DM MK AAA VJ RSdA. Contributed reagents/materials/analysis tools: HRA VC RR JJR MK. Wrote the paper: OFM EA RSdA.

3. OIE (2009) Newcastle disease. Chapter 2.3.14. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees. Office International des Epizooties, Paris (May 2009). pp 576–589.
4. Mayo MA (2002) Virus taxonomy. Arch Virol 147: 1071–1076.
5. Mayo MA (2002) A summary of taxonomic change recently approved by ICTV. Arch Virol 147: 1655–1656.
6. Peeters BPH, Gruijthuisen YK, de Leeuw OS, Gielkens ALJ (2000) Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. Archives of Virology 145: 1829–1845.
7. Cho S-H, Kim S-J, Kwon H-J (2007) Genomic sequence of an antigenic variant Newcastle disease virus isolated in Korea. Virus Genes 35: 293–302.
8. Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O, et al. (2006) Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. Virus Research 120: 36–48.
9. Huang Z, Panda A, Elankumaran S, Govindarajan D, Rockemann DD, et al. (2004) The Hemagglutinin-Neuraminidase Protein of Newcastle Disease Virus Determines Tropism and Virulence. J Virol 78: 4176–4184.
10. Kattenbelt JA, Meers J, Gould AR (2006) Genome sequence of the thermostable Newcastle disease virus (strain I-2) reveals a possible phenotypic locus. Veterinary Microbiology 114: 134–141.
11. Herczeg J, Wehmann E, Bragg RR, Travassos Dias PM, Hadjiev G, et al. (1999) Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. Archives of Virology 144: 2087–2099.
12. Czeglédi A, Eacute, Di A, Herczeg J, Hadjiev G, et al. (2002) The occurrence of five major Newcastle disease virus genotypes (II, IV, V, VI and VIII) in Bulgaria between 1959 and 1996. Epidemiology and Infection 129: 679–688.
13. Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ (2003) A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathology 32: 239–257.
14. Tsai H-J, Chang K-H, Tseng C-H, Frost KM, Manvell RJ, et al. (2004) Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. Veterinary Microbiology 104: 19–30.
15. Bogoyavlenskiy A, Berezin V, Prilipov A, Usachev E, Lyapina O, et al. (2005) Molecular Characterization of Virulent Newcastle Disease Virus Isolates from Chickens during the 1998 NDV Outbreak in Kazakhstan. Virus Genes 31: 13–20.
16. Wang Z, Liu H, Xu J, Bao J, Zheng D, et al. (2006) Genotyping of Newcastle Disease Viruses Isolated from 2002 to 2004 in China. Annals of the New York Academy of Sciences 1081: 228–239.
17. Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, et al. (2007) Phylogenetic Diversity among Low-Virulence Newcastle Disease Viruses from Waterfowl and Shorebirds and Comparison of Genotype Distributions to Those of Poultry-Origin Isolates. J Virol 81: 12641–12653.
18. Liu H, Wang Z, Wu Y, Zheng D, Sun C, et al. (2007) Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. Journal of Virological Methods 140: 206–211.
19. Lien Y-Y, Lee J-W, Su H-Y, Tsai H-J, Tsai M-C, et al. (2007) Phylogenetic characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan during 2003–2006. Veterinary Microbiology 123: 194–202.
20. Alexander DJ (2003) Newcastle disease virus, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Disease of poultry, 11th ed. YM Saif, HJ Barnes, JR Glisson, AM Fadly, LR McDougald, DE Swayne. Iowa State University Press Ames, IA. pp 63–87.
21. Gotoh B, Ohnishi Y, Inocencio NM, Esaki E, Nakayama K, et al. (1992) Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. J Virol 66: 6391–6397.
22. Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordany A, Kaleta EF, et al. (1998) Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). Arch Virol 143: 49–64.
23. Herczeg J, Wehmann E, Bragg RR, Travassos Dias PM, Hadjiev G, et al. (1999) Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. Arch Virol 144: 2087–2099.
24. Abolnik CHR, Bisschop SP, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ (2004) A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. Archives of Virology 149: 603–619.
25. Yang CY, Shieh HK, Lin YL, Chang PC (1999) Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (genotype VII) from recent outbreaks in western Europe. Avian Dis 43(1): 125–130.
26. Rajaonarison JJ (1991) Production de vaccin contre la maladie de Newcastle à Madagascar. PANVAC Debre Zeit Addis Ababa. pp 135–137.
27. Koko M, Maminiana OF, Ravaomanana J, Rakotonindrina S (2006) Aviculture villageoise à Madagascar : enquête épidémiologique. In Improving farmyard poultry production in Africa: interventions and their economic assessment. TECDOC-1489. AIEA, Vienne. pp 157–163.
28. Maminiana OF, Koko, Ravaomanana J, Rakotonindrina SJ (2007) Epidémiologie de la maladie de Newcastle en aviculture villageoise à Madagascar. Rev Sci Tech Off Int Epi 26: 691–700.
29. Zou J, Shan S, Yao N, Gong Z (2005) Complete Genome Sequence and Biological Characterizations of A Novel Goose Paramyxovirus-SF02 Isolated in China. Virus Genes 30: 13–21.
30. Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl Acids Res 25: 4876–4882.
31. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596–1599.
32. Kimura S, Hatakeyama M, Konagaya A (2004) Inference of S-system Models of Genetic Networks from Noisy Time-series Data. Chem-Bio Informatics Journal 4: 1–14.
33. Saitou, Nei (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406–425.
34. Martin S, Sambade A, Rubio L, Vives MC, Moya P, et al. (2009) Contribution of recombination and selection to molecular evolution of Citrus tristeza virus. J Gen Virol 90: 1527–1538.
35. Huovilainen A, Ek-Kommonen C, Manvell R, Kinnunen L (2001) Phylogenetic analysis of avian paramyxovirus 1 strains isolated in Finland. Archives of Virology 146: 1775–1785.
36. Meulemans G, Berg TPvd, Decasstecker M, Boschmans M (2002) Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. Avian Pathology 31: 515–519.
37. Terregino C, Cattoli G, Grossele B, Bertoli E, Tisato E, et al. (2003) Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. Avian Pathology 32: 63–68.
38. Ujvári D, Wehmann E, Kaleta EF, Werner O, Savic V, et al. (2003) Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. Virus Research 96: 63–73.
39. Lee YJ, Sung HW, Choi JG, Kim JH, Song CS (2004) Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in South Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. Avian Pathology 33: 482–491.
40. Toyoda T, Sakaguchi T, Imai K, Inocencio NM, Gotoh B, et al. (1987) Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of newcastle disease virus. Virology 158: 242–247.
41. Yusoff K, Nesbit M, McCartney H, Meulemans G, Alexander DJ, et al. (1989) Location of Neutralizing Epitopes on the Fusion Protein of Newcastle Disease Virus Strain Beaudette C. J Gen Virol 70: 3105–3109.
42. Liu XF, Wan HQ, Ni XX, Wu YT, Liu WB (2003) Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985–2001. Archives of Virology 148: 1387–1403.
43. Seal BS (2004) Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. Functional & Integrative Genomics 4: 246–257.
44. Panda A, Elankumaran S, Krishnamurthy S, Huang Z, Samal SK (2004) Loss of N-Linked Glycosylation from the Hemagglutinin-Neuraminidase Protein Alters Virulence of Newcastle Disease Virus. J Virol 78: 4965–4975.
45. Chen L, Gorman JJ, McKimm-Breschkin J, Lawrence LJ, Tulloch PA, et al. (2001) The Structure of the Fusion Glycoprotein of Newcastle Disease Virus Suggests a Novel Paradigm for the Molecular Mechanism of Membrane Fusion. 9: 255–266.
46. Romer-Oberdorfer A, Werner O, Veits J, Mebatsion T, Mettenleiter TC (2003) Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. J Gen Virol 84: 3121–3129.
47. Miller PJ, Kim LM, Ip HS, Afonso CL (2009) Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. Virology 391: 64–72.
48. Iorio RM, Glickman RL, Riel AM, Sheehan JP, Bratt MA (1989) Functional and neutralization profile of seven overlapping antigenic sites on the HN glycoprotein of Newcastle disease virus: monoclonal antibodies to some sites prevent viral attachment. Virus Research 13: 245–261.
49. Iorio RM, Syddall RJ, Sheehan JP, Bratt MA, Glickman RL, et al. (1991) Neutralization map of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus: domains recognized by monoclonal antibodies that prevent receptor recognition. J Virol 65: 4999–5006.
50. Yusoff K, Nesbit M, Samson ACR, Emmerson PT (1988) Location of epitopes within the haemagglutinin-neuraminidase (HN) protein of newcastle disease virus by sequencing the HN genes of monoclonal antibody-resistant mutants. Virus Research 11: 12–12.
51. Crennell S, Takimoto T, Portner A, Taylor G (2000) Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. Nat Struct Mol Biol 7: 1068–1074.
52. Connaris H, Takimoto T, Russell R, Crennell S, Moustafa I, et al. (2002) Probing the Sialic Acid Binding Site of the Hemagglutinin-Neuraminidase of Newcastle Disease Virus: Identification of Key Amino Acids Involved in Cell Binding, Catalysis, and Fusion. J Virol 76: 1816–1824.
53. Jorgensen ED, Collins PL, Lomedico PT (1987) Cloning and nucleotide sequence of newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase mRNA: Identification of a putative sialic acid binding site. Virology 156: 12–24.

54. Lamb RA, Kolakofsky D (1996) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. In *Fundamental Virology*. Philadelphia: Lipincott–Raven. pp 1177–1204.
55. Qin Z, Xu H, Ouyang W, Wang Y, Wang L, et al. (2008) Correlation of the neutralization index in chicken embryo with the homologies of F and HN gene of different Newcastle-disease isolates. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 48: 226–233.
56. Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordány A, Kaleta EF, et al. (1998) Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology* 143: 49–64.
57. Wehmann E, Ujvári D, Mazija H, Vehlner M, Ciglar-Grozdanic I, et al. (2003) Genetic analysis of Newcastle disease virus strains isolated in Bosnia-Herzegovina, Croatia, Slovenia and Yugoslavia, reveals the presence of only a single genotype, V, between 1979 and 2002. *Veterinary Microbiology* 94: 269–281.
58. Yu L, Wang Z, Jiang Y, Chang L, Kwang J (2001) Characterization of Newly Emerging Newcastle Disease Virus Isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *J Clin Microbiol* 39: 3512–3519.
59. Millar NS, Chambers P, Emmerson PT (1986) Nucleotide sequence analysis of the haemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 67(Pt 9): 1917–1927.
60. OIE (2004) Newcastle disease.» Chapter 2.1.15. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees*. Office International des Epizooties, Paris (2004). pp 270–282.
61. Ujvári D, Wehmann E, Kaleta E, Werner O, Savic V, et al. (2003) Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. *Virus Res* 96: 63–73.
62. Alexander DJ, Manvell RJ, Lowings JP, Frost KM, Collins MS, et al. (1997) Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol* 26: 399–418.
63. Kapczynski DR, King DJ (2005) Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23: 3424–3433.
64. Servan de Almeida R, Maminiaina OF, Gil P, Hammoumi S, Molia S, et al. (2009) Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus? *Vaccine* 27: 3127–3129.
65. Snoeck C, Ducatez M, Owoade A, Faleke O, Alkali B, et al. (2009) Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Archives of Virology* 154: 47–54.
66. Qin Z, Sun L, Ma B, Cui Z, Zhu Y, et al. (2008) F gene recombination between genotype II and VII Newcastle disease virus. *Virus Research* 131: 299–303.
67. Alexander DJ, Russell PH, Parsons G, Elzein EMEA, Ballouh A, et al. (1985) Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons - an international collaborative study. *Avian Pathology* 14: 365–376.
68. Miller PJ, Decanini, EduardoLucio, Afonso, Claudio L (2010) Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 26–35.
69. Xu M, Chang S, Ding Z, Gao HW, Wan JY, et al. (2008) Genomic analysis of Newcastle disease virus strain NA-1 isolated from geese in China. *Archives of Virology* 153: 1281–1289.
70. Gravel, Morrison (2003) Interacting Domains of the HN and F Proteins of Newcastle Disease Virus. *J Virol* 77: 11040–11049.
71. Zaitsev V, von Itzstein M, Groves D, Kiefel M, Takimoto T, et al. (2004) Second Sialic Acid Binding Site in Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase: Implications for Fusion. *J Virol* 78: 3733–3741.
72. Gravel KA, Morrison TG (2003) Interacting domains of the HN and F proteins of newcastle disease virus. *J Virol* 77: 11040–11049.
73. Han G-Z, He C-Q, Ding N-Z, Ma L-Y (2008) Identification of a natural multi-recombinant of Newcastle disease virus. *Virology* 371: 54–60.
74. Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL (2009) Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution*. doi:10.1016/j.meegid.2009.09.012.
75. Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL (2007) Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 25: 7238–7246.
76. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
77. Czeglédi A, Wehmann E, Lomniczi B (2003) On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33. *Avian Pathology* 32: 271–276.
78. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.

ANNEXE 4

ROLE OF THE TRADING NETWORK IN THE DIFFUSION OF NEWCASTLE DISEASE
IN THE LAKE ALAOTRA REGION, MADAGASCAR: A SOCIAL NETWORK ANALYSIS.

H. RASAMOELINA ANDRIAMANIVO, R. DUBOZ, R. LANCELOT, O.F. MAMINIAINA,
M. JOURDAN., T.M.C. RAKOTONDRAMARO, S.N. RAKOTONJANAHARY, R. SERVAN
DE ALMEIDA, P. GIL, E. ALBINA, D. MARTINEZ, RAKOTONDRAVAO AND
V. CHEVALIER

SUMMARY

First reported in 1946, Newcastle disease (ND) is one of the major constraints of poultry farming in Madagascar. The trading network is thought to be the major pathway for transmission of this disease. This study aimed to describe the poultry commercial network in the Lake Alaotra region and assess the potential role of its components and its structure in the diffusion of ND virus. Several methods were combined to acquire data: classical survey, participatory epidemiology and disease surveillance. Social network analysis methods were used to analyze data. Network topology was scale-free, with 347 nodes and 1448 links. Hierarchical clustering showed six classes of nodes which were associated with ND outbreaks ($p=0.004$).

The originality of this study was having an almost complete network in developing countries with a measure of diseases. This is the first step of analysis, further studies would concern modelling the dynamics of ND within network taking into account virus strains which circulate.

INTRODUCTION

Newcastle disease (ND) is an infectious and highly contagious disease due to Newcastle disease virus (NDV) namely avian paramyxovirus type 1 (APMV-1) which belongs to the family of *Paramyxoviridae* and of genus *Avulavirus*. It affects several wild and domestic bird species but chickens are among those which are most sensitive. It is still one the major constraints to the development of poultry farming in a developing country.

The poultry industry holds an important place in Madagascar. According to Food and Agriculture Organization of the United Nations, there are 34.4 million domestic poultry (FAOSTAT, 2008), most of them being in smallholder production systems representing two-thirds of the rural population (Ocean Consultant, 2004). ND was first reported in Madagascar in 1946 (Rajaonarison, 1991). Well controlled by vaccination in industrial production, it causes high mortality in smallholder production systems. A study undertaken in 1999 in the peri-urban area of Antananarivo, the capital, showed that ND was responsible for 44% of poultry mortality

· Rasamoelina Andriamanivo H. FOFIFA-DRZV Rue Farafaty Ampandrianomby Antananarivo Madagascar. Email: harena23@yahoo.fr

(Maminiana et al, 2007). Besides ND, two avian pathogens are known to circulate in Madagascar: *Pasteurella multocida*, the agent responsible of fowl cholera (FC) and avian influenza virus (AIV). A study undertaken by Porphyre (1999) determined that 14.9% (n=204) of chickens and 2.9% (n=175) of palmipeds showed serological evidence of AIV circulation. The same study (Porphyre, 1999) determined a seroprevalence rate of FC at 70.6% (n=187) in chickens and 25% (n=140) in palmipeds. FC and ND are registered as priority diseases by the national veterinary services. Leading to high morbidity and mortality rates with very similar clinical signs, these three diseases may be easily confounded in the field and the respective clinical impact of these 3 diseases remain unevaluated.

In Madagascar, the poultry industry related to smallholder production systems is complex, involving different types of actors in relation with each other: farms, collectors, live-birds markets and consumers. Farms can be classified according to their commercial practices (contact with collectors and markets). Some collectors are linked to farms where they buy poultry, collecting point and/or markets. Markets could be classified according to their size which is closely related to their administrative level (village market, municipal market, regional market and market in the capital). Generally, locally bred poultry are slaughtered at home by the consumer who buys directly from a market or eat their own birds.

The Role of the trading network or one of its components (e.g. market) in spreading AIV (Kung et al, 2003; Liu et al, 2003; Senne et al, 2003; Trock et al, 2003; Webster, 2004; Garber et al, 2007; Amonsin et al, 2008; Dent et al, 2008; Van Kerkhove et al, 2009; Yee et al, 2009; Soares Magalhães et al, 2010) and NDV (Kung et al, 2003; Sánchez-Vizcaíno et al, 2010) has already been established. In Madagascar, it is empirically hypothesised by poultry stakeholder that commercial network is the major pathway for transmission of ND and/or FC. In Madagascar, a typology study performed in the Lake Alaotra region (data not published) showed that farms could be described and classified according to a combination of risk factors including commercial practices, breeding types and environmental vicinity and that the risk of infection by NDV was statistically linked to some of these factors.

The aim of this study is to describe the poultry commercial network in Lake Alaotra region, analyze its structure and assess the potential role of its components and this structure in the diffusion of NDV.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study area is a landlocked region in the middle-eastern Madagascar. This is the basin of Lake Alaotra, the largest wetland area in Madagascar. It is contained in the centre, at 750 meters above sea level, 23.000 hectares (ha) of swamps, over 70.000 ha of rice paddies and 20.000 ha of open water (Ferry et al, 2009). The whole area is surrounded by hills reaching over 1300 metres of altitude. In the east it is bordered by the rainforest and in the west there are vast sparsely populated plateaus. The main channel of communication with the outside is the main road that connects with Andilamena in the north and with other regions of the island in the south. However, the region is densely populated because of the importance of agriculture and livestock.

The poultry population is high, estimated at 1.260.000 in 2001 (Andilamena included), with the largest population of domestic geese in Madagascar (UPDR/MAEP, 2003). Poultry flows are

important within the region. Exchanges with the outside are formed mainly by the supply of the largest port city on the island (Toamasina) and the capital (Antananarivo). Trade with Andilamena in the north, which is also a very isolated area, and the east and west could be considered as negligible. Finally 35 municipalities in Ambatondrazaka and Amparafaravola districts were included in the study area. Only two municipalities of Amparafaravola (Tanambao-Besakay and Soalazaina) were excluded because they were far from other municipalities and have negligible connections with them.

Network Data collection

Two methods have been combined to collect data and to get a trading network as complete as possible. Firstly, a questionnaire survey involving professional traders was carried out from December 2009 to July 2010. Professional traders buy and sell poultry permanently (throughout the year) or temporarily. This group includes collectors (or middlemen) and stallholders in markets. A list of all known live poultry markets and collection points was established and all of them were visited. In each market or collection point, all identified traders were included in the survey. The questionnaire included questions about the origin and/or destination of poultry, frequencies of activity, number of birds treated and flow variation during year.

In a second step, a participatory approach (Jost et al, 2007) was conducted from December 2009 to November 2010. This survey involved the community animal health worker (CAHW) of the region and the chiefs of fokontany. Fokontany are administrative units constituted by one or some neighboring villages. The CAHW are farmers elected by the members of their village and trained for several weeks by “Agronomes et Vétérinaires Sans Frontières” (AVSF, a nongovernmental organization) for basic care, to help veterinarians providing a local service to farmers. Each of them is in charge of two or three fokontany. However, the network of CAHW has worked with only 60% of existing fokontany. To complete data and to compare answers, chiefs of fokontany in every municipality - the municipality being the administrative unit constituted by several fokontany- were asked to participate to the survey. Meetings were organized with them in collaboration with the local officials such as Mayors. For every municipality and CAHW’s association, two meetings were conducted. Network data targeted concerned villagers trading practices: the places where they usually buy and sale their poultry. After announcement of general subject i.e. trading network and poultry diseases, meeting always began with an open discussion. Individual semi-structured interview (SSI) and focus group were organized after the open discussion to focus on targeted data. Before its validation, all information collected by individual SSI was discussed again in focus groups. Our knowledge of the study area combined with direct observation and secondary data from literature were also used. At the final stage, triangulation was done to validate each data point. It consisted of allowing time for collecting all information from different sources (informants, literature and direct observation) and cross-checking them, at final stage, to correct any uncertainty or variations amongst responses.

Disease occurrence

Disease occurrence was recorded using two different methods: the above mentioned participatory epidemiology (Jost et al. 2007) and the second was a classical disease surveillance network. The same outbreak definition, established at the beginning of the study, was used for both methods. The targeted disease of interest was ND so “outbreak” declaration was validated when the following conditions were met: in at least two farms in a village there was an acute mortality (more than 30% of birds in flocks), or continual mortality (at least one bird per day

during three days), with nervous signs (e.g. torticollis) and/or respiratory or gastrointestinal signs (diarrhoea). However, this case definition cannot differentiate ND from FC and avian influenza so RT-PCR was performed from brain and/or cloacal and tracheal swabs. Fokontany were chosen as the epidemiological unit so each fokontany was considered infected if there was at least one village within it where an outbreak occurred during the study period.

Poultry diseases were the second topic during participatory meetings. Participants described: (i) occurrence of poultry diseases in their fokontany since December 2009 and (ii) the clinical signs associated with each disease. All declarations were registered but an assessment of correspondence with outbreak definition was done after each meeting before validating each declaration as an outbreak.

The disease surveillance network of ND was implemented in collaboration with local veterinary services. The surveillance started in December 2009. CAHW or the chief of each fokontany declared, by phone, when there was outbreak. Correspondence with outbreak definition was assessed and a mobile team went to collect data and samples when a declaration was validated. Sample size targeted within each outbreak was at least 10 birds to obtain an absolute accuracy of 5% with a threshold prevalence rate of 30% (Thrusfield et al, 2001). During sampling, priority was given to diseased or recently deceased birds (less than one day). Implementation of surveillance network depended on collaboration of CAHW and chiefs of fokontany. It started in December 2009 with only CAHW on the south and east sides of the lake. It covered the whole study area in July 2010 after several meetings to convince the chiefs of fokontany and the other CAHW.

Data analysis

A social network analysis method (Wasserman and Faust, 2009) was used to describe and analyze the network in R 2.12 software (R Development Core Team, 2010). As data directions of links were known, a network with directional relations was computed. Outbreaks detected by participatory epidemiology were used in statistical analysis and proportion of outbreaks detected by the classical disease surveillance and confirmed by laboratory analysis was used to investigate specificity of declaration from fields.

Definition of network elements: Farms were grouped per village because poultry within villages share same environment and contact with trading network. According to our field knowledge, it was assumed that people in neighboring villages (fokontany) go to the same places to buy or to sell poultry. As it was impossible to get data for every village, fokontany were chosen as the epidemiological unit and node. Villages which were far from the other villages of its fokontany were considered as an independent fokontany or were put into the nearest fokontany. Ties were all movements (human with poultry) connecting fokontany. In addition to poultry farms, there were, live birds market inside some fokontany (with a maximum of one market per fokontany). Farms located within these fokontany were likely to be more exposed to commercial exchanges. This characteristic was used as an attribute of nodes. The occurrence of an outbreak within fokontany was considered also as an attribute. Destination, or only receiver nodes, which were located outside the study area were withdrawn from the analysis.

Network parameters, topology and outbreak occurrence: To describe the network, centrality parameters (degree, betweenness), clustering coefficient and density were first calculated. Their values and the distribution of degree explained the topology of the network. Simplified

definitions of these parameters, in accordance with those already given in literature (Martínez-López et al, 2009; Wasserman and Faust, 2009), could be given:

- (i) Degree is a measure of centrality of each node. It represents the number of ties connected with node. For directed network, there are three kinds of degree: the indegree is the number of ties received by node; the outdegree is the number of ties sent by node and the freeman degree is the sum of both in and out degree.
- (ii) Betweenness is another centrality measure of node. It represents a measure of how a node lies in the middle of two other nonadjacent nodes. It means that a path which connects the two nonadjacent nodes has to pass through the node between them.
- (iii) Clustering coefficient is an indicator of the importance of clusters present in network. It measures the sum of the proportion of nearest neighbouring nodes that are directly connected.
- (iv) Density measures the proportion of observed contacts compared with all possible contacts among nodes. It indicates how the network is connected.

To assess the potential link between the occurrence of an outbreak and the centrality parameters of nodes, generalized linear models were implemented where the dependant variable was the occurrence or not of an outbreak in the nodes and explanatory variables were the centrality parameters. Since nodes were not independent, each parameter was tested individually. To assess the significance of model coefficients, random permutation tests were performed. Several random permutations of the matrix were done and coefficients of models were calculated for each permutation. The proportion of coefficients which were higher than for the observed matrix was calculated. The coefficient was considered as significant when this proportion was smaller than 5%.

Positional analysis and outbreak occurrence: Positional analysis consists on simplifying the network data set. This simplification consists on classifying nodes within positions identified by their structural equivalence. Two nodes are structurally equivalent if they are identically tied to and from all other nodes in the network (Wasserman and Faust, 2009). The following steps were performed for positional analysis and its association with outbreak occurrence:

- (i) Measure of structural equivalence with euclidean distance.
- (ii) Representation of network positions which consisted on partitioning nodes into classes where each class was constituted by structurally equivalent nodes. Partition of nodes was performed using hierarchical clustering of matrix of euclidean distances calculated above. Ward's algorithm was used to aggregate nodes into class thus minimizing within-class dissimilarity and maximizing between-classes dissimilarity. The output of hierarchical clustering was a dendrogram or tree diagram which represents the series of partition. A cut-off level within the tree diagram was chosen to get interpretable and realistic classes. Description of obtained classes was done using values of centrality parameters and attributes within each class.
- (iii) The association among nodes characteristic (according to clustering) and occurrence of outbreak was assessed by comparing the number of outbreak among classes using chi squared test.

RESULTS

The participatory approach concerned 40 CAHW and 35 municipalities in the study area. Two-hundred and thirty-one traders were interrogated on 21 markets and 20 collection points. Disease surveillance network recorded and investigated 35 outbreaks in 27 fokontany but the participatory approach revealed 134 outbreaks. Up to now, samples from 17 fokontany were assessed in the lab and 15 fokontany were confirmed to be infected with ND which corresponded to 18 outbreaks confirmed out of 24 assessed.

Network topology

Three-hundred and forty-seven nodes and 1448 links were identified. Fig 1 shows the network structure. There is no isolate node and some nodes are more connected than others, so it is a connected and heterogeneous network, meaning that the majority of nodes are weakly linked and few nodes are highly linked with others. The distribution of degrees follows a power law distribution (Fig 2). Table 1 shows network parameters and a clustering coefficient that is low (0.11). This network heterogeneity with the power law distribution of degrees and the low clustering coefficient confirmed that the avian commercial trade network of the Lake Alaotra region is a scale-free network (Barabási and Albert, 1999).

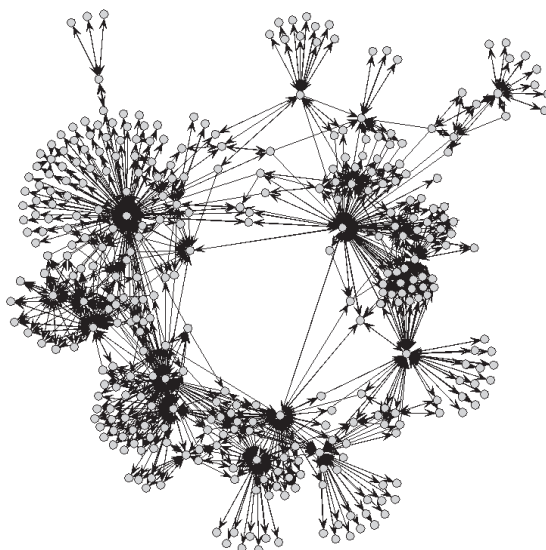


Fig. 1 Structure of the network of poultry commercial trade in the Lake Alaotra region. Madagascar

Table 1. General parameters of network

PARAMETERS	VALUES
Number of nodes	347
Number of links	1448
Clustering coefficient	0.11
Density	0.01
Average degree	8.35
Average betweenness	775.97

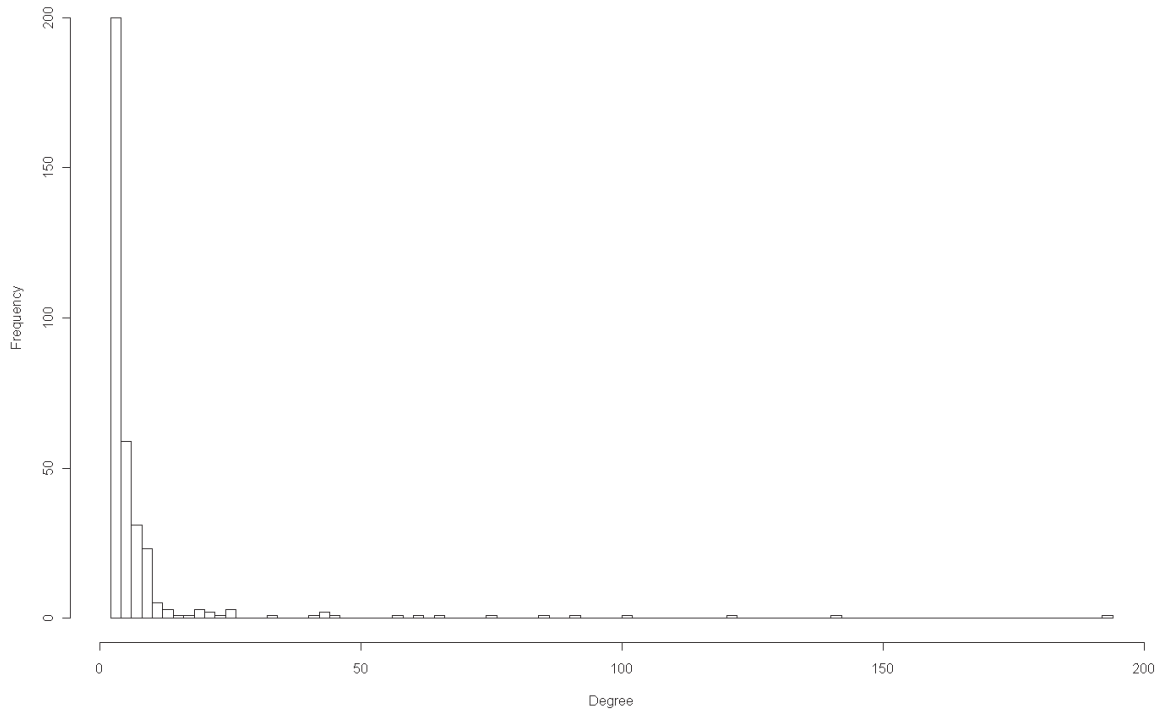


Fig. 2 Distribution of degree per nodes

Centrality measures and outbreak occurrence

Table 2 shows coefficients of each centrality parameter from binary logistic models and the related p-values from permutation tests. None of the parameters were significant indicating that occurrence of outbreak was not linearly associated with the logit of centrality parameters.

Table 2. Centrality parameters coefficients from logistic models

PAREMETERS	COEFFICIENTS	P-VALUE
Freeman degree	0.005	0.18
Indegree	0.008	0.24
Outdegree	0.015	0.12
Betweenness	$< 10^{-4}$	0.29

Hierarchical clustering and outbreak occurrence

Fig 3 shows the dendrogram from hierarchical clustering according to structural equivalence which was measured by euclidean distance. The horizontal line indicates a cut-off level putting in the same cluster all branches below. Six clusters were retained and table 3 shows their description in terms of different parameters.

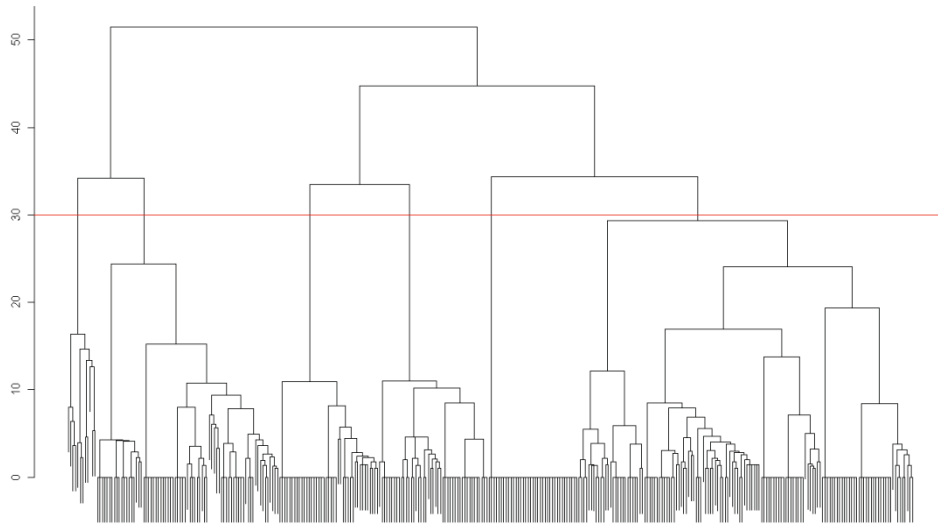


Fig. 3 Dendrogram of nodes representing assembling nodes by structural equivalence

Table 3 shows the description of clusters according to centrality parameters and attribute values. According to centrality parameters there was a hierarchy of their values among classes. Class 4 included the most connected nodes with highest betweenness and degree. All of them had big market (market 1) inside explaining this intensity of poultry commercial exchanges. It was the smallest class in terms of number of nodes inside but they were the hubs of the network. The second most connected class was class 6. There were some big markets and this class ranked second with 74 nodes. These two classes were those where outbreaks occurred more frequently during the period of study. Third place in terms of centrality was taken by class 3. It is the most common class with 138 nodes. 12% of them had small market inside. Frequency of outbreak was lower than the two former classes but it was still high with 41% of nodes infected. In terms of centrality, class 1 and class 5 were comparable. However, although there were more nodes having a big market inside in class 1, the frequency of outbreaks seemed to be lower than class 5. The last and the most peripheral class was the class 2. Its average betweenness was 0 meaning that none of the nodes of this class were necessary to connect two other nonadjacent nodes. However, the frequency of outbreak was higher than in class 1.

Chi-squared test comparing occurrence of outbreak, recorded by participatory epidemiology, among classes was highly significant ($p= 0.004$). It means that occurrence of outbreak was associated with position of nodes within the network.

Table 3. Cluster centrality parameters and outbreak occurrence

CLASS	NUMBER OF NODES	BETWEENNESS	FREEMAN DEGREE	INDEGREE	OUTDEGREE	FREQUENCY OF MARKET 1*(%)	FREQUENCY OF MARKET 2*(%)	FREQUENCY OF OUTBREAK (%)
1	41	55.6	5.5	2.6	2.9	5	7	22
2	37	0.0	2.5	1.5	1.0	0	5	27
3	138	203.0	5.0	2.3	2.7	3	12	41
4	12	17384.8	89.3	47.8	41.5	100	0	50
5	45	34.4	4.6	2.1	2.5	0	7	29
6	74	389.2	8.2	4.0	4.2	8	3	54

*Market 1: Biggest markets with regular presence of poultry trading.

*Market 2: Small markets with irregular presence of poultry trading.

DISCUSSION

In recent years, network analysis has increased its relevance in studying disease spread within complex inter-connected structures (Berthélemy et al, 2004; Berthélemy et al, 2005; Eames et al, 2008). There is also an increase in interest for this method in veterinary epidemiology (Martínez-López et al, 2009) and there were several studies about avian influenza and ND which used this method (Dent et al, 2008; Van Kerkhove et al, 2009; Soares Magalhães et al, 2010). However, in contrast to developed countries where there are generally good registration systems, there is a lack of data in developing countries making acquisition of network structures difficult. Consequently, most studies are based on a small sample of the population with resultant questions about validity of results. The originality of this study is that it was undertaken in an isolated area where it was possible to get almost complete network data combined with disease measures.

The combination of participatory approach and classical survey allowed the collection of a large set of data. It is safe to assume that almost 100% of existing nodes of this network were identified. As mentioned above, the study area is landlocked. Connections that directionally link the network with nodes located outside of the considered area as an output were withdrawn from analysis since it was assumed that they did not influence the circulation of a given pathogen. Other connections with external area could be considered as negligible because they were rare and included isolated villages outside the study area (i.e. in north, west and east). Apart from vaccination against ND and FC, which are facultative, there were no official control measures taken against these diseases even if an outbreak occurred. So, there was no modification of the network structure during an outbreak. Also, a survey of professional traders revealed that the flows of poultry they sell and frequency of activity change within year but places where they buy or sell poultry do not change. As the network was not valued, i.e. flows or poultry quantity exchanged were not considered, these cited modifications do not affect the network structure. This suggests that the structure of the network is stable considering the one year time-scale of study.

Results of this study show an important occurrence of poultry disease outbreak confirming their economic impact. The number of outbreaks declared corresponds to 37% of fokontany. But it should be remembered that there were several villages in each fokontany and it was declared as infected as soon as one village became infected. It means that at least 132 villages were infected.. It should be noted that the type of network identified (i.e. scale-free) is favourable for spreading pathogens (Barthélemy et al, 2004; Barthélemy et al, 2005).

Participatory epidemiology and formal disease surveillance network did not detect the same number of outbreaks. This is likely to be due to sequential implementation of the formal disease surveillance network. Furthermore, several meetings were necessary to encourage network compliance and to improve outbreak declaration from the observation posts. In addition, as field agents who declared cases were the same as those implicated in participatory approach, all outbreaks declared in formal surveillance were also declared during participatory meeting. Confidence was obtained after several meetings, during the participatory approach, so they could provide a complete list of outbreaks. The problem was that as diseased birds were not always seen by the mobile team, validation of outbreak declaration depended on clinical signs declared by Chiefs of fokontany or CAHW. Even if field's agents had a good knowledge of these diseases, it was impossible to distinguish ND, FC and avian influenza on the sole basis of clinical signs. Laboratory confirmation was necessary but this was only possible for samples from the formal disease surveillance. Thus, there was a lack of sensitivity for formal disease

surveillance and a lack of specificity for participatory surveillance. A total of 15 fokontany out of 17 were confirmed infected after laboratory analysis implying that field agents had a good knowledge of disease and the outbreak definition was good. Without having means to get perfect data, both methods were complementary because participatory surveillance gave the overall importance of the three diseases and formal surveillance provided information on ND virus outbreaks. This study confirmed the relevance of using participatory epidemiology in developing country, as already shown elsewhere (Jost et al, 2007).

Results from logistic models and comparison of outbreaks within classes seem to be a paradox because none of the coefficients from logistic models was significant but the number of outbreaks was significantly different among classes. However, logistic models have just considered the centrality position of nodes without taking into account the way in which each node was connected to others nodes in the network. It appeared that this was not sufficient to explain the differences among nodes. Justly, hierarchical clustering was based on structural equivalence of nodes i.e. nodes that held the same position in the network (Wasserman and Faust, 2009) were classified in the same cluster. These nodes were interchangeable because they were linked with the same other nodes. However, description of classes revealed that there was a hierarchy of values of centrality parameters among clusters. Finally, it appeared that there was a highly significant association between positions of nodes in the network and occurrence of outbreak. Centrality parameters were not linearly correlated to the outbreak occurrence (more precisely to its link function) but these were still important indicators when coupled with the positions of network in the network.

This study is the first step of analyzing these data. Further analysis would permit the setting up of targeted disease surveillance by identifying the appropriate nodes. Furthermore, integration of values of links, virus strains and temporality of events (outbreaks and links) within each year would enable the modelling of diseases dynamics within the network and to simulate the effects of realistic control measures.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CAHW and local authorities, especially the chiefs of fokontany who participated to the study, Veterinary Services for their contributions in disease surveillance, and finally all other members of field and laboratory team.

This work was supported by the French Ministry of Foreign and European Affairs, project FSP GRIPAVI (Ecology and epidemiology of avian influenza in southern countries).

REFERENCES

- Amonsin A, Choatrakol C, Lapkuntod J, Tantilertcharoen R, Thanawongnuwech R, Suradhat S. (2008). Influenza virus (H5N1) in live bird markets and food markets, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* 14(11):1739–42.
- Barabási, A.L., Albert R. (1999): Emergence of scaling in random networks. *Science* 286, 509–512.

- Barthélemy Barrat A.M., Pastor-Satorras R., Vespignani A. (2005). Dynamical patterns of epidemic outbreaks in complex heterogeneous networks. *Journal of Theoretical Biology*. 235 275–288
- Barthélemy, M., Barrat, A., Pastor-Satorras, R., Vespignani, A. (2004). Velocity and hierarchical spread of epidemic outbreaks in scale-free networks. *Phys. Rev. Lett.* 92, 178701.
- Dent J, Kao R, Kiss I, Hyder K, Arnold M. (2008). Contact structures in the poultry industry in Great Britain: exploring transmission routes for a potential avian influenza virus epidemic. *BMC Vet. Res.* 4:27.
- Eames, K.T.D. (2008). Modelling disease spread through random and regular contacts in clustered populations. *Theor. Popul. Biol.* 73, 104–111.
- FAOSTAT (2008). FAO Statistics Division. Tech. rep. FAO.
- Ferry, L., Mietton, M., Robison, L., Erismann, J. (2009). Lac Alaotra à Madagascar – Passé, présent et futur. *Z. Geomorph. N. F.* 53, 299-318.
- Garber, L., Voelker, L., Hill, G., Rodriguez, J. (2007). Description of live poultry markets in the United States and factors associated with repeated presence of H5/H7 low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis.* 51 (1), 417-420.
- C.C. Jost , J.C. Mariner , P.L. Roeder , E. Sawitri , G.J. Macgregor-Skinner. (2007). Participatory epidemiology in disease surveillance and research *Rev. sci. tech. OIE.*, 26 (3), 537-547
- Kung, N.Y., Guan, Y., Perkins, N. R., Bissett, L., Ellis, T., Sims, L., Morris, R.S., Shortridge, K.F., Peiris, J. S.M. (2003). The impact of a monthly rest day on avian influenza virus isolation rates in retail live poultry markets in Hong Kong. *Avian Dis.* 47 (3), 1037-1041.
- Liu M., He S., Walker D., Zhou N., Perez D.R., Mo B., Li F., Huang X., Webster R.G., Webby J.R. (2003). The influenza virus gene pool in a poultry market in south central China. *Virology*, 305(2):267–275.
- Maminiana, O.F., Koko, M., Ravaomanana, J., Rakotonindrina, S.J. (2007). Epidémiologie de la maladie de Newcastle en aviculture villageoise à Madagascar. *Rev. sci. tech. OIE.* 26 (3), 691-700.
- Martínez-López B., Perez A. M. and Sánchez-Vizcaíno J. M. (2009). Social Network Analysis. Review of General Concepts and Use in Preventive Veterinary Medicine. *Transboundary and Emerging Diseases.* 56.109–120
- Ocean Consultant. (2004). Filière aviculture traditionnelle. In *Filières de l'agriculture, de l'élevage et de la pêche*. Ministère de l'Agriculture de l'Élevage et de la Pêche de Madagascar (UPDR/MAEP).
- Porphyre, V. (1999). Enquête séro-épidémiologique sur les principales maladies infectieuses des volailles à Madagascar. *DESS Productions Animales en Régions Chaudes*. CIRAD Montpellier.

- R Development Core Team. (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0.
- Rajaonarison, J.J. (1991). Production de vaccin contre la maladie de Newcastle à Madagascar. Newcastle Disease or Rural Africa. In *Proceedings of a workshop. Debre Zeit, Addis Ababa Ethiopia*, 135-137.
- Sánchez-Vizcaíno F., Perez A., Lainez M.; Sánchez-Vizcaíno J.M.(2010). Quantification of the risk for introduction of virulent Newcastle disease virus into Spain through legal trade of live poultry from European Union countries. *Avian Pathology* 39(6), 459-465
- Senne D.A., Suarez D.L., Pederson J.C., Panigrahy B.(2003) Molecular and biological characteristics of H5 and H7 avian influenza viruses in live bird markets of the northeastern United States. *Avian Dis.* 47, 898–904.
- Soares-Magalhães R.J., Ortiz-Pelaez A., Thi K.L.L., Dinh Q.H., Otte J., Pfeiffer D.U. (2010). Associations between attributes of live poultry trade and HPAI H5N1 outbreaks: a descriptive and network analysis study in northern Vietnam. *BMC Veterinary Research* 6:10
- Thrusfield, M., Ortega, C., and Noordhuizen, J.P.(2001). WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148 (18), 567-572.
- Trock S.C., Senne D.A., Gaeta M., Gonzalez A., Lucio B. (2003). Low-pathogenicity avian influenza viruses in live bird markets—what about the livestock area. *Avian Dis.* 47, 1111–13.
- UPDR-MAEP (2003). Monographie de la région d’Ambatondrazaka. Unité de Politique pour le Développement Rural. Ministère de l’Agriculture, de l’Elevage et de la Pêche Madagascar.
- Van-Kerkhove M.D., Vong S., Guitian J., Holl D., Mangtani P., San S., Ghani A.C. (2009). Poultry movement networks in cambodia: implications for surveillance and control of highly pathogenic avian influenza (HPAI/H5N1). *Vaccine*, 27(45), 6345–6352.
- Wasserman, S. and Faust K.(2009). *Social Network Analysis: Methods and Applications*, p. 825. Cambridge University Press, Cambridge.
- Webster R.G.,(2004). Wet markets—a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? *The Lancet.* Vol 363
- Yee K.S., Carpenter T.E., Farver T.B., Cardona J.C.(2009). An evaluation of transmission routes for low pathogenicity avian influenza virus among chickens sold in live bird markets. *Virology*, 394(1), 19–27.

ANNEXE 5

Listes des oiseaux sauvages au lac Alaotra

Familles	Espèces	Noms vernaculaires
PODICIPPEDIDAE	<i>Tachybaptus ruficollis</i>	Vivy
PODICIPPEDIDAE	<i>Tachybaptus pelzelni</i>	Vivy
PODICIPPEDIDAE	<i>Tachybaptus rufalovatus</i>	Vivy
PHALACROCORACIDAE	<i>Phalacrocorax africanus</i>	Razamboay
ANHINGIDAE	<i>Anhinga melanogaster</i>	Vano
ARDEIDAE	<i>Ixobrychus minutus</i>	Voromalemy
ARDEIDAE	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Goaka rano
ARDEIDAE	<i>Ardeola ralloides</i>	Mpiandrivotatatra
ARDEIDAE	<i>Ardeola idea</i>	Mpiandrivotatatra
ARDEIDAE	<i>Bubulcus ibis</i>	Vorompotsy
ARDEIDAE	<i>Butorides striatus</i>	Vorompatsika
ARDEIDAE	<i>Egretta ardesiaca</i>	Salobokomana
ARDEIDAE	<i>Egretta dimorpha</i>	Vanofotsy
ARDEIDAE	<i>Casmeridius albus</i>	Vanofotsy
ARDEIDAE	<i>Ardea purpurea</i>	Vanomena
ARDEIDAE	<i>Ardea cinirea</i>	Vano
ARDEIDAE	<i>Ardea humbloti</i>	Vorompasika
COCONIIDAE	<i>Mycteria ibis</i>	Voronomby
COCONIIDAE	<i>Anastomus lamelligerus</i>	Mijoha
COCONIIDAE	<i>Plegadis falcinellus</i>	Famakisifotra
TITONIDAE	<i>Tito alba</i>	Tararaka
STRIGIDAE	<i>Asio capensis</i>	Vorondolo
CAPRIMULGIDAE	<i>Caprimulgus madagascariensis</i>	Matoriandro
ALCEDINIDAE	<i>Corythornis vintsioides</i>	Vintsy
MEREOPIDAE	<i>Merops superciliosus</i>	Tsikirikirioka
HIRUNDINIDAE	<i>Riparia paludicola</i>	Sididina
HIRUNDINIDAE	<i>Phedina borbonica</i>	Sididina
TURDIDAE	<i>Saxiola torquata</i>	Fitatra
SYLVIIDAE	<i>Acrocephalus newtoni</i>	Vorombaratra

SYLVIIDAE	<i>Nesillas typica</i>	Lavasalaka
SYLVIIDAE	<i>Cisticola cherina</i>	Adibo
DICRURIDAE	<i>Dicrurus forficatus</i>	Dronga
PLOCEIDAE	<i>Foudia madagascariensis</i>	Fody
PLOCEIDAE	<i>Lonchura nana</i>	Tsikiry
CICONIIDAE	<i>Platalea alba</i>	Sotrobe vava
ANATIDAE	<i>Dendrocygna bicolor</i>	Tahia
ANATIDAE	<i>Dendrocygna viduata</i>	Tsiriry
ANATIDAE	<i>Sarkidiornis melanotos</i>	Arosy
ANATIDAE	<i>Nettapus auritus</i>	Vorontsara
ANATIDAE	<i>Anas melleri</i>	Angaka
ANATIDAE	<i>Anas erythrorhynca</i>	Menamolotra
ANATIDAE	<i>Anas hottentonta</i>	Kazazaka
ANATIDAE	<i>Aythia inonata</i>	Onjy
ANATIDAE	<i>Thalassorus leuconotus</i>	Damanona
PANDIONIDAE	<i>Milvus migrans</i>	Papango
FALCONIDAE	<i>Falcon newtoni</i>	Hitsikitsika
FALCONIDAE	<i>Falcon eleonora</i>	Firasambalala
FALCONIDAE	<i>Falcon concolor</i>	Fandrasambary
PHASIANIDAE	<i>Conturnis conturnix</i>	Papelika
RALLIDAE	<i>Rallus madagascariensis</i>	Kitsiakely
RALLIDAE	<i>Dryolimnas cuvieri</i>	Kitsiabe
RALLIDAE	<i>Porzana pusila</i>	Birindrano
RALLIDAE	<i>Gallinula chloropus</i>	Akohondrano
RALLIDAE	<i>Porphyryla alleni</i>	Talevana
RALLIDAE	<i>Porphyrio porphyrio</i>	Talevambe
RALLIDAE	<i>Fulica cristata</i>	Otrika
JACANIDAE	<i>Actophilornis albinucha</i>	Piritsy
ROSTRALUDAE	<i>Rostratula benghalensis</i>	Tatoka
RECURVIROSTRIDAE	<i>Himantopus himantopus</i>	Tsakaranta
GLAREOLIDAE	<i>Glareola ocularis</i>	Vorombato

CHARADRIIDAE	<i>Charadrius hiaticula</i>	Vorombato
CHARADRIIDAE	<i>Charadrius pecuriarius</i>	Viky-viky
CHARADRIIDAE	<i>Charadrius tricollaris</i>	Vorombato
SCOLAPACIDAE	<i>Numenius phaeopus</i>	Mantazazana
SCOLAPACIDAE	<i>Tringa nebularia</i>	Mantazazana
SCOLAPACIDAE	<i>Actitis hypoleucos</i>	Mantazazana
SCOLAPACIDAE	<i>Gallinago macrodactyla</i>	Harakaraka
SCOLAPACIDAE	<i>Calidris feruginea</i>	Harakaraka
LARIDAE	<i>Larus cirrocephalus</i>	Goakarano
STERNIDAE	<i>Chlidonias hybridus</i>	Samby
CUCULIDAE	<i>Centropus toulou</i>	Toloho

Oiseaux sauvages capturés et analysés dans cette étude

* : Endémique à Madagascar

Document Durrell Wildlife Conservation Trust Lac Alaotra

RESUME

Nom: MAMINIAINA Olivier Fridolin

Titre: Caractérisation des virus de la maladie de Newcastle (APMV-1), circulant sur les hauts plateaux de Madagascar

La maladie de Newcastle (MN) est une maladie infectieuse des volailles essentiellement les gallinacées. L'agent causal de cette maladie est une forme virulente des paramyxovirus aviaires type 1 (APMV-1). Les APMV-1 sont des virus à ARN négatif monocaténaire non segmenté, dans la famille des Paramyxoviridae, genre *Avulavirus*. Le génome de ce virus code pour six protéines structurales dont l'ARN polymérase ARN-dépendant (L gène), la hémagglutinine-neuraminidase (gène de HN), la fusion (gène de F) et les protéines de matrice (gène de M), la phosphoprotéine (gène de P) et la nucléoprotéine (gène du NP). Avant les résultats menés dans le cadre des activités de cette étude, les APMV-1 sont classifiés phylogénétiquement en deux classes (I et II). Les souches responsables des épizooties de la MN, en générale, appartiennent à la classe II qui est encore subdivisé en dix génotypes différents (I à X). Actuellement, les souches dans le génotype VII sont les plus prévalentes en Asie, en Europe et en Afrique. A Madagascar, depuis la première description de la MN en 1946, aucune donnée phylogénétique et moléculaire sur les souches d'APMV-1 apathogène et virulente circulantes n'est disponible. Pourtant, cette maladie est l'une des majeures contraintes de l'aviculture.

Au cours de cette étude, des échantillons sériques, écouvillonnages et organes, provenant des oiseaux sauvages et des volailles domestiques de deux sites d'étude (lac Alaotra et Antananarivo) de 2008 à 2010, ont été récoltés et analysés. Des analyses biologiques d'épreuve virulente et de test de pathogénicité ont été faites pour déterminer la pathogénicité des souches isolées et aussi pour élucider les cas sporadiques de la MN dans l'élevage de poulet type commercial qui ont vacciné leurs volailles.

Les résultats sérologiques, virologiques, phylogénétique ainsi que moléculaires obtenus nous ont montré l'existence des souches d'APMV-1 virulentes et apathogènes appartenant à quatre génotypes I, III, VII et XI différents, circulant dans les trois compartiments et inter-compartiment des avifaunes aquatiques (compartiment I) et des volailles domestiques (compartiment II et III). Ces analyses phylogénétiques et moléculaires montrent que les souches isolées dans le génotype III, dans le compartiment I, ont dérivé probablement des souches vaccinales Mukteswar.

Pour les cas des souches dans le génotype I, l'analyse des résultats montre l'existence des souches apathogènes co-circulant dans les trois compartiments I, II et III. Cependant, aucune souche virulente n'a été isolée jusqu'à maintenant dans le compartiment des oiseaux sauvages (III).

Cette étude a montré que les différentes souches APMV-1 virulentes, responsables des foyers de la maladie de Newcastle dans les deux sites d'étude aussi bien dans les élevages de volaille type villageoise que les cas sporadiques dans les élevages de type commercial, appartiennent à un nouveau cluster. Ces souches dans ce nouveau cluster que nous avons appelé génotype XI, possèdent des multiples substitutions spécifiques par rapport aux autres génotypes. Parmi ces spécifiques substitutions sont le site de clivage type virulente inédite formé par 5 arginines ($^{112}RRRRR\downarrow F^{117}$) et la présence de double codon d'initiation (ATGATG \rightarrow $^0MM^1$) sur la protéine de fusion (F).

L'épreuve vaccinale avec les souches La Sota, Hitchner B1 et Mukteswar, réalisée sur des poulets de race local (FOFIFA/DRZV - Antananarivo) avec la souche MG-1992 (IPIC=1,9 – génotype XI) et avec des poulets EOPS avec la souche MG-725/08 (IPIC=1,9 – génotype XI) par rapport à une souche de référence européenne Herts/33 (ANSES – Ploufragan France) montrent que les poulets sont protégés contre la morbidité et mortalité mais n'ont pas contre l'excrétion virale par voie oropharyngien.

Mots clés : Maladie de Newcastle - APMV-1 - Avulavirus – Phylogénie – QRT-PCR – isolement virale - épreuve vaccinale

Encadreurs : Renata SERVAN De ALMEIDA, Patricia GIL

Laboratoires : FOFIFA/DRZV (Antananarivo –Madagascar); Laboratoire de Virologie UMR15 CIRAD-Montpellier (France); ANSES (Ploufragan - France)

ABSTRACT

Nom: MAMINIAINA Olivier Fridolin

Titre: Caractérisation des virus de la maladie de Newcastle (APMV-1), circulant sur les hauts plateaux de Madagascar

Newcastle disease (ND) is a high contagious disease of poultries, especially chickens. The causative agent of this disease is a virulent form of the avian paramyxovirus type 1 (APMV-1). The genome of APMV-1 comprises a single stranded negative sense RNA that encodes the RNA-dependent RNA polymerase (L gene), the haemagglutinin-neuraminidase (HN gene), the fusion (F gene) and matrix (M gene) proteins, the phosphoprotein (P gene) and the nucleoprotein (NP gene). This virus belongs to the genus *Avulavirus* within family Paramyxoviridae. Before the results carried out within the framework of the activities of this study, the APMV-1 are classified phylogenetically in ten different genotypes. Now, strains within genotype VII are currently more prévalentes in Asia, Europe and Africa. In Madagascar, since the first description of ND in 1946, no data is available concerning phylogenetic and molecular study of circulating APMV-1 apathogenic strain or virulent strain.

During this study, sera, cloaca/tracheal swabs or tissus from wild birds or domestic poultry of two area of this study (lake Alaotra and Antananarivo), were collected and analyzed. We assessed also the ability of the NDV vaccines based on the La Sota, Hitchner B1 or Mukteswar strains to protect chickens with the currently isolated pathogenic strain.

The results serologic, virological, phylogenetic as molecular obtained showed us the existence of the strain of virulent or apathogenes APMV-1 belonging to four different genotypes I, III, VII and XI, circulating in the three compartments and inter-compartment of the watery avifaunas (compartment I) of the lake Alaotra and domestic poultry (compartment II and III). The phylogenetic and molecular analyses showed that the strain isolated into genotype III, in compartment I, was probably derived from the vaccine strain Mukteswar. For the cases of the strain in genotype I, the analysis of the results shows the existence of apathogenes strain Co-circulating in three compartments I, II and III. However, no virulent strain was isolated until now in the compartment (III) from in the wildwater birds. This study showed that the various virulent strain of APMV-1, responsible, as well the epizootic case of ND in the two area of study in the village poultry as the sporadic cases in the commercial poultry, belong to a new cluster. These strain of APMV-1 in this new cluster which we called genotype XI, have a multiple specific substitutions compared to other genotypes. Among these specific substitutions are the clivage site formed by 5 arginines ($^{112}RRRRR\downarrow F^{117}$) and the presence of two initiations codons (ATGATG \rightarrow^0MM^1) on the fusion (F).

The vaccine test with the stocks Sota, Hitchner B1 and Mukteswar, carried out on local race of chickens (FOFIFA/DRZV - Antananarivo) with strain MG-1992 (IPIC=1,9 - genotype XI) and with EOPS chickens with strain MG-725/08 (IPIC=1,9 - genotype XI) compared to European reference Herts/33 strain (ANSES - Ploufragan France) showed that the chickens are protected from morbidity and mortality but not protected against shedding challenged virus belonged to genotype XI by oropharynx way.

Mots clés : *Newcastle Disease - APMV-1 - Avulavirus- Phylogény - QRT-PCR - isolement virale - challenge vaccinal*

Encadreurs : Renata SERVAN De ALMEIDA, Patricia GIL

Laboratoires : Virology laboratory of FOFIFA/DRZV (Antananarivo -Madagascar) ; Virology laboratory of UMR15 CIRAD-Montpellier (France) and Virology laboratory of; ANSES (Ploufragan - France)
