

Table des matières

REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	5
TABLE DES MATIERES	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	16
LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION	18
PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : PRODUCTION ET MALADIES RESPIRATOIRES DU POULET EN AFRIQUE DE L'OUEST	19
1. LA PRODUCTION DE POULET EN AFRIQUE DE L'OUEST	20
1.1. PRODUCTION AVICOLE DANS L'UEMOA (UNION ECONOMIQUE ET MONETAIRE OUEST AFRICAIN)	20
1.2. PRODUCTION AVICOLE AU TOGO, AU BENIN ET EN COTE D'IVOIRE	21
2. LES AFFECTIONS RESPIRATOIRES VIRALES DU POULET	23
2.1. PRINCIPAUX VIRUS RESPIRATOIRES AVIAIRES	23
2.2. LE VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE (IBV)	23
2.2.1. Le virus de la bronchite infectieuse (IBV)	23
2.2.2. Formes cliniques de la bronchite infectieuse	25
2.2.3. Les souches d'IBV	26
2.2.4. Epidémiologie de la bronchite infectieuse dans le monde et en Afrique	28
2.3. LE VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE (NDV)	29
2.3.1. Etiologie de NDV	29
2.3.2. Formes cliniques de la maladie de Newcastle	31
2.3.3. Souches virales de NDV	32
2.3.4. Epidémiologie de NDV dans le monde et en Afrique	35
DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES	37
1. ETUDE DE LA PREVALENCE D'IBV, NDV, ILTV ET AIV AU TOGO ET AU BENIN EN 2011	38
1.1. MATERIELS ET METHODES	38
1.1.1. Extraction d'ADN/ARN	38
1.1.2. (RT)-PCR	39
1.1.2.1. Présentation	39
1.1.2.2. Application	40
1.2. RÉSULTATS	41
1.3. DISCUSSION	45
2. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE SOUCHES IVOIRIENNES DU VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE	46
2.1. MATERIELS ET METHODES	46
2.1.1. PCR de contrôle	46
2.1.2. Purification	47
2.1.3. Séquençage	47
2.2. RESULTATS	49
2.3. DISCUSSION	50

3. EVALUATION DE L'EFFICACITE DU VACCIN H120 CONTRE UNE SOUCHE AFRICAINE DU VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE.....	50
3.1. MATERIELS ET METHODES.....	51
3.1.1. Amplification du virus sur œufs embryonnés	51
3.1.1.1. Infection.....	52
3.1.1.2. Récolte du liquide allantoïque	53
3.1.2. Etude vaccinale	55
3.1.2.1. Formation des lots	55
3.1.2.2. Infection et écouvillonnages	56
3.1.2.3. (RT)-PCRq.....	56
3.1.2.4. Sérologie.....	57
3.2. RESULTATS	57
3.3. DISCUSSION.....	59
CONCLUSION.....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	62
ANNEXE 1 : POSTER SYMPOSIUM TOULOUSE-MUNICH-SARRAGOSSE 2013.....	64
ANNEXE 2 : AVIAN INFLUENZA SURVEILLANCE IN CENTRAL AND WEST AFRICA, 2010–2014, T. Fuller and al. 2014.....	65
ANNEXE 3 : PREVALENCE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS AND INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS IN AVIAN INFLUENZA NEGATIVE BIRDS FROM LIVE BIRD MARKETS AND BACKYARD AND COMMERCIAL FARMS IN IVORY-COAST, A. V. Kouakou and al. 2015.....	73

Liste des figures

Figure 1 : (a) : Photo de coronavirus observés au microscope électronique (d'après ENS-Lyon.fr); (b) : représentation schématique d'un coronavirus (d'après Graham et al [11]).....	24
Figure 2 : Organisation génomique des coronavirus (d'après Dong et al, [13]).....	25
Figure 3 : Représentation schématique des paramyxovirus (d'après Anne Decoster [23]).....	31
Figure 4 : Analyse phylogénétique des virus NDV de classe I.....	33
Figure 5 : Analyse phylogénétique des virus NDV de classe II.....	34
Figure 6 : Analyse phylogénétique de NDV en Afrique de l'Ouest [25].....	36
Figure 7 : Pourcentage d'échantillons positifs et répartition des virus étudiés au sein de ces échantillons, pour chaque marché aux volailles (a) au Bénin et (b) au Togo (d'après poster en annexe)	43
Figure 8 : (a) : placement aléatoire des dNTP et des ddNTP sur le brin complémentaire ; (b) : fluorescence des différents brins obtenus et superposition pour former la séquence ; (c) : séquence obtenue après analyse (BioEdit [33])	48
Figure 9 : vue intérieure d'un œuf d'oiseau (www.infovisual.info)	52
Figure 10 : (a) chambre à air observée lors du mirage et (b) embryon au sein de l'œuf (IHAP ENVT).....	52
Figure 11 : (a) : localisation du liquide allantoïque cible ; (b) : représentation du trou foré au niveau de l'œuf ; (c) : injection du virus dans l'œuf ; (d) : représentation de l'aiguille atteignant l'intérieur du sac allantoïque (d'après Dufour-Zavala [35] et banque d'images [36])	53
Figure 12 : différence entre un embryon sain (à gauche) et un embryon infecté par IBV (à droite) d'après UMR-ENVT-IHAP	54
Figure 13 : Schéma expérimental.....	55
Figure 14 : prise de sang et écouvillonnage des poulets (ENVT – Clinique Aviaire et porcine)	56
Figure 15 : Suivi de la charge virale après épreuve virulente, chez les oiseaux vaccinés (en bleu) et non vaccinés (en rouge)	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : estimation des effectifs avicoles total et traditionnel (FAOstat)	20
Tableau 2 : Population et production de volailles, de 2009 à 2013, en Côte d'Ivoire et au Bénin (FAOstat)	22
Tableau 3 : récapitulatif des souches d'IBV en circulation dans le monde	27
Tableau 4 : Amorces utilisées dans le travail expérimental	41
Tableau 5 : Nombre et pourcentage d'échantillons positifs pour chaque virus au Togo et au Bénin en 2011	42
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR de contrôle	46
Tableau 7 : nombre d'échantillons correspondant aux virus lentogènes ou vélogènes avec leur site de clivage associé	49

Liste des abréviations

A : Adénine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AIV : Avian Influenza Virus

aMPV : Avian MetaPneumoVirus

ARN : Acide Ribonucléique

C : Cytosine

Conn : Connecticut

dATP : Désoxy-Adénine Tri-Phosphate

dCTP : Désoxy-Cytosine Tri-Phosphate

dGTP : Désoxy-Guanine Tri-Phosphate

dNTP : Désoxy-Nucléotide Tri-Phosphate

dTTP : Désoxy-Thymine Tri-Phosphate

EOPS : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques

FAO : Food and Agriculture Organization

IBV : Infectious Bronchitis Virus

ILTV : Infectious Laryngo-trachéitis Virus

KDa : KiloDalton

Mass : Massachussetts

NDV : Newcastle Disease Virus

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PMV-1 : ParaMyxoVirus 1

RT : RétroTranscriptase

UEMOA : Union Economique et Monétaire Ouest Africain

INTRODUCTION

Les maladies respiratoires sont à l'origine d'importantes pertes économiques en élevage avicole à travers le monde. Elles font l'objet de nombreuses études pour détecter et caractériser les agents pathogènes responsables. Les virus en font partie, et sont souvent les agents les plus complexes et les plus difficiles à combattre notamment parce qu'ils sont souvent agents de co-infections.

En Afrique sub-saharienne, la filière avicole est en pleine expansion, ce qui en fait un secteur à surveiller et à protéger. De nombreuses familles vivent de cette production et le gain peut être conséquent. La production avicole devrait permettre de générer des protéines animales bon marché pour la consommation humaine mais la conduite d'élevage et la pression sanitaire y font encore obstacle à l'heure actuelle : les viandes caprine et bovine sont moins chères pour le consommateur ouest-africain que la volaille. De multiples épizooties ont émergé au cours des dernières années, avec l'apparition de nouveaux virus dont on ne connaissait ni l'agent étiologique ni les moyens de prévention.

Des techniques d'analyses moléculaires ont alors été mises au point pour détecter spécifiquement ces virus et des vaccins performants ont été développés, initialement pour les marchés européen et nord-américain. L'adéquation de ces vaccins aux souches virales africaines mérite une évaluation. Dans un premier temps, nous présenterons une courte synthèse sur l'élevage et l'économie du poulet en Afrique de l'Ouest et plus particulièrement au Togo, au Bénin et en Côte d'Ivoire. Nous présenterons par la suite les deux principaux virus que nous avons retenus pour nos travaux : le virus de la bronchite infectieuse et le virus de la maladie de Newcastle. Enfin nous présenterons en détail nos trois études expérimentales :

- Une étude de prévalence des virus respiratoires aviaires au Togo et au Bénin en 2011
- Une étude d'épidémiologie moléculaire de souches ivoiriennes du virus de la maladie de Newcastle
- Une évaluation de l'efficacité d'un vaccin contre une souche africaine du virus de la bronchite infectieuse

Chacune de ces parties comprendra un volet matériel et méthodes, un volet résultats et un volet discussion.

PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :
PRODUCTION ET MALADIES
RESPIRATOIRES DU POULET EN AFRIQUE
DE L'OUEST

1. La production de poulet en Afrique de l'Ouest

1.1. Production avicole dans l'UEMOA (Union Economique et Monétaire Ouest Africaine)

Les estimations de populations d'oiseaux en Afrique de l'Ouest ne distinguent pas clairement à l'heure actuelle aviculture moderne et aviculture traditionnelle.

Les services vétérinaires sont tenus de transmettre chaque année à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) leurs estimations sur la population aviaire totale (« World Animal Health Information System »). Les chiffres pour l'année 2012 sont mentionnés dans le tableau 1 ci-dessous. Toutefois, ces chiffres peuvent parfois être assez éloignés de la réalité, en absence de méthode réelle de recensement et en raison de la non transmission des mises à jour annuelles à l'OIE.

Ces chiffres indiqueraient un cheptel avicole total de 225 millions dans l'espace UEMOA et une augmentation annuelle de 3 % en 2012. [1] Ce sont les derniers chiffres connus à ce jour (tableau 1).

Tableau 1 : estimation des effectifs avicole total et traditionnel (FAOstat)

	Cheptel Avicole total OIE WAHIS 2012	Cheptel Avicole Traditionnel Estimation 2012	Source complémentaire
Bénin	17 600 000	17 000 000	Estimation de la Direction de l'Elevage (2011)
Burkina Faso	42 000 000	40 000 000	Estimation de la Direction de l'Elevage
Côte d'Ivoire	53 800 000	40 000 000	Estimation de la Direction des Services Vétérinaires
Guinée Bissau	1 482 641	1 500 000	
Mali	35 095 598	32 000 000	Estimation de la Direction Nationale des Services Vétérinaires pour fin 2012
Niger	12 196 411	16 000 000	Estimation de la Direction des statistiques en 2011
Sénégal	39 709 866	23 000 000	Estimation de la Direction des Services Vétérinaires en 2010
Togo	23 500 000	23 000 000	
Total UEMOA	225 280 000	192 500 000	

Les chiffres collectés à l'occasion des échanges avec les acteurs des 8 Etats membres de l'UEMOA en fin 2012 indiquent un cheptel avicole traditionnel d'environ 192.5 millions (Tableau 1).

En ce qui concerne l'estimation du cheptel de l'aviculture intensive, il serait indispensable pour les Services vétérinaires d'effectuer un suivi permanent afin de :

- ✓ Recenser le cheptel de volailles reproductrices
- ✓ Comptabiliser les poussins, pintadeaux, cannetons et dindonneaux importés en différenciant ceux pour la ponte et ceux pour la chair
- ✓ Enregistrer progressivement l'ensemble des élevages, avec leur géolocalisation, compte tenu de leur nombre relativement restreint autour des grands centres urbains et de la nécessité d'un suivi lié au risque sanitaire

1.2. Production avicole au Togo, au Bénin et en Côte d'Ivoire

Les informations concernant le contexte économique et la production de la filière avicole dans les pays africains sont rares. Nous avons pu, avec l'aide du laboratoire vétérinaire de Lomé, avoir accès à des informations utiles sur la production avicole dans ce pays. Nous avons analysé en parallèle ces informations togolaises et les données disponibles sur le site de l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).

Longtemps considéré comme une activité secondaire, l'élevage avicole constitue une source de revenu et un moyen d'épargne non négligeables pour les paysans ouest-africains. Il est pratiqué par une large majorité des agriculteurs et concerne les poulets, les pintades et les canards. Deux systèmes de production cohabitent : l'aviculture traditionnelle et l'aviculture moderne. Au Togo, l'aviculture traditionnelle couvre toute l'étendue du territoire national, produit plus de 90% du cheptel de volailles et n'est généralement ni organisée ni contrôlée. L'aviculture moderne, quant à elle, est concentrée dans la région maritime et plus précisément dans la Préfecture du Golfe qui abrite plus de la moitié des unités de production du pays. La filière avicole togolaise – secteurs traditionnel et moderne - compte environ 25 millions de volailles qui fournissent l'essentiel de la consommation nationale en œufs et environ le 1/3 de la consommation nationale en viande.

Tableau 2 : Population et production de volailles, de 2009 à 2013, en Côte d'Ivoire et au Bénin (FAOstat [1])

Année	Côte d'Ivoire			Bénin			Togo		
	Cheptel de volaille (million)	Quantité d'œufs (million)	Quantité de viande (tonnes)	Cheptel de volaille (million)	Quantité d'œufs (million)	Quantité de viande (tonnes)	Cheptel de volaille (million)	Quantité d'œufs (million)	Quantité de viande (tonnes)
2009	41.5	600	23388	16	290	21440	19.8	185	26000
2010	45	640	34900	16.5	219	22400	21.6	185	28400
2011	43	660	33600	17	237	23840	23	185	29600
2012	53.8	810	42000	17.6	257	24000	23.5	190	31200
2013	58.4	920	47500	14.6	232	24400	25	200	32000

Nous pouvons remarquer que la Côte d'Ivoire produit beaucoup plus que ses voisins, que cela soit en cheptel, en quantité d'œufs ou en quantité de viande. Les productions sont en forte augmentation depuis quelques années dans ce pays. Au Bénin, la production a chuté depuis 2012, en raison notamment des crises sanitaires [1]. Le Togo, quant à lui, a connu une production stagnante en œufs, pendant 3 ans, mais a réussi à augmenter sa production en 2012. La production en viande de volaille reste élevée pour les trois pays, ce qui représente un objectif économique certain qu'il faut préserver.

Plusieurs contraintes du secteur avicole persistent :

- ✓ La non maîtrise des techniques de production (formulation d'aliment répondant aux besoins des animaux, conduite des élevages, infrastructures inadéquates ne répondant pas aux normes....)
- ✓ Le non-respect des mesures de biosécurité (fort taux de morbidité et de mortalité...)
- ✓ Les contraintes d'ordre pathologique liées au climat, à l'insuffisance des services d'encadrement et à l'émergence de certaines maladies (Gumboro, Newcastle, Salmonellose)
- ✓ La divagation des animaux faute d'habitats appropriés (aviculture traditionnelle ou familiale surtout) ;
- ✓ L'insuffisance de couvoir pour la production de poussins d'un jour ;
- ✓ La non disponibilité de certaines matières premières ou leur prix élevé pour la fabrication de la provende (mélange alimentaire destiné aux animaux d'élevage).

Après les foyers d'influenza aviaire dans la région entre 2006 et 2008, la Maladie de Newcastle demeure la contrainte majeure de l'aviculture en Afrique de l'Ouest.

2. Les affections respiratoires virales du poulet

2.1. Principaux virus respiratoires aviaires

La diversité des agents pathogènes et l'influence de facteurs techniques font de la pathologie respiratoire des volailles une entité complexe à étudier. Les virus à tropisme respiratoire font partie de cette entité. Ils sont nombreux mais peu ont à eux seuls un réel impact sur la santé des volailles.

Cinq virus principaux ont une importance dominante dans les maladies respiratoires des volailles :

- ✓ Le virus de la maladie de Newcastle (NDV)
- ✓ Le virus de la bronchite infectieuse (IBV)
- ✓ Le virus de l'influenza aviaire (AIV)
- ✓ Le virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV)
- ✓ Le virus de la rhinotrachéite infectieuse ou métapneumovirus aviaire (aMPV)

En se basant sur la littérature, nous avons fait le choix de ne retenir que les 4 premiers virus, pour notre étude de prévalence en Afrique de l'ouest. Les virus IBV et NDV engendrent le plus de pertes sur le terrain et nous avons donc ciblé leur caractérisation pour la suite de notre travail. C'est pourquoi nous allons les exposer de façon plus précise.

2.2. Le virus de la bronchite infectieuse (IBV)

La bronchite infectieuse est une maladie infectieuse, très contagieuse, causée par un coronavirus, le virus de la bronchite infectieuse (IBV). C'est une maladie qui a une importance économique majeure car elle peut provoquer des retards de croissance, une baisse de la production et de la qualité des œufs et une augmentation de la mortalité. Sa première description remonte à 1930 aux Etats-Unis [2], [3].

2.2.1. Le virus de la bronchite infectieuse (IBV)

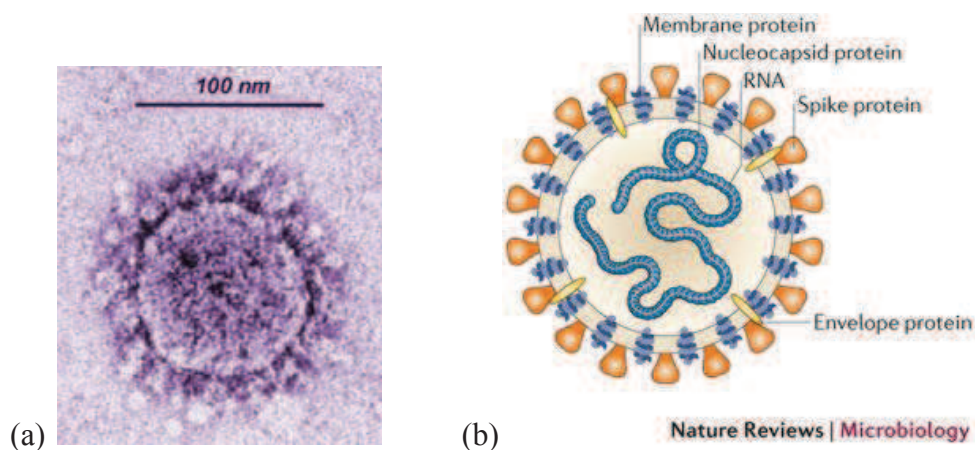
L'IBV appartient à la famille des *Coronaviridae*. Cette famille comprend deux genres, les *Coronavirus* et les *Torovirus*. L'IBV fait partie du groupe 3 du genre *Coronavirus*, maintenant nommé *Gammacoronavirus* [2]–[4].

Ce groupe englobe pour l'essentiel des coronavirus aviaires. Les coronavirus des groupes alpha et bêta, quant-à eux, comprennent les coronavirus des mammifères. Les deltacoronavirus regroupent des virus aviaires et de mammifères [5]

L'IBV est un virus enveloppé, à ARN simple brin, de polarité positive. Son enveloppe a un diamètre de 120 nanomètres. Quatre protéines structurales jouent un rôle majeur (Figure 1a et 1b) :

- La protéine de la spicule (S) : la protéine S est une glycoprotéine, de 180 KDa. Elle se présente sous forme de dimère ou de trimère. Elle a deux fonctions majeures : l'attachement du virus aux cellules de l'hôte et la fusion de la membrane virale à la membrane des cellules hôtes [2], [4], [6]. La protéine S est formée de deux sous-unités, les glycoprotéines S1 et S2. La glycoprotéine S1 est responsable du pouvoir d'hémagglutination et de l'induction d'anticorps neutralisants protecteurs. La glycoprotéine S2 permet l'encrage de S dans la membrane du virus [2], [3].
- La glycoprotéine de la membrane (M) : la protéine M est une glycoprotéine hydrophobe partiellement exposée à la surface du virion, de masse moléculaire comprise entre 27 et 36 KDa. Cette protéine est la protéine structurale la plus abondante. Elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales [7], [8].
- La nucléocapside (N) : la nucléoprotéine N est une protéine phosphorylée, hautement basique de 52 KDa [9]. Elle est étroitement liée à la molécule d'ARN du génome et forme une nucléocapside de symétrie hélicoïdale. Une région de cette protéine est bien conservée chez les différentes souches d'IBV. Elle jouerait un rôle dans la transcription et probablement dans la traduction de l'ARN viral [2], [3].
- La protéine de l'enveloppe (E) : la protéine E est une protéine hydrophobe, transmembranaire, non glycosylée, de petite taille et intégrée à l'enveloppe virale. Elle joue un rôle essentiel dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales [10].

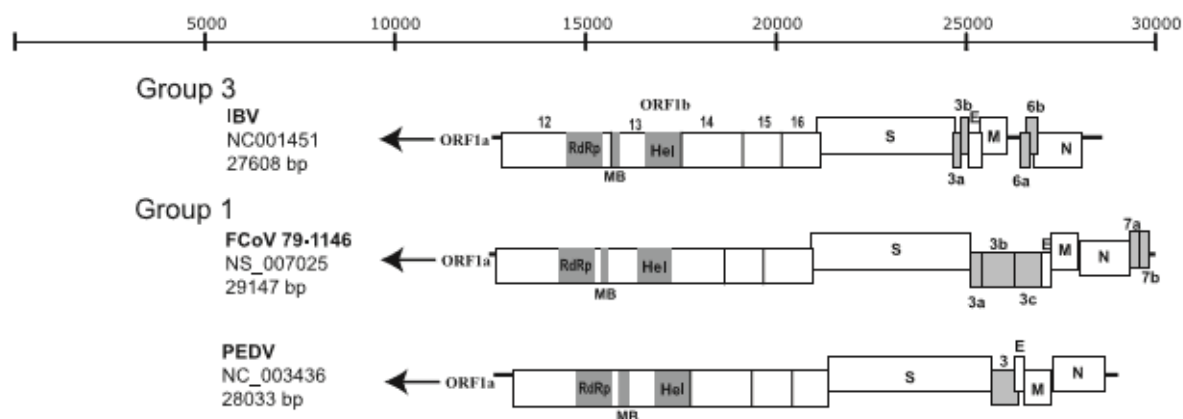
Figure 1 : (a) : Photo de coronavirus observés au microscope électronique (d'après ENS-Lyon.fr); (b) : représentation schématique d'un coronavirus (d'après Graham et al [11])



L'organisation du génome de l'IBV présente certaines similitudes avec les autres membres du genre *Coronavirus* :

- Un gène codant pour la polymérase (ou gène 1) qui représente les 2/3 du génome, à partir de la région 5' terminale : il contient deux cadres de lecture (ORF), 1a et 1b (Figure 2), qui codent pour une polyprotéine fusionnée 1ab, indispensable à la réplication [3], [12]
- Des gènes codant pour les protéines structurales (S, E, M et N) [2]
- Deux gènes (gènes 3 et 5) codant pour des protéines non essentielles à la réplication mais probablement essentielles dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte [2], [12]

Figure 2 : Organisation génomique des coronavirus (d'après Dong et al, [13])



2.2.2. Formes cliniques de la bronchite infectieuse

Initialement, la bronchite infectieuse (BI) aviaire était décrite comme une atteinte respiratoire des jeunes poulets. Ce n'est que plus tard qu'elle fut décrite sur des animaux plus âgés, notamment chez les poules pondeuses.

Les signes cliniques sont souvent frustrés, mais un poulet atteint de BI peut présenter :

- une atteinte respiratoire : détresse respiratoire, toux, reniflement, râles trachéaux, yeux qui pleurent
- une atteinte de l'état général : anorexie, retard de croissance, animaux déprimés
- dans de rares cas, une atteinte rénale : fèces humides, dépression

Les poules pondeuses atteintes d'IBV, quant à elles, présentent une chute de ponte, avec des œufs « fripés » à la coquille fine. Les poules peuvent également avoir des lésions au niveau de l'oviducte [2], [3]. Des souches IBV variantes peuvent provoquer une atrésie de l'appareil

génital femelle lorsque l'infection virale est très précoce (moins de 3 semaines d'âge) : cette infection précoce aboutit à la formation de kystes. Les poules atteintes sont dites « fausses pondeuses » car si elles ne présentent aucun signe clinique particulier, elles ne seront jamais capables de pondre.

2.2.3. Les souches d'IBV

L'IBV a été pour la première fois isolé au Massachusetts, dans les années 1930 et pendant de nombreuses années, le sérotype Mass fut le seul sérotype d'IBV connu [12]. On compte maintenant une dizaine de sérotypes et un nombre bien plus élevé de génotypes. La distinction génétique et antigénique entre souches d'IBV est complexe et ne correspond pas aux protectotype (une souche d'un sérotype ou d'un génotype donné ne protégera pas forcément contre une autre souche de ce même sérotype/génotype) [14]–[16]. Les souches en circulation dans le monde sont résumées dans le tableau 3 (Jackwood et al [12]).

Tableau 3 : récapitulatif des souches d'IBV en circulation dans le monde

Country	Strain	Type	GenBank no.	Reference ^a	
United States	Ark/ArkDP/81	Arkansas	AF006624	16	
	CA/557/03	California	DQ912828	33	
	CA/1737/04	California	DQ912830	33	
	CA/CAL99/CAL99/99	Cal99	DQ912831	57	
	CA/CAV/CV56b/91	California Variant	AF027509	63	
	Conn/Conn46/51	Conn	L18990	16	
	DE/DH072/92	Delaware	U77298	25	
	GA/GA11/124/11	GA11	NA ^b	Unpublished	
	GA/GA08/GA08/08	GA08	GU361606	32	
	GA/GA07/GA07/07	GA07	JN160805	Unpublished	
	GA/GA98/0476/98	GA98	AF274457	39	
	Mass/Mass41/01	Mass	AY561711	16	
	PA/Wolgemuth/98	Wolgemuth	AF305595	37	
	PA/171/99	PA/171	AF419314	71	
	Mexico	Mexico/Ark type	Arkansas	NA	62
		Mexico/Conn/43/UNAM/08	Conn	EU526403	Unpublished
Mexico/Mass/4/UNAM/08		Mass	EU526411	Unpublished	
Mexico/47/UNAM/01		?	EU526405	Unpublished	
Mexico/7277/99		?	AF365596	26, 39	
Mexico/BL56-19/UNAM/08		BL56	EU526407	24, 26	
Mexico/07484/98		?	AF288467	10	
Mexico/UNAM-9797		?	NA	24	
South America		Brazil/Ark type	Arkansas	NA	Unpublished
	Brazil/BR1/USP-28/08	BR1	FJ791269	67	
	Brazil/BR2/USP-21/08	BR2	FJ791262	67	
	Brazil/BR3/USP-16/07	BR3	FJ791257	67	
	Brazil/793B/USP-31/08	793B	FJ791272	67	
	Brazil/USP-01/05	?	DQ355995	67	
	Brazil/Mass/USP-15/08	Mass	FJ791256	67	
	Chile/LDL/Q1-12103b/09	LDL	HM446012	Unpublished	
	Colombia/LDL/Q1-92079/12	LDL	NA	Unpublished	
	Europe	UK/793B/4/91/91	793B	AF093794	17
France/CR88/CR88121/88		CR88	JN542567	17	
Italy/624/94		G241	AJ243261	11	
Italy/Italy-02/497/02		Italy-02	DQ901377	69	
Italy/LDL/Q1-11VIR3141-7/11		LDL	JQ290229	Unpublished	
Western Europe/Mass/ HI 20 type		Mass	EU822541	69	
Netherlands/D207/79		D207	X58003	15	
Netherlands/D1466/79		D1466	M21971	15	
Netherlands/LX4/QX4D388/04		LX4	DQ674739	21	
Belgium/B1648/96		B1648	X87238	55	
Spain/LX4-Ila/ QX-1a/ 116/09		LX4	GQ259485	Unpublished	
UK/B/D274/84		D274	X15832	69	
UK/E/D3896/84		D3896	X52084	13	
Russia/Mass/13/09		Mass	HQ840475	60	
Kazakhstan/793B/24/09		793B	HQ840487	60	
Slovenia/D274/15/09		D274	HQ840495	60	
Russia/LX4/QX-RF05/ 07		LX4	HQ840500	60	
Ukraine/Italy-02/01/07	Italy-02	HQ840498	60		
Kazakhstan/Ark/KZ14/07	Arkansas	HQ840499	60		
Slovenia/Italy-02/257/09	Italy-02	GU564326	36		
China/Taiwan	China/LX4/QX/99	LX4	AF193423	28	
	China/LDT3/03	LDT3	AY702975	28	
	China/LHLJ/951	LHLJ	DQ167341	28	
	China/BJ/97	BJ	AY319651	28	
	China/LDL/Q1/98	LDL	AF286302	28	
	China/N1/62/AA5/04	Subgroup 1	AY859140	28	
	China/LSC/99	LSC	DQ167347	28	
	China/793B/Sichuan/06	793B	GQ844991	28	
	China/Mass-HI20/ SDLY0612/06	Mass	EU857816	28	
	Taiwan/LDL/Q1-3374/05	LDL	DQ402364	Unpublished	
	Korea	Korea/KM91/91	KM91	FJ807946	40, 44
Korea/K1/K620/02		K-1	FJ807944	40	
Korea/LX4/KII/K354/05		K-41 (LX4)	FJ807922	40	
Korea/KII/K147/10		K-4II (LDL)	HM486961	40	
Korea/Mass/K446/01		Mass	AY257063	41	

Table 1. Continued.

Country	Strain	Type	GenBank no.	Reference ^A
Iran, Iraq, and Saudi Arabia	Iran/793B/19/08	793B	HQ842714	Unpublished
	Iran/Mass/17/00	Mass	HQ842709	Unpublished
Israel/Middle East	Iraq/IS720/Sul/01/09	IS720	GQ281656	47
	Israel/793B/Variant 1/96	793B	AF093795	54
	Israel/Variant 2/98	Variant 2	AF093794	10
	Israel/IS720/720/99	IS720	AY091552	54
	Israel/IS720/885/00	IS720	AY279533	54
Egypt	Egypt/IS720/Beni-Suef/01	IS720	AF395531	1
	Egypt/Mass/F/03	Mass	DQ487085	1
	Egypt/D274/D/89	D274	DQ487086	1
India	India/793B/NMK/72/IVRI/10	793B	HM748585	Unpublished
	India/PDRC/Pune/9/99	?	AY091551	Unpublished
	India/744-AD/04	?	ADR71728	Unpublished
	India/Mass/16-V-AD/07	Mass	HM179146	Unpublished
Malaysia	Malaysia/LX4/QX-like MH5365/95	LX4	EU086600	72
	Malaysia/V9/04	?	FJ518779	72
Thailand	Thailand/Group 1/THA90151/08	Group 1	GQ503617	61
	Thailand/LX4 (Group 2)/QX-like/THA80151/09	LX4	GQ503616	61
Japan	Thailand/Mass/THA320352	Mass	GQ885131	61
	Japan/JP-I/C78/99?	JP-I	AB120653	4
	Japan/JP-II/TM86/02?	JP-II	AB120655	4
	Japan/JP-III/LX4/Shimane/02	LX4 (JP-III)	AB120651	50
	Japan/JP-IV/Ibaraki/168-1/09	JP-IV	NA	49
	Japan/793B/Miyazaki/03	793B	AB120654	4
	Japan/Gray/ON/74	Gray	AB120658	50
	Japan/Mass/Nerima/00	Mass	AB363962	50
Australia	Australia/subgroup 1/N1/62	Subgroup 1	DQ490206	29
	Australia/subgroup 2/N1/88	Subgroup 2	U29450	29
	Australia/subgroup 3/N1/03	Subgroup 3	FJ235194	48

^AReferences are published papers documenting isolation and characterization of the isolate.

^B? = variant or type unknown.

^CNA = no sequence available.

2.2.4. Epidémiologie de la bronchite infectieuse dans le monde et en Afrique

La bronchite infectieuse est l'une des maladies virales les plus répandues dans l'industrie avicole mondiale. Elle cause des pertes économiques très importantes dans le monde entier. Pour exemple, elle serait associée, souvent en co-infections, à environ deux tiers des infections respiratoires du poulet en Europe [12].

La souche la plus représentative au niveau mondial est la première souche d'IBV détectée aux Etats-Unis en 1930 : la souche Massachussetts (Mass.). En effet, elle est présente sur les continents américain, européen, asiatique et africain. D'autres souches posent des problèmes de santé animale à travers le monde, telles que les souches Connecticut (Conn), 4/91, 793/B. Dernièrement, un variant appelé Qx, a été détecté en Chine où il a un réel impact clinique et économique. Il a, depuis, largement diffusé dans le monde [12].

L'IBV est l'un des virus aviaires les plus étudiés en Europe. Plusieurs variants d'IBV ont été isolés dans de nombreux pays européens, notamment en Angleterre, en France, en Belgique, en Italie et en Espagne. Beaucoup de ces variants, voire la majorité, ont été détectés durant une brève période [12].

L'Australie, due à sa situation géographique, est l'unique continent où l'IBV a toujours évolué de façon indépendante du reste du monde. De nombreux variants propres à ce continent ont été détectés, tel le variant australien « T » [12].

Les premières identifications de l'IBV en Afrique remontent aux années 1950, en Egypte, où plusieurs variants liés au type Mass ou à d'autres variants européens, ont été identifiés par des techniques moléculaires. Il a fallu attendre les années 80 pour que de nouvelles souches d'IBV soient détectées en Afrique du Sud. Cela a alors laissé place à plusieurs projets de recherche sur le sujet. En 1985, cinq isolats liés au sérotype Mass ont été détectés au Maroc ainsi qu'un variant entérotrope appelé IB « G » proche du sérotype 4/91. Entre 1996 et 2000, d'autres études au Maroc ont été réalisées. Elles ont permis de mettre en exergue un nouveau variant nommé 12/97 [12].

En 2011, le variant Qx a été détecté au Zimbabwe. Entre 2009 et 2012, des recherches ont été menées en Tunisie pour étudier la pathogénicité des variants tunisiens TN20/00 et TN335/01. Enfin, en 2015, une étude a montré la présence de la souche Italy 02 au Maroc [12].

A notre connaissance, une seule étude sur IBV en Afrique de l'ouest a été publiée. Elle a permis de détecter un nouveau variant nommé « IBADAN », génétiquement distinct des autres génotypes connus [17]. Cette étude a été réalisée en 2009 au Nigeria et au Niger.

2.3. Le virus de la maladie de Newcastle (NDV)

La maladie de Newcastle est une maladie infectieuse, très contagieuse, affectant les oiseaux et particulièrement les galliformes. Cette maladie est provoquée par certaines souches de paramyxovirus de type 1 (PMV-1). On considère actuellement que le virus de la maladie de Newcastle affecte au moins 117 espèces d'oiseaux appartenant à 17 ordres [18].

2.3.1. Etiologie de NDV

Le NDV fait partie de la famille des *Paramyxoviridae*, virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative. Cette famille comprend 2 sous-familles, les *Paramyxovirinae* et les *Pneumovirinae*. La sous-famille des *Paramyxovirinae* comprend, quant à elle, 7 genres dont le genre *Avulavirus*. NDV en est le sérotype 1 (PMV-1). [18],[19],[20]

Classiquement, on parle des virus de la maladie de Newcastle par abus de langage car cette appellation ne correspond en fait qu'aux seuls PMV-1 hautement pathogènes ou « vélogènes », selon des critères virologiques bien définis. En effet pour faire la différence entre l'infection à PMV-1 et la maladie de Newcastle, on utilise classiquement un indice

appelé IPIC (Indice de Pathogénicité IntraCérébral). Si cet indice est supérieur à 0,7, on est en présence du virus de la maladie de Newcastle. On peut également utiliser la séquence du site de clivage de la protéine de fusion qui détermine la pathogénicité des PMV-1. Les virus NDV ont un site de clivage spécifique ($^{112}\text{X-R-X-R/K-R-F}^{117}$) [21].

On répartit les virus NDV en 5 pathotypes :

- **les souches vélogènes viscérotropes** qui provoquent une maladie aiguë mortelle avec des lésions hémorragiques du tube digestif ;
- **les souches vélogènes neurotropes** qui provoquent une forte mortalité avec des symptômes respiratoires et nerveux ;
- **les souches mésogènes** qui entraînent des symptômes respiratoires. Une mortalité est souvent relatée chez des jeunes oiseaux atteints de signes nerveux ;
- **les souches lentogènes** asymptomatiques qui donnent peu ou pas de lésions ;
- **les souches avirulentes** asymptomatiques sans lésions.

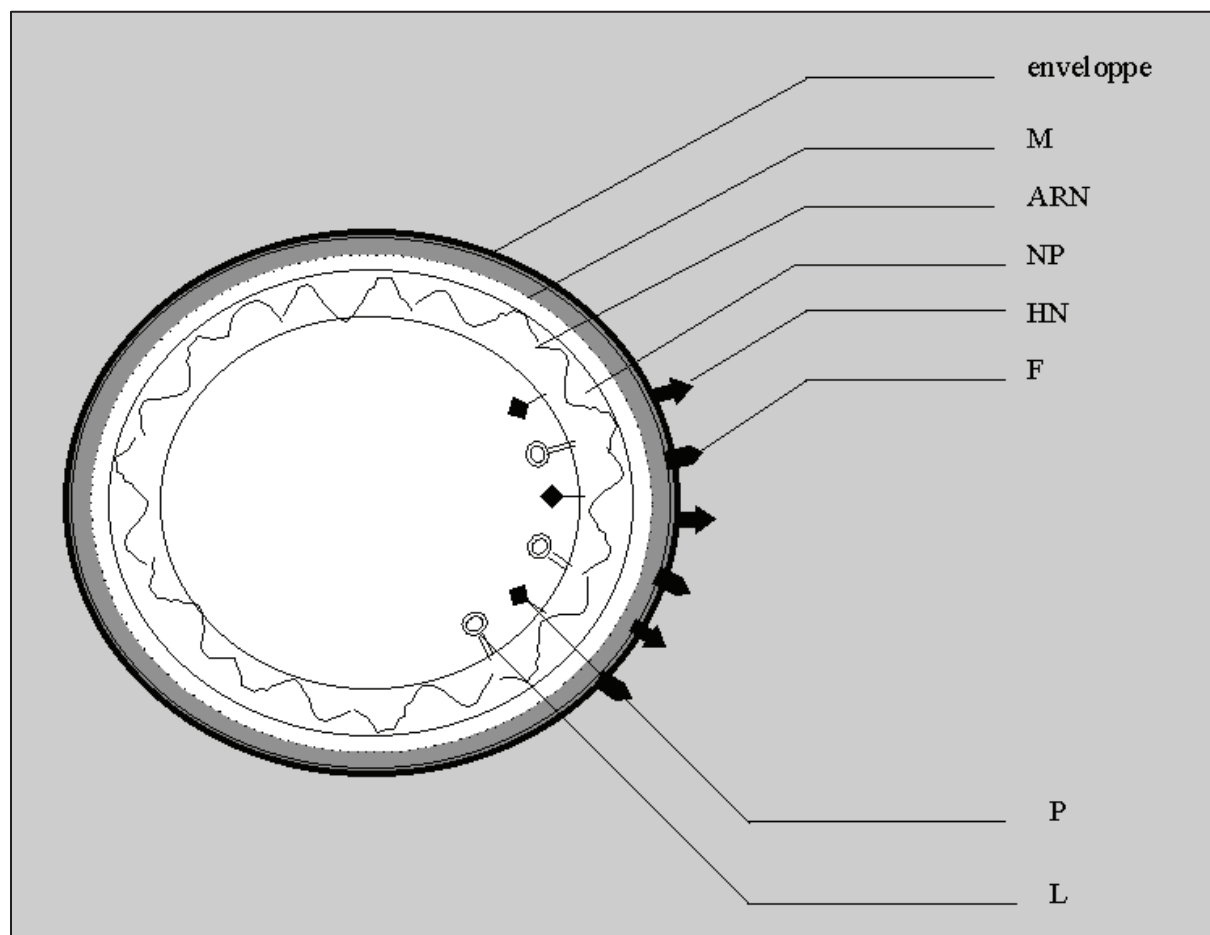
Les caractéristiques des virus NDV sont les suivantes [18], [19], [20], [22] :

- **génom** : un ARN non segmenté monocaténaire de polarité négative, ce qui impose la présence d'une transcriptase virale. Cette activité est assurée par les protéines P (polymérase) et L (large).
- **capside** : de symétrie hélicoïdale, elle est constituée par la protéine NP et forme avec l'ARN une nucléocapside tubulaire d'un diamètre de 18 nm, repliée au sein de l'enveloppe.
- **enveloppe** : appelée aussi péplos. Elle dérive, pour sa partie lipidique, de la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte. Sa face interne est doublée d'une protéine M (matrice). Des spicules glycoprotéiques HN et F sont insérées sur sa face externe.
- **glycoprotéine HN** : elle possède une activité à la fois hémagglutinante et neuraminidasique. Elle est composée d'unités, parfois associées en dimères ou tétramères, et formées de deux chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un pont disulfure. C'est elle qui assure la fixation du virus aux cellules cibles.
- **glycoprotéine F** : elle est composée, elle aussi, de deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. Elle assure la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire lors de la pénétration du virus dans la cellule cible.

Ces deux dernières protéines jouent un rôle déterminant dans le tropisme cellulaire, le pouvoir infectieux et l'induction d'anticorps neutralisants protecteurs. Le pouvoir hémagglutinant des virus NDV est utilisé pour la détection du virus dans un échantillon. En effet, on pourra

utiliser des tests d'héماغglutination et d'inhibition d'héماغglutination pour rechercher la présence de NDV [22].

Figure 3 : Représentation schématique des paramyxovirus (d'après Anne Decoster [23])



2.3.2. Formes cliniques de la maladie de Newcastle

Les symptômes dépendent de plusieurs facteurs : la souche virale, l'espèce sensible et la résistance individuelle. On distingue alors 4 formes cliniques pouvant coexister [18]:

- **une forme suraiguë** : il y a une atteinte générale grave. Une mortalité brutale survient en 1 à 2 jours sur plus de 90% des effectifs.
- **une forme aiguë** : dans un premier temps, il y a apparition de signes généraux (abattement, plumage ébouriffé, œdèmes, cyanose ou hémorragie des caroncules, des crêtes et des barbillons). Dans un deuxième temps, apparaissent des signes digestifs (diarrhée verdâtre à hémorragique), respiratoires (catarrhe oculonasal, trachéobronchite), nerveux (convulsions, ataxie, paralysies d'un ou de plusieurs membres). Si les animaux survivent, une longue convalescence se met en place avec des séquelles nerveuses ainsi qu'une chute de ponte pour les femelles.

- **une forme subaiguë et chronique**
- **une forme inapparente** : c'est certainement l'une des formes les plus fréquentes. Là encore, l'espèce cible est déterminante.

2.3.3. Souches virales de NDV

Comme nous en avons parlé ci-dessus, nous pouvons classer les virus NDV selon leur virulence : lentogènes, vélogènes, mésogènes, avirulents.

Cependant, dans ces classifications, il existe des séparations par génotype. Ces génotypes ont été séparés en 2 classes, basées sur la séquence nucléotidique du gène F [24]:

- la classe I comprend un génotype unique
- la classe II comprend 17 génotypes

Chaque génotype comprend des sous-génotypes. Ces 2 classes sont résumées dans les figures 4 et 5 (Diel et al [24]).

Figure 4 : Analyse phylogénétique des virus NDV de classe I

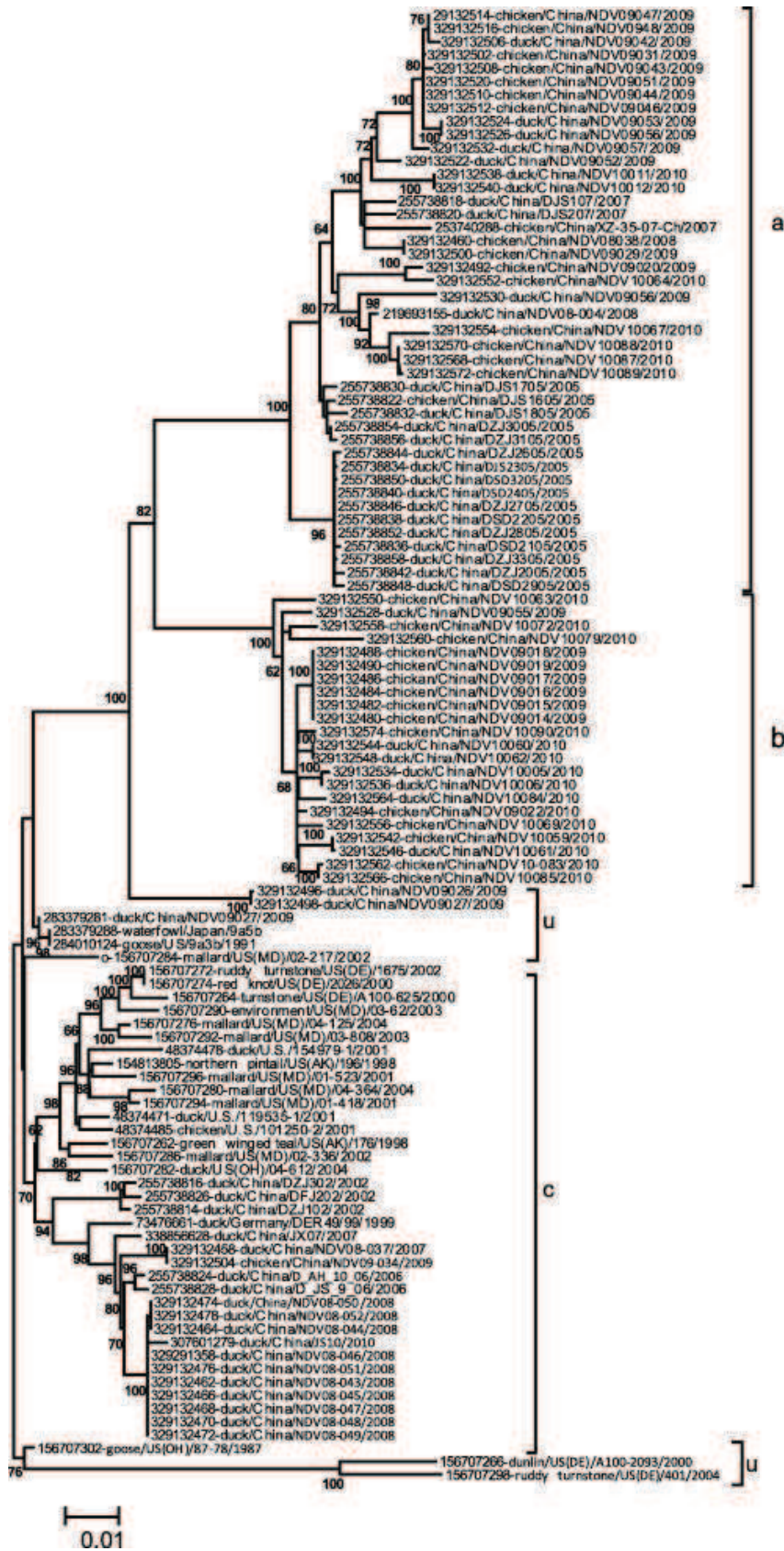
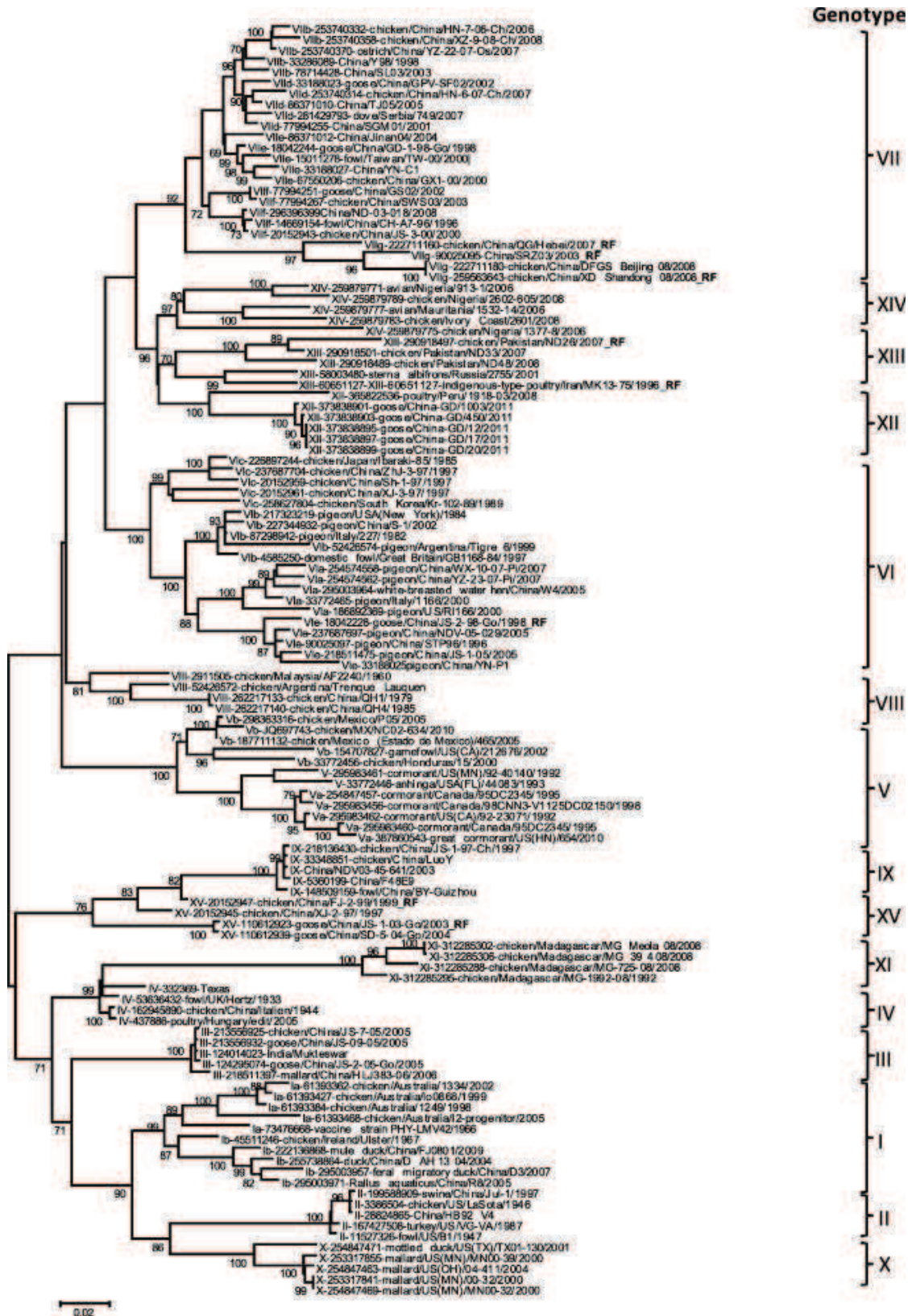


Figure 5 : Analyse phylogénétique des virus NDV de classe II



2.3.4. Epidémiologie de NDV dans le monde et en Afrique

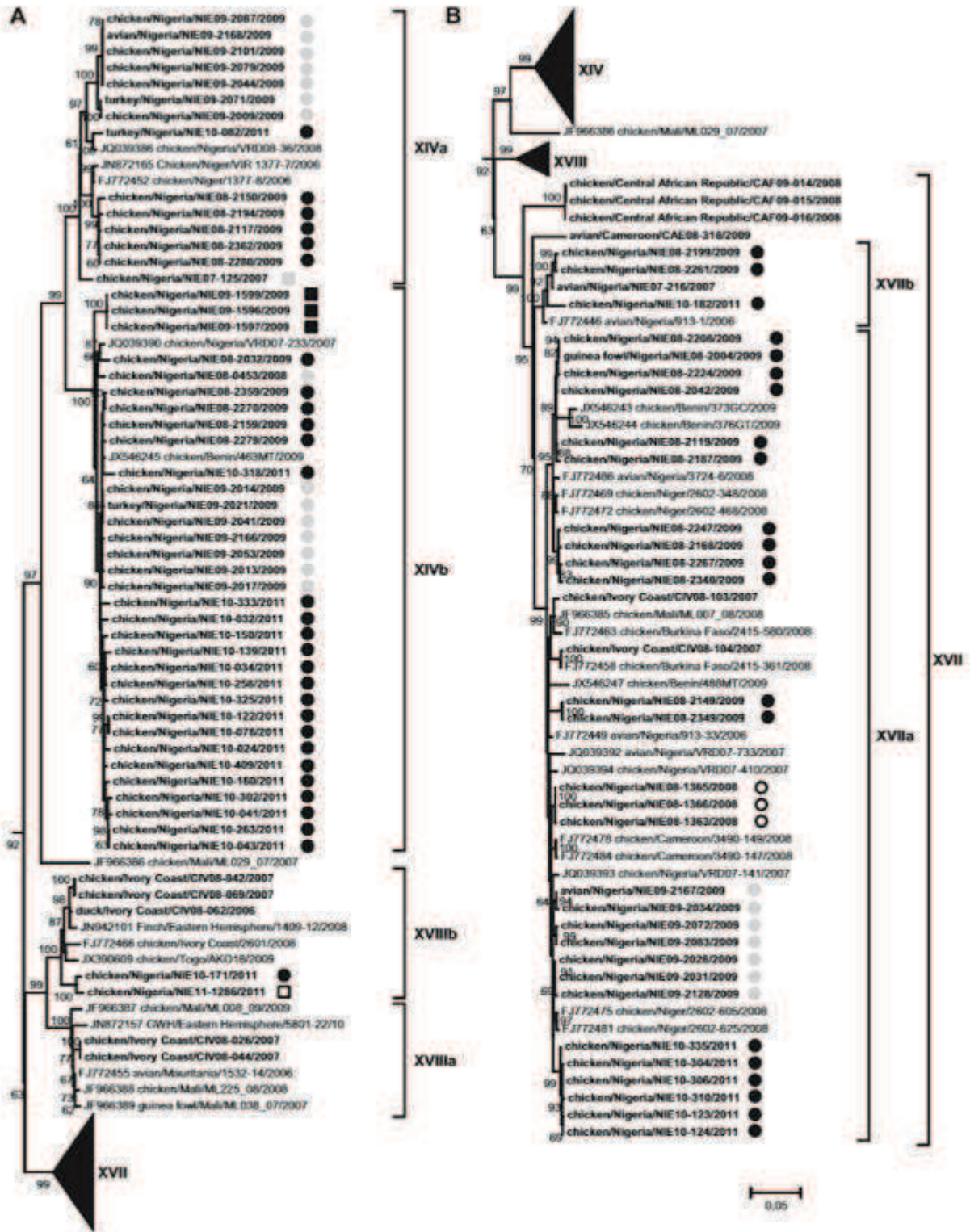
Actuellement, il y a peu de corrélation entre génotype de NDV et zone géographique. En effet, il existe de nombreux génotypes se retrouvant à la fois sur les continents américain, européen, asiatique et africain. Le génotype II est sans aucun doute le génotype le plus présent sur ces différents continents [24].

Le virus de la maladie de Newcastle est l'agent responsable de maladies respiratoires et neurologiques qui engendre le plus de mortalité dans les élevages de poulets en Afrique. En effet, la littérature relate des morbidités et des mortalités pouvant aller jusqu'à 100% [24].

Deux génotypes sont fréquemment décrits sur le continent africain : le génotype V et le génotype VII. D'autres génotypes ont été retrouvés dans plusieurs études. C'est le cas des génotypes III et VI, qui entre 1926 et 1960, ont été responsables de la première épizootie sur le sol africain. De façon plus marginale, le génotype III a été retrouvé à Madagascar dans les années 1960 [25], [26],[27], [28].

En Afrique de l'Ouest, la littérature montre qu'il existe une diversité génotypique de NDV très élevée. A l'heure actuelle, l'ensemble des variants retrouvés en Afrique de l'Ouest, ont été regroupés dans 3 génotypes différents, appartenant tous à la classe II : les génotypes XIV, XVII et XVIII (Figure 6 d'après Snoeck et al [25]).

Figure 6 : Analyse phylogénétique de NDV en Afrique de l'Ouest [25]



DEUXIEME PARTIE : ETUDES EXPERIMENTALES

Notre démarche expérimentale se découpe en trois études distinctes : la première a permis de décrire les virus respiratoires circulants chez la volaille au Togo et au Bénin en 2011. La deuxième étude nous a permis de typer des souches ivoiriennes de NDV pour faire un bilan épidémiologique sur le territoire de la Côte d'Ivoire. Enfin, dans un troisième temps, nous avons évalué la protection conférée par un vaccin H120, utilisé en routine dans les pays grands producteurs de volaille d'Europe comme d'Afrique, contre une souche nigériane d'IBV du génotype « IBADAN ».

1. Etude de la prévalence d'IBV, NDV, ILTV et AIV au Togo et au Bénin en 2011

Cette première étude consistait à évaluer la prévalence de virus respiratoires circulant chez la volaille en Afrique de l'Ouest. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur la recherche de 4 virus qui ont un impact fort sur les filières avicoles à travers le monde : IBV, NDV, ILTV et AIV.

Pour réaliser cette étude, 2053 écouvillons trachéaux et cloacaux, provenant du Togo et du Bénin, ont été testés. Ces échantillons ont été prélevés durant l'année 2011 sur des poulets vivants, dans les marchés aux volailles des deux pays étudiés. Ils ont été mis dans un conteneur à azote liquide et envoyés au laboratoire par avion.

Pour gagner du temps, les échantillons ont été réunis en pools (mélanges) de 5 échantillons. Pour chaque pool, nous avons recherché la présence ou non de 4 virus : IBV, NDV, ILTV et AIV. Pour cela, nous avons effectué :

- une extraction ADN/ARN combinée
- une (RT)-PCR (selon le type de virus)
- une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

1.1. Matériels et méthodes

1.1.1. Extraction d'ADN/ARN

Tout d'abord, avant de commencer à tester un échantillon, il faut extraire son matériel génétique. Nous nous sommes basés sur le protocole du kit utilisé : « viral RNA minikit » de Qiagen [29].

Pour cela, nous avons mélangé 140 µl d'échantillons avec 560 µl de tampon de lyse. Cette étape permet de casser le matériel cellulaire et de libérer ainsi le génome viral (ADN ou ARN). Après 10 minutes à température ambiante, nous avons rajouté dans le mélange 560 µl

d'éthanol pour précipiter le matériel génétique présent dans la solution. Nous avons ensuite passé le mélange sur une colonne et mis l'ensemble à centrifuger pour que le mélange traverse la colonne. Ceci permet de capturer le matériel génétique précipité sur la membrane de silicate. Puis viennent deux étapes de lavage pour éliminer tout ce qui a pu rester accroché à la colonne mais qui n'est pas du matériel génétique. Pour cela nous avons mis 500 µl de solution de lavage (2 solutions) avec à chaque fois une étape de centrifugation. Enfin, nous avons mis 60 µl de tampon d'éluion pour obtenir le matériel génétique : ARN et ADN combinés.

1.1.2. (RT)-PCR

1.1.2.1. Présentation

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une réaction d'amplification de l'ADN permettant d'obtenir des millions de copies d'un matériel génétique donné, au sein d'un échantillon. La matrice à amplifier peut être de l'ADN directement extrait (ADN génomique) d'un échantillon (organe, écouvillon, ...) ou de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par une réaction de rétro-transcription depuis un ARN extrait.

Dans notre étude, nous avons réalisé des PCR spécifiques visant des séquences génétiques des virus de la bronchite infectieuse, de la maladie de Newcastle, de la laryngotrachéite infectieuse et de l'influenza aviaire. Nous avons cherché à mettre en évidence leur présence ou non au sein de l'échantillon : soit la présence de leur ARN (pour les virus à ARN : AIV, IBV et NDV dans notre cas) soit la présence de leur ADN (virus à ADN : ILTV dans notre cas). Nous avons ainsi réalisé une réaction de RT (reverse transcription) pour les virus à ARN, avant d'effectuer les réactions de PCR sur un mélange du produit d'extraction brut (ADN) et du produit de RT (ADNc issus des ARN).

Nous avons utilisé les réactifs suivants :

- **un couple d'amorce** : ce sont de petites séquences (oligonucléotides, une vingtaine de bases en général) correspondantes aux extrémités de la séquence que l'on souhaite amplifier ; ils vont ainsi s'hybrider sur chacun des deux brins complémentaires d'ADN (ADNg ou ADNc) et servir de support initial à la polymérase pour la synthèse d'un nouveau brin d'ADN

N.B. : l'enjeu dans le choix des amorces est primordial : la séquence cible doit être suffisamment spécifique de l'agent pathogène cible (donc propre à celui-ci pour éviter les faux positifs : spécificité du test) mais aussi suffisamment conservée entre chacun des sous-types que l'on peut rencontrer (pour éviter les faux négatifs : sensibilité du test).

- **des acides désoxy-nucléiques** (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) : indispensables à l'activité de la polymérase
- **une polymérase**, enzyme spécifique de la synthèse d'ADN, qui va allonger le nouveau brin (les points de départ sont les sites d'hybridation des amorces)

Un cycle de PCR est constitué de **3 étapes** :

- **dénaturation** : chauffage, généralement à 95°C pendant 15-30 secondes, pour dissocier les doubles brins d'ADN et rompre les structures secondaires.
- **hybridation** (association des amorces avec les brins d'ADN cible) à une température spécifique à chaque couple d'amorces (entre 45 et 65°C le plus souvent).
- **élongation** à une température de 72°C le plus souvent. La durée de cette étape varie avec la longueur de la séquence à amplifier.

Sont ensuite appliqués 30 à 45 cycles comprenant ces 3 étapes pendant lesquels l'ADN initialement présent sera amplifié (chaque cycle permettant théoriquement de multiplier par 2 la quantité d'ADN).

Si l'échantillon de départ contient une séquence d'ADN correspondant au couple d'amorces utilisé (et en quantité suffisante), nous obtenons alors un produit de PCR. Une migration sur gel d'agarose permet de révéler la présence de ce produit et d'en vérifier la taille en paires de bases.

1.1.2.2. Application

Pour notre étude, nous avons recherché la présence de 4 virus aviaires (3 virus à ARN et un virus à ADN).

Pour cela nous avons utilisé 4 couples d'amorces différents, chaque couple étant spécifique à un virus (Tableau 4).

Tableau 4 : Amorces utilisées dans le travail expérimental

Virus cible	Amorces	Source	Taille des fragments amplifiés	Température d'hybridation
IBV	N791: 5' GTGATGACAAGATGAATGAGGA 3' N1129: 5' CAGCTGAGGTCAATGCTTTATC 3'	Akin et al. (2001)	380 bp	54°C
NDV	FOP1: 5' TACACCTCATCCCAGACAGGGTC 3' FOP2: 5' AGGCAGGGGAAGTGATTTGTGGC 3'	Kho et al. (2000)	532 bp	58°C
ILTV	gEU: 5' GCTGGGTTCTGGGCTACACAAC 3' gEL: 5' TGC GCGTGACTCGGAGAG 3'	Humberd et al. (2002)	626 bp	61°C
AIV	Flu AM 52+ : 5' CTTCTAACCGAGGTCGAAACG 3' Flu AM 253- : 5' AGGGCATT TTTGGACAAAG/TCGTCTA 3'	Fouchier et al. 2000	200 bp	60°C

1.2. Résultats

Au total, 2053 écouvillons trachéaux/cloacaux ont été testés. Au vu du nombre d'échantillons, nous avons constitué des pools (mélanges) de 5 échantillons. Pour chaque pool, nous avons testé la présence de chaque virus. Si un pool sortait positif pour au moins un virus, nous testions alors chaque échantillon du pool, indépendamment. Chaque pays a été étudié séparément et nous avons également pris en compte la provenance géographique de chaque échantillon pour comprendre le contexte épidémiologique du pays.

Le tableau 5 résume nos résultats de prévalence.

Tableau 5 : Nombre et pourcentage d'échantillons positifs pour chaque virus au Togo et au Bénin en 2011

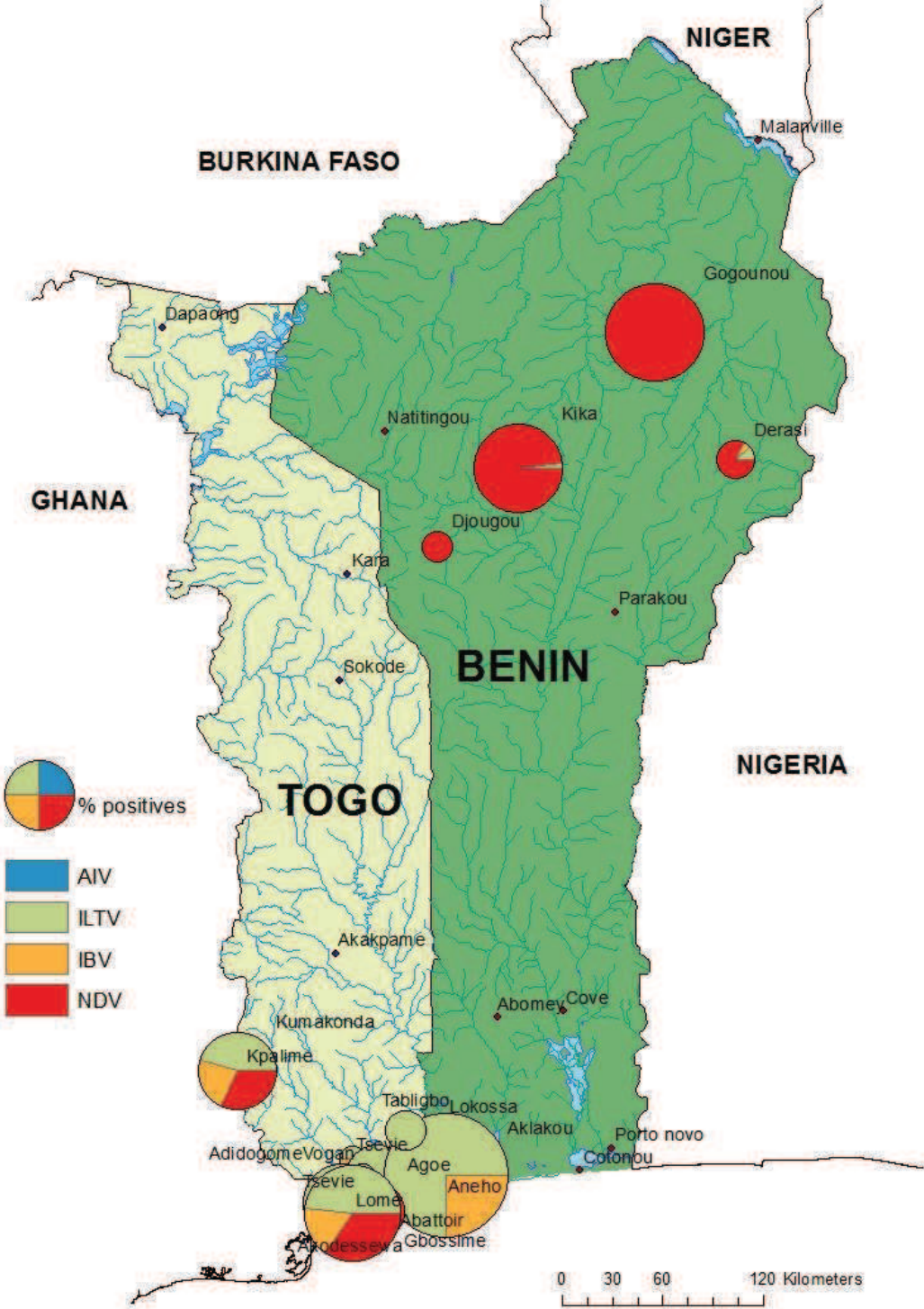
Virus	Togo		Bénin	
	Nombre de positifs / Nombre d'échantillons	Prévalence (%)	Nombre de positifs / Nombre d'échantillons	Prévalence (%)
ILTV	59/1350	4.4 %	4/703	0.57 %
IBV	13/1350	0.96 %	3/703	0.43 %
NDV	28/1350	2 %	161/703	23 %
AIV	10/1350	0 %	0/703	0 %

Nous observons deux zones présentant des circulations virales bien distinctes sur notre zone d'étude. Au nord du Bénin, NDV prédomine. Au sud du Togo, NDV est également présent mais cette fois, IBV et ILTV circulent également (Figure 7). Cette première étude expérimentale a été présentée en communication affichée lors du symposium Toulouse-Munich-Saragosse qui a eu lieu en Avril 2013 à Toulouse (poster en annexe).

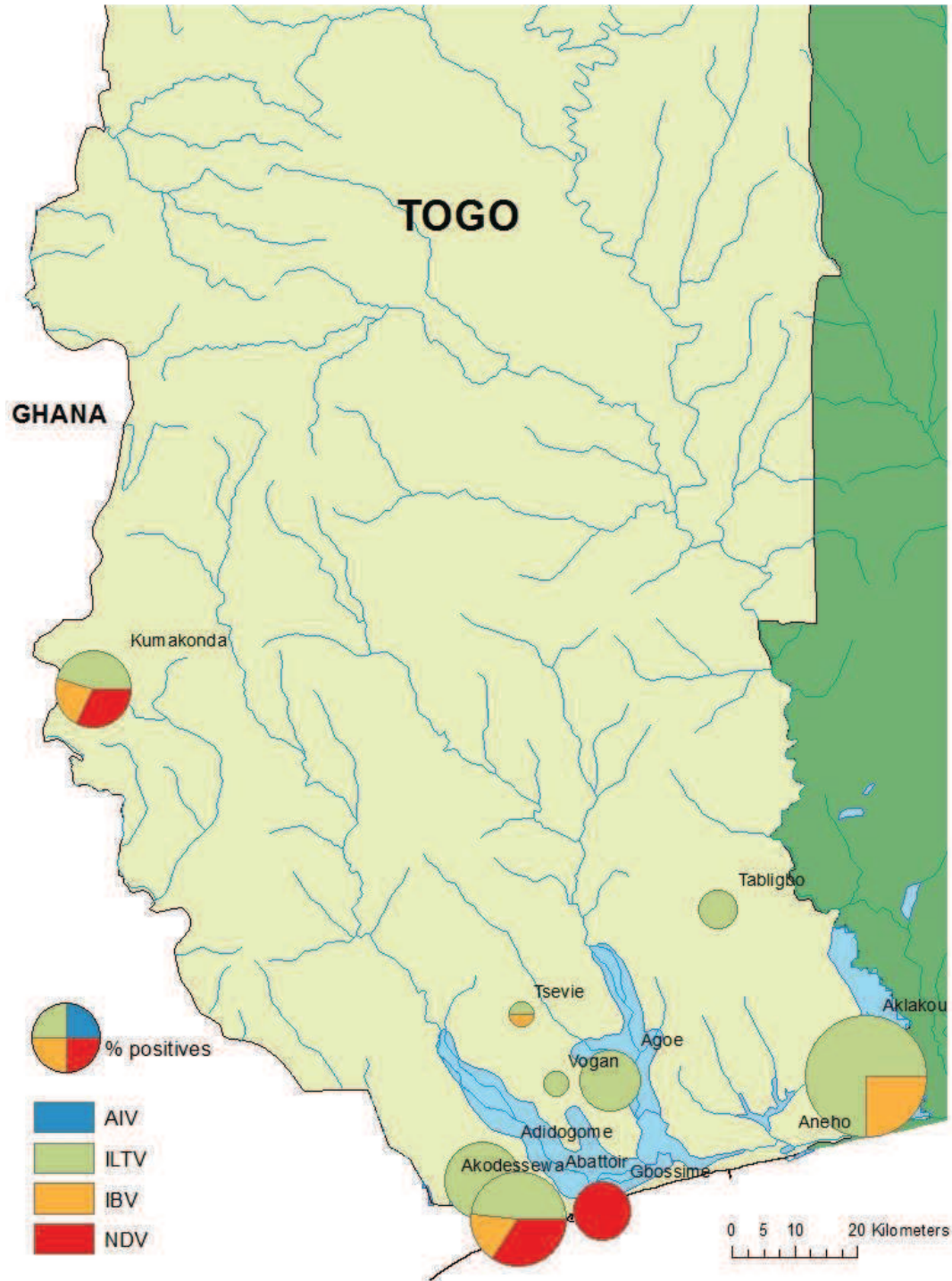
Concernant le virus de l'influenza aviaire, nous n'avons pas détecté le virus dans les deux pays étudiés. Ces résultats ont été combinés à des données de surveillance de l'AIV en Afrique centrale et ont fait l'objet d'une publication. Entre 2010 et 2014, AIV ne circulait pas chez la volaille domestique en Afrique de l'ouest ni en Afrique centrale. Par contre le virus circulait à bas bruit dans l'avifaune sauvage d'Afrique centrale [30].

Figure 7 : Pourcentage d'échantillons positifs et répartition des virus étudiés au sein de ces échantillons, pour chaque marché aux volailles (a) au Bénin et (b) au Togo (d'après poster en annexe)

(a) :



(b) :



La taille des camemberts est proportionnelle au pourcentage d'échantillons positifs parmi les échantillons testés.

1.3. Discussion

Depuis 2006, une épizootie d'influenza aviaire provoquée par un virus hautement pathogène H5N1 a affecté de nombreux élevages de volailles, non plus seulement en Asie, mais également au Moyen-Orient, en Europe et en Afrique. En juillet 2015, 844 cas humains (dont 449 décès) d'infection avec le H5N1 ont été recensés par l'OMS ; la plupart des cas sont survenus chez des enfants et de jeunes adultes sains [31].

Au total, plus de 200 millions de poulets sont morts, abattus pour arrêter la propagation du virus ou tués par la maladie, ce qui a provoqué, pour les aviculteurs, des pertes s'élevant à des milliards de dollars [31]. Il était donc important de poursuivre la surveillance du virus en Afrique de l'Ouest notamment. Nous avons donc travaillé en collaboration avec l'équipe de Trevon Fuller de l'Université de Californie Los Angeles (UCLA) et combiné nos données sur l'AIV entre 2010 et 2014 en Afrique de l'ouest et centrale. Notre étude a pu montrer que le virus n'était plus présent chez la volaille domestique dans les pays étudiés. La circulation à bas bruit du virus chez l'avifaune sauvage d'Afrique centrale pose la question de sa transmission à la volaille domestique du continent, voire à sa propagation sur de plus longues distances par les oiseaux migrateurs.

De plus, nous avons fait le choix d'étudier la prévalence des virus NDV, IBV et ILTV qui sont des virus à impact économique fort sur l'ensemble du continent. Nous avons pu montrer une disparité d'apparition des virus selon la région où on se trouve. En effet, NDV est majoritaire dans le nord du Bénin, alors qu'IBV et ILTV se trouvent dans le sud du Togo. Nous avons essayé d'étudier la relation entre la présence d'un virus et son environnement, mais cela fut impossible. En effet, les échantillons provenaient des grands marchés aux volailles des pays étudiés et non pas d'élevages que l'on pouvait situer sur une carte. Il était donc impossible de connaître avec précision les élevages fournisseurs des volailles prélevées. Il aurait été utile d'avoir ses informations pour faire un parallèle entre environnement (biosécurité, management d'élevage etc) et virus, pour connaître l'épidémiologie précise des virus et essayer de lutter contre leur propagation plus efficacement.

Enfin, notre étude a été réalisée intégralement dans les laboratoires de l'UMR INRA-ENVT - IHAP (Toulouse, France). Il aurait été intéressant de réaliser les analyses directement sur place pour limiter le risque de dégradation du matériel biologique au cours des transports. C'est pourquoi, pour assurer la pérennité de cette étude, nous avons effectué durant l'été 2013 une mission au Togo pour former les équipes togolaises et béninoises aux techniques de laboratoire utiles pour ce type d'étude.

2. Epidémiologie moléculaire de souches ivoiriennes du virus de la maladie de Newcastle

Le virus de la maladie de Newcastle est un des virus aviaires qui ont le plus d'impact au niveau économique en Afrique et notamment en Côte d'Ivoire. Dans certains cas, les souches vélogènes (hautement pathogènes) de ce virus peuvent engendrer 100% de mortalité sur les poulets infectés [18], [32]. C'est pourquoi le laboratoire vétérinaire de Bingerville a entamé une étude d'épidémiologie moléculaire concernant NDV avec pour buts (i) d'évaluer la circulation de NDV sur le territoire ivoirien ; et (ii) de déterminer la pathogénicité des NDV en circulation.

2.1. Matériels et méthodes

Dans le cadre de cette étude, le laboratoire vétérinaire de Bingerville, en Côte d'Ivoire, nous a adressé 50 produits de RT-PCR provenant d'échantillons positifs pour NDV, échantillons cloacaux et trachéaux prélevés entre 2010 et 2012. Nous les avons testés à la réception pour s'assurer que les amplicons n'avaient pas été dégradés au cours du voyage. Une fois que nous avons pu attester de la positivité des échantillons, les produits de PCR ont été purifiés et séquencés.

2.1.1. PCR de contrôle

Les échantillons reçus étaient des produits de RT-PCR. Nous avons réalisé une PCR de contrôle sur ces échantillons : une PCR nichée amplifiant un fragment des produits de PCR reçus. Les amorces utilisées pour la PCR étaient donc différentes que celles utilisées dans l'étude de prévalence de NDV et sont détaillées dans le Tableau 6.

Nous avons ensuite purifié les produits de PCR nichée.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR de contrôle

Virus cible	Amorces	Source	Taille des fragments amplifiés	Température d'hybridation
NDV	FIP1: 5'TACTTTGCTCACCCCCTT 3' FIP2: 5'CATCTTCCCAACTGCCACT 3'	Kho et al. (2000)	280 bp	58°C

2.1.2. Purification

L'étape de purification est une étape importante avant de séquencer un échantillon. En effet, elle permet de nettoyer l'échantillon de tous les résidus des PCR précédentes (amorces, dNTP, etc...) susceptibles d'inhiber la réaction de séquençage.

Le kit « QIAquick PCR Purification » a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant [29].

2.1.3. Séquençage

L'ADN est composé de 4 nucléotides : A, C, G et T. L'alignement de ces nucléotides constituant le brin d'ADN représente l'information génétique proprement dite.

Le séquençage est l'étape qui permet d'identifier cette séquence.

Pour réaliser cet essai, nous avons mélangé les échantillons à une solution composée de :

- désoxyribonucléotides (dNTP) : dATP, dCTP, dGTP et dTTP, utilisés pour compléter le brin d'ADN complémentaire
- didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui jouent le rôle de « poison » terminateurs de chaînes. Lorsqu'un ddNTP est utilisé dans la chaîne, la polymérisation s'arrête. Chaque type de ddNTP possède un traceur fluorescent spécifique à son extrémité. Les ddNTP sont en plus faible quantité que les dNTP
- Des amorces spécifiques du gène recherché
- Une enzyme polymérase

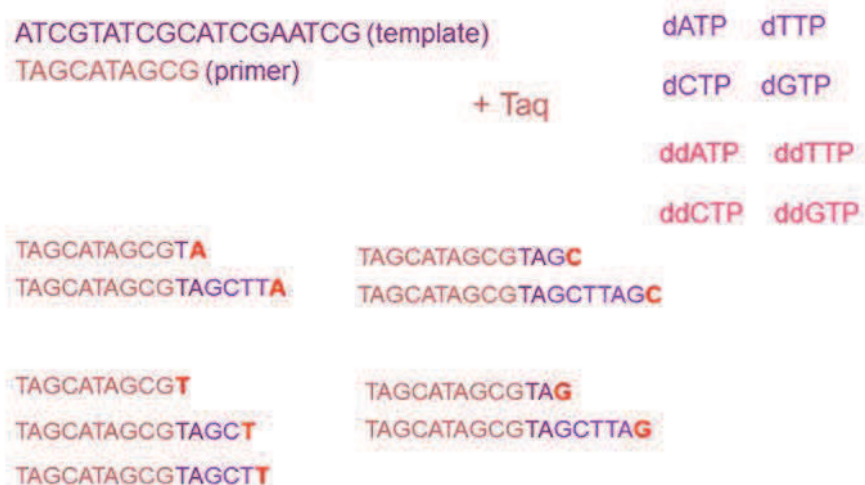
Les amorces viennent s'attacher au brin d'ADN présent, au niveau de la séquence correspondant au gène recherché. L'enzyme va alors venir accrocher les nucléotides complémentaires au brin d'ADN. Si durant la polymérisation l'enzyme place un ddNTP, la réaction s'arrête. Le brin a alors une taille plus petite que le brin final. Plusieurs réactions vont se faire en même temps, donnant ainsi un mélange de brins d'ADN, de tailles différentes, avec à leur extrémité, des ddNTP (Figure 8a). Chaque ddNTP, correspondant à A, C, G et T, vont réagir par fluorescence (grâce à leur traceur) en donnant un pic de couleur spécifique à chacun : vert pour A, bleu pour C, noir pour G et rouge pour T (Figure 8b).

A l'aide du logiciel BioEdit® [33], nous avons obtenu une séquence de nucléotides suite à la superposition de tous les brins d'ADN qui ont été créés et analysés par fluorescence. Nous avons ensuite vérifié point par point qu'il n'y avait pas eu d'erreur de lecture (Figure 8c).

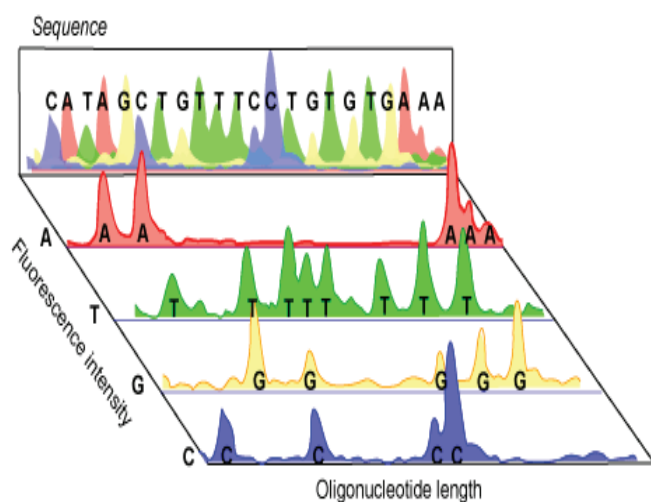
Nous nous sommes ensuite rendus sur le site du National Center for Biotechnology Information pour obtenir une séquence de référence d'un NDV lentogène et d'un NDV vélogène. En effet, chaque pathotype de virus a un site de clivage spécifique.

Figure 8 : (a) : placement aléatoire des dNTP et des ddNTP sur le brin complémentaire ; (b) : fluorescence des différents brins obtenus et superposition pour former la séquence ; (c) : séquence obtenue après analyse (BioEdit [33])

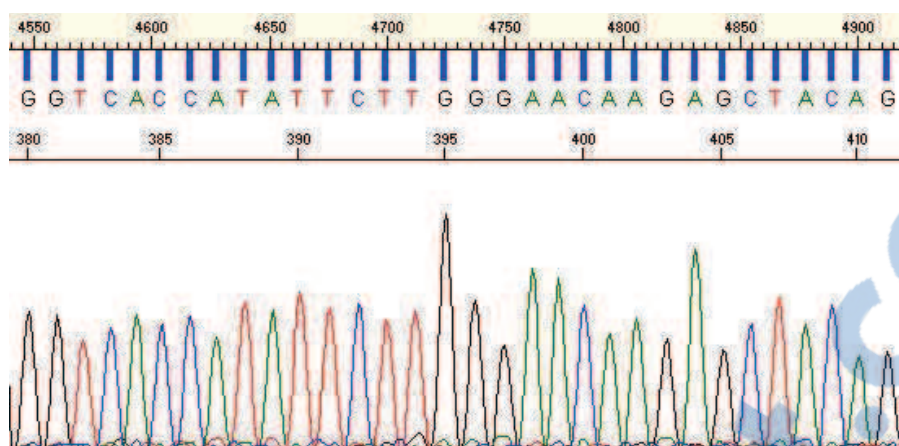
(a) :



(b) :



(c) :



2.2. Résultats

Sur les 50 échantillons reçus, nous avons pu en séquencer 45. En effet, pour 5 prélèvements, soit le produit PCR expédié s'était évaporé pendant le transport soit la RT-PCR nichée était négative.

Sur ces 45 échantillons, nous avons pu déterminer quel virus était lentogène ou vélogène. Nous avons résumé les résultats dans le tableau 7.

Tableau 7 : nombre d'échantillons correspondant aux virus lentogènes ou vélogènes avec leur site de clivage associé

Type de virus	Site de clivage (position des acides aminés indiquée en 3' et 5')	Nombre d'échantillons
Virus lentogènes (faiblement pathogène)	112 GRQGR*L 117	15
Virus vélogènes (hautement pathogène)	112 GRRQER*F 117 ou 112 RRQKR*F 117	30

Nous avons pu constater qu'il y a deux fois plus de virus vélogènes que lentogènes sur le sol ivoirien. Cela peut poser un réel problème épidémiologique sur l'ensemble du pays, car les virus vélogènes peuvent engendrer 100% de mortalité chez les oiseaux infectés [18]. Ce travail a fait l'objet d'une publication avec l'équipe ivoirienne [34].

2.3. Discussion

Cette étude d'épidémiologie moléculaire faisait partie d'une étude de plus grande ampleur, menée par le laboratoire de Bingerville en Côte d'Ivoire (AV. Kouakou et al, [34]) qui avait pour but d'étudier la prévalence des virus NDV et IBV sur le territoire ivoirien et de les caractériser au niveau moléculaire. Elle faisait suite aux travaux de Snoeck et al, en 2013 [25].

Nos résultats confirment la forte présence du virus NDV en Afrique sub-saharienne. Nous avons retrouvé en majorité des souches vélogènes, qui sont les souches les plus virulentes du virus. Cela pose un problème majeur pour les élevages avicoles ivoiriens. Ces souches peuvent engendrer de fortes mortalités dans les élevages et ainsi avoir un impact économique considérable. La perspective de ce travail serait d'identifier le génotype de ces souches, pour compléter les études faites sur le virus en Afrique [24], [26]. Il serait également intéressant d'étudier la relation entre pathotypes présents et saisonnalité pour voir s'il existe un lien avec l'environnement car cette corrélation n'était pas évidente dans notre étude.

Une étude de 2012 (Samuel et al, [32]) a montré qu'il existait une circulation à bas bruit de souches vélogènes de NDV, au sein de la population de volaille au Togo et au Bénin. Elle a également montré que la vaccination avec la souche vaccinale La Sota (très utilisée dans les pays européens et aux Etats-Unis) protégeait contre les signes cliniques et la mortalité dus à ces souches. Cependant elle ne protège pas contre l'infection et la réplication du virus. Au vu de la forte présence de souches hautement pathogènes, la Côte d'Ivoire a tout à gagner à investir dans des campagnes massives de vaccination pour protéger les volailles contre la mortalité au moins. Nous savons que ce pays, marqué par de multiples crises politiques est en reconstruction et se tourne de plus en plus vers l'élevage moderne. Il faudra alors tenir compte des résultats obtenus pour essayer d'éradiquer le virus NDV des élevages avicoles ivoiriens.

3. Evaluation de l'efficacité du vaccin H120 contre une souche africaine du virus de la bronchite infectieuse

Les infections par IBV sont associées à des pertes économiques importantes en élevage. La vaccination prophylactique contre ce virus est pratiquée dans presque tous les pays producteurs de volailles à l'échelle industrielle. Cependant, les souches vaccinales d'IBV sont généralement produites sur la base des souches en circulation dans les plus gros pays producteurs de volailles (représentants les plus gros marchés pour la vente de vaccins). Les souches circulantes en Afrique Sub-Saharienne sont souvent différentes sur le plan génétique

comme sur le plan antigénique, des souches en circulation dans les pays industrialisés gros producteurs de volailles.

Le but de cette troisième étude était donc de tester la protection conférée par un vaccin commercial, la souche IBV H120, face à un IBV ouest-africain du génotype « IBADAN ».

Nous avons vacciné des poulets avec la dose de vaccin commercial recommandée en élevage puis nous avons fait une épreuve de virulence pour vérifier l'efficacité du vaccin utilisé. Nous avons prélevé des écouvillons tous les deux jours pour doser la charge virale, ainsi que du sang la veille de l'épreuve de virulence et deux semaines après pour suivre la production d'anticorps. Nous avons recouru à de l'expérimentation animale pour répondre à la fois à des questions en élevage et des questions sociétales (amélioration de la production avicole en Afrique de l'Ouest qui permettra indirectement de réduire le coût pour les consommateurs).

3.1. Matériels et méthodes

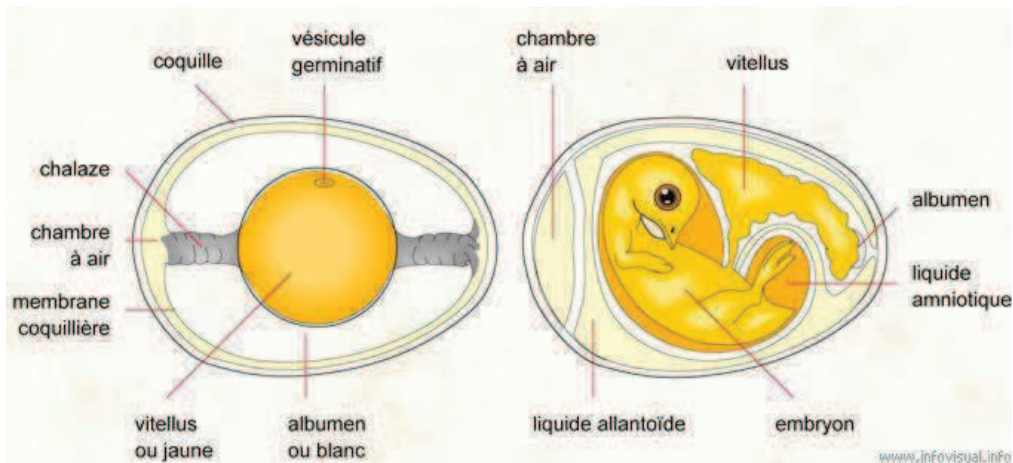
3.1.1. Amplification du virus sur œufs embryonnés

Pour l'infection des poulets, nous avons utilisé une souche nigériane d'IBV, appelée IBADAN06, découverte en 2009. Pour cela, nous l'avons fait venir d'un laboratoire luxembourgeois, collaborateur de l'IHAP. Ayant peu de virus, l'étape d'amplification fut une étape clé pour la suite de l'étude.

Elle consiste à injecter le virus dans un œuf embryonné de poule pour lui permettre de s'y multiplier. Les œufs utilisés, étaient des œufs « Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques » (EOPS). Ceux-ci sont très importants car ils évitent qu'un autre agent infectieux vienne « parasiter » l'essai et en compromettre la signification.

La multiplication du virus s'est faite dans des œufs de poule embryonnés. Les œufs de poule ont été incubés à 37°C pendant 9 à 11 jours, pour que l'embryon se développe. Ils ont donc été mis à leur arrivée dans un incubateur possédant un mécanisme imitant les mouvements de la poule en ponte. Ainsi, la rotation artificielle de l'œuf et la chaleur vont permettre un bon développement de l'embryon.

Figure 9 : vue intérieure d'un œuf d'oiseau (www.infovisual.info)

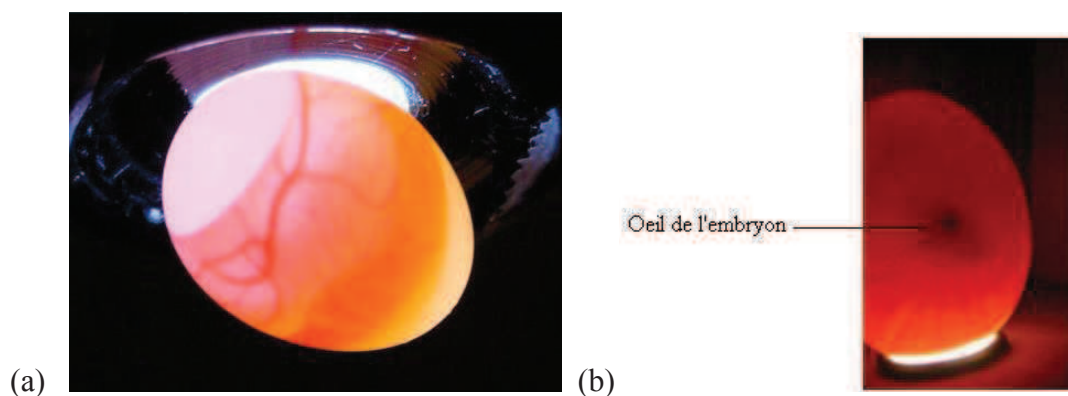


Dans la littérature, il est utile de noter que pour isoler le virus de la bronchite infectieuse, la technique par isolement dans le liquide allantoïque (Figure 9) est conseillée. Nous avons donc utilisé cette méthode pour multiplier IBADAN06. Toutes les étapes d'infection et de récolte ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique.

3.1.1.1. Infection

Dans un premier temps, les œufs ont été mirés pour voir si ils étaient vivants ou non. Seuls les œufs possédants un embryon vivant ont été gardés pour la suite de la manipulation. (Figure 10b) Le mirage a également permis de délimiter la chambre à air. (Figure 10a) Nous avons ainsi souligné le contour de la chambre à air directement sur la coquille, à l'aide d'un feutre permanent.

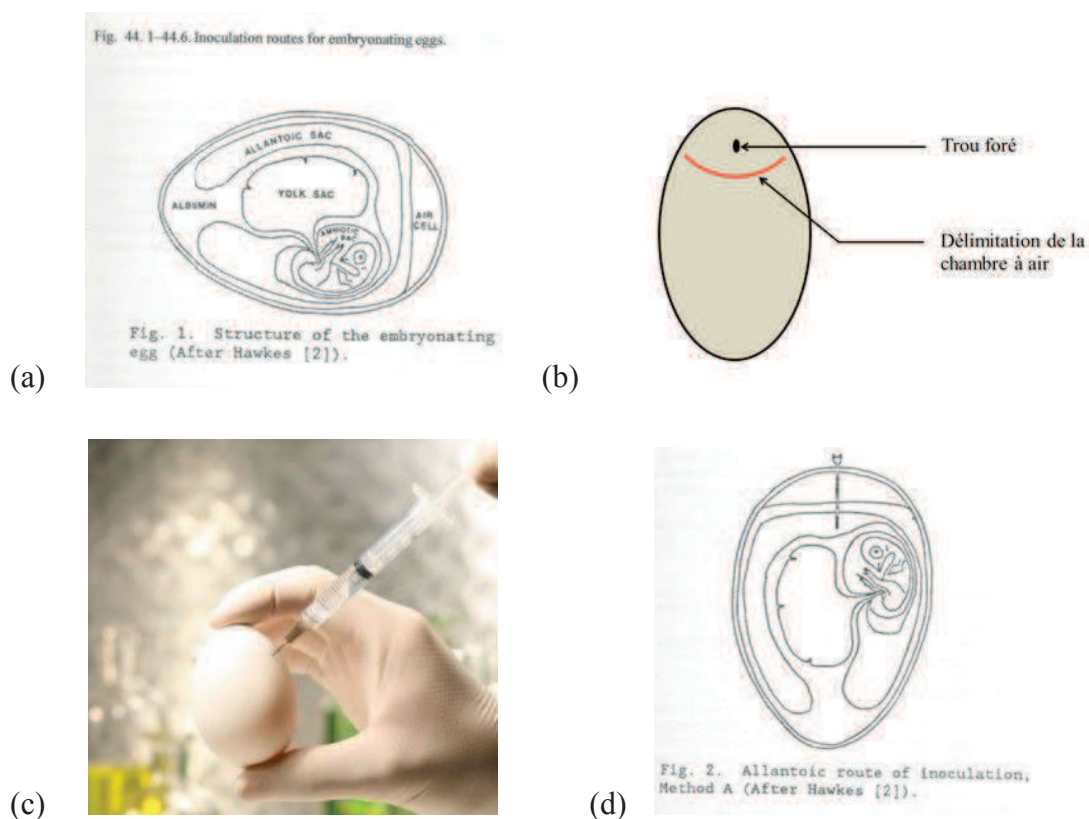
Figure 10 : (a) chambre à air observée lors du mirage et (b) embryon au sein de l'œuf (IHAP ENVT)



Une fois les œufs prêts, nous avons injecté le virus, dilué préalablement au $1/5^e$, avec un tampon phosphate salin (PBS), dans le liquide allantoïque. Il est utile d'ajouter à l'échantillon un antibiotique (Pénicilline-streptomycine) supprimant le risque de développement d'agents bactériens dans l'œuf.

Pour atteindre le liquide allantoïque, nous avons foré un petit trou à travers la coquille, dans la chambre à air, à 0,5 cm environ au-dessus de la délimitation faites après le mirage des œufs. (Figure 11b) A l'aide d'une aiguille montée sur une seringue, nous avons traversé la membrane coquillière, l'albumine, la membrane chorio-allantoïque et nous sommes arrivés dans le liquide allantoïque. (Figure 11c et d)

Figure 11 : (a) : localisation du liquide allantoïque cible ; (b) : représentation du trou foré au niveau de l'œuf ; (c) : injection du virus dans l'œuf ; (d) : représentation de l'aiguille atteignant l'intérieur du sac allantoïque (d'après Dufour-Zavala [35] et banque d'images [36])



Une fois la solution injectée dans le liquide allantoïque, nous avons colmaté le trou à l'aide de paraffine. Les œufs ont ensuite été mis dans un incubateur spécifique pour œufs infectés pendant 3 jours.

3.1.1.2. Récolte du liquide allantoïque

Après 3 jours d'incubation, les œufs ont été placés toute une nuit en chambre froide à 4°C. Cette opération permet de tuer l'embryon avant de récolter le liquide allantoïque.

Nous avons pu ensuite récolter le liquide allantoïque. Pour cela, nous avons découpé le haut de l'œuf, au niveau de la chambre à air, à l'aide de ciseaux fin, en faisant attention de ne pas casser toute la coquille. Nous avons ensuite percé les membranes coquillière et chorio-allantoïque. Grâce à une cuillère à café, nous avons plaqué l'embryon vers le bas, afin de faire

remonter le liquide, sans percer le sac vitellin. Nous avons enfin récolté le liquide allantoïque à l'aide d'une pipette. Sachant que pour un échantillon positif, nous avons en moyenne trois œufs infectés, nous avons mélangé l'ensemble des liquides allantoïques récoltés. Nous avons également observé les embryons. En effet, lorsque le virus de la bronchite infectieuse se développe dans l'œuf, l'embryon peut souffrir de nanisme, est recroquevillé et tout rouge (Figure 12).

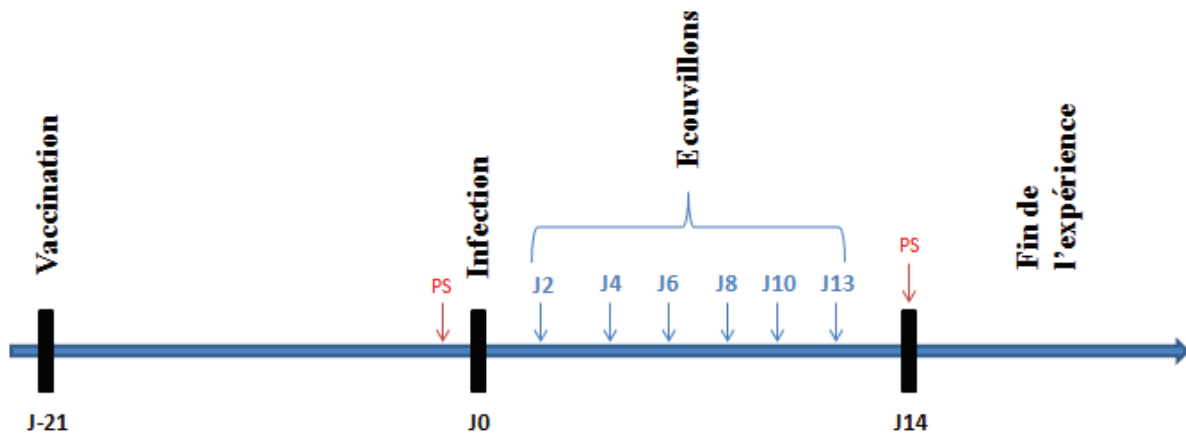
Figure 12 : différence entre un embryon sain (à gauche) et un embryon infecté par IBV (à droite) d'après UMR-ENVT-IHAP



3.1.2. Etude vaccinale

Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'un vaccin commercial contre une souche africaine d'IBV chez le poulet. Toutes les étapes de l'expérience ont été réalisées en animalerie A2 (Niveau 2 de bioconfinement requis pour ce protocole expérimental) et sont résumées dans la figure suivante :

Figure 13 : Schéma expérimental



3.1.2.1. Formation des lots

Pour cette étude, nous avons constitué 3 lots de 8 poulets chacun, selon le protocole suivant :

- Lot A : vacciné, infecté
- Lot B : non vacciné, infecté
- Lot C : lot témoin non vacciné, non infecté

Les poulets utilisés étaient des poulets EOPS, de souche White Leghorn. Nous avons constitué les lots de façon aléatoire, sans prendre en compte le sexe ratio car nous étions dépendants de la disponibilité des oiseaux et à l'heure actuelle aucune différence entre mâles et femelles n'a été observée dans la réponse à l'infection à l'IBV.

Vaccination

Pour le virus étudié, nous avons choisi une souche vaccinale disponible en Afrique Sub-Saharienne : la souche H120.

Sur la base des recommandations des firmes qui commercialisent les vaccins IBV (et des protocoles de vaccination disponibles), nous avons adapté l'âge des oiseaux pour coller aux conditions de terrain de l'utilisation des vaccins. Ainsi, nous avons constitué un protocole vaccinal :

- une primo-vaccination à 1 jour
- un rappel de vaccination à 2 semaines

Pour la dose et la voie d'inoculation, nous avons appliqué 50 µL du vaccin sous forme d'une goutte directement dans l'œil.

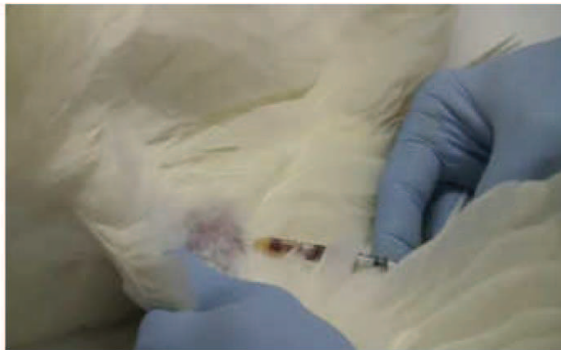
3.1.2.2. Infection et écouvillonnages

Pour mener à bien les épreuves de virulence, nous avons infecté les volailles vaccinées 3 semaines post-vaccination avec la souche nigériane d'IBV appelée IBADAN06.

Tous les animaux étaient hébergés en isolateurs pour volailles pour l'épreuve de virulence (groupes de 8 animaux par isolateur), en séparant les animaux non infectés/non vaccinés, infectés/non vaccinés et infectés/vaccinés .

Pour chaque oiseau, nous avons fait une prise de sang la veille de l'épreuve virulente ainsi que deux semaines post-infection pour un suivi sérologique. Les animaux ont également été écouvillonnés à j2, j4, j6, j8, j10 et j13 post-infection (écouvillons oropharyngés Figure 14, charge virale présentée en Figure 15). Les écouvillons ont été placés dans des microtubes avec du PBS (tampon phosphate salin). Ils ont ainsi permis de doser la charge virale au cours du temps, par RT-PCRq (q pour quantitative).

Figure 14 : prise de sang et écouvillonnage des poulets (ENVT – Clinique Aviaire et porcine)



Prise de sang à la veine alaire



Écouvillonnage oropharyngé

3.1.2.3. (RT)-PCRq

La (RT)-PCR quantitative ((RT)-PCRq) permet d'avoir en temps réel l'information sur la quantité d'ADN double brin dans la solution grâce à l'utilisation de molécules émettant une fluorescence. Il existe plusieurs techniques possibles, celle que nous avons utilisée ici est basée sur la chimie Sybr Green : le Sybr Green est une molécule qui s'hybride avec la double

hélice d'ADN et émet alors une fluorescence. L'intensité de fluorescence augmente donc avec le nombre de molécules d'ADN double-brin produites au cours des cycles de PCR. La courbe d'émission du signal fluorescent au cours des cycles d'amplification permet de quantifier l'ADN initialement présent dans le mélange réactionnel.

Cette technique n'est pas spécifique de l'amplicon : elle nécessite, après la réalisation de la (RT)-PCRq, de générer des courbes de dissociation. Les échantillons sont chauffés de 60 à 100°C : l'intensité de la fluorescence augmente jusqu'à une température dite « température de dissociation » spécifique d'une séquence donnée. Cette température de dissociation permet donc de vérifier la spécificité d'un signal de PCR. La courbe de dissociation est en fait la dérivée de cette courbe décroissante.

3.1.2.4. Sérologie

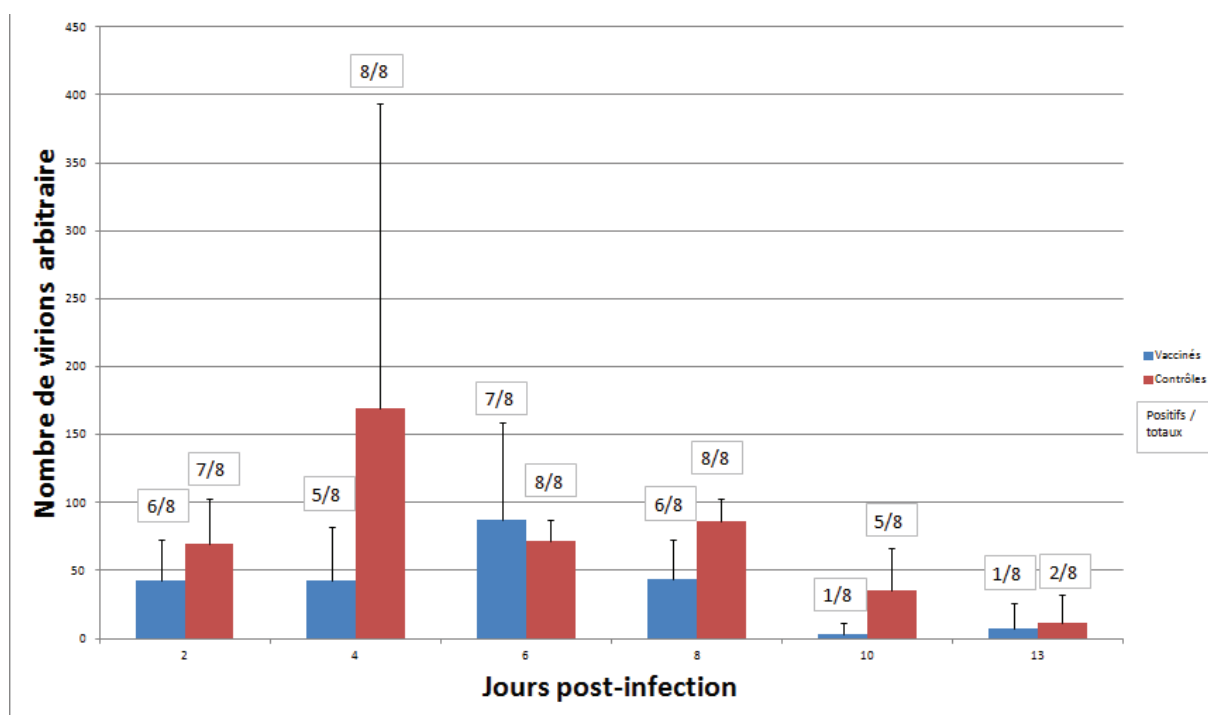
Pour détecter la présence d'anticorps anti-IBV dans le sérum, nous avons réalisé des Western Blot. Des séries de 20µl de virus IBADAN06 ont été déposés sur un gel SDS page à côté d'un marqueur de poids moléculaire. Une fois migré, le gel a été transféré sur une membrane de nitrocellulose, bloquée (1h à température ambiante dans du lait) puis découpée en languettes de 2 puits (marqueur + IBADAN06). Chaque languette a été incubée une nuit à 4°C avec un sérum expérimental différent : les sérums pré-épreuve virulente et post infection ont ainsi tous été testés. Après trois lavages en PBS-tween 0.05%, les membranes ont été incubées ensemble avec un anticorps secondaire anti-poulet marqué à la peroxydase (1 h à température ambiante sous agitation) et révélées.

3.2. Résultats

Après infection, nous n'avons pu observer aucun signe clinique (toux, jetage, etc..) et ce, jusqu'à la fin de l'étude, sur les oiseaux vaccinés ou contrôles. Nous avons écouvillonné les animaux du lot A et du lot B, tous les 2 jours. Chaque jour d'écouvillonnage, nous avons donc 16 échantillons à traiter : 8 échantillons provenant de poulets vaccinés et infectés et 8 échantillons provenant de poulets non vaccinés et infectés. Chaque échantillon, après une (RT)-PCRq et analyse, donnait une valeur seuil de fluorescence (Ct) à partir duquel un signal correspondant à la quantité de virus était émis. Plus le Ct était élevé, moins il y avait de virus dans l'échantillon. Pour permettre une meilleure lecture des résultats, nous avons converti cette valeur de Ct en quantité arbitraire de génomes viraux. Nous avons considéré qu'un Ct de 20 correspondait arbitrairement à 1000 virions (unité : quantité arbitraire de virus, qav). A

partir de ce nombre, nous avons pu convertir tous les Ct en quantité arbitraire de virus, pour chaque échantillon au cours du temps. Nous avons également dû choisir un seuil de Ct au-dessus duquel nous considérons que la quantité de virus était négligeable : Ct = 32 pour cette expérience. Enfin pour chaque jour de prélèvement, nous avons calculé la quantité de virus arbitraire moyenne chez les vaccinés et chez les non vaccinés. Ces résultats ont été représentés sous la forme d'histogramme, dans la figure 15 ci-dessous.

Figure 15 : Suivi de la charge virale après épreuve virulente, chez les oiseaux vaccinés (en bleu) et non vaccinés (en rouge)



Pour que la présentation des résultats soit plus claire, nous avons rajouté le nombre de poulets positifs (excrétant du virus) par rapport au nombre total de poulets écouvillonnés, au-dessus de chaque histogramme.

En regardant les résultats de la figure, nous pouvons dégager 3 informations :

- Tout au long de l'étude, la quantité de virus chez les individus vaccinés est toujours moindre que celle chez les individus non vaccinés. La différence n'est cependant pas significative. Ceci nous montre qu'il y a un effet négatif de la vaccination sur la multiplication du virus dans l'organisme.
- Le pic de virulence est décalé dans le temps pour les individus vaccinés, ce qui montre qu'il y a bien un ralentissement de la multiplication du virus.

- La clairance du virus se fait plus rapidement chez les individus vaccinés que chez les non vaccinés. On remarque que nous atteignons un nombre de positif très faible (1/8) dès le 10^e jour post-infection chez les vaccinés alors qu'il y avait toujours 2 poulets excréteurs (2/8) chez les non vaccinés à 13 jours post-infection.

Le suivi sérologique a été réalisé par western blot. Nous avons observé la présence d'anticorps anti-IBV chez les oiseaux vaccinés (prise de sang juste avant l'épreuve de virulence), et également chez tous les oiseaux après infection. Les oiseaux témoins (non vaccinés non infectés) étaient séronégatifs durant toute l'étude.

3.3. Discussion

L'effet du vaccin H120, utilisé fréquemment en Europe et en Afrique dans les élevages avicoles, sur la souche nigériane IBADAN06, n'est pas spectaculaire mais existe. Le virus se multiplie plus lentement et en moindre quantité que chez des individus non protégés. En production avicole, on attend d'un vaccin qu'il stoppe la réplication virale et non qu'il atténue uniquement les signes cliniques. La souche vaccinale H120 ne semble donc pas adaptée à la lutte contre les IBV du génotype IBADAN. Une vaccination avec H120 pourrait tout de même réduire la propagation du virus en réduisant légèrement la charge virale. Il existe certaines limites à cette étude :

- L'épreuve virulente avec IBADAN06 n'a pas causé de signe clinique, y compris chez les animaux non vaccinés. Il est donc difficile de conclure à l'efficacité du vaccin H120 sur la morbidité et la mortalité associées à IBV. Il serait sans doute relevant à l'avenir de répéter cette étude vaccinale sur des poulets non EOPS et peut-être avec un agent de co-infection pour se rapprocher des conditions du terrain.
- H120 étant peu efficace contre IBADAN, il serait intéressant de tester l'efficacité d'autres souches vaccinales (telles 4/91 ou QX) seules ou en combinaison.
- Le nombre d'animaux utilisés pour chaque lot était au plus bas, en conformation avec la règle des 3R. Parfois, les valeurs de Ct étaient très hétérogènes au sein d'un lot comme le montrent les écarts types élevés. Nous avons pu analyser nos résultats tout de même mais avec un plus grand nombre d'animaux par lot, ces disparités se lisseraient sans doute et les différences entre oiseaux vaccinés et non-vaccinés seraient peut-être plus significatives.
- Le suivi de sérologie fut fastidieux car le virus n'était pas hémagglutinant. En effet, certains IBV hémagglutinent et d'autres non. Cette spécificité du virus nous a

empêchés de faire des tests d'inhibition de l'hémagglutination et contraints à utiliser la technique du western blot pour étudier la présence des anticorps chez les animaux, méthode plus longue et fastidieuse.

- Le protocole de vaccination utilisé est celui prévu par les laboratoires fournissant le vaccin. Cependant, en Afrique de l'Ouest, les élevages avicoles sont le plus souvent des particuliers possédant un petit nombre de poulets. Chacun de ces éleveurs possède son propre « protocole » de vaccination selon le temps et l'argent qu'ils y consacrent (parfois aucun). Il faudrait, pour appliquer notre étude au terrain, vérifier la faisabilité d'une vaccination IBV en élevage traditionnel en passant par exemple par une enquête épidémiologique.

Nous avons pu montrer que les vaccins utilisés fréquemment dans les pays « industrialisés » pour lutter contre le virus de la bronchite infectieuse, donnaient des résultats peu concluants contre une souche africaine de ce virus. Ici, le vaccin permet une légère diminution de la multiplication de ce virus et facilite son élimination. Sur le terrain, cela pourrait permettre de limiter la propagation du virus au niveau national. Mais il est nécessaire de tester l'efficacité d'autres souches vaccinales contre IBADAN avant de recommander un protocole de vaccination. Les marchés aux volailles sont des lieux où volailles et éleveurs de différents endroits du pays se réunissent et sont en contacts permanents. Ce sont donc des réservoirs potentiels de virus aviaires. Si les poulets arrivants sur place sont vaccinés, cela pourrait contribuer à la réduction de la pression du virus de la bronchite infectieuse dans les élevages africains.

CONCLUSION

L'objectif de cette thèse était de détecter et de caractériser des virus respiratoires aviaires circulants en Afrique de l'Ouest. Elle a également eu pour but de répondre à une attente des aviculteurs africains en montrant si oui ou non les vaccins actuels fonctionnent contre les souches virales africaines de la bronchite infectieuse. Elle fut faite en étroite collaboration avec les laboratoires vétérinaires de Bingerville (Côte d'Ivoire), Lomé (Togo), et de Parakou (Bénin), qui nous ont permis de récolter un nombre important d'échantillons.

La filière avicole est un secteur en pleine expansion en Afrique de l'Ouest, tant sur le plan de taille de population que sur le plan économique [1]. Les autorités connaissent les enjeux et sont prêts à renforcer les plans de surveillance. Une étude comme la nôtre permet de donner une idée sur le statut d'un pays en matière d'agents pathogènes sur une période donnée. Ces résultats sont utiles pour les banques de données mondiales en matière d'épidémiologie. Elles permettent ainsi de connaître, de comprendre et de lutter contre des virus à l'expansion rapide.

Cette thèse permet également de montrer l'importance de la vaccination dans la lutte contre des virus aviaires d'importance mondiale. Les campagnes prophylactiques, lorsqu'elles sont justifiées, peuvent permettre de limiter l'expansion des virus mais également peuvent favoriser leur extinction. A nous de promouvoir l'utilité de ces vaccinations auprès des aviculteurs locaux et de créer un protocole adapté en fonction des spécificités du terrain (en terme de type de souches virales en circulation mais également d'environnement (biosécurité, conduite d'élevage, température, humidité, densité d'animaux, etc)), mais aussi des attentes et contraintes économiques des éleveurs.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Jean-Luc GUERIN, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LANGEOIS Quentin** intitulée « **Détection et caractérisation de virus respiratoires aviaires en Afrique de l'Ouest.**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 10 septembre 2015
Professeur Jean-Luc GUERIN
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse




Vu :
Le Président du jury :
Professeure Christine ROQUES



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Références bibliographiques

- [1] “FAOSTAT.” [Online]. Available: <http://faostat3.fao.org/home/E>. [Accessed: 14-Aug-2015].
- [2] D. Cavanagh, “Coronavirus avian infectious bronchitis virus,” *Vet. Res.*, vol. 38, no. 2, pp. 281–297, Mar. 2007.
- [3] D. Cavanagh and Naqi, “Infectious bronchitis,” *Diseases of poultry*, Iowa, pp. pp. 101–119, 2003.
- [4] D. Cavanagh, “Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein,” *J. Gen. Virol.*, vol. 64 (Pt 12), pp. 2577–2583, Dec. 1983.
- [5] “ICTV Virus Taxonomy.” [Online]. Available: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. [Accessed: 23-Aug-2015].
- [6] D. Cavanagh, P. J. Davis, J. H. Darbyshire, and R. W. Peters, “Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolyptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection,” *J. Gen. Virol.*, vol. 67 (Pt 7), pp. 1435–1442, Jul. 1986.
- [7] M. Godet, R. L’Haridon, J. F. Vautherot, and H. Laude, “TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions,” *Virology*, vol. 188, no. 2, pp. 666–675, Jun. 1992.
- [8] P. S. Masters, “The molecular biology of coronaviruses,” *Adv. Virus Res.*, vol. 66, pp. 193–292, 2006.
- [9] M. E. Boursnell, M. M. Binns, I. J. Foulds, and T. D. Brown, “Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus,” *J. Gen. Virol.*, vol. 66 (Pt 3), pp. 573–580, Mar. 1985.
- [10] M. J. Raamsman, J. K. Locker, A. de Hooge, A. A. de Vries, G. Griffiths, H. Vennema, and P. J. Rottier, “Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E,” *J. Virol.*, vol. 74, no. 5, pp. 2333–2342, Mar. 2000.
- [11] R. L. Graham, E. F. Donaldson, and R. S. Baric, “A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 12, pp. 836–848, décembre 2013.
- [12] M. W. Jackwood, “Review of infectious bronchitis virus around the world,” *Avian Dis.*, vol. 56, no. 4, pp. 634–641, 2012.
- [13] B. Q. Dong, W. Liu, X. H. Fan, D. Vijaykrishna, X. C. Tang, F. Gao, L. F. Li, G. J. Li, J. X. Zhang, L. Q. Yang, L. L. M. Poon, S. Y. Zhang, J. S. M. Peiris, G. J. D. Smith, H. Chen, and Y. Guan, “Detection of a Novel and Highly Divergent Coronavirus from Asian Leopard Cats and Chinese Ferret Badgers in Southern China,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 13, pp. 6920–6926, Jul. 2007.
- [14] W. Jia, K. Karaca, C. R. Parrish, and S. A. Naqi, “A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains,” *Arch. Virol.*, vol. 140, no. 2, pp. 259–271, 1995.
- [15] L. Wang, D. Junker, and E. W. Collisson, “Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus,” *Virology*, vol. 192, no. 2, pp. 710–716, Feb. 1993.
- [16] L. Wang, D. Junker, L. Hock, E. Ebiary, and E. W. Collisson, “Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus,” *Virus Res.*, vol. 34, no. 3, pp. 327–338, Dec. 1994.
- [17] M. F. Ducatez, A. M. Martin, A. A. Owoade, I. O. Olatoye, B. R. Alkali, I. Maikano, C. J. Snoeck, A. Sausy, P. Cordioli, and C. P. Muller, “Characterization of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa,” *J. Gen. Virol.*, vol. 90, no. 11, pp. 2679–2685, Nov. 2009.
- [18] P. . Miller and G. Kosh, “Newcastle disease,” in *Diseases of Poultry*, 13th Edition., Wiley-Blackwell, 2013, pp. p.89–107.
- [19] D. J. Alexander, “Newcastle disease and other avian paramyxoviruses,” *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.*, vol. 19, no. 2, pp. 443–462, Aug. 2000.
- [20] P. Gogoi, K. Ganar, and S. Kumar, “Avian Paramyxovirus: A Brief Review,” *Transbound. Emerg. Dis.*, Apr. 2015.

- [21] B. P. Peeters, O. S. de Leeuw, G. Koch, and A. L. Gielkens, "Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence," *J. Virol.*, vol. 73, no. 6, pp. 5001–5009, Jun. 1999.
- [22] S. K. Samal, "Newcastle disease and related avian paramyxoviruses," in *The biology of paramyxoviruses*, Caister Academic press., Norfolk, United Kingdom, pp. p. 69–114.
- [23] A. DECOSTER, "PARAMYXOVIRUS," 07-Aug-2015. [Online]. Available: <http://anne.decoستر.free.fr/d1viro/vparamyx.html>. [Accessed: 07-Aug-2015].
- [24] D. G. Diel, L. H. A. da Silva, H. Liu, Z. Wang, P. J. Miller, and C. L. Afonso, "Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 12, no. 8, pp. 1770–1779, Dec. 2012.
- [25] C. J. Snoeck, A. A. Owoade, E. Couacy-Hymann, B. R. Alkali, M. P. Okwen, A. T. Adeyanju, G. F. Komoyo, E. Nakoune, A. Le Faou, and C. P. Muller, "High Genetic Diversity of Newcastle Disease Virus in Poultry in West and Central Africa: Cocirculation of Genotype XIV and Newly Defined Genotypes XVII and XVIII," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 7, pp. 2250–2260, Jul. 2013.
- [26] C. J. Snoeck, M. F. Ducatez, A. A. Owoade, O. O. Faleke, B. R. Alkali, M. C. Tahita, Z. Tarnagda, J.-B. Ouedraogo, I. Maikano, P. O. Mbah, J. R. Kremer, and C. P. Muller, "Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms," *Arch. Virol.*, vol. 154, no. 1, pp. 47–54, Jan. 2009.
- [27] D. K. Byarugaba, K. K. Mugimba, J. B. Omony, M. Okitwi, A. Wanyana, M. O. Otim, H. Kirunda, J. L. Nakavuma, A. Teillaud, M. C. Paul, and others, "High pathogenicity and low genetic evolution of avian paramyxovirus type I (Newcastle disease virus) isolated from live bird markets in Uganda," *Virol. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2014.
- [28] R. Servan de Almeida, O. F. Maminiana, P. Gil, S. Hammoumi, S. Molia, V. Chevalier, M. Koko, H. R. Andriamanivo, A. Traoré, K. Samaké, A. Diarra, C. Grillet, D. Martinez, and E. Albina, "Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus?," *Vaccine*, vol. 27, no. 24, pp. 3127–3129, May 2009.
- [29] Qia. P. P. Kit, Qia. N. R. Kit, and Qia. G. E. Kit, "QIAquick® Spin Handbook," 2002.
- [30] T. L. Fuller, M. F. Ducatez, K. Y. Njabo, E. Couacy-Hymann, A. Chasar, G. L. Aplogan, S. Lao, F. Awoume, A. Téhou, Q. Langeois, S. Krauss, and T. B. Smith, "Avian influenza surveillance in Central and West Africa, 2010–2014," *Epidemiol. Infect.*, vol. 143, no. 10, pp. 2205–2212, Jul. 2015.
- [31] OMS, "tableaurecapitulatif." [Online]. Available: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20150717cumulativeNumberH5N1cases.pdf?ua=1. [Accessed: 24-Aug-2015].
- [32] A. Samuel, B. Nayak, A. Paldurai, S. Xiao, G. L. Aplogan, K. A. Awoume, R. J. Webby, M. F. Ducatez, P. L. Collins, and S. K. Samal, "Phylogenetic and Pathotypic Characterization of Newcastle Disease Viruses Circulating in West Africa and Efficacy of a Current Vaccine," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 3, pp. 771–781, Mar. 2013.
- [33] "BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP/Vista/7." [Online]. Available: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. [Accessed: 24-Aug-2015].
- [34] A. V. Kouakou, V. Kouakou, C. Kouakou, P. Godji, A. Lou Kouassi, H. A. Krou, Q. Langeois, R. J. Webby, M. F. Ducatez, and E. Couacy-Hymann, "Prevalence of Newcastle disease virus and Infectious bronchitis virus in avian influenza negative birds from live bird markets, backyard and commercial farms in Ivory-Coast," *Res. Vet. Sci.*, Jul. 2015.
- [35] L. Dufour-Zavala, "Avian influenza ; infectious bronchitis ; newcastle disease," in *A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens*, 5th Edition., 2008.
- [36] "Gros Plan De La Seringue Pour Injection Oeuf Expérience Banque D'Images Et Photos Libres De Droits. Pic 2860739." [Online]. Available: http://fr.123rf.com/photo_2860739_gros-plan-de-la-seringue-pour-injection-oeuf-exp-rience.html. [Accessed: 24-Aug-2015].

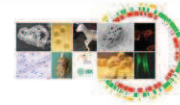
Detection and identification of avian viruses in Togo and Benin



Quentin Langeois¹, Gilbert L. Aplogan², Felix Awoume³, Manon Tournou¹, Brittany Hael¹, Mathilde Paul¹, and Mariette Ducatez¹



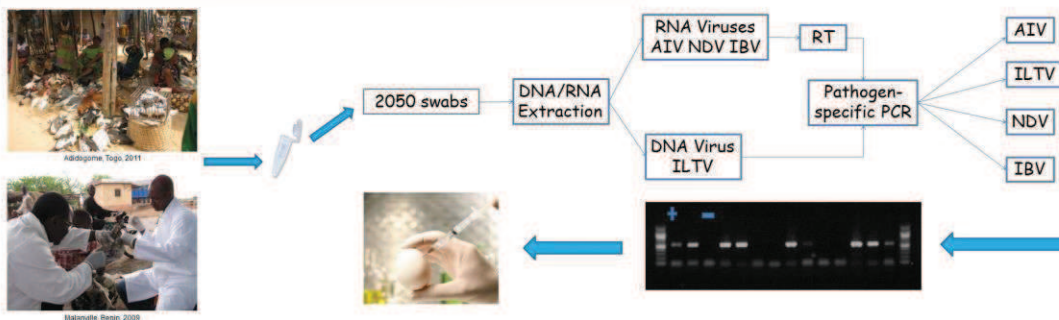
¹ Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Université de Toulouse, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR IHAP 1225, Toulouse, France.
² Laboratoire de Diagnostic Vétérinaire et de Sérosurveillance, Parakou, Benin
³ Laboratoire Vétérinaire de Lomé, Lomé, Togo



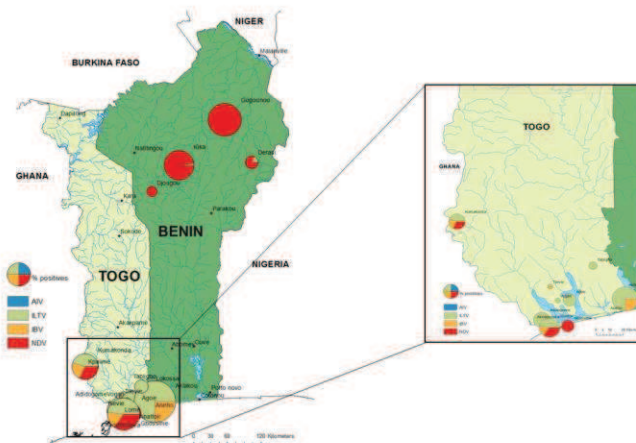
Context & Objectives

- In Togo and Benin, a couple of outbreaks of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses have been reported in 2006 and 2007 but no virus was detected since ^(a,b)
- Newcastle disease virus (NDV), infectious laryngotracheitis virus (ILT), and infectious bronchitis virus (IBV) were present in 2009 in Togo with prevalences reaching 5, 3, and 1.5%, respectively ^(b)
- We collected 1350 and 700 cloacal and tracheal swabs from live poultry markets in Togo and Benin
- The aims of the present study were to assess avian virus circulation in Benin and Togo in 2011 and to characterize detected strains

Experimental setup



Results and Discussion



Avian viruses prevalences in Togo and Benin

Diameter of pies is proportional to the total number of positive samples in the market.

- No avian influenza virus was detected in Benin or Togo live bird markets in 2011 (as observed between 2008 and 2010).
- In Benin, prevalences reached 0,7% (95% CI: 0,3 – 1,6%), 0,1% (CI: 0,01 – 0,7%), 20,8% (CI: 16,5 – 25,6%) for ILTV, IBV, and NDV, respectively.
- In Togo, prevalences reached 4,4% (CI: 3,4 – 5,7%), 1% (CI: 0,5 – 1,6%), 2,1% (CI: 1,4 – 2,9%) for ILTV, IBV, and NDV, respectively.
- NDV circulated mainly in Northern Benin, while ILTV was the most prevalent virus in Southern Togo.
- In rural areas in Western Africa with low bird density, poultry circulation between markets is limited. Differences were observed between markets as far as virus prevalences are concerned. Further epidemiological studies are warranted to identify putative associated risk factors.

Conclusion and perspectives

We successfully detected avian viruses in Benin and Togo by (RT)-PCR. Prevalences were however interestingly low (except for NDV in Benin) despite absence of vaccination. We will continue studying the circulation of avian viruses in the two countries. Virus isolation is ongoing with the aim of antigenic and genetic characterization of the pathogens. Future perspectives would be to carry out a vaccine study to assess the efficacy of commercially available vaccines to counter Western African avian viruses.

Acknowledgments: We thank Lamidi Kakpo, Toussaint Lougbégnon, Tawaliou Aidou, Assana Garba Bankole, Dr Tatiana Touré, Séverin Adjitore, Adjin Rachidath, Jeanne Abdoulaye, Rodrigue Setchegebe, Adimi Adje Sylvain, and the market sellers in Benin; Alao Funmi, Lengo Kossiwa, Go-Maró Wolali, Kpatina Alfred, Voedjo Koukpealedou, Aketre Yawo, and the market sellers in Togo. This study was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (contract no. HHSN266200700005C).

References: ^(a) <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2013/>; ^(b) Couacy-Hymann et al., Emerging Infectious Diseases, 2012.

Avian influenza surveillance in Central and West Africa, 2010–2014

T. L. FULLER^{1*}, M. F. DUCATEZ^{2,3}, K. Y. NJABO¹, E. COUACY-HYMAN⁴,
A. CHASAR¹, G. L. APLOGAN⁵, S. LAO¹, F. AWOUME⁶, A. TÉHO⁷,
Q. LANGEAIS^{2,3}, S. KRAUSS⁸ AND T. B. SMITH^{1,9}

¹ Center for Tropical Research, Institute of the Environment and Sustainability, University of California, Los Angeles, CA, USA

² Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1225, Interaction Hôtes Agents Pathogènes, Toulouse, France

³ Université de Toulouse, Institut National Polytechnique, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France

⁴ Central Laboratory for Animal Diseases (LANADA), Bingerville, Côte d'Ivoire

⁵ Laboratoire de Diagnostic Vétérinaire et de Sérosurveillance (LADISERO), Parakou, Benin

⁶ Laboratoire Vétérinaire de Lomé, Lomé, Togo

⁷ Centre National de Gestion de Réserve de Faune (CENAGREF), Cotonou, Benin

⁸ Department of Infectious Diseases, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

⁹ Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Los Angeles, CA, USA

Received 4 August 2014; Final revision 23 November 2014; Accepted 28 November 2014

SUMMARY

Avian influenza virus (AIV) is an important zoonotic pathogen, resulting in global human morbidity and mortality and substantial economic losses to the poultry industry. Poultry and wild birds have transmitted AIV to humans, most frequently subtypes H5 and H7, but also different strains and subtypes of H6, H9, and H10. Determining which birds are AIV reservoirs can help identify human populations that have a high risk of infection with these viruses due to occupational or recreational exposure to the reservoir species. To assess the prevalence of AIV in tropical birds, from 2010 to 2014, we sampled 40 099 birds at 32 sites in Central Africa (Cameroon, Central African Republic, Congo-Brazzaville, Gabon) and West Africa (Benin, Côte d'Ivoire, Togo). In Central Africa, detection rates by real-time RT-PCR were 16.6% in songbirds (eight passerine families, $n = 1257$), 16.4% in kingfishers (family Alcedinidae, $n = 73$), 8.2% in ducks (family Anatidae, $n = 564$), and 3.65% in chickens (family Phasianidae, $n = 1042$). Public health authorities should educate human cohorts that have high exposure to these bird populations about AIV and assess their adherence to biosecurity practices, including Cameroonian farmers who raise small backyard flocks.

Key words: Avian influenza, influenza A, surveillance.

INTRODUCTION

Avian influenza virus (AIV) is an important zoonotic pathogen, resulting in global human morbidity and mortality. Poultry and wild birds have transmitted AIV to humans, most frequently subtypes H5 and

* Author for correspondence: Dr T. L. Fuller, 619 Charles E. Young Drive East, La Kretz Hall Suite 300, Institute of the Environment and Sustainability, University of California, Los Angeles 90049, USA.
(Email: fullertl@ucla.edu)

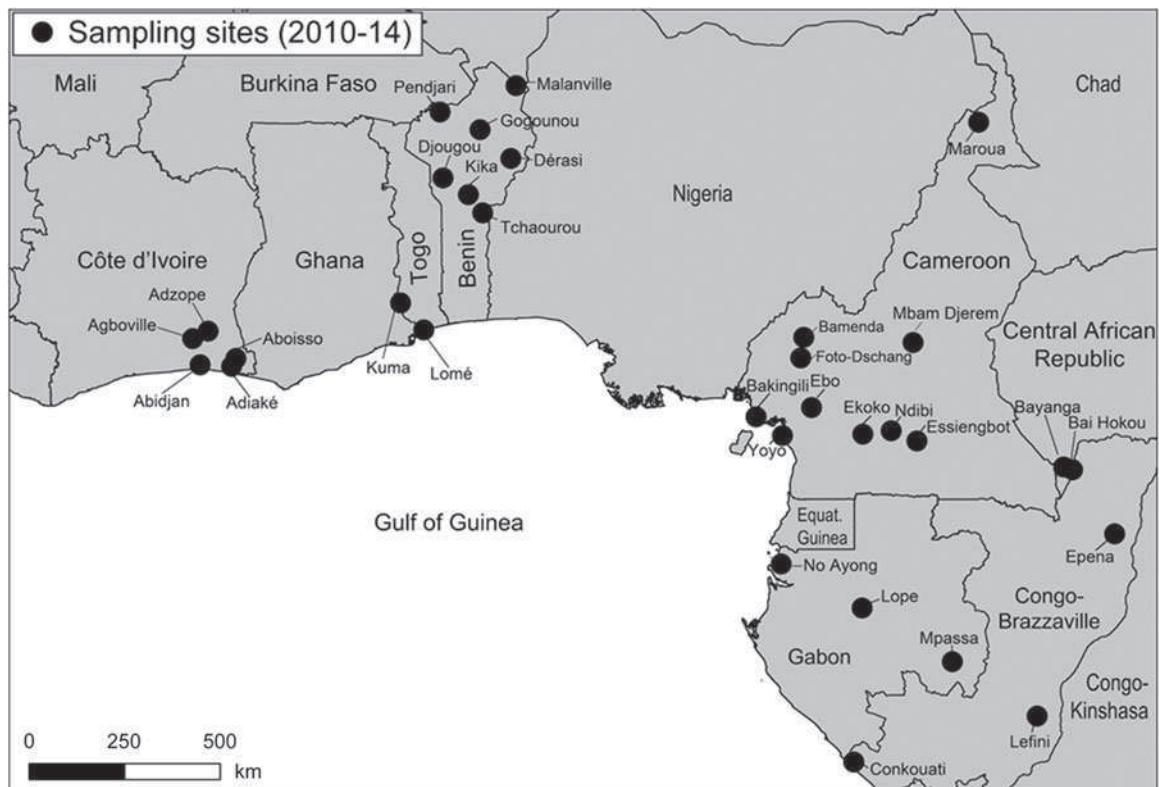


Fig. 1. Location of avian influenza surveillance sites in Central and West Africa.

H7, but also different strains and subtypes of H6, H9, and H10 (reviewed in [1]). Determining which birds are AIV reservoirs can help identify human populations that have a high risk of infection with these viruses due to occupational or recreational exposure to the reservoir species. Public health authorities can prioritize high exposure cohorts for interventions such as educational campaigns.

Such detection efforts are especially important in tropical countries where AIV subtype H5N1 has been isolated from birds but the capacity for sampling and screening is typically limited. A region in which the need for surveillance is particularly great is tropical Africa, where H5N1 has been confirmed in 11 countries [2, 3]. To date, surveillance in the region has focused on poultry, ducks, and shore birds [4–7]; however, the prevalence of AIVs in other birds merits investigation.

For example, a variety of AIV subtypes have been isolated from songbirds in Asia, Europe, and North America, including H1N1, H4N6, H5N1, H5N2, H7N9, and H9N2 [8]. In Africa, AIVs have been detected in passerines but surveillance has been limited to fewer than 300 individuals [4, 7, 9], hence more extensive sampling is needed. The objective of

this study was to detect influenza and isolate the virus in tropical birds, including passerines, in Central and West Africa.

METHODS

Domestic and wild birds were sampled at 32 sites in Central and West Africa (Fig. 1, Tables 1 and 2).

Central Africa

A single cloacal sample was collected from each bird in viral transport media (VTM). All samples were placed immediately on ice after collection, then stored in liquid nitrogen at -196°C or at -70°C until processed. Swabs were screened at St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA. Total RNA was extracted from individual swabs using the RNeasy Mini kit or with the QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's guidelines.

Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) was used to detect the presence of influenza virus genetic material. Viral RNA was amplified using 4x TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Life

Table 1. Avian influenza surveillance sites in Central and Western Africa (2010–2014) showing the number of cloacal and oropharyngeal samples per site and the timing of data collection

Region/country	Site	Samples	Sampling date (month/year)	Wild (W) and/or domestic (D) birds
Central Africa				
Cameroon	Bakingili	132	11/2011	W,D
	Bamenda	475	10/2013–12/2013	D
	Ebo	53	6/2013	W
	Ekoko	124	11/2011	W, D
	Essiengbot	190	10/2010–11/2010	W, D
	Foto-Dschang	80	11/2011	W, D
	Maroua	917	1/2013	D
	Mbam Djerem	52	7/2013	W
	Ndibi	204	10/2010	W, D
	Yoyo	85	9/2011	W, D
Central African Republic	Bai Hokou	42	12/2011	W
	Bayanga	151	11/2011–12/2011	W, D
Gabon	Lope	126	12/2012	W
	Mpassa	58	12/2012	W
Congo Brazzaville	No Ayong	92	11/2012–12/2012	W
	Conkouati	111	10/2010–11/2010	W
	Epena	160	11/2010	W, D
	Lefini	134	11/2010	W, D
West Africa				
Côte d'Ivoire	Agboville	4292	10/2011–2/2014	D
	Adzope	3026	10/2011–2/2014	D
	Aboisso	1773	10/2012–4/2013	D
	Adiaké	5836	10/2011–2/2014	D
	Abidjan	2546	11/2011–2/2014	D
	Benin	Malanville	300	01/2011–2/2011
Gogounou		2900	01/2011–2/2014	D
Dérasí		2900	01/2011–1/2014	D
Djougou		2600	08/2011–2/2014	D
Kika		900	08/2011–4/2012	D
Tchaourou		1700	09/2012–2/2014	D
Pendjari		830	9/2011, 12/2011, 10/2012, 11/2013	W
			1/2014, 4/2014	
Togo	Kuma	175	10/2011–4/2012	D
	Lomé	7135	8/2011–1/2014	D
Total		40099		

Technologies, USA), including a universal influenza A forward primer (5'-GACCRATCCTGTCACCTCTGAC-3'), reverse primer (5'-AGGGCATTYTGACAAKCGTCTA-3'), and probe (5'-FAM-TGCAGTCCTCGTCACTGGGCACG-TAMRA-3') under the following cycling conditions: one cycle at 50 °C for 5 min; one cycle at 95 °C for 20 s; 40 cycles at 95 °C for 20 s and 60 °C for 30 s. Samples showing a cycle threshold (C_t) <40 were considered positive by qRT-PCR and were selected for egg culture.

Influenza virus A/California/04/2009(H1N1) was used as a positive control throughout all stages of sample processing.

To further assess the evidence for AIV we also performed a separate round of qRT-PCR screening using a different set of primers. In this round, we re-screened the samples collected in Central Africa in 2010 ($n = 817$) with an additional influenza assay using primers known to amplify a conserved segment of the Matrix I gene of AIV strains that circulate in

Table 2. Sampling strategy and screening assays utilized in West and Central Africa

	West Africa	Central Africa
Birds sampled		
Domestic birds in LBMs	×	×
Domestic birds in backyard flocks	×	×
Wild birds near villages		×
Wild birds around ponds	×	
Screening		
RT-PCR	×	×
Egg culture		×

LBMs, Live bird markets.

passerines [10]: 5'-GARATCGCGCAGARACTTGA-3' and 5'-CACTGGGCACGGTGAGC-3' were the forward and reverse primers, respectively. In addition, we attempted to amplify and sequence the second subunit of the AIV HA gene using primers HA-1144 [11]: 5'-GGAATGATAGATGGNTGGTAYGG-3' and Bm-NS-890R [12]: 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGT-3'.

Samples positive by qRT-PCR were subsequently grown in the allantoic cavities of 10-day-old embryonated chicken eggs in attempt to isolate influenza A, following established protocols [12].

West Africa

In Côte d'Ivoire and Togo, cloacal and oropharyngeal swabs were collected in VTM from domestic birds. In Benin, cloacal and oropharyngeal swabs were collected in VTM from wild birds. Avian faecal (environmental) samples were also collected in VTM at the Beninese sites. Upon sampling, swabs were stored in liquid nitrogen or on ice and transported to the laboratory within 1 day. In Côte d'Ivoire and Benin, swabs were stored at -80°C before processing and in Togo they were stored in liquid nitrogen.

Côte d'Ivoire samples were screened at the Central Laboratory for Animal Diseases (LANADA) in Bingerville (Côte d'Ivoire), Benin and Togo samples were either screened on site [at the Veterinary Diagnosis and Serosurveillance Laboratory (LADISERO) in Parakou, Benin or at the Laboratoire vétérinaire central de Lomé, Lomé, Togo] or at UMR 1225 in Toulouse (France). Viral RNA was extracted from individual swabs with the RNeasy Mini kit or with the QIAamp Viral RNA Mini kit. Swabs samples were tested by RT-PCR as described previously [5].

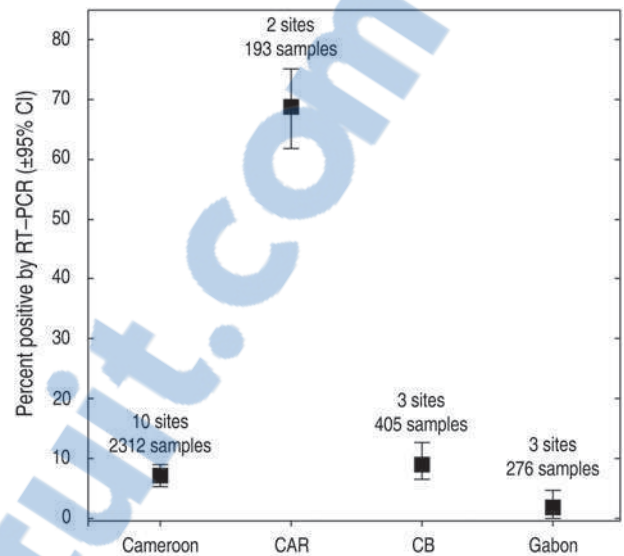


Fig. 2. AIV-positive rates by country in Central Africa based on RT-PCR. Confidence intervals were obtained by logistic regression. CAR, Central African Republic; CB, Congo-Brazzaville; CI, confidence interval.

RESULTS

Regional comparison

The species composition and abundance of bird communities in Central and West Africa were significantly different (Mantel test: $r = 0.513$, $P = 1.99 \times 10^{-4}$, for description of the Mantel test, see [13]). For example, 55% of the wild birds sampled in West Africa were not collected in Central Africa. In light of this, we analysed the two regions separately.

West Africa

The positive rate by RT-PCR was 0% in Benin, Côte d'Ivoire, and Togo.

Central Africa

The prevalence of AIV differed significantly in the countries sampled (Wald $\chi^2 = 325$, D.F. = 3, $P < 0.0001$). Prevalence was highest in the Central African Republic at 65% (Fig. 2); however, this must be interpreted with caution as we only sampled two sites with a total of 193 birds. Elsewhere in Central Africa our sampling was more extensive and the positive rate was 2–9%; for example, prevalence in Cameroon was 7.4% based on 10 sites and 2312 birds.

When we pooled the data across Central African countries, there were significant differences in

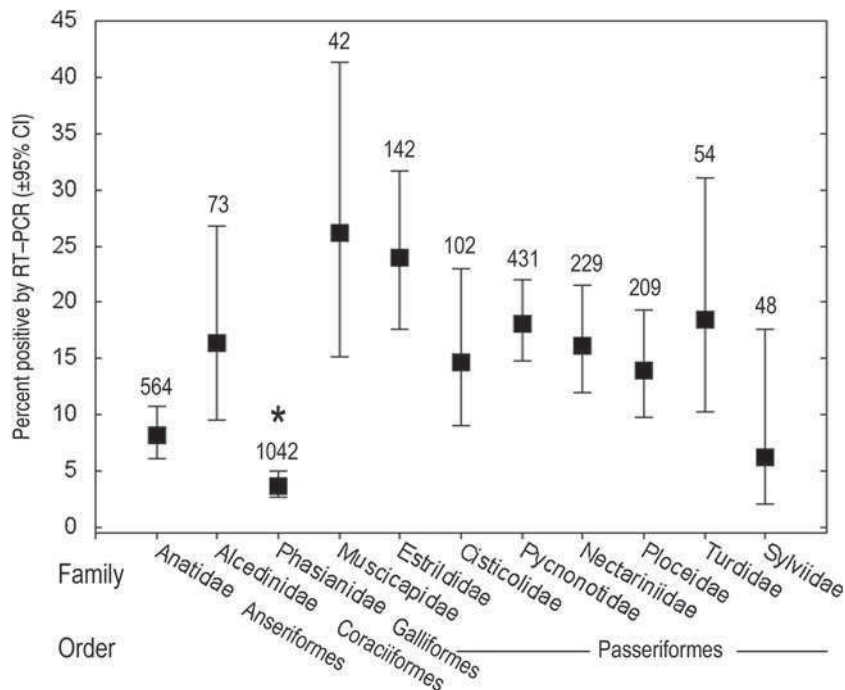


Fig. 3. Passerine birds have AIV positive rates similar to anatid ducks in Central Africa. Only Phasianidae (chickens) had a lower positive rate than anatids by a *t* test with a Holm adjustment for multiple comparisons (* indicates $P = 0.0043$). The sample size for each family is listed above the confidence intervals. The plot includes families with ≥ 40 individuals sampled, which comprised 92% of the Central African samples. For families with < 40 individuals, the number of samples was insufficient to accurately calculate confidence intervals (CIs).

prevalence in avian families (Wald $\chi^2 = 117$, D.F. = 10, $P < 0.0001$). Comparing AIV-positive rates in families reveals a number of interesting patterns (Fig. 3). Based on qRT-PCR using the first set of primers listed in the Methods section, the positive rate was 16.6% in songbirds (eight avian families, $n = 1257$), 16.4% in kingfishers (family Alcedinidae, $n = 73$), 8.2% in ducks (family Anatidae, $n = 564$), and 3.65% in chickens (family Phasianidae, $n = 1042$). The positive rate for chickens was significantly lower than that of songbirds or ducks; however, there was no statistical difference in the positive rate between songbirds and ducks. Within songbirds, the highest positive rate was in flycatchers (family Muscipidae), which are small insectivorous birds and lowest in warblers (family Sylviidae). These two families had low sample sizes of 40–50 individuals so the confidence intervals for the positive rates are large. Songbird families for which we sampled > 200 individuals – including bulbuls (family Pycnonotidae), weavers (family Ploceidae), and sunbirds (family Nectariniidae) – had AIV rates of 14–18%. With respect to the ecological and land use characteristics of sites where we detected AIV, two of the sites were live bird markets (LBMs), Bamenda and Maroua, both of which were in

Cameroon. At these LBMs, the positive rates were 0.8% and 1.2%, respectively.

None of the attempts to isolate virus in chicken eggs were successful. Because the amount of RNA extracted from cloacal swabs is generally low, without the ability to grow AIV, it was not possible to further characterize viral subtype via molecular analyses. In order to address the potential of false-positive results from an overly sensitive assay, we compared the C_t values of our positive samples to C_t cut-off values typically used in the influenza literature and found that our results were significantly lower (one-sample *t* test: $t = -3.5307$, D.F. = 339, $P = 2.36 \times 10^{-4}$; Supplementary Table S1). While the low C_t values of the positive samples provide relative confidence in the presence of AIV in the original samples, the use of the first set of primers listed in the Methods section detected the same rate of AIV positives as the second set (13.3% vs. 10.1%, $\chi^2 = 0.1261$, D.F. = 1, $P = 0.723$). The consistency of the results based on two sets of primers provides additional support that AIV was present in the Central African samples. However, elucidating why AIVs circulating in passerines are refractory to growth in egg culture remains an important area for future research.

DISCUSSION

Consistent with previous surveillance reports of West Africa [5], our sampling did not detect AIV in the region's poultry or wild birds. For the remainder of the Discussion, we focus on Central African countries. As domestic birds are not vaccinated against AIV in Central or West Africa [14, 15], the positives would be due to natural infections rather than vaccinations. Although AIV was not isolated by culture in chicken eggs, the qRT-PCR assay utilized here is highly sensitive and replicable [16, 17]. Indeed, our estimates of AIV positivity by qRT-PCR are consistent with results of previous surveillance efforts in sub-Saharan Africa [9]. Furthermore, our 8.2% positive rate for anatids is comparable with reported rates for African ducks ranging from 5% to 20% [6, 7, 18].

In Asia, a variety of different poultry species, such as chickens and ducks, are sold at LBMs, and all birds are penned in close proximity at high density, facilitating interspecies transmission of AIV [19, 20]. In comparison with Asian LBMs, those in Africa appear to be less important for the emergence and spread of AIVs because they contain fewer ducks and lower poultry density [5]. Hence, LBM surveillance in sub-Saharan Africa has reported no AIV or a low prevalence of ~1%. For example, screening of 19 000 domestic birds sampled at LBMs in Benin, Côte d'Ivoire, and Togo in 2006–2008, detected 0% AIV prevalence [5]. In Nigeria, surveillance of 13 597 LBM samples from 25 states in 2006–2007 detected 12 H5N1 positives (~0.09% prevalence) [21]. LBM surveillance in the state of Sokoto, Nigeria in 2008–2009, detected AIV in ~1% of chickens ($n = 182$) and pigeons ($n = 19$) [22]. In Kenya, AIV was detected in 0.8% of 5221 LBM samples collected from 2009–2011 [23]. Our results are consistent with these reports in that we found no AIV in West Africa and low prevalence (0.8–1.2%) in LBMs in Central Africa. A factor that could explain the higher rate of AIV positives in Central Africa is that these sites contained more ducks; for example, ducks comprised 53% of the samples at the LBMs in Maroua, Cameroon, whereas the West Africa samples were primarily chickens and guinea fowl.

In addition to domestic birds sampled in LBMs, we found evidence of AIV in backyard poultry and wild birds in Central Africa. Public health authorities should therefore educate human cohorts that have high exposure to these bird populations about AIV and assess their adherence to biosecurity practices.

In the countries surveyed here, knowledge of AIV in these cohorts is virtually unknown. However, previous research that measured AIV awareness, biosecurity practices, and infection rates in cohorts exposed to domestic birds in Ghana and Nigeria could provide insights that can inform public health policies in the countries we surveyed.

In Nigeria, workers with occupational exposure to poultry at LBMs and small backyard farms showed evidence of past infection with AIV at a low prevalence of 1.2% [15]. Although experienced workers were well informed about risk factors for AIV transmission and wore personal protective equipment, knowledge of AIV in new workers was poor [14]. In Ghana, adherence to AIV biosecurity practices such as hand washing after handling poultry was low in troops and their families who raised small backyard flocks, and less than half of this cohort knew the symptoms of AIV [24]. This limited awareness led to the question of how best to increase knowledge of AIV via educational campaigns. In Nigeria, poultry workers reported that they were most likely to consult TV, newspapers, and the radio for information about AIV [14], hence these forms of mass media would be the most effective avenues for awareness campaigns.

After Nigeria, Cameroon has the second largest poultry sector in Central and West Africa [25]. In light of this, of the countries we surveyed, rates of occupational exposure to domestic birds are likely to be highest in Cameroon. Although exposure rates of LBM workers and individuals who work with wild birds are unknown, exposure to domestic ducks is high in Cameroonian farmers who raise small backyard flocks [26]. Health authorities should measure levels of AIV awareness and adherence to biosecurity practices at small farm households in Cameroon. If these cohorts have limited knowledge of AIV, they could be targeted for awareness campaigns based on TV, radio, and print media.

The present analysis contributes to the understanding of AIV circulation in wild birds by confirming surveillance reports which have found no AIV in West Africa [5] and sampling Central African Republic, Congo-Brazzaville, and Gabon in Central Africa, which are countries that have not previously been surveyed. The positive rate that we detected in Central Africa's wild birds suggests the possibility that AIVs circulate widely in passerines, a finding that should stimulate further surveillance to isolate these viruses by egg culture. Expanding AIV screening programmes in Central and West Africa can confirm the

qRT-PCR positives reported here and possibly obtain isolates for molecular characterization and pathogenicity studies. If the AIV subtypes circulating in birds in tropical Africa were low pathogenic with a putative low pandemic risk (as could be assessed using risk assessment tools as described in [27]), controlling the spread of AIVs may not be urgent. However, if highly pathogenic subtypes H5 or H7 occur in the region, then shifts in poultry rearing practices would be warranted to limit spillover from wild birds to domestic animals and humans. Since subtype H5N1 has already caused losses of \$20 billion to the global poultry industry [20], it could have a substantial impact on food production in Central and West Africa. Furthermore, subtype H7N9, which has high virulence in humans and circulates in songbirds in China, could result in treatment costs of \$5.3 billion if it spreads to a major city [28]. Improving our understanding of the occurrence of AIV in African birds can provide insights useful for the formulation agricultural and biosecurity policies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

For supplementary material accompanying this paper visit <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268814003586>.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nicole Arrigo, Richard Webby, Simon Ducatez, and two anonymous reviewers for comments on the manuscript. We also acknowledge Viviane Kouakou, Yapi Yapo, Danho Thérèse, Koffi Yao Mathurin, Gnabro Privat, Kouassi Sue Lou Antoinette, Nana Pauline, Agolai Innocent, Toussaint Loubégnon, Tawaliou Alidou, Assana Garba Bankole, Tatiana Toure, Séverin Adjitore, Jeanne Abdoulaye, Rodrigue Setchegbe, Adimi Adje Sylvain, Alao Funmi, Lengo Kossiwa, Go-Marou Wolali, Dogno Koffi, Pali Magnoudéwa, Kpatina Alfred, Voedjo Koukpeledou, Aketre Yawo, Charlotte Foret, Angélique Teillaud, Josyane Loupias, Brigitte Peralta, Charley Lagarde, Christelle Camus-Bouclainville, Guillaume Croville, Etienne Liais, Renaud Berger, Clément Fage, Florian Grard, Jean-Benoit Tanis, Brittany Hale, and Manon Tournou for their excellent technical assistance. We also thank Amanda Ball, James Knowles, Jennifer DeBeauchamp, Jerry Parker, Richard Elia, Pamela McKenzie, and Maureen Rice for help with logistics and data management.

This work was supported in part by Contract No. HHSN266200700005C from the U.S. National Institute of Allergy and Infectious Diseases and by award 3R01-TW005869 from the Fogarty International Center, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, and by the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC) to St Jude Children's Research Hospital.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Freidl GS, et al.** Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1). *Eurosurveillance* 2014; **19**: 8–26.
2. **Ducatez MF, et al.** Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa. *Journal of General Virology* 2007; **88**: 2297–2306.
3. **World Organisation for Animal Health.** World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. Accessed 20 October 2014 (http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home). Paris: World Organisation for Animal Health, 2014.
4. **Snoeck CJ, et al.** Reassortant low-pathogenic avian influenza H5N2 viruses in African wild birds. *Journal of General Virology* 2011; **92**: 1172–1183.
5. **Couacy-Hymann E, et al.** Surveillance for influenza viruses in poultry and swine, West Africa, 2006–2008. *Emerging Infectious Diseases* 2012; **18**: 1446–1452.
6. **Gaidet N, et al.** Understanding the ecological drivers of avian influenza virus infection in wildfowl: a continental-scale study across Africa. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 2012; **279**: 1131–41.
7. **Cappelle J, et al.** Circulation of avian influenza viruses in wild birds in Inner Niger Delta, Mali. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2012; **6**: 240–244.
8. **Buch J, et al.** GISAID – a global initiative on sharing all influenza data. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2011; **5**: 419.
9. **Cumming GS, et al.** The ecology of influenza A viruses in wild birds in southern Africa. *EcoHealth* 2011; **8**: 4–13.
10. **Fuller TL, et al.** Mapping the risk of avian influenza in wild birds in the US. *BMC Infectious Diseases* 2010; **10**: 187.
11. **Hoffmann E, et al.** Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology* 2001; **146**: 2275–2289.
12. **Webster RG, et al.** *WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance*. WHO Global Influenza Programme, 2002.

13. **Kindt R, Coe R.** *Tree Diversity Analysis*. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies. Nairobi: World Agroforestry Centre, 2005.
14. **Fatiregun AA, Saani MM.** Knowledge, attitudes and compliance of poultry workers with preventive measures for avian influenza in Lagelu, Oyo State, Nigeria. *Journal of Infection in Developing Countries* 2007; **2**: 130–134.
15. **Okoye J, et al.** Serologic evidence of avian influenza virus infections among Nigerian agricultural workers. *Journal of Medical Virology* 2013; **85**: 670–676.
16. **Kirunda H, et al.** Prevalence of influenza A viruses in livestock and free-living waterfowl in Uganda. *BMC Veterinary Research* 2014; **10**: 50.
17. **Fouchier RAM, et al.** Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; **38**: 4096–4101.
18. **Caron A, et al.** Persistence of low pathogenic avian influenza virus in waterfowl in a southern African ecosystem. *Ecohealth* 2011; **8**: 109–115.
19. **Gao R, et al.** Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *New England Journal of Medicine* 2013; **368**: 1888–1897.
20. **Guan Y, Smith GJD.** The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses. *Virus Research* 2013; **178**: 35–43.
21. **Joannis TM, et al.** Serologic and virologic surveillance of avian influenza in Nigeria, 2006–7. *Eurosurveillance* 2008; **13**: 1–5.
22. **Nwankwo IO, et al.** Avian influenza virus infection in apparently healthy domestic birds in Sokoto, Nigeria. *Veterinaria Italiana* 2012; **48**: 309–312.
23. **Munyua PM, et al.** Detection of influenza A virus in live bird markets in Kenya, 2009–2011. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2013; **7**: 113–119.
24. **Odoom JK, et al.** Troop education and avian influenza surveillance in military barracks in Ghana, 2011. *BMC Public Health* 2012; **12**: 957.
25. **Tukur HM.** Egg production in Africa. In: Van Immerseel F, Nys Y, Bain M, eds. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products Egg Safety and Nutritional Quality*. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2011, pp. 27–38.
26. **Larison B, et al.** Spillover of pH1N1 to swine in Cameroon: an investigation of risk factors. *BMC Veterinary Research* 2014; **10**: 55.
27. **Trock SC, et al.** Development of an influenza virologic risk assessment tool. *Avian Diseases* 2012; **56**: 1058–1061.
28. **Khazeni N, et al.** Health and economic benefits of early vaccination and nonpharmaceutical interventions for a human influenza A (H7N9) pandemic: a modeling study. *Annals of Internal Medicine* 2014; **160**: 684–694.



Prevalence of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in avian influenza negative birds from live bird markets and backyard and commercial farms in Ivory-Coast



A.V. Kouakou^a, V. Kouakou^a, C. Kouakou^a, P. Godji^a, A.L. Kouassi^a, H.A. Krou^a, Q. Langeois^b, R.J. Webby^c, M.F. Ducatez^{b,c,d,1}, E. Couacy-Hymann^{a,*,1}

^a LANADA/Laboratoire Central de pathologie Animale, BP 206 Bingerville, Côte d'Ivoire

^b INRA UMR 1225 IHAP, F-31076 Toulouse, France

^c Department of Infectious Diseases, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

^d Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2014

Received in revised form 20 July 2015

Accepted 23 July 2015

Available online xxxx

Keywords:

Newcastle disease
Infectious bronchitis
Avian influenza virus
PCR
ELISA
Poultry
Ivory-Coast

ABSTRACT

Newcastle disease (ND) and infectious bronchitis (IB) are two major viral diseases affecting the respiratory tracts of birds and whose impact on African poultry is still poorly known. In the present study we aimed at assessing NDV and IBV prevalences in Ivory-Coast by molecular screening of >22,000 avian swabs by nested PCR and by serology testing of close to 2000 avian sera from 2010 through 2012. The NDV and IBV seroprevalences over the study period reached 22% and 72%, respectively. We found 14.7% pooled swabs positive by PCR for NDV and 14.6% for IBV. Both pathogens are therefore endemic in Ivory-Coast. Economic losses associated with NDV and IBV infections still need to be evaluated.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Newcastle disease (ND) and infectious bronchitis (IB) are two viral diseases affecting the respiratory tracts of many species of birds and placing a severe economic burden on the poultry industry (Alexander, 1997; Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood et al., 2012).

ND has a worldwide distribution. In Africa, it is the major constraint of chicken development, mainly in rural areas (Maminiaina et al., 2010; Couacy-Hymann et al., 2012a). The infectious agent of ND, Newcastle disease virus (NDV), is a single stranded, non-segmented, negative-sense RNA virus belonging to the order *Mononegavirales*, family *Paramyxoviridae*, sub-family *Paramyxovirinae*, and genus *Avulavirus* (Lamb and Parks, 2007; Cattoli et al., 2011). However, only virulent strains of NDV cause ND when they infect birds. This genus contains at least 9 serogroups of avian paramyxoviruses (APMV-1 to -9) previously described and recently 3 more serogroups have been added: APVM10 (Miller et al., 2010), APMV11 (Briand et al., 2012) and APVM12

(Terregino et al., 2013). According to their virulence in poultry, APMV-1 isolates can be grouped into three pathotypes: lentogenic, mesogenic or velogenic (Alexander, 1997; Cattoli et al., 2009). The velogenic strains may cause 100% mortality in infected chicken flocks (Kho et al., 2000); they are further classified as neurotropic or viscerotropic based on their pathological manifestations (Alexander, 1998; Wise et al., 2004). Mesogenic strains cause primarily respiratory disease while lentogenic isolates are of low virulence and may cause mild respiratory or enteric infections. The virulent NDV isolates (mesogens and velogens) are notifiable agents that require reporting to the OIE (OIE, 2000).

IB, in contrast, remains less known in Africa, and is found mainly in the backyard poultry production system. It is a highly contagious upper-respiratory tract disease of chickens. The causative agent, infectious bronchitis virus (IBV), is a coronavirus, an enveloped, positive-strand RNA virus with a genome of about 27 kb. It belongs to the family *Coronaviridae* and subfamily *Coronavirinae* within the genera of *Gammacoronaviridae* (Jackwood et al., 2012). Clinical signs of IB disease in chickens are watery eyes, mucus in the nares and trachea, gasping, coughing, and tracheal rales. The disease can also cause a decrease in egg production and egg quality and some strains of the virus can cause an interstitial nephritis (Jackwood et al., 2012). Morbidity is close to 100%, while mortality can be variable, ranging from 14% to 82%,

* Corresponding author.

E-mail address: chymann@hotmail.com (E. Couacy-Hymann).

¹ These authors contributed equally to this article.

depending on the age of the birds, strain of the virus and secondary infections (Cavanagh and Gelb, 2008).

Up to now little is known about the distribution and impact of IBV in sub-Saharan African countries including Ivory-Coast. A recent study undertaken on chickens from commercial farms, live bird markets and backyard farms in Nigeria and Niger revealed the presence of IBV genome. Phylogenetic analysis of the S1 coding sequence revealed a new genotype of IBV. This strain did not cross-react with antisera against known strains such as IT02, M41, D274 or Connecticut in virus neutralisation tests (Ducatez et al., 2009). In Ivory-Coast, poultry technicians report on a regular basis the presence of IB in commercial farms and recommend the use of vaccine, mainly based on the M41 strain, although there is no prior study of the presence of IBV in the country or on the type of strains circulating. These reports, based on clinical signs, were never confirmed by the laboratory.

Both ND and IB affect the respiratory tract, so the differential diagnosis between them and with respect to other respiratory diseases such as *Mycoplasma gallisepticum* (chronic respiratory disease), infectious laryngotracheitis, *Haemophilus paragallinarum* (infectious coryza) and avian influenza virus (AIV) infections, remains a challenge (Ducatez et al., 2009).

The present study took advantages of the surveillance for avian influenza viruses carried out within Ivory-Coast to determine the prevalence of NDV and IBV in poultry farms (both backyard and commercial farms) and at live poultry markets.

2. Materials and methods

2.1. Sampling sites

Outbreaks of avian influenza due to H5N1 strains were detected in Ivory-Coast in 2006. From that date on a continuous surveillance of

poultry farms, both backyard and commercial production systems, has been implemented. Every month, the team of the Virology Laboratory was sent to the field to collect tracheal and cloacal swabs and serum samples. These samples were collected in the southern regions (Agneby, District of Abidjan, South Comoe), which are the biggest large-scale poultry production areas in the country. In addition, the south-eastern region (South Comoe) includes lakes and rivers with large populations of various water bird species (Fig. 1). The sampling was carried out following a validated protocol previously described with data from 2007 through 2009 previously reported (Couacy-Hymann et al., 2012a). In each region, a minimum of 5 villages were randomly selected from a known list of villages. In addition, following the same protocol, 5 commercial farms were selected per region. However, any commercial farm, having reported any diseases to the veterinary field technician, was systematically included in the survey (in addition to the 5 commercial farms randomly selected). Within a selected village, any backyard poultry's owner having a poultry flock (flock size varying between 5 and 20 birds per household) was systematically included in the survey. At live bird markets (mainly one big live market per region), 5 vendors were randomly selected (average number of vendors per market = 10). In addition, farmers were interviewed regarding the case mortality that occurred on their farms.

2.2. Sample collection

At the sampling sites (backyard and commercial poultry farms, live-poultry markets), clinical examination of each bird (chicken, guinea fowl or duck) was undertaken for any signs of disease prior to sampling. In each selected village, a minimum of 30 birds were sampled. From a commercial farm, 30 to 50 chickens were selected and at live bird market, 5 birds were selected from each selected vendor in a given market. Any dead or sick animals were systematically included in the survey at any sampling sites and sampled. Blood samples were obtained from

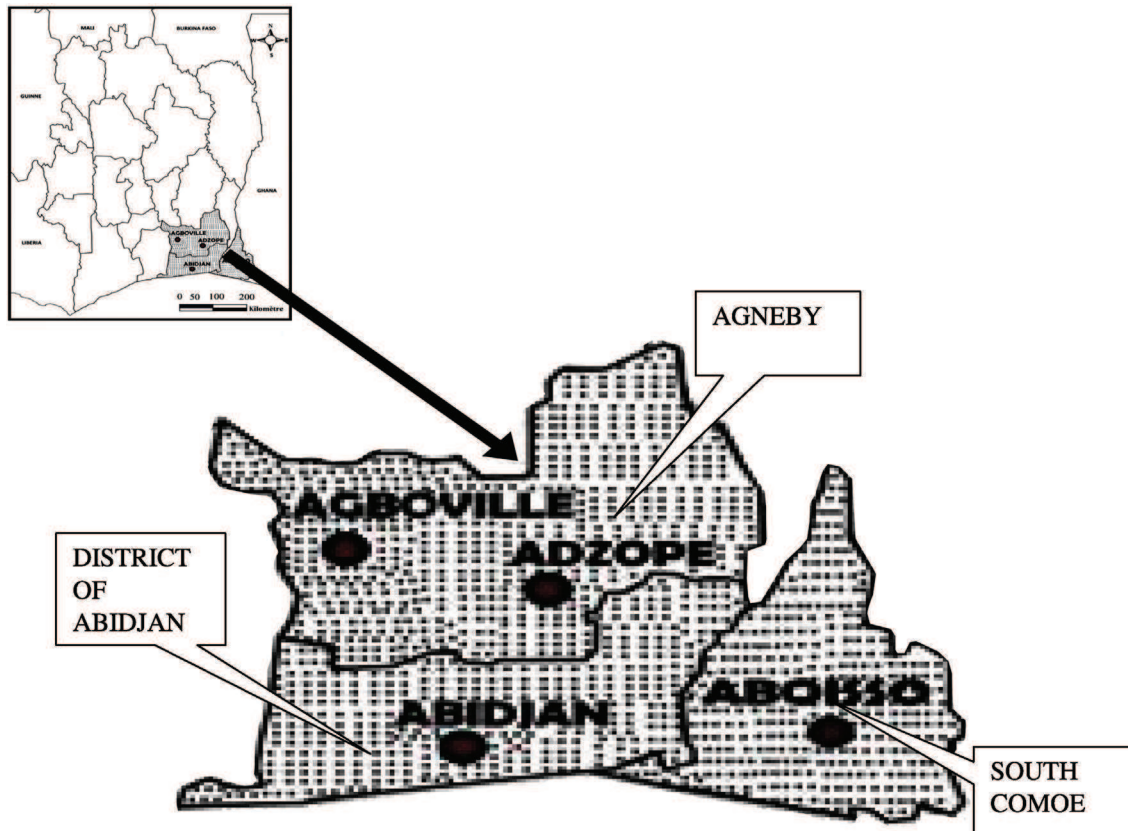


Fig. 1. Sampling sites.

examined animals and processed to yield serum. Individual sterile swabs were used in this survey. Tracheal and cloacal swabs were also collected from the same birds and placed in viral transport medium (VTM) (50% sterile glycerin; 45% sterile PBS 1 M, pH 7.2–7.4; 2% antibiotic solution with Penicillin and Streptomycin; 0.5% Gentamycin; 1% Nystatin; 1.5% Polymyxin B) with the final antibiotic concentration of Penicillin 1000 units/mL, Streptomycin 200 µg/mL, Nystatin 50 units/mL, Gentamycin 250 µg/mL, and Polymyxin B 100 units/mL. Each tracheal and cloacal swab was stored in a sterile individual tube containing the VTM. In the field, collected swab samples were kept in liquid nitrogen to prevent any degradation of biological materials. At the laboratory, serum samples were stored at –20 °C and swabs were transferred to a –80 °C freezer until used for analysis (Tables 1 & 2).

2.3. Serological tests

2.3.1. Detection of anti-NDV antibodies

Serum samples (n = 1943) were screened for anti-NDV antibodies using the haemagglutination/haemagglutination inhibition test (HA/HAI), the gold standard test, following the reference method (OIE, 2012) with reference NDV antigens (batch no. 1/08 – Ulster 2C) and corresponding reference positive serum as positive control. The reference reagents were provided free of charge by the World Organization for Animal Health (OIE)/Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Reference Laboratory in Padova (Italy) and by St Jude Children's Research Hospital, Memphis (TN, USA).

2.3.2. Detection of anti-IBV antibodies

Serum samples were also screened for specific anti-IBV antibodies by ELISA using the IDEXX IBV kit (IDEXX, The Netherlands with specificity = 100% and sensitivity > 90%) according to the protocol recommended by the manufacturer. Only 1938 serum samples were used for this analysis, as five (5) serum samples from guinea fowl were not available anymore to perform this test.

2.4. Molecular detection of avian viral genomes

Tracheal and cloacal swabs were processed as described (Kho et al., 2000; Snoeck et al., 2009). In the laboratory, each individual swab in an individual tube with VTM was processed and the suspension was kept individually. Then 5 individual swab-suspensions were pooled from the same species, farm or vendor in the live market. Finally, the samples were screened in pools of 5 swabs (Couacy-Hymann et al., 2012a). However some pools could contain less than 5 individual samples depending upon the number of available samples. The procedure for RNA isolation was as recommended by the manufacturer, using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). The RNA was eluted in 50 µL of nuclease-free water. The RT step was performed by using random hexamer primers (Introgen, Carlsbad, CA., USA) with 10 µL of extracted RNA and the First-strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare Europe GmbH, Orsay, France) as recommended by the manufacturer's protocol. Then, 5 µL of the cDNA obtained was used as the template for the PCR step with each outer set of primers specific for NDV F (Kho et al., 2000) or IBV S1 (Akin et al., 2001). Conventional PCR was carried out with the GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Applied-Biosystems, Paris, France) using a

Table 1

Collected serum samples from live bird markets and serological results on the period 2010–2012.

Year	Region	Localities	Species/prod syst	Collected serum	NDV positive	IBV positive	NDV prevalence (×100)	IBV Prevalence (×100)
2010	Agneby	Agboville/Adzope	BYC	382	91	244	23.8	63.9
			CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	7	0	–	–	–
			Guinea fowl	5 ^a	3	–	60	–
			BYC	17	7	11	41.2	64.7
	District of Abidjan	Bingerville/Abidjan Market	CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	25	–	4	–	16
			Guinea fowl	–	–	–	–	–
			BYC	292	110	217	37.6	74.3
	South Comoe	Aboisso	CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	23	9	1	39.1	4.3
			Guinea fowl	–	–	–	–	–
Subtotal			751	220	477	29.3	63.9	
2011	Agneby	Agboville/Adzope	BYC	91	8	77	8.8	84.6
			CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	31	0	–	–	–
			Guinea fowl	–	–	–	–	–
			BYC	–	–	–	–	–
	District of Abidjan	Bingerville/Abidjan Market	CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	–	–	–	–	–
			Guinea fowl	–	–	–	–	–
			BYC	351	62	293	17.7	83.5
	South Comoe	Aboisso	CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	9	1	–	11.1	–
			Subtotal	482	71	370	14.7	76.8
2012	Agneby	Agboville/Adzope	BYC	310	33	284	10.6	91.6
			CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	–	–	–	–	–
			Guinea fowl	–	–	–	–	–
			BYC	8	3	8	37.5	100
	District of Abidjan	Bingerville/Abidjan Market	CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	6	–	2	–	33.3
			Guinea fowl	–	–	–	–	–
			BYC	386	93	260	24.1	67.4
	South Comoe	Aboisso	CMF	–	–	–	–	–
			Ducks	–	–	–	–	–
			Subtotal	710	129	554	18.2	78
Total	1943	420	1401	21.6	72.3			

BYC: backyard chicken. CMF: commercial poultry farm. Prod syst: production system.

^a Minus 5 guinea fowl for IBV total serum.

Table 2
Collected swab samples from poultry's farms and at live bird markets and corresponding RT-PCR results on the period 2010–2012.

Year	Region	Localities	Species/prod syst	Collected samples TS + CIS	Total pooled samples TS + CIS	Results PCR NDV-pools		Results PCR IBV-pools	
						TS	CIS	TS	CIS
2010	Agneby	Agboville/Adzope	BYC	2934	586	26	16	8	27
			CMF	952	190	20	10	10	32
			Ducks	20	4	0	0	0	0
			Guinea fowl	80	16	0	0	1	3
	District of Abidjan	Bingerville/Abidjan Market	BYC	564	112	13	11	3	5
			CMF	838	168	18	10	10	28
			Ducks	190	38	0	0	0	0
			Guinea fowl	30	6	0	0	2	2
	South Comoe	Aboisso	BYC	2550	510	50	30	22	40
			CMF	272	54	8	5	0	0
Ducks			160	32	4	2	1	5	
Guinea fowl			6 ^a	2 ^a	0	0	0	0	
2010-total			8596	1718	139 (16.2%)	84 (9.8%)	57 (6.6%)	142 (16.5%)	
2011	Agneby	Agboville/Adzope	BYC	920	184	20	11	15	19
			CMF	1620	324	29	18	21	44
			Ducks	180	36	6	2	3	5
			Guinea fowl	110	22	2	1	3	1
	District of Abidjan	Bingerville/Abidjan Market	BYC	240	48	7	2	8	6
			CMF	870	174	12	9	19	20
			Ducks	–	–	–	–	–	–
			Guinea fowl	70	14	2	0	0	2
	South Comoe	Aboisso	BYC	2710	542	48	19	27	48
			CMF	680	136	16	8	14	18
Ducks			60	12	0	0	2	0	
2011-total			7460	1492	142 (19%)	70 (9.4%)	112 (15%)	163 (21.8%)	
2012	Agneby	Agboville/Adzope	BYC	1990	398	42	22	24	40
			CMF	1190	238	27	13	16	20
			Ducks	20	4	–	–	–	–
			Guinea fowl	30	6	–	–	–	1
	District of Abidjan	Bingerville/Abidjan Market	BYC	140	28	5	2	1	1
			CMF	780	156	12	8	7	10
			Ducks	14 ^a	4 ^a	–	–	–	–
			Guinea fowl	–	–	–	–	–	–
	South Comoe	Aboisso	BYC	2460	492	67	30	25	44
			CMF	120	24	4	3	1	2
Ducks			6 ^a	2 ^a	–	–	–	–	
2012-total			6750	1352	157 (23.2%)	78 (11.5%)	74 (10.9%)	118 (17.4%)	
2010–2012-total prevalence			22,806	4562 ^b	438 (19.2%)	232 (10.2%)	243 (10.7%)	423 (18.5%)	

^a 14 individual samples (7 tracheal swabs and 7 cloacal swabs giving 2 pools of each with 3 and 4 individual samples, respectively) and 6 individual samples (3 tracheal swabs and 3 cloacal swabs giving 1 pool of 3 individual samples each).

^b 2281 TS + 2281 CIS.

50 µL reaction mixture as previously described (Couacy-Hymann et al., 2012b; Kho et al., 2000; Akin et al., 2001). Nested PCR with inner primer sets specific for NDV (Kho et al., 2000) or IBV (Akin et al., 2001) was carried out in the same tubes, using the whole of the first stage PCR, to prevent any contamination (Kho et al., 2000; Akin et al., 2001).

The matrix gene was targeted for AIV detection in a single RT-PCR reaction (Couacy-Hymann et al., 2009; Starick et al., 2000).

2.5. Statistical analysis

A measure of precision of the prevalence estimate was obtained using 95% confidence intervals. The chi-squared test was used to compare the prevalence of NDV and IBV between species, production system and locations while the McNemar's test was used to compare the prevalence of NDV and IBV between cloacal and tracheal swab samples.

All experimental and animal management procedures were undertaken in accordance with the requirements of the Animal Care and Ethics Committees of LANADA.

3. Results

3.1. Clinical examination and sample collection

Individual sampled birds were clinically examined before sampling. Over the sampling period, a total of 234 dead chickens were found, 95 in 2010, 92 in 2011 and 47 in 2012. Regarding clinical signs (respiratory

and nervous signs, inappetence, diarrhoea), a total of 1254 chickens (11% of the total 11,403 birds sampled) presented apparent signs of disease (340 in 2010, 503 in 2011 and 411 in 2012). The total number of dead and sick chickens was 1488 from which we collected both cloacal and tracheal swabs giving a total of 2976 swab samples.

A total of 22,806 samples, consisting of 11,403 cloacal and 11,403 tracheal swabs, were collected during the period 2010–2012 during the monthly surveys, including the samples from dead and sick chickens. These collected materials were pooled using maximum of 5 individual samples per pool, giving 4562 pools of samples (2281 pools of each type of swab) including 595 pools from sick and dead birds. During the same period, 1943 serum samples were collected (serum sampling only every 3 months) with 186 sera from apparently sick chickens (9.6%). These samples were obtained from backyard poultry farms, commercial farms and at live-bird markets within the three selected regions and involved samples from chickens, ducks and guinea fowl, with chickens representing 95.6% (23,667/24,749), duck, 3.04% (753/24,749) and guinea fowl, 1.3% (329/24,749) of the total collected samples, including serum samples (Tables 1 & 2). An average of 687.5 samples (24,749/36) was collected each month during the survey period. Samples collected from live bird markets represented 19% (4704/24,749) of the total.

3.2. NDV- and IBV-specific antibodies

Of a total of 1943 serum samples screened using the HA/HI test, 420 sera were positive, with an overall NDV prevalence of 21.6% (95% CI

19.8, 23.5%). Yearly prevalence ranged from 18.2% (95% CI 15.4, 21.0) in 2012 to 29.3 (95% CI 26.0, 32.5) in 2010. Species prevalence was 22.1% (95% CI 20.2, 24.0) (407 positive/1837) in chickens, 9.9 (95% CI 4.1, 5.7) (10/101) in ducks and 60% (95% CI 17.1, 100.9) (3/5) in guinea fowl. Among these positive serum samples, 156 were from the 186 serum samples collected from sick chickens (84%). The same serum samples (minus 5 guinea fowl samples) were screened for IBV antibodies by ELISA and 1401 samples were found positive out of 1938 serum samples giving 72.3% (95% CI 70.3, 74.3) IBV seroprevalence in the population as a whole. This ranged from 63.9% (95% CI 60.4, 67.3) in 2010 to 78% (95% CI 75.0, 78.0) in 2012. Species prevalence was 74.9% (95% CI 72.9, 76.9) (1387/1851) in chickens (including 13.8% (95% CI 7.1, 20.5) from sick chickens) and 13.9% (95% CI 7.2, 20.6) (14/101) in ducks. Regarding the locations, the NDV prevalence ranged from 13.2% (95% CI 11.7, 14.7) (265/2008) in Agneby region, 14.8% (95% CI 12.3, 17.3) (111/748) in District of Abidjan to 16.3% (95% CI 14.6, 18.0) (294/1806) in South Comoe region. The IBV prevalence ranged from 13.8% (95% CI 12.2, 15.4) (249/1806) in South Comoe region, 14.6% (95% CI 13.1, 16.1) (293/2008) in Agneby region to 16.6% (95% CI 14.0, 19.2) (124/748) in District of Abidjan (Table 1).

3.3. Detection of viral genomes

The 4562 pooled samples were analysed using nested-PCR on cDNA generated with random hexamers. This analysis found that 670 (14.7% (95% CI 13.7, 15.7)) and 666 (14.6% (95% CI 13.6, 15.6)) pools were positive for NDV or IBV respectively, all years, types of swabs or hosts taken together. However, regarding especially backyard poultry (chicken, duck and guinea fowl) the prevalence of IBV was 12.7% (95% CI 11.5, 13.9) (394/3098) and 12.5% (95% CI 11.3, 13.7) (363/2900) in backyard chicken only. IBV prevalence in commercial farms' chicken was 18.6% (95% CI 16.6, 20.6) (272/1464).

On a yearly basis, the prevalence of NDV in swab samples was 13% (95% CI 11.4, 14.6) (223/1718) in 2010, 13.2% (95% CI 11.5, 14.9) (212/1492) in 2011 and 17.4% (95% CI 15.2, 19.6) (235/1352) in 2012, while the prevalence of IBV in the samples was 11.6% (95% CI 10.1, 13.1) (199/1718), 18.4% (95% CI 16.4, 20.4) (275/1492) and 14.2% (95% CI 12.3, 16.1) (192/1352) in the same years. From the 595 pools of samples collected from dead and sick chickens, 572 pools were NDV positive (96.1% (95% CI 94.5, 97.7)) and 17 pools, IBV positive (2.8% (95% CI 1.4, 4.1)) with 3 pools positive for both viruses (Table 2).

The statistical analysis using the chi-squared test showed that the difference in NDV prevalence between backyard poultry and commercial chickens was not significant ($p > 0.3$) while this difference was significant regarding IBV prevalence ($p < 0.0001$). Between locations (Agneby, District of Abidjan and South Comoe), the difference in NDV prevalence was significant ($p < 0.03$) while the IBV prevalence was not significantly different between these regions ($p > 0.05$). About species (chicken, duck, guinea fowl), the difference in both NDV and IBV prevalences was not significant ($p > 0.05$ and $p > 0.1$, respectively).

When the results were broken down in terms of the type of swab, this survey found 19.2% (95% CI 17.6, 20.8) (438/2281) tracheal swab pools versus 10.2% (95% CI 8.9, 11.4) (232/2281) cloacal swab pools positive for NDV genome: NDV was more common in the tracheae of birds ($p < 0.0001$, McNemar's test). IBV prevalence, in contrast, was higher in the cloacal than tracheal swabs: 18.5% (95% CI 17.0, 20.1) (423/2281) and 10.7% (95% CI 9.4, 12.0) (243/2281) prevalence in cloacal and tracheal swabs, respectively ($p < 0.0001$, McNemar's test). We found a total of 49 pools that were positive for both NDV and IBV, of which 21 were tracheal and 28 cloacal. The detailed breakdown of the results is shown in Table 2.

4. Discussion

The avian influenza crisis, starting in Asia, reached Africa and in particular Ivory-Coast in 2006, causing huge economic losses. This situation

greatly affected local poultry industries along with the loss of an important source of proteins for middle income and poor populations. Interestingly, the avian crisis highlighted the importance of ND (of which the main concern is the velogenic form) alongside other respiratory diseases such as IB. We took advantage of the ongoing surveillance for avian influenza virus within Ivory-Coast which followed the detection of 12 outbreaks of H5N1 (Couacy-Hymann et al., 2009). Birds that were sampled were clinically examined for any signs of disease. Animals showing clinical signs were included in the survey along with dead animals found on the site of sampling. The collected samples were screened for avian influenza virus type A RNA and for specific subtype H5, H7 and H9 antibodies and the overall result remained negative (Couacy-Hymann et al., 2012b).

These same samples have been screened in the present study for the presence of NDV and IBV, using assays for both genetic material and antibodies, for the period 2010–2012. The study has demonstrated the importance of ND in these mainly rural areas with poor populations, whose backyard poultry farms contribute significantly to household income and so contribute to poverty alleviation. Particularly, essentially all chickens found dead or sick were positive for NDV genome, with 96.3% prevalence. Partial sequencing of the F gene from samples collected on dead chickens showed the presence of polybasic sequence at the F protein cleavage site, corresponding with that expected for a velogenic strain of NDV. NDV-specific antibody prevalence ranged from 18.2% to 29.3% over the period of the study, with an overall average value of 21.6%, while the NDV F gene detection gave an overall prevalence of 14.7%, showing widespread distribution of the virus even among apparently healthy animals. These results confirm a previous study undertaken in Ivory-Coast on the burden of NDV in backyard poultry units, when compared to commercial farms where vaccinations are implemented in a correctly and thoroughly applied programme (Couacy-Hymann et al., 2012a). In rural regions, no vaccination against NDV is implemented on free range poultry. Among the three avian species studied, chickens, with 22.1% seroprevalence, are of main concern. The widespread nature of NDV in these populations contributes to the maintenance of the endemic pattern of the disease, causing mass seasonal death and impacting negatively on food security and poverty alleviation in those rural populations.

If ND is well known and studied in Africa, this is not the case with IB, which remains less investigated, with few data available presently (Ducatez et al., 2009). Cases of IB are reported mainly from commercial layer farms based on clinical signs such as respiratory distress, decline of the egg production, and damage of the shape of the eggs. Vaccination against the disease is strongly recommended in commercial poultry farms. Although field veterinary personnel and rural farmers report from time to time cases of low egg size or change of the shape of the eggs, any respiratory signs in the field are associated with, and reported as, ND. Little is also known on IB in backyard poultry units, since ND is still reported as the most important disease in that type of poultry farm. Our study shows that IBV is widespread in such units, albeit causing largely inapparent or subclinical infections; the seroprevalence in the period 2010–2012 was 72.3%, much higher than the seroprevalence for NDV, while the prevalence of the viral genomes was similar for the two viruses (12.7% IBV positive, 14.2% NDV positive). Chickens, with a seroprevalence of 74.9%, appear to be the main host of IBV in backyard poultry species. Our results demonstrate the high levels of circulation of IBV in poultry farms in free range (backyard) poultry farms as in commercial farms. Our results are in agreement with previous studies in Nigeria and Senegal, which also found high levels of circulation of IBV in backyard poultry farms, with seroprevalence rates above 70% (Owoade et al., 2006; Emikpe et al., 2010; Ntirandekura, 2011). The IBV virus itself was so far only reported in Africa in Morocco in 1982–1983 (el Houadfi and Jones, 1985), in Egypt in 2003 (Abdel-Moneim et al., 2006), and in Nigeria in 2006–2007 (Ducatez et al., 2009), likely more because very few research teams looked for the virus on the continent rather than because it is not present.

While we observed a much higher seroprevalence for IBV than for NDV (72% versus 22%), the virus prevalences were similar for both viruses. The sequenced NDV F cleavage sites highlighted the circulation of velogenic strains of the virus in the country. Taken together these results suggest that while healthy birds have been detected positive for NDV velogenic strains, the pathogen likely causes severe mortality in the field that may explain a lower seroprevalence for NDV than for IBV. A recent study in domestic poultry reported 8.7% NDV prevalence by virus isolation in Uganda with circulation of mainly velogenic viruses as well. In the Ugandan study, 28.6% (6/21) and 9.0% (108/1229) of the chickens from which NDV could be isolated were sick and healthy, respectively, confirming both the morbidity caused by velogenic NDV in the field and the detection of these strains in asymptomatic birds (Byarugaba et al., 2014).

Forty nine (49) of the pooled samples were positive for both NDV and IBV. Since each pool contained material from 5 birds, this result could be that the two viruses came from different birds or was a dual infection of the same individual bird. To clarify this situation, further work clearly needs to be done on individual samples from each positive pool.

This study on IBV in free range poultry farms is the first investigation on this disease undertaken in the country. Commercial poultry farms in the country used to vaccinate their flocks with vaccine having the Massachusetts 41 (M41) strain of IBV while several serotypes circulate worldwide and there is not always cross-protection from one serotype to another (reviewed in Cavanagh, 2003). There needs to be fuller investigation to determine the genotype(s) and serotype(s) of the strains which are present in a concerned area prior to any vaccination. Re-use of samples collected for AIV surveillance may provide the opportunity to characterise the IBV strains currently circulating in Ivory-Coast.

Acknowledgements

We are grateful to Pr. C.P. Muller and Dr C. Snoeck, Laboratoire National de Santé, Centre de Recherche Public Santé, Luxembourg, who provided the ELISA kit for the IBV antibody detection.

We would like to thank the field veterinary services and personnel for their collaboration as well as all the poultry owners, vendors and other stakeholders for their cooperation during this study.

We specially thank Dr M. Baron, The Pirbright Institute, Ash Road, Pirbright GU24 0NF, UK, for his comments and the editing of this manuscript.

This study was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services under contract no. HHSN266200700005C, by the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC).

References

Abdel-Moneim, A.S., El-Kady, M.F., Ladman, B.S., Gelb Jr., J., 2006. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology* 33, 78.

Akin, A., Lin, T.L., Wu, C.C., Bryan, T.A., Hooper, T., Schrader, D., 2001. Nucleocapsid protein gene sequence analysis reveals close genomic relationship between turkey coronavirus and avian infectious bronchitis virus. *Acta Virologica* 45, 31–38.

Alexander, D.J., 1997. Newcastle disease and other Paramyxoviridae infections. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougall, L., Saif, J.Y.M. (Eds.), *Diseases of Poultry*, 10th ed. Iowa State University, Ames, Iowa, pp. 541–569.

Alexander, D.J., 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E., Reed, W.M. (Eds.), *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp. 156–168.

Briand, F.X., Henry, A., Massin, P., Jestin, V., 2012. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus. *J. Virol.* 86 (14), 7710. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00946-12>.

Byarugaba, D.K., Mugimba, K.K., Omony, J.B., Okitwi, M., Wanyana, A., Otim, M.O., Kirunda, H., Nakavuma, J.L., Teillaud, A., Paul, M.C., Ducatez, M.F., 2014. High pathogenicity and low genetic evolution of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolated from live bird markets in Uganda. *Virology* 461, 173. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-11-173>.

Cattoli, G., Monne, I., Fusaro, A., Tony, M.J., Lombin, L.H., Aly, M.M., Arafa, A.S., Sturm-Ramirez, K.M., Couacy-Hymann, E., Awuni, J.A., Batawui, K.B., Awoume, K.A., Aplogan, G.L., Sow, A., Ngangnou, A.C., El Nasri, I.M., Gamatie, H.D., Dauphin, D., Domenech, J.M., Capua, I., 2009. Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in Africa: a comprehensive phylogenetic analysis and molecular characterization of isolates. *PLoS One* 4 (3), e4842 (1–9).

Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C., Corrie, B., 2011. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J. Vet. Diagn. Investig.* 23, 637–657.

Cavanagh, D., 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32, 567–582.

Cavanagh, D., Gelb Jr., J., 2008. Infectious bronchitis. In: Saif, Y.M. (Ed.), *Diseases of Poultry*, 12th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 117–135.

Couacy-Hymann, E., Danho, T., Keita, D., Bodjo, S.C., Kouakou, C., Koffi, Y.M., Beudje, F., Tripodi, A., De Benedictis, P., Cattoli, G., 2009. The first specific detection of a highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in Ivory Coast. *J. Vet. Med. Zoonoses Public Health* 58, 10–15.

Couacy-Hymann, E., Kouakou, A.V., Kouamé, K.C., Kouassi, L.A., Koffi, Y.M., Godji, P., Lana, P., Tarnagda, Z., Akoua-Koffi, C., 2012a. Surveillance for avian influenza and Newcastle disease in backyard poultry flocks in Côte-d'Ivoire, 2007–2009. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 31 (3), 821–828.

Couacy-Hymann, E., Kouakou, A.V., Aplogan, G.L., Awoumé, F., Kouakou, K.C., Kakpo, L., Sharp, B.R., McClenaghan, L., McKenzie, P., Webster, R.G., Webby, R.J., Ducatez, M.F., 2012b. Surveillance for influenza viruses in poultry and swine, West Africa, 2006–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 18 (9), 1446–1452.

Ducatez, M.F., Martin, A.M., Owoade, A.A., Olatoye, I.O., Alkali, B.R., Maikano, I., Snoeck, C.J., Sausy, A., Cordioli, P., Muller, C.P., 2009. Characterisation of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa. *J. Gen. Virol.* 90, 2679–2685.

el Houadfi, M., Jones, R.C., 1985. Isolation of avian infectious bronchitis viruses in Morocco including an enterotropic variant. *Vet. Rec.* 116, 445.

Emikpe, B.O., Ohore, O.G., Olujoonwo, M., Akpavie, S.O., 2010. Prevalence of antibodies to infectious bronchitis virus (IBV) in chickens in southwestern Nigeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4 (1), 92–95.

Jackwood, M.W., Hall, D., Handel, A., 2012. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1305–1311.

Kho, C.L., Mohd-Azmi, M.L., Arshad, Yusoff, K., 2000. Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. *J. Virol. Methods* 86, 71–83.

Lamb, R.A., Parks, G.D., 2007. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Howley, D.M., Wolters, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 5th Knipe. Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1449–1496.

Maminiana, O.F., Gil, P., Briand, F.-X., Albina, E., et al., 2010. Newcastle disease virus in Madagascar: identification of genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. *PLoS One* 5 (11), 1–12.

Miller, P.J., Afonso, C.L., Spackman, E., Scott, M.A., Pedersen, J.C., Senne, D.A., Brown, J.D., Fuller, C.M., Uhart, M.M., Karesh, W.B., Brown, I.H., Alexander, D.J., Swayne, D.E., 2010. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.* 84 (21), 11496–11504.

Ntirandekura, J.B., 2011. Séroprévalence de la bronchite infectieuse en aviculture traditionnelle au Sénégal (Mémoire de diplôme de Master), en santé publique vétérinaire (41 pages).

OIE, 2000. Newcastle disease. *International Health Code 9th ed.* Office International des Epizooties, Paris, France.

OIE, 2012. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th edn. Office International des Epizooties, Paris.

Owoade, A.A., Ducatez, M.F., Muller, C.P., 2006. Seroprevalence of avian influenza virus, infectious bronchitis virus, reovirus, avian pneumovirus, infectious laryngotracheitis virus, and avian leucosis virus in Nigerian poultry. *Avian Dis.* 50, 222–227.

Snoeck, C.J., Ducatez, M.F., Owoade, A.A., Faleke, O.O., Alkali, B.R., Tahita, M.C., Tarnagda, Z., Ouedraogo, J.-B., Maikano, I., Mbah, P.O., Kremer, J.R., Muller, C.P., 2009. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Arch. Virol.* 154, 47–54.

Starick, E., Romer-Oberdorfer, A., Werner, O., 2000. Type and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). *J. Vet. Med. B* 47 (4), 295–301.

Terregino, C., Aldous, E.W., Heidari, A., Fuller, C.M., De Nardi, R., Manvell, R.J., Beato, M.S., Shell, W.M., Monne, I., Brown, I.H., Alexander, D.J., Capua, I., 2013. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). *Arch. Virol.* 158, 2233–2243.

Wise, M.G., Suarez, D.L., Seal, B.S., Pedersen, J.C., Senne, D.A., King, D.J., Kapczynski, D.R., Spackman, E., 2004. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 42, 329–338.



Toulouse, Septembre 2015

Nom : LANGEOIS

Prénom : Quentin

Titre : Détection et caractérisation de virus respiratoires aviaires en Afrique de l'Ouest

Résumé : Ce manuscrit présente, dans un premier temps, une courte synthèse sur l'élevage et l'économie du poulet en Afrique de l'Ouest et plus particulièrement en Côte d'Ivoire, au Togo et au Bénin, ainsi qu'une description des deux virus aviaires que nous avons retenus pour nos travaux : le virus de la bronchite infectieuse (IBV) et le virus de la maladie de Newcastle (NDV). Ce travail a été mené à bien en collaboration étroite avec le Laboratoire vétérinaire de Lomé (Togo), le LANADA de Bingerville (Côte d'Ivoire) et le LADISERO de Parakou (Bénin). Le travail expérimental s'est articulé en trois études distinctes : une première étude de prévalence des virus respiratoires aviaires au Togo et au Bénin ; une seconde étude d'épidémiologie moléculaire de souches ivoiriennes du virus de la maladie de Newcastle ; et une troisième étude d'efficacité vaccinale contre une souche africaine du virus de la bronchite infectieuse, IBADAN06. Les résultats ont montré une prévalence élevée des virus IBV (0.5-1%) et surtout NDV (2-23%) en Afrique de l'Ouest en 2011. Nous n'avons pas détecté le virus influenza A au Togo ni au Bénin. L'étude d'épidémiologie moléculaire du NDV en Côte d'Ivoire a mis en évidence la dominance de souches vélogènes. Enfin, la souche vaccinale IBV H120 permet de réduire très légèrement l'excrétion virale après épreuve virulente avec IBADAN06 dans le modèle poulet. Ce vaccin n'empêche pourtant pas la réplication virale et ne semble pas optimal pour être utilisé sur le terrain.

Mots clés : virus respiratoire aviaire, virus de la bronchite infectieuse, virus de la maladie de Newcastle, Togo, Bénin, Côte d'Ivoire, épidémiologie moléculaire, étude vaccinale

Title: Detection and characterisation of avian respiratory viruses in West Africa

Abstract : In the present manuscript, we briefly summarized the poultry production in West Africa and introduced the two main avian respiratory viruses we focused on: infectious bronchitis virus (IBV) and Newcastle disease virus (NDV). The work was carried out in close collaboration with the Laboratoire vétérinaire de Lomé (Togo), the LANADA of Bingerville (Côte d'Ivoire) and the LADISERO of Parakou (Benin). The experimental work was divided in three axes: the first study aimed at calculating a prevalence of avian respiratory viruses in Togo and Benin; then a molecular epidemiology study of NDV in Côte d'Ivoire was performed; finally a vaccine study on the African IBV strain IBADAN06 was carried out. We showed a high virus prevalence of IBV (0.5-1%) and an even higher prevalence of NDV (2-23%) in Togo and Benin in 2011. No avian influenza A virus was however detected. In Côte d'Ivoire, velogenic NDV strains dominated. Finally, the H120 IBV commercial vaccine did not protect birds against IBADAN06 virus replication in the chicken model despite a slight decrease in virus shedding and earlier virus clearance for vaccinated birds.

Keywords : avian respiratory virus, infectious bronchitis virus, Newcastle disease virus, Togo, Benin, Côte d'Ivoire, molecular epidemiology, vaccine study