

ANALYSE EPIDEMIO-MOLECULAIRE ET PHYLOGENETIQUE DE L'INFLUENZA AVIAIRE H9 ISOLE DES ELEVAGES AVICOLES AU MAROC ENTRE 2021 ET 2023.

Oumayma Arbani^{1,*}, Mariette F. Ducatez², Salma Mahmoudi³, Faïçal Salamat¹, Mohamed EL Houadfi¹, Siham Fellahi^{1,*}

¹Unité de Pathologies Aviaires, Département de Pathologie Vétérinaire et de Santé Publique Vétérinaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat 10000, B.P. 6202, Maroc.

² IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31300 Toulouse, France.

³Laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire, Département de biologie, Faculté des sciences, Université Mohammed V de Rabat, 4 Avenue Ibn Battouta, Rabat 10000, B.P. 10106, Maroc.

*Correspondance : arbanoumayma@iav.ac.ma

RÉSUMÉ :

Les virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) constituent une menace importante pour l'industrie avicole et la santé publique dans le monde entier, parmi eux, le sous-type H9. Ce dernier a fait l'objet d'une attention particulière en raison de sa forte prévalence, notamment en Asie, au Moyen-Orient et en Afrique. Au Maroc, depuis son introduction en 2016, le H9 a aimanté le secteur avicole du royaume à cause des lourdes pertes économiques qu'il engendre ainsi que son caractère mutant et son potentiel d'infection zoonotique. Cette communication a pour objectif de décrire l'allure épidémiologique du virus de l'IAFP sous-type H9 sur le territoire Marocain, caractériser moléculairement et phylogénétiquement les souches circulantes du virus entre 2021 et 2023, ainsi qu'analyser les possibles mutations pouvant affecter sa virulence et sa pathogénicité sur le terrain. Grâce à des enquêtes épidémiologiques actives sur des élevages suspects, un total de 1100 échantillons comprenant des organes et des écouvillons oropharyngés provenant de 250 fermes situées dans sept régions du Maroc, connues pour leur forte densité d'élevages de volailles, ont été analysés. Au total, les séquences génétiques partielles du gène HA de 21 souches isolées ont été séquencées à l'aide de la technique de séquençage Sanger. La RT-PCR en temps réel a montré un pourcentage de positivité globale de 35.6% (89/250). L'analyse phylogénétique du gène HA a indiqué que toutes les souches circulantes appartenaient à la lignée G1. Les nouveaux isolats détectés se sont regroupés avec les génotypes précédemment isolés au Maroc, en Afrique du Nord et de l'Ouest, et au Moyen-Orient. Une grande diversité génétique au niveau des nucléotides et des acides aminés a été observée parmi toutes les souches isolées dans cette étude, par rapport aux souches H9 isolées au Maroc depuis 2016. De nouvelles mutations d'acide aminés ont été détectées dans les positions 226, 227 et 193 de l'hémagglutinine, ce qui met en évidence l'évolution génétique des AIV H9. Ces résultats contribuent à notre compréhension de l'évolution du H9 dans la région et fournissent des indications précieuses pour l'élaboration de stratégies de prévention et de contrôle efficaces contre ce sous-type émergent.

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF H9 AVIAN INFLUENZA ISOLATED FROM MOROCCAN POULTRY FARMS BETWEEN 2021 AND 2023.

Avian influenza viruses pose a significant threat to both poultry industry and public health worldwide. H9 subtype has specifically received particular attention due to its high prevalence, especially in Asia, the Middle East and Africa. In Morocco, since its introduction in 2016, the virus has magnetized the kingdom's poultry sector not only because of the heavy economic losses it causes, but also because of its mutant nature and zoonotic infection potential.

This paper describes the epidemiological profile of LPAI virus subtype H9 in Morocco, characterizes the molecular and phylogenetic characteristics of circulating strains of the virus between 2021 and 2023, and analyzes possible mutations that could affect its virulence and pathogenicity in the field. Between 2021 and 2023 we launched active epidemiological investigations on suspect farms. A total of 1100 samples including organs and oropharyngeal swabs from 250 farms located in seven regions of Morocco, known for their high density of poultry farms, were analyzed. 21 genetic sequences of HA gene were sequenced using Sanger sequencing technique. Real-time RT-PCR showed an overall positivity percentage of 34.4% (86/250). Phylogenetic analysis of the HA gene indicated that all circulating strains belonged to the G1 lineage. The new isolates detected clustered distinctly from genotypes previously isolated in Morocco, North and West Africa, and the Middle East. High genetic diversity at nucleotide and amino acid level was observed among all strains isolated in this study, compared to H9 strains isolated in Morocco since 2016, suggesting the co-circulation of genetically diverse H9 variants. Newly discovered mutations were detected in HA positions 226, 227 and 193. These results contribute to our understanding of the evolution and epidemiology of H9 in the region and provide valuable insights for the development of effective prevention and control strategies against this emerging subtype.

INTRODUCTION

Malgré son caractère faiblement pathogène, le sous-type H9 du virus de l'influenza aviaire est un agent pathogène hautement infectieux qui cause de lourdes pertes économiques dans l'industrie avicole mondiale, en raison de l'immunosuppression et des mortalités relativement élevées accentuées par la co-infection avec d'autres agents pathogènes.

Les analyses moléculaires des virus H9 isolés dans les deux dernières décennies ont permis de classer ces virus en deux grandes lignées ; la lignée nord-américaine et la lignée eurasiennne. La lignée eurasiennne se compose de quatre sous-lignées : KR323-like (A/Chicken/Korea/38349-p96323/96), Y439-like (A/Duck/Hong Kong/Y439/1997), Y280-like (A/Duck/Hongkong/Y439/97) et G1-like (A/Quail/Hong Kong/G1/97) (12)

Sa capacité à infecter l'homme en se liant préférentiellement aux récepteurs salicyliques des cellules de l'appareil respiratoire de type humain, ainsi que son pouvoir de réassortiments et d'échanges de gènes internes avec d'autres virus grippaux, notamment de sous-type H5N1, H5N6, H7N9 et H10N8, souligne son intérêt sanitaire. (4,11,20,23). Cependant, aucune preuve de transmission interhumaine des virus d'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) de sous type H9 n'a encore été observée. (20). Globalement, le virus est endémique dans de multiples régions du monde comptant l'Asie, le Moyen-Orient et l'Afrique. (7,22). Rapidement répandue sur le continent africain, la maladie a été déclarée au Maroc début 2016 (8), puis en Algérie fin 2017 montrant plus de 99% de similitudes génétiques et antigéniques avec les souches marocaines (16). Depuis, le virus a commencé à se propager vers le sud en se rendant dans plusieurs pays subsahariens : il a été détecté pour la première fois au Burkina Faso en 2016 (27), au Ghana en 2018 (3) et il s'est étendu au Togo, au Bénin, à l'Ouganda, au Kenya, au Nigéria et au Sénégal entre 2017 et 2020 et au Sénégal, avec un cas humain signalé en 2020 (10,15,17,19). Au Maroc, dans le cadre des programmes de surveillance active du virus sur le territoire national, plusieurs études moléculaires ont été conduites pour surveiller les possibles mutations que le virus puisse subir (9,18,24).

Notre communication fait suite à ces efforts pour apporter de nouvelles sur les éventuelles dérivées moléculaires du dit virus. Pour ce faire, les souches circulantes du virus au Maroc dans la période comprise entre septembre 2021 et juin 2023 ont été isolées, caractérisées et ont fait l'objet de construction d'arbres phylogénétiques dans un premier volet.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Collecte des prélèvements :

À partir de nos enquêtes épidémiologiques lancées de septembre 2021 à mars 2023 dans sept régions du Maroc, nous avons collecté 1100 échantillons, dont des organes (trachée et poumons) et des écouvillons oropharyngés provenant de 250 fermes (vaccinées et non vaccinées) de différents types de productions (197 élevages de poulet de chair, 30 de poule pondeuse, 11 de poulet reproducteur et 12 de dinde chair)

Les échantillons prélevés étaient de deux natures ; des tissus frais principalement du tractus respiratoire (trachée et poumons) et des écouvillons oropharyngés. L'échantillonnage était basé sur les élevages suspects d'être infectés par le virus de l'IAFP H9 présentant les signes respiratoires et oculaires rappelant la maladie ; notamment les éternuements, la toux, les râles et le larmolement excessif. Les facteurs de baisse de performances zootechniques liées à la diminution de la consommation alimentaire ainsi que les taux élevés de morbidité et de mortalité ont été aussi prises en considération.

1.2. Extraction l'ARN viral et RT-PCR en temps réel pour la détection du sous type H9 :

L'ARN viral a été extrait de pools de 3 écouvillons oropharyngés et des tissus homogenisés, à l'aide du kit de purification de l'ARN/ADN Kyt@, conformément aux instructions du fabricant (AniCon Labor GmbH Laboratory, Allemagne). Les échantillons ont d'abord été analysés par RT-PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques de H9 et des ensembles de sondes pour les régions conservées dans la sous-unité HA2 comme décrit par (21), en utilisant le kit Invitrogen™ SuperScript™ III One-Step RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Göteborg, Suède) sur un système de PCR en temps réel 7500 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

1.3. Isolement du virus et purification de l'ADNc :

Les échantillons fortement positifs à la qRT-PCR avec des valeurs du seuil de cycle inférieur à 30 (CT < 30) ont été soumis à l'isolement du virus sur des œufs embryonnés de poulets exempts d'agents pathogènes spécifiques, âgés de 9 à 11 jours. Les embryons inoculés ont été incubés à 37°C pendant 72 heures, puis réfrigérés à 4°C pendant 4 heures avant d'être récoltés. Le liquide allantoïdien récolté a été clarifié par centrifugation et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Les isolats obtenus ont été soumis à une RT-PCR point final pour le séquençage du gène d'hémagglutinine. Les amorces décrites par (14) ont été utilisées pour l'amplification du gène HA avec une taille prédite du produit d'environ 670 pb sur gel d'agarose à 1 %. Tous les amplicons correspondant à cette taille ont été excisés et purifiés du gel à l'aide d'un kit Machery-Nagel (Nucleospin gel and PCR clean-up), en suivant les instructions du fabricant.

1.4. Séquençage et analyse phylogénétique :

Les produits purifiés ont été envoyés pour séquençage Sanger à Eurofins (Allemagne).

Les séquences brutes obtenues au format AB1 ont été assemblées et alignées à l'aide du logiciel Bioedit 7.2.5 (13). L'arbre phylogénétique a été construit avec le logiciel MEGA 6.06 selon le modèle de Tamura en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (ML : Maximum likelihood method) (25).

2. Les résultats :

2.1. Résultats de la RT-PCR en temps réel pour la détection du virus H9 :

La RT-PCR en temps réel a montré que 89 élevages sur 250 ont été testés positifs, soit un taux de positivité de 35,6 % (89/250). Le taux de positivité selon le type de production est distribué comme suit : 35,3% (70/198) pour les élevages de poulet de chair, 28% (7/25) des élevages de poule pondeuse, 40% (6/15) des élevages de poulet reproducteur et 50% (6/12) des élevages de dinde chair. Les valeurs des Ct étaient comprises entre 9.2 et 34.9 avec 33% des échantillons ayant un Ct inférieur ou égal à 25, 61% avait un Ct compris entre 25 et 35, et 5% avait un Ct supérieur à 35.

2.2. Distribution géographique des élevages étudiés et statut de vaccination :

La distribution des élevages diagnostiqués dans notre étude se concentraient principalement dans les régions Nord-Ouest et Centre-Ouest du pays, principalement autour des régions de Casablanca-Settat, Rabat-Salé-Kénitra et Fes-Meknes. Globalement, les élevages poulet de chair (PC) étaient les plus diagnostiqués vu qu'ils sont les plus répandus dans toutes les régions, suivis par les autres types de production, avec des effectifs variables selon les régions. La région de Rabat-Salé Kénitra était la plus diagnostiquée avec un total de 114 élevages, dont 35 testés positifs, suivie par la région de Casablanca-Settat avec un total de 77 élevages testés dont 34 positifs.

Le taux de vaccination globale atteint était de 22% (55/250). La prévalence relative des élevages positifs à l'IAFP H9 dans les élevages vaccinés a été estimée à 40% (22 positifs dans 55 élevages vaccinés) tandis qu'elle était 34,3% dans les élevages non vaccinés (67 positifs dans 195 élevages non vaccinés). Toutefois, cette différence de détection de l'IAFP H9 dans les élevages n'est pas statistiquement significative (valeur p : 0,9).

En somme, la distribution des élevages positifs par région géographique pour chaque type de production est présentée sur le **tableau 1**.

Sur la base du Ct, de la zone géographique et du type de production, un total de 21 échantillons positifs

représentatifs a été sélectionné pour le séquençage partiel du génome.

2.3. Analyse phylogénétique du gène HA :

Toutes les séquences nucléotidiques caractérisées dans cette étude ont été soumises à GenBank et se sont vu attribuer les numéros d'accèsion suivants : OR592450, OR592441, OR592474, OR592443, OR592455, OR592451, OR592475, OR592452, OR592453, OR592442, OR592454, OR592514, OR592449, OR592456, OR592448, OR592457, OR592447, OR592444, OR592513, OR592446 OR592445.

L'analyse Blast des séquences nucléotidiques partielles des 21 segments du gène de l'hémagglutinine (HA) du H9 a montré que nos isolats étaient liés aux précédentes souches marocaines H9 isolées depuis 2016 par des identités nucléotidiques allant de 94,3% à 98,2%. Ces isolats présentaient également des identités nucléotidiques allant de 95,4% à 98,0% avec des souches nord-africaines, notamment d'Algérie et de Tunisie ; ainsi que des identités nucléotidiques allant de 95,1% à 97,2% avec des souches ouest-africaines telles que celles identifiées au Bénin et au Nigéria en 2019.

L'analyse phylogénétique ML a révélé que les virus LPAIV H9 marocains appartiennent à la lignée G1 et se regroupaient avec des virus précédemment isolés au Maroc en 2016, 2017, 2018 et 2020, ainsi que des virus d'Afrique du Nord ; Algérie (2017) et Tunisie (2018) ainsi que les virus H9 du Bénin (2019, 2020), des pondeuses du Sénégal (2017), du Nigéria (2019) et du Togo (2019). (**Figure 1**)

3.3. Caractérisation moléculaire du gène HA :

Les séquences d'acides aminés du gène HA de nos virus H9 montrent des variations significatives observées à plusieurs positions par rapport aux souches précédemment isolées.

Toutes les souches isolées présentaient le motif RSSR*GLF au niveau du site de clivage de l'HA0, ce qui est une caractéristique des virus H9 faiblement pathogènes.

Plusieurs mutations ont été observées parmi nos virus H9, principalement en position 226 (numérotation H3), où une sérine (S) est présente à la place d'une leucine (L) ou d'une arginine (A). En outre, la glutamine (Q) était le déterminant le plus fréquent en position 193. En outre, les mutations observées en positions 191, 193, 195, 196, 197, 228 et 230 par rapport aux souches isolées au Maroc en 2016 et 2018 étaient principalement Q191G, N193Q, Y195K, T196R, R197Q, G228R et I230R, qui sont toutes résumées dans le **tableau 2**.

Cependant, aucune mutation n'a été notée en position 194, qui conserve l'acide aminé leucine (L).

De plus, les principaux sites de glycosylation étaient identiques aux virus marocains précédents et se

trouvaient dans la sous-unité HA2 aux positions 154 NGTY et 213 NGSC. Quatre isolats sur vingt et un présentaient un site de glycosylation supplémentaire en position 95 NASC.

DISCUSSION :

La présente étude, menée entre Septembre 2021 et Juin 2023 constitue une base épidémiologique, phylogénétique et moléculaire sur les virus H9 circulants sur le territoire marocain et fourni des informations précieuses sur la diversité génétique et la dynamique évolutive associées à ce sous-type. Commencant par l'analyse moléculaire, la RT-PCR en temps réel a montré un taux de positivité de 35,3%, le virus étant présent dans les sept régions du Maroc testées. Le taux de viro-positivité observé dans notre enquête est nettement inférieur à celui rapporté précédemment en 2019, qui était de 58% dans 108 fermes, comme indiqué par une étude antérieure (24). Cette baisse pourrait être liée à la co-circulation de multiples agents pathogènes à tropisme respiratoires, notamment le virus de la bronchite infectieuse (5) et l'amélioration des mesures de biosécurité. En outre, la distribution des élevages étudiés dans le cadre de notre étude était principalement dans les régions du nord-ouest (Rabat, Casablanca et les régions avoisinantes). Cette particularité est le résultat direct de l'activité avicole accrue et de la croissance de l'industrie dans ces régions géographiques. En effet, cet axe se distingue par son climat favorable et sa proximité aux grands marchés de commercialisation et de consommation. Nous reconnaissons que la distribution de l'échantillonnage peut ne pas fournir une description diversifiée de l'ensemble du territoire national. Toutefois, cette répartition nous permet de mieux comprendre les zones où le virus se propage le plus fréquemment. Par ailleurs, le taux de vaccination dans les élevages diagnostiqués dans notre étude était de 22%, principalement notée dans les types de productions type poudeuse, reproducteur et dinde chair. Certes, la vaccination contre le H9 est très peu répandue dans les élevages poulet de chair au Maroc, mais les programmes de vaccination mis en œuvre dans les autres types de production avicole, principalement au niveau des élevages type reproducteur, peuvent jouer un rôle important dans la diminution de prévalence du virus (8,18). De nombreuses études ont révélé qu'une vaccination adaptée réduit le niveau et la durée de l'excrétion du virus et augmente la résistance à l'infection de l'hôte (1,6). Cependant, dans le contexte de l'endémicité du H9 dans plusieurs pays d'Afrique, en particulier dans les pays avoisinants d'Afrique du Nord, souligne l'importance d'étendre les programmes de vaccination pour couvrir l'ensemble de la production avicole et l'adaptation des souches vaccinales aux souches circulantes sur le terrain. L'analyse phylogénétique a montré que tous les virus H9 marocains isolés depuis 2016 appartiennent à la

lignée G1 et se regroupent directement avec des souches isolées du Maroc (2016, 2018, 2019 et 2020), de l'Algérie (2017), de la Tunisie (2018), du Bénin (2019,2020), du Sénégal (2017), du Nigéria (2019) et du Togo (2019). Cette similitude est évocatrice d'une ascendance génétique partagée ou d'une origine commune récente. La proximité géographique facilitant les échanges entre ces pays voisins, les oiseaux migrateurs et mouvements fréquents peuvent servir de vecteur de transmission et d'évolution du virus. (2,8,9).

De point de vue moléculaire, notre étude a révélé de la détection de mutations non encore observées dans des positions cruciales : L226S, G228R et E193T. Ces mutations peuvent être à l'origine de variations adaptatives pour un passage de la barrière d'espèce chez l'homme ou chez d'autres hôtes mammifères, favoriser la liaison préférentielle aux récepteurs d'acide sialique des cellules épithéliales et échapper aux mécanismes immunitaires (4,15)

En effet, les variations du résidu 193 du gène HA affectaient diverses propriétés des virus H9, ce qui souligne l'importance d'une surveillance continue de la protéine HA pour mieux comprendre l'étiologie du H9 et lutter efficacement contre ce virus chez les volailles (26). Cependant, d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer si ces mutations ont entraîné une augmentation de la transmission zoonotique, de la virulence et de la résistance aux antiviraux.

Dans l'ensemble, la circulation et l'évolution des virus de la grippe aviaire A(H9) chez la volaille marocaine soulignent l'importance de la surveillance active et de l'analyse continue et vigilante des virus de la grippe aviaire dans le pays afin de gérer tous les risques potentiels de la maladie sur la filière avicole et la santé publique.

CONCLUSION

Les résultats discutés dans notre étude suggèrent une diversité génétique et des changements évolutifs au sein de la population virale de H9 sur le territoire national. La circulation de souches divergentes génétiquement ainsi que les pressions sélectives liées au système immunitaire de l'hôte ou aux conditions environnementales souligne le potentiel de dérive génétique au sein de la population. Ceci impacte sur l'efficacité des vaccins et des outils de diagnostic existants, d'où la nécessité d'adapter les vaccins et les programmes aux souches en circulation et à la situation épidémiologique de chaque région. De plus, l'étroite parenté génétique des souches marocaines avec celles des pays voisins suggère une transmission transfrontalière, soulignant la nécessité d'une surveillance régionale et d'efforts coordonnés pour contrôler la propagation du virus.

Figure 1. Arbre phylogénétique (générée par l'algorithme Maximum Likelihood) du gène HA des virus représentatifs de l'IAFP H9N2. Les virus marocains séquencés dans le cadre de cette étude sont marqués en jaune.

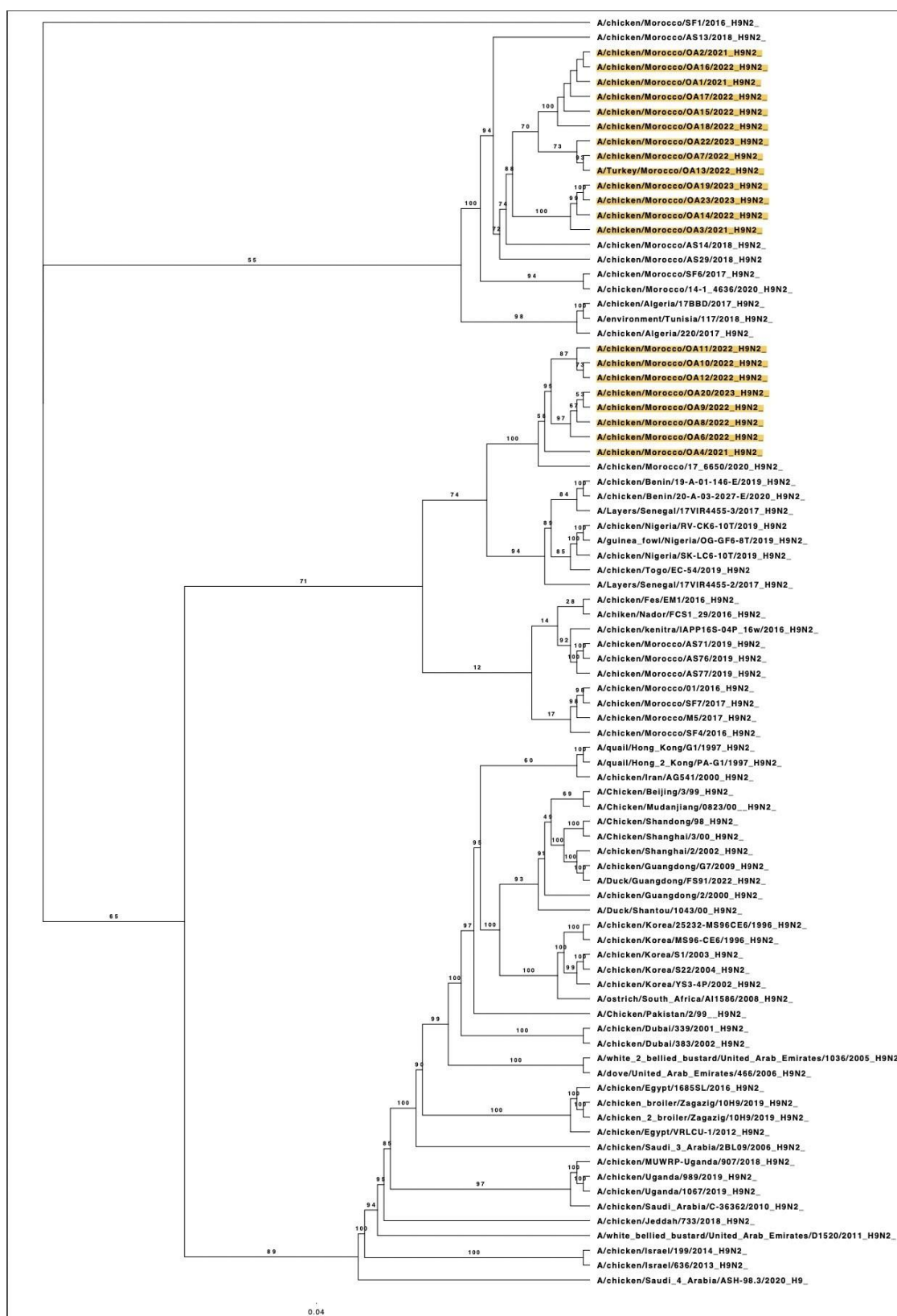


Tableau 1. Distribution des élevages étudiés dans chaque région par type de production.

Région	Type de production	Elevages positifs	Elevages négatifs	Total
Casablanca-Settat	PC	28	32	60
	PP	2	2	4
	PR	2	3	5
	DC	4	4	8
Rabat-Salé-Kénitra	PC	26	59	85
	PP	5	16	21
	PR	2	2	4
	DC	2	2	4
Fes-Meknes	PC	6	9	15
Marrakech-Safi	PC	7	17	24
Souss-Massa	PC	2	4	6
Tanger-Tétouan-Al Hoceïma	PR	2	4	6
Daraâ-Tafilalt	PC	1	7	8
Total		89	161	250

PC : Poulet de chair ; PP : Poule pondeuse ; PR : Poulet reproducteur ; DC : Dinde chair.

Tableau 2. Caractérisation de déterminants moléculaires des isolats marocains H9 dans les positions nucléotidiques par rapports aux souches de références.

Séquences	Positions nucleotidiques (numérotation H3)													
	196	197	198	230	191	192	193	194	195	221	225	226	227	228
Beijing/3/99	N	R	R	I	N	N	K	C	D	*	V	A	R	S
Hong_2_Kong/1997	I	R	N	I	Q	T	N	L	Y	P	G	L	Q	G
SF1/2016	T	R	T	I	Q	T	N	L	Y	P	G	L	I	G
AS14/2018	T	R	T	I	Q	T	N	L	Y	P	G	L	I	G
AS77/2019	T	R	T	I	Q	T	N	L	Y	P	G	L	I	G
17-6650/2020	T	R	T	I	Q	T	N	L	Y	P	G	L	I	G
OA1/2021	R	Q	L	R	G	F	Q	L	K	M	N	S	V	R
OA2/2021	R	Q	L	R	G	F	Q	L	K	M	N	S	V	R
OA15/2022	R	Q	L	R	G	F	Q	L	K	M	N	S	V	R
OA16/2022	R	Q	L	R	G	F	Q	L	K	M	N	S	V	R
OA17/2022	R	Q	L	R	G	F	Q	L	K	M	N	S	V	R
OA18/2022	R	Q	L	R	G	F	Q	L	K	M	N	S	V	R

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alexander, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25: 5637–5644. 2007.
2. Amal, E.-B., N. Saâdi, F. Asma, B. Moncef, and F. F. Ouafae. Characterization and Phylogenetic Analysis of the Hemagglutinin Gene in H9 Influenza Viruses from Chickens in Morocco from 2017 to 2019. *Avian disease* 64: 310–314. 2020.
3. Awuni, J. A., A. Bianco, O. J. Dogbey, A. Fusaro, D. T. Yingar, A. Salviato, P. T. Ababio, A. Milani, F. Bonfante, and I. Monne. Avian influenza H9N2 subtype in Ghana: virus characterization and evidence of co-infection. *Avian Pathology* 48: 470–476. 2019.
4. Baigent, S. J., and J. W. McCauley. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays* 25: 657–671. 2003.
5. Belkasm, S. F. Z., S. Fellahi, C. D. Touzani, F. Z. Faraji, I. Maaroufi, M. Delverdier, J.-L. Guérin, O. F. Fihri, M. El Houadfi, and M. F. Ducatez. Co-infections of chickens with avian influenza virus H9N2 and Moroccan Italy 02 infectious bronchitis virus: effect on pathogenesis and protection conferred by different vaccination programmes. *Avian Pathology* 49: 21–28. 2020.
6. Capua, I., C. Terregino, G. Cattoli, and A. Toffan. Increased resistance of vaccinated turkeys to experimental infection with an H7N3 low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol* 33: 158–163. 2004.
7. Ducatez, M. F., R. G. Webster, and R. J. Webby. Animal influenza epidemiology. *Vaccine* 26: D67–D69. 2008.
8. EL Houadfi, M., S. Fellahi, S. Nassik, J.-L. Guérin, and M. F. Ducatez. First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco. *Virology* 13: 140. 2016.
9. El Mellouli, F., M. Mouahid, A. Fusaro, B. Zecchin, H. Zekhnini, A. El Khantour, E. Giussani, E. Palumbo, H. Rguibi Idrissi, I. Monne, and A. Benhoussa. Spatiotemporal Dynamics, Evolutionary History and Zoonotic Potential of Moroccan H9N2 Avian Influenza Viruses from 2016 to 2021. *Viruses* 14: 509. 2022.
10. Fusade-Boyer, M., F. Djegui, K. Batawui, D. K. Byuragaba, J. C. Jones, F. Wabwire-Mangeni, B. Erima, G. Atim, Q. A. Ukuli, T. Tugume, K. Dogno, K. Adjabli, M. Nzuzi, R. Adjini, T. Jeevan, A. Rubrum, W. Go-Marro, G. Kayali, P. McKenzie, R. J. Webby, and M. F. Ducatez. Antigenic and molecular characterization of low pathogenic avian influenza A(H9N2) viruses in sub-Saharan Africa from 2017 through 2019. *Emerging Microbes & Infections* 10: 753–761. 2021.
11. Gao, X., N. Wang, Y. Chen, X. Gu, Y. Huang, Y. Liu, F. Jiang, J. Bai, L. Qi, S. Xin, Y. Shi, C. Wang, and Y. Liu. Sequence characteristics and phylogenetic analysis of H9N2 subtype avian influenza A viruses detected from poultry and the environment in China, 2018. *PeerJ* 9: e12512. 2021.
12. Guan, Y., K. F. Shortridge, S. Krauss, and R. G. Webster. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: Were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 9363–9367. 1999.
13. Hall, T. A. BIOEDIT: A USER-FRIENDLY BIOLOGICAL SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR AND ANALYSIS PROGRAM FOR WINDOWS 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999.
14. Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster, and D. R. Perez. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology* 146: 2275–2289. 2001.
15. Jallow, M. M., A. Fall, M. A. Barry, B. Diop, S. Sy, D. Goudiaby, M. Fall, V. Enouf, M. N. Niang, and N. Dia. Genetic characterization of the first detected human case of low pathogenic avian influenza A/H9N2 in sub-Saharan Africa, Senegal. *Emerging Microbes & Infections* 9: 1092–1095. 2020.
16. Jeevan, T., D. Darnell, E. A. Gradi, Y. Benali, R. Kara, D. Guetarni, A. Rubrum, P. J. Seiler, J. C. Crumpton, R. J. Webby, and F. Derrar. A(H9N2) influenza viruses associated with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. *Influenza Other Respir Viruses* 13: 622–626. 2019.
17. Kariithi, H. M., C. N. Welch, H. L. Ferreira, E. A. Pusch, L. O. Ateya, Y. S. Binopal, A. A. Apopo, T. D. Dulu, C. L. Afonso, and D. L. Suarez. Genetic characterization and pathogenesis of the first H9N2 low pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens in Kenyan live bird markets. *Infection, Genetics and Evolution* 78: 104074. 2020.
18. Khantour, A. E., M. E. Houadfi, S. Nassik, N. S. Tligui, F. E. Mellouli, F.-Z. Sikht, M. F. Ducatez, A. Soulaymani, and S. Fellahi. Protective Efficacy Evaluation of Four Inactivated Commercial Vaccines Against Low Pathogenic Avian Influenza H9N2 Virus Under Experimental Conditions in Broiler Chickens. *Avian Diseases* 65. 2021.
19. Lanre et al. Live Bird Markets in Nigeria: A Potential Reservoir for H9N2 Avian Influenza Viruses. 2021.
20. Li, R., A. Adel, J. Bohlin, Å. Lundkvist, B. Olsen, J. H.-O. Pettersson, and M. M. Nagueib. Phylogeographic Dynamics of Influenza A(H9N2) Virus Crossing Egypt. *Front. Microbiol.* 11: 392. 2020.

21. Monne, I., S. Ormelli, A. Salviato, C. De Battisti, F. Bettini, A. Salomoni, A. Drago, B. Zecchin, I. Capua, and G. Cattoli. Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 46: 1769–1773. 2008.
22. Peacock, T. P., J. James, J. E. Sealy, and M. Iqbal. A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus. *Viruses* 11: 620. 2019.
23. Peiris, M., K. Y. Yuen, C. W. Leung, K. H. Chan, P. L. S. Ip, R. W. M. Lai, W. K. Orr, and K. F. Shortridge. Human infection with influenza H9N2. *The Lancet* 354: 916–917. 1999.
24. Sikht, F.-Z., M. Ducatez, C. D. Touzani, A. Rubrum, R. Webby, M. El Houadfi, N.-S. Tligui, C. Camus, and S. Fellahi. Avian Influenza a H9N2 Viruses in Morocco, 2018-2019. *Viruses* 14: 529. 2022.
25. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729. 2013.
26. Wan, H., and D. R. Perez. Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H9N2 Influenza Viruses Determines Cell Tropism and Replication in Human Airway Epithelial Cells. *Journal of Virology* 81: 5181–5191. 2007.
27. Zecchin, B., G. Minoungou, A. Fusaro, S. Moctar, A. Ouedraogo-Kaboré, A. Schivo, A. Salviato, S. Marciano, and I. Monne. Influenza A(H9N2) Virus, Burkina Faso. *Emerg Infect Dis* 23: 2118–2119. 2017.