

DONNEES EPIDEMIO-CLINIQUES ET VIROLOGIQUES SUR L'EMERGENCE DE L'INFLUENZA AVIAIRE H9N2 AU MAROC

El Houadfi Mohammed¹, Fellahi Siham¹, Nassik Saadia¹, Ducatez Mariette², Guérin
Jean-Luc²

¹Unité de Pathologie Aviaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

² Université de Toulouse, ENVT, INRA UMR 1225 IHAP, F-31076, Toulouse, France

elhouadfimohammed@yahoo.fr

RÉSUMÉ

L'influenza aviaire de sous type H9N2 est une maladie contagieuse des volailles, à tropisme essentiellement respiratoire. Au cours de la dernière décennie, le virus a connu une très forte expansion pour devenir enzootique dans plusieurs régions d'Asie, du Moyen Orient et dans certains pays de l'Afrique du Nord. Même si les virus H9N2 sont considérés comme « faiblement pathogènes » au sens de la réglementation sanitaire internationale, leurs impacts pathologiques et économiques sont considérables.

Cette communication décrit l'introduction du virus H9N2 au mois de Janvier 2016 dans les élevages avicoles marocains et sa très rapide propagation à toutes les régions du royaume, fort probablement par le biais des transports. En quelques semaines après son introduction, le virus a affecté tous les types de productions avicoles : chez le poulet de chair, le taux de mortalité variait entre 20 et 70 % ; Dans les élevages de poules pondeuses et de reproducteurs, le taux de mortalité a atteint 15 et 20 %, les chutes de ponte atteignant 70 à 80 %. Des prélèvements ont été réalisés dans 11 élevages avicoles : 4 virus ont été isolés dans des élevages de poulets de chair et 1 sur des reproductrices chair. Le génome complet de ces 5 isolats a été séquencé : leur analyse phylogénétique a démontré que le virus H9N2 introduit au Maroc appartient au génotype G1 et qu'il présente un fort lien phylogénétique avec les virus circulant au Moyen Orient. Les modalités d'introduction du virus sur le territoire du Maroc restent méconnues. Cette expérience marocaine rappelle que le virus H9N2 devrait être considéré comme un danger sanitaire majeur, contre lequel les pays indemnes doivent prendre toutes les mesures préventives pour éviter son introduction.

ABSTRACT

Epidemio-clinical and virological data on emergence of H9N2 avian influenza virus in Morocco

Avian influenza H9N2 is a contagious respiratory disease of avian species. During the last decade, the virus became enzootic in many parts of Asia, Middle East and some countries of North Africa. Despite the fact that AIV H9N2 is known as LPAI, it has been shown that under some circumstances, particularly in some concomitant infections or under some environmental factors, the virus could be responsible for great economic losses.

The present report describes the first introduction of AIV H9N2 in January 2016 to Moroccan poultry farms, and its very quick spread to all parts of the country and affecting all types of poultry production through live poultry market, human movements and vehicles. In broilers, mortality rates observed were between 20 and 70%. In layers and breeders, mortality rates were around 15 to 20%, however, drop in egg production reached 70 to 80%. Samples were collected from 11 chicken flocks with high morbidity and mortality rates. Four viruses were successfully isolated from broiler chickens and one from broiler breeders and fully sequenced. Phylogenetic and molecular markers analyses showed the Moroccan viruses belonged to the G1 lineage and likely originated from the Middle East. How the virus was introduced to the country still unknown. As known for H9N2 viruses, the Moroccan isolates possess several genetic markers that enhance virulence in poultry and transmission to humans. The present study illustrated that under field conditions H9N2 could have a devastating effect on egg production and mortalities and all preventive measures should taken to prevent its entry.

INTRODUCTION

L'influenza aviaire de sous type H9N2, représente un intérêt économique et de santé publique (1). L'agent causal est actuellement enzootique dans plusieurs pays du continent asiatique, le Moyen Orient et les pays Nord Africains. Pendant plusieurs décennies, le virus affectait en Chine les oiseaux aquatiques sans symptômes apparents. Ce n'est qu'en 1992 que le virus fut rapporté pour la première fois chez le poulet dans ce pays (2) et par la suite dans d'autres pays ; Corée du Sud en 1996 (3), Iran en 1998 (4) et le Pakistan en 1999 (5). Au début des années 2000, le virus apparaît dans plusieurs pays du Moyen Orient ; Israël, Arabie Saoudite, les Emirats et Oman (6, 7, 8). En Afrique, avant Janvier 2016, le virus fut détecté dans trois pays de l'Afrique du Nord : Egypte, Libye, Tunisie (9, 10, 25). Le virus influenza aviaire H9N2 (VIA H9N2) est classé parmi les virus faiblement pathogènes (IAFP), cependant, lors des co-infections avec d'autres agents pathogènes de l'appareil respiratoire ou ceux affectant le système immunitaire, ou autres facteurs d'environnement, une maladie respiratoire très sévère peut se déclencher, engendrant des taux de mortalité chez le poulet de chair dépassant les 60 % et chez la poule pondeuse et les reproducteurs des chutes de ponte pouvant atteindre 70% (11, 12). Les VIA H9N2 affectent plusieurs espèces d'oiseaux domestiques et sauvages tels que le faucon, la perdrix, la caille, l'outarde, le moineau. Certaines espèces de mammifères, notamment le chien et le chat, peuvent être infectés (14). Le virus a été isolé chez les humains et fait l'objet d'une surveillance par l'OMS pour ses menaces pandémiques. Plusieurs études ont révélé que le virus H9N2 est un « donneur de gènes » pour d'autres virus influenza de type A (16). Cette présentation décrit quelques données épidémiologiques recueillies lors de la 1^{ère} introduction du virus H9N2 au Maroc, sa dissémination rapide à tous les types d'élevage avicole, ainsi que les résultats des études phylogénétiques réalisées sur les virus isolés (17).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Recueil des prélèvements et des commémoratifs

Durant les 2 dernières semaines de Janvier 2016, des lots de poulets de chair malades, issus de plusieurs régions du centre du Maroc, ont été reçus au laboratoire de Pathologie Aviaire à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, pour diagnostic. Ces lots ont fait l'objet de prélèvements systématiques en vue d'analyses virologique, bactériologique et histologique. Selon les données épidémiocliniques et lésionnelles, l'influenza aviaire H9N2 a été fortement suspectée.

1.2. Isolement viral

Cinq prélèvements positifs par RT-PCR en temps réel ont fait l'objet d'essais d'isolement viral sur des œufs EOPS de 9 jours d'incubation.

1.3. Amplification et séquençage du génome complet des virus marocains H9N2

L'extraction des ARNs viraux des échantillons étudiés a été réalisée à l'aide du kit QIAamp DNA minikit (Qiagen). L'amplification par RT-PCR a été réalisée dans un thermocycleur (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) en utilisant des amorces spécifiques décrites précédemment (18) pour chaque segment du virus. La RT-PCR est effectuée par le biais du protocole du kit Applied Biosystem, la réaction de la RT-PCR est réalisée selon la méthode décrite par EL Houadfi et al. 2016 (17). Les produits de PCR amplifiés sont purifiés avec le kit Nucleospin PCR (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. Le séquençage par la méthode Sanger a été effectué sur tous les segments en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour la RT-PCR. Le séquençage a été réalisé avec un séquenceur capillaire 3130XL Applied Biosystems au Plateau de Génomique GeT-Purpan, UDEAR UMR 5165 CNRS / UPS, CHU Purpan, Toulouse, France.

1.4. Analyse phylogénétique

Les séquences des huit segments des génomes complets de cinq isolats marocains H9N2 ont été assemblées manuellement à l'aide du logiciel BioEdit Version 5.0.9 (19). Cette analyse permet de matérialiser la comparaison des souches marocaines avec celles choisies dans la banque génomique sous forme d'un arbre dont la longueur des branches, séparant deux souches, est proportionnelle à leur différence génétique. L'arbre phylogénétique a été construit par la méthode du maximum de vraisemblance (maximum likelihood method) qui est la plus couramment utilisée en virologie en utilisant le logiciel Mega 6.06 (20).

2. RESULTATS

2.1. Données épidémiologiques, cliniques et lésionnelles

Les commémoratifs recueillis, révèlent une forte diminution de la prise alimentaire, des symptômes respiratoires sévères (éternuements, râles, dyspnée, halètement) et, en outre, tous les lots de poulets inclus présentaient une forte augmentation des taux de mortalité, variant de 2 à 10% par jour entre le 3^{ème} et 6^{ème} jour après l'apparition des signes cliniques. La majorité des cas avait un âge supérieur à 3 semaines, certains même étaient en phase de commercialisation. Tous les oiseaux avaient été vaccinés selon le programme habituel contre la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse et la maladie de Gumboro. Les autopsies effectuées sur ces cas ont révélé que toutes les carcasses étaient congestionnées, et

quelques cadavres présentaient des écoulements oculonasaux et des sinusites infraorbitaires ; les lésions dominantes étant représentées par des hémorragies trachéales, des dépôts de fibrines dans les bronches obstruant ainsi les voies respiratoires. Certains lots de poulets présentaient par ailleurs des pneumonies fibrineuses, des lésions d'aérosacculite et des congestions de la rate et du foie. Trois à 4 semaines plus tard, la maladie s'était propagée à d'autres régions avicoles du pays et aux élevages de poules pondeuses et de reproducteurs. Dans ces derniers types d'élevage, la mortalité est restée inférieure à celle observée chez le poulet de chair, les chutes de pontes atteignant cependant 80 % dans certains cas. Des observations similaires ont été signalées en Iran (4), par contre en Tunisie les pertes liées à H9N2 semblent beaucoup moins sévères que celles du Maroc.

Chez la dinde, les symptômes respiratoires ont été similaires à ceux observés chez le poulet de chair, mais les symptômes de sinusite pouvant prêter à confusion avec la mycoplasmoses ont été plus fréquemment notés. Le taux de mortalité était de l'ordre de 10% dans la plupart des cas.

2.2. Analyse phylogénétique

Les séquences nucléotidiques du génome complet de cinq isolats marocains A/chicken/Morocco/SF1/2016, A/chicken/Morocco/SF2/2016, A/chicken/Morocco/SF3/2016, A/chicken/Morocco/SF4/2016 et A/chicken/Morocco/SF5/201 ont été enregistrées dans la base de données «GenBank», sous les numéros d'accès suivants : LT598497, LT598498, LT598499, LT598500 et LT598501. L'analyse phylogénétique des séquences d'acides aminés codés par les gènes HA et NA des ces souches isolées au Maroc, a été effectuée. Les souches marocaines ont montré une grande homologie aux virus représentatifs du lignage G1. Une forte homologie entre 98% et 100% a été constatée entre les cinq virus marocains. Tous les gènes codant pour les différents segments PB1, PB2, PA, NP, M1, M2, NS1, NS2 et PB-F2 ont été classés sous la lignée G1, et présentent une forte homologie avec A/pheasant/United Arab Emirates/D1521/2011-like H9N2.

2.3. Caractérisation moléculaire

Les gènes d'Hémagglutinine (HA) et Neuraminidase (NA).

La glycoprotéine HA des isolats marocains possède, sur le site de clivage HA0, un motif RSSR*GLF, qui classe le virus marocain parmi les virus faiblement pathogènes. D'ailleurs tous les virus H9N2 sont considérés comme faiblement pathogènes. L'analyse révèle la présence de sept sites potentiels de glycosylation avec un site supplémentaire (résidu 82) par rapport aux virus H9N2 égyptiens récemment caractérisés (21) (Tableau 1).

Tous les virus marocains ont présenté des substitutions d'acides aminés dans les sites antigéniques responsables de liaisons aux récepteurs, qui leur confèrent l'attachement aux récepteurs humains (158 N, 183H, 226 L et 391 K(22, 21)).

Caractéristiques des gènes structuraux internes. Trois marqueurs d'adaptation des virus aux mammifères ont été identifiés sur la protéine PB2 : 318R, 590S and 661T (23). En outre, deux mutations liées à la virulence (147V, 504V) ont été constatées chez tous les isolats (Tableau 1).

Au niveau de la protéine PB1, un seul déterminant moléculaire de spécificité de l'hôte (13P) a été détecté, signifiant ainsi la possibilité de transmission du virus à partir des volailles aux humains (23).

Sur la protéine PA, trois mutations liées à la virulence des souches ont été observées (127V, 550L, 672L). Ce résultat corrobore les études publiées par d'autres auteurs (21). Les mutations 409N, 100I et 312R constatées chez les souches marocaines sont considérées comme une adaptation des virus influenza H9N2 d'origine aviaire après leur passage à l'espèce humaine (Shaw et al., 2002).

La substitution de l'acide aminé 372D au niveau de gène NP a été précédemment identifiée comme une importante mutation pour l'atteinte humaine (23).

Toutes les souches marocaines ont présenté au niveau de leur protéine M2, un résidu 10L qui est un marqueur de la lignée G1. En l'occurrence, une substitution de l'acide aminé 31 (S31N) a été observée, ce qui suggère une forte résistance des souches marocaines à l'antiviral l'amantadine (7, 23).

Aucune délétion n'a été notée au niveau des isolats marocains dans la partie C-terminale de NS1 (80–84). En revanche, tous les isolats marocains possèdent les marqueurs de virulence 42S et 189D et le motif GSEV sur la protéine NS1 (tableau 1). La caractérisation moléculaire de la protéine NS2 a révélé la présence de deux mutations : 31 M et 56H qui sont deux déterminants de la virulence des virus d'influenza aviaire faiblement pathogènes.

DISCUSSION

Les données épidémiologiques montrent une très rapide propagation du VIA H9N2 à tous les types de production avicole dans toutes les régions du royaume, fort probablement par le biais des véhicules transportant les volailles vers les marchés de gros, en effet, la commercialisation du poulet vif représente plus de 80% du circuit de commercialisation de poulet de chair. En outre, les véhicules de livraison d'aliment ont probablement joué un rôle non négligeable dans la propagation virale. Ceci révèle que les mesures de biosécurité appliquées dans les élevages industriels avicoles ainsi que le mode de commercialisation sont défaillants et devraient être revus dans les plus brefs

délais, surtout que la situation épidémiologique de IA à l'échelle internationale est préoccupante et que le Maroc n'est pas à l'abri d'une introduction éventuelle d'un autre virus d'influenza aviaire hautement pathogène de type H7 et H5, qui risquerait d'avoir un impact de santé publique beaucoup plus grave. Même si le H9N2 est considéré comme un virus faiblement pathogène, dans les conditions du terrain où plusieurs facteurs concomitants sont présents, les pertes engendrées pourraient être considérables et que malgré la généralisation de la vaccination par l'utilisation des vaccins inactivés dans tous les types de production avicole, la maladie est devenue enzootique dans le pays. Les vaccins ont pu réduire relativement les pertes économiques mais pas la circulation virale. L'analyse moléculaire

du génome complet des virus H9N2 marocains isolés a montré qu'ils appartiennent à la lignée G1 et qu'ils présentent une très forte homologie avec les virus en circulation au Moyen-Orient. Plusieurs mutations signifiant la possibilité de transmission aux humains ont été détectées, par conséquent, une enquête sérologique sur le personnel des abattoirs et des fermes avicoles mérite d'être réalisée. Plusieurs études réalisées en Iran où le virus est enzootique ont révélé une séroprévalence élevée auprès du personnel des abattoirs et des élevages avicoles. Le virus H9N2 est considéré par l'OMS comme un virus pandémique et nécessite la mise en place des programmes de surveillance dans les pays infectés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Khan SU, Anderson BD, Heil GL, Liang S, Gray GC. J Infect Dis. 2015; 212 (4) : 562-9.
2. Chen BL, Zhang Z, Chen WB. Chinese Journal of Veterinary Medicine. 1994 ; 20 : 3-5
3. Dong-Hun L and Chang-Seon S. Clin Exp Vaccine Res. 2013 ; 2 (1) : 26 -33.
4. Nili H and Asasi K. Avian Dis. 2003 ; 47 : 828-31.
5. Naeem K, Ullah A, Manvell RJ, Alexander DJ. Vet Rec. 1999 ; 145 (19) : 560.
6. Perk S, Banet-Noach C, Shihmanter E, Pokamunski S, Pirak M, Lipkind M, et al. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2006 ; 29 (4) : 207-23.
7. Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N, Webster RG.. Virology. 2007 ; 361 (1) : 45-55.
8. Body MH, Alrarawahi AH, Alhubsy SS, Saravanan N, Rajmony S, Mansoor MK. Avian Dis. 2015 ; 59 (2) : 329-34.
9. Monne I, Hussein HA, Fusaro A, Valastro V, Hamoud MM, Khalefa RA, Dardir SN, Radwan MI, Capua I, Cattoli G. Influenza Other Respiratory Viruses. 2013; 7 (3) : 240-3.
10. Kammon A, Heidari A, Dayhum A, Eldaghayes I, Sharif M, Monne I, et al. Avian Dis. 2015; 59 (3) : 422-30.
11. Seifi S, Asasi K, Mohammadi A. Iranian. J. Vet. Res. 2012 ; 13 (2) : 138-142.
12. Azizpour A, Goudarzi H , Charkhkar S , Momayez R, Hablolvarid MH. The Journal of Animal & Plant Sciences. 2014 ; 24 (6) : 1655-1662.
13. Iqbal M, Yaqub T, Mukhtar N, Shabbir MZ, McCauley JW. Vet Res. 2013 ; 44 : 100.
14. Zhang K, Zhang Z, Yu Z, Li L, Cheng K, Wang T, et al. Virus research. 2013 ; 175 : 52-57.
15. Phipps LP, Essen SC, Brown IH. Veterinary Microbiology. 2015; 178 : 144 -149.
16. Watanabe T , Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, et al., Nature. 2013; 501: 551-555.
17. EL Houadfi M, Fellahi S, Nassik S, Guérin JL and Ducatez MF. Virology Journal. 2016; 13:140-147
18. Hoffmann E, Stech J, Gyan Y, Webster R.G. and Perez D.R. ,Arch Virol (2001) 146: 2275-2289
19. Hall TA. Nucleic Acids Symp. Ser. 1999; 95-98.
20. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. Mol Biol Evol. 2013; 30 : 2725-9.
21. Kandeil A, El-Shesheny R, Maatouq AM, Moatasim Y, Shehata MM, Bagato O, et al. Arch Virol. 2014; 159 : 2861-76.
22. Wanzeck K, Boyd KL, McCullers JA. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:767-73.
23. Wernery U, Shanmuganatham KK, Krylov PS, Joseph S, Friedman K, Krauss S, Webster RG. Influenza Other Respiratory Viruses. 2013 ;7 : 1241-1245
24. Shaw M.W, Xu X, Li Y, Normand S, Ueki R.T, Kunimoto R.Y, Hall H, Klimov A, Cox N. j and Subbarao K , Virology . 2002 ; 303 : 1-8
25. Tombari W, Nsiri J, Larbi I, Guérin JL and Gram A. Virology Journal. 2011 ; 8 : 467

Tableau 1. Caractérisation de déterminants moléculaires de la virulence, de la spécificité de l'hôte et de la résistance à l'amantadine des isolats marocains H9N2

Protéines	Déterminants moléculaires de la virulence	Déterminants moléculaires de l'adaptation aux mammifères)	Déterminants moléculaires de la résistance à l'amantadine	Autres éléments
PB2	147V, 504V	318R, 590S, 661T		
PB1		13P		
PB1-F2	66N	82L		protéine tronquée de 52 aa
PA	127V, L550, 672L	I100, R312, 409N		
PA-X				Longueur de 252 acides aminés
HA*		158N, 183H, 226L, 391K		Site de clivage: RSSR*GLF Sites de glycosylation: 29NSTE, 82NPSC, 105NGTC, 141NVTY, 298 NSTM, 305NISK, 492NGTY
NP		372D		
NA			Non	
M1		15I		
M2		D16	31N (résistance à l'amantadine)	
NS1	42S, 189D			Absence de délétion 80-84 et motif GSEV PL
NS2	31M, 56H			