



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 15570

**To cite this version :**

Grard, Florian. *Variole aviaire chez l'Outarde houbara (Chlamydotis undulata) : étude d'une souche d'avipoxvirus*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 140 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# VARIOLE AVIAIRE CHEZ L'OUTARDE HOUBARA (*Chlamydotis undulata*) : ETUDE D'UNE SOUCHE D'AVIPOXVIRUS

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**GRARD Florian**

Né, le 15 avril 1987 à Arras(62)

---

**Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Christophe PASQUIER**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

**M. Stéphane BERTAGNOLI**

**Mme Christelle CAMUS-BOUCLAINVILLE**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt**  
**ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directrice** : **Madame Isabelle CHMITELIN**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

#### **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

#### **MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### **MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*

#### **ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- M. **TANIS Jean-Benoît**, *Anatomie – Imagerie Médicale*



## **Remerciements**

### **A Monsieur Christophe PASQUIER**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Doyen de la faculté des sciences pharmaceutiques

Virologie – Maladies infectieuses

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse*

*Remerciements et hommages respectueux*

### **A Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie – Maladies infectieuses

*Pour m'avoir guidé dans l'élaboration de cette thèse, et pour m'avoir permis de la mener à bien.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma plus vive gratitude et de mon profond respect*

### **A Madame le Docteur Christelle CAMUS-BOUCLAINVILLE**

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie et génétique moléculaire

*Pour avoir accepté d'être l'assesseur de ma thèse.*

*Veillez accepter ici le témoignage de mon profond respect.*

Je remercie également les bailleurs de fond des programmes de conservation d'Outardes houbara, son Altesse **Cheikh Mohamed BIN ZAYED AL NAHYAN**, Prince Héritier d'Abou Dhabi et président de l'International Fund for Houbara Conservation (IFHC), son Excellence **Mohammed AL BOWARDI** vice-président de l'IFHC. Je remercie également **Jacques RENAUD**, fondateur de RENEKO.

Merci à **Frédéric LACROIX** directeur exécutif de RENEKO et **Gwen LEVEQUE**, directrice de l'ECWP, qui ont accepté de m'accueillir au sein de l'ECWP afin de réaliser les infections expérimentales, points clefs de cette thèse.

Merci à **Stéphane BERTAGNOLI** d'avoir accepté d'encadrer et de diriger cette thèse pendant trois ans et demi. Merci de m'avoir accueilli au sein de l'équipe du labo comme l'un des votre, merci pour votre bonne humeur constante, votre enthousiasme et votre disponibilité et pour tout le temps que vous m'avez consacré.

Merci à **Guillaume LE LOC'H** pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, pour m'avoir tout de suite mis à l'aise, et pour m'avoir montré comment faire des migrations à l'envers (de bas en haut, c'est vachement plus logique !)

Merci également à **Jean-Luc GUERIN** qui m'a accueilli au sein de cette équipe et qui a toujours accepté d'éteindre le thermocycleur pour moi quand je lançais des PCR à 18h...

Merci à **Maxence DELVERDIER** pour les analyses histologiques des lésions.

Merci à **Guillaume CROVILLE** pour m'avoir aidé en toute circonstance, pour m'avoir appris énormément et pour ta patience.

Merci à **Aurélie LE LOC'H**, **Delphine JOUVE**, **Imane SMAÏNI**, **Hassan CHADLI**, **Mohamed IDENDEL**, et **Mohamed TANGARFI**, pour avoir fait partie intégrante des manipulations de thèse au Maroc, pour leur disponibilité et leur gentillesse, et pour m'avoir accueilli chez eux.

## Table des Matières

REMERCIEMENTS .....	7
TABLE DES MATIERES .....	13
LISTE DES FIGURES .....	15
LISTE DES TABLEAUX .....	17
LISTE DES ABREVIATIONS .....	18
<b>CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :</b> .....	<b>20</b>
A. LES AVIPOXVIRUS .....	20
1. <i>Structure et caractéristiques</i> .....	20
2. <i>Taxonomie, évolution et phylogénie</i> .....	26
3. <i>Variole aviaire</i> .....	31
Épidémiologie.....	31
Clinique .....	36
B. L'OUTARDE HOUBARA.....	42
1. <i>Taxonomie et distribution</i> .....	42
2. <i>Biologie</i> .....	42
3. <i>Conservation</i> .....	44
4. <i>Élevage</i> .....	48
5. <i>Gestion sanitaire</i> .....	52
Épidémiosurveillance.....	53
Prophylaxie.....	54
6. <i>Variole aviaire et Outarde houbara</i> .....	54
C. OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	60
<b>CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE :</b> .....	<b>64</b>
A. EXTRACTION DU VIRUS, AMPLIFICATION VIRALE ET CINETIQUE DE CROISSANCE .....	64
1. <i>Contexte, problématique et objectifs</i> .....	64
2. <i>Matériel et méthodes</i> .....	64
Choix des souches virales .....	64
(a) Travaux de laboratoire : .....	64
(b) Infection expérimentale : .....	69
Extraction du virus à partir de lésions de variole aviaire .....	70
Amplification virale.....	71
(a) Inoculation virale .....	72
(b) Récolte et traitement des récoltes.....	72
(c) Passage au dounce .....	73
Mise en place d'un outil d'étude de la cinétique de croissance virale : la PCR quantitative : .....	74
Cinétique de croissance.....	75
(a) Première série de cinétique : CPV-V, APV1 et APV7 sur QT6 et GKT.....	75
(b) Seconde série de cinétique : CPV-V, APV7, APV24, APV64, APV66 et APV87 sur QT6 et CEF.....	76
3. <i>Résultats</i> .....	76
Amplification virale.....	76
Outil d'étude de la cinétique de croissance : PCRq .....	79
(a) Première série de cinétique .....	79
(b) Seconde série de cinétique .....	79
Cinétique d'amplification virale par PCRq.....	80
(a) Première série de cinétique : CPV-V, APV1 et APV7 sur QT6 et GKT.....	80
(b) Seconde série de cinétique : CPV-V, APV7, APV24, APV64 et APV87 sur QT6 et CEF .....	82

B.	CHOIX DE LA SOUCHE VIRALE ET PREPARATION D'UN INOCULUM POUR L'INFECTION EXPERIMENTALE	88
1.	<i>Choix de la souche virale pour l'infection expérimentale</i> .....	88
2.	<i>Semi-purification du virus d'épreuve et préparation des broyats</i> .....	89
	Matériel et Méthodes.....	89
	Résultats.....	90
C.	INFECTION EXPERIMENTALE.....	91
1.	<i>Contexte</i> .....	91
2.	<i>Problématique et objectifs</i> .....	92
3.	<i>Démarche expérimentale</i> .....	93
	Choix des oiseaux.....	93
	Choix du mode opératoire.....	94
	Matériel et méthodes.....	94
	(a) Oiseaux et infections.....	94
	(b) Suivi des oiseaux.....	95
	(c) PCR quantitative.....	96
	(d) Hématologie et électrophorèse des protéines plasmatiques.....	96
	(e) Histologie.....	97
	(f) Analyses statistiques.....	97
4.	<i>Résultats</i> .....	97
	Infections avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale.....	97
	(a) Expression clinique.....	97
	(b) Virémie.....	100
	(c) Analyses moléculaires et histologiques des lésions.....	100
	Infections avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion.....	101
	(a) Expression clinique.....	101
	(b) Poids et consommations d'aliments.....	103
	(c) Paramètres hématologiques.....	103
	(d) Analyses moléculaires et histologiques des lésions.....	103
5.	<i>Conclusion</i> .....	104
D.	ESSAI DE MISE AU POINT D'UN TEST SEROLOGIQUE DE TYPE IMMUNOPEROXYDASE.....	106
1.	<i>Contexte</i> .....	106
2.	<i>Matériel et méthodes</i> .....	106
	i. Travail préliminaire.....	106
	ii. Réaction d'immunopéroxydase sur CPV-V.....	107
3.	<i>Résultats</i> :.....	110
<b>CHAPITRE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>111</b>
A.	ISOLEMENT ET TRAITEMENT <i>IN VITRO</i> .....	111
B.	CINETIQUES D'AMPLIFICATION VIRALE SUR CELLULES AVIAIRE <i>IN VITRO</i> :.....	112
C.	CHOIX DE LA SOUCHE VIRALE POUR L'INFECTION EXPERIMENTALE :.....	114
D.	SEMI-PURIFICATION :.....	114
E.	INFECTIONS EXPERIMENTALES.....	115
1.	<i>Reproduction de la maladie</i> .....	115
2.	<i>Expression clinique et modifications physiologiques</i> .....	117
F.	TESTS SEROLOGIQUES : APPROCHE DE LA METHODE.....	121
G.	APPLICATIONS SUR LE TERRAIN.....	124
H.	CONCLUSION.....	126
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>128</b>

## Liste des Figures

FIGURE 1. REPRESENTATION DES DEUX FORMES DE PARTICULES VIRALES MATURES DES POXVIRUS. ©SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS.....	21
FIGURE 2. GENOMES DES CINQ AVIPOXVIRUS SEQUENCES, D'APRES OFFERMAN <i>ET AL.</i> 2014 (11).....	23
FIGURE 3. CYCLE DE REPLICATION DU VIRUS DE LA VACCINE, D'APRES MOSS 2013 (4).....	25
FIGURE 4. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES CHORDOPOXVIRUS CONSTRUIT A PARTIR DES SEQUENCES EN ACIDES AMINES DE 17 PROTEINES CONSERVEES, D'APRES GUBSER <i>ET AL.</i> 2004 (15).....	27
FIGURE 5. PHYLOGENIE DES AVIPOXVIRUS CONSTRuite A PARTIR DU LOCUS P4B, D'APRES GYURANECZ <i>ET AL.</i> 2013 (2).....	29
FIGURE 6. LESIONS DE VARIOLE AVIAIRE : FORMES CUTANEEES (1 ET 2) ET DIPHTERIQUE (3), CELLULES BALLONISEES CONTENANT DES INCLUSIONS INTRACYTOPLASMIQUES EOSINOPHILES CARACTERISTIQUES (4), D'APRES FRIEND <i>ET AL.</i> 1999 (105) ET TRIPATHY <i>ET AL.</i> 2013 (20).....	38
FIGURE 7. OUTARDE HOUBARA NORD-AFRICAINNE ( <i>C. UNDULATA</i> ) A GAUCHE ET OUTARDE HOUBARA ASIATIQUE ( <i>C. MACQUEENII</i> ) A DROITE. © IFHC.....	42
FIGURE 8. AIRES DE REPARTITION DES DEUX ESPECES D'OUTARDE HOUBARA ET DISTRIBUTION DES PROJETS DE CONSERVATION ETUDIES.....	47
FIGURE 9. PHOTO AERIENNE DU SITE D'ENJIL, A L'ECWP, AU MAROC. ©ECWP.....	49
FIGURE 10. CAGES DE REPRODUCTEURS EN EXTERIEUR (1) ET EN BATIMENT (2), BATTERIES DE REPRODUCTEURS (3), VOLIERES POUR LA PREPARATION DES OISEAUX AU RELACHER (4). ©ECWP ET IFHC.....	50
FIGURE 11: ARBRE PHYLOGENETIQUE DES AVIPOXVIRUS CONSTRUIT SUIVANT UNE DISCRIMINATION PAR LE GENE P4B .....	66
FIGURE 12: ARBRE PHYLOGENETIQUE DES AVIPOXVIRUS CONSTRUIT SUIVANT UNE DISCRIMINATION PAR LE GENE FPV140 .....	68
FIGURE 13: LESIONS DE VARIOLE AVIAIRE CHEZ DES OUTARDES HOUBARA. PETITE LESION CUTANEE A L'ANGLE DE LA BOUCHE (A), SUR LA PAUPIERE (B) ET LA PATTE (C), GROSSE LESION CUTANEE SUR UNE PATTE (D) ET LESION DIPHTERIQUE SUR LES MUQUEUSES DE LA CAVITE BUCCALE (E).....	70
FIGURE 14: CUPULE AVANT INOCULATION PAR CPV-V (GAUCHE) ET PRESENTANT DES ECP (DROITE) PLUSIEURS JOURS POST-INOCULATION, VU AU MICROSCOPE, GROSSISSEMENT X10 .....	73
FIGURE 15. COURBES D'AMPLIFICATION DE LA GAMME DE LA PCR QUANTITATIVE CIBLANT UNE SEQUENCE DE L'ORF <i>CNPV185</i> DES VIRUS DU SOUS-CLADE B2. ....	79
FIGURE 16: COURBES D'AMPLIFICATION DE LA GAMME DE LA PCR QUANTITATIVE CIBLANT UNE SEQUENCE DE L'ORF <i>FPV167</i> DES AVIPOXVIRUS. CHAQUE ECHANTILLON A ETE PASSE EN DUPLICATA. ....	80
FIGURE 17: NOMBRE DE COPIES GENOME DANS LES SURNAGEANTS DE CULTURE EN FONCTION DU TEMPS PAR AMPLIFICATION SUR TAPIS CELLULAIRE IN VITRO. ....	81
FIGURE 18: NOMBRE DE COPIE GENOME EN FONCTION DU TEMPS APRES INOCULATION D'UN TAPIS CELLULAIRE DE QT6 PAR DEUX VIRUS. ....	82
FIGURE 19: NOMBRE DE COPIES GENOME DE CPV-V EN FONCTION DU TEMPS APRES INOCULATION D'UN TAPIS CELLULAIRE DE CEF. ....	84
FIGURE 20: NOMBRE DE COPIES GENOME DE CPV-V EN FONCTION DU TEMPS APRES INOCULATION D'UN TAPIS CELLULAIRE DE QT6.....	85

FIGURE 21: NOMBRE DE COPIES GENOME DE APV7 EN FONCTION DU TEMPS APRES INOCULATION D'UN TAPIS CELLULAIRE DE QT6.....	86
FIGURE 22: NOMBRE DE COPIES GENOME DE APV7 EN FONCTION DU TEMPS APRES INOCULATION D'UN TAPIS CELLULAIRE DE CEF.....	87
FIGURE 23. DISTRIBUTION DES TEMPS D'INCUBATION POUR CHAQUE PATTE.....	99
FIGURE 24. LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UNE SEMI-PURIFICATION VIRALE.....	100
FIGURE 25. ÉVOLUTION D'UNE LESION EXPERIMENTALE DEPUIS LE STADE DE PAPULE JUSQU'AU STADE DE MASSE CROUTEUSE.....	102
FIGURE 26. EXAMEN HISTOLOGIQUE DES LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UN BROYAT DE LESION.....	104
FIGURE 27: REACTION D'IMMUNOPEROXYDASE SUR UNE P6 RK13 INFECTEE AVEC UN VIRUS DE LA MYXOMATOSE.....	106
FIGURE 28: REACTION D'IMMUNOPEROXYDASE SUR P24 QT6 INFECTEES AVEC CPV-V.....	109

## Liste des Tableaux

TABLEAU 1. CARACTERISTIQUES DES ELEVAGES CONSERVATOIRES D'OUTARDES HOUBARA.....	48
TABLEAU 2. SYNTHESE DES PRINCIPAUX EPISODES PUBLIES DE VARIOLE AVIAIRE SUR DES OUTARDES HOUBARA. .....	56
TABLEAU 3: RESUME DES CARACTERISTIQUES DES VIRUS ETUDIES .....	69
TABLEAU 4: AMORCES UTILISEES POUR LES PCRQ DE CHAQUE SOUCHE VIRALE ETUDIEE. ....	76
TABLEAU 5: DELAIS MOYENS D'APPARITION EN JOURS DES ECP POUR DIFFERENTES SOUCHES VIRALES ET SUR DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES .....	78
TABLEAU 6. ANALYSES REALISEES A PARTIR DES PRELEVEMENTS SANGUINS LORS DES DEUX SERIES D'INFECTIONS EXPERIMENTALES.....	96
TABLEAU 7. LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UNE SEMI-PURIFICATION VIRALE. ....	98
TABLEAU 8. LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UN BROyat DE LESION. ....	102

## Liste des abréviations

Ac : Anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

CAM : membrane chorio-allantoïdienne

CEF : Chick Embryo Fibroblast

CITES : Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction

CNPV : canarypox virus

DEF : Duck Embryo Fibroblast

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EAU : Émirats Arabes Unis

ECCH : Emirates Centre for Houbara Conservation

ECWP : Emirates Center for Wildlife Propagation

EID50 : fifty percent embryo infective dose

ELISA: Enzyme linked immuno assay

EV : particule virale enveloppée

FWPV : fowlpox virus

GKT : Goose Kidney Toulouse

ICTV : Comité International sur la Taxonomie des virus

IFI : Immunofluorescence indirecte

IgY : Immunoglobulines Y

ITR : séquences répétées inversées terminales

kDa : kilo Dalton

kpb : kilo paires de bases

MOI : Multiplicity of infection

MV : particule virale mature

NARC : National Avian Research Center

ORF : cadre ouvert de lecture (open reading frame)

pb : paires de bases

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PFU : plaque-forming unit / pock forming-unit

PSPV : psittacinepox virus

QT6 : Quail Tumor line 6

REV : rétrovirus de la réticuloendothéliose

RIA : Radioimmunoassay

RT-PCRq : Réaction de polymérisation en chaine quantitative et en temps réel (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction)

SKHBC-AD : Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center aux Émirats Arabes Unis

SKHBC-KZ : Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center au Kazakhstan

SVF : Sang de veau foetal

UICN : Union internationale pour la conservation de la nature

## Chapitre I : Partie bibliographique :

### A. Les avipoxvirus

Les avipoxvirus sont classés dans la famille des *Poxviridae*, la sous-famille des *Chordopoxvirinae* et le genre *Avipoxvirus*. Sur la base des données génétiques disponibles, les avipoxvirus se positionnent dans trois clades : les fowlpox-like virus (FWPV-like, clade A), les canarypox-like virus (CNPV-like, clade B) et les psittacinepox-like virus (PSPV-like, clade C) (1–3).

#### 1. Structure et caractéristiques

Les poxvirus sont des virus enveloppés à ADN. Ils sont parmi les plus gros virus connus et possèdent une morphologie complexe, visible en microscopie électronique (virion enveloppé en forme de brique). Mesurant environ 330 x 280 x 200 nm, la particule virale mature (MV : mature virion) des avipoxvirus est constituée d'un core dense et biconcave adossé à deux corps latéraux logés dans les concavités (4) et entouré d'une enveloppe constituée de divers lipides et de nombreuses protéines (virales et cellulaires) ; à titre d'exemple, l'enveloppe du MV du virus de la vaccine contient au moins 22 protéines différentes (5). La particule virale peut acquérir une seconde enveloppe à partir du compartiment membranaire intracellulaire, avant d'être expulsée de la cellule (6). Elle est alors appelée particule virale enveloppée (EV : enveloped virion) (Figure 1). Les protéines structurales des avipoxvirus ont majoritairement été identifiées par homologie de séquence avec le génome du virus de la vaccine. Jusqu'à 31 protéines structurales ont ainsi été identifiées. Des travaux ont également permis, soit par purification virale et électrophorèse en gel de polyacrylamide (7), soit par production et utilisation d'anticorps monoclonaux (8), d'identifier certaines protéines structurales des avipoxvirus, notamment une protéine immunodominante de 35 kDa impliquée dans l'attachement du MV à la cellule et codée par le gène *FPV140* chez les virus FWPV-like et le gène *CNPV186* chez les virus CNPV-like<sup>1</sup>. Le génome des poxvirus est niché dans le core, complexé avec des protéines. Formé d'un double brin d'ADN linéaire, il est constitué d'une région génomique centrale entourée par deux régions

---

<sup>1</sup> Dans la suite du manuscrit, les gènes commençant par FPV désignent les gènes des virus FWPV-like et ceux commençant par CNPV, les gènes des virus CNPV-like.

identiques de séquences répétées inversées terminales (ITR) qui forment des structures en épingle à cheveux à chacune de ses extrémités.

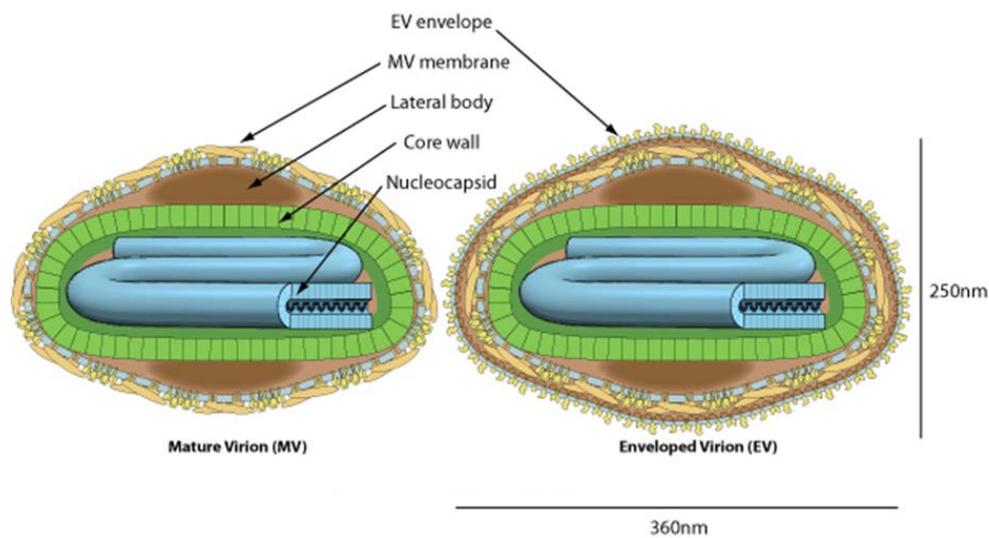


Figure 1. Représentation des deux formes de particules virales matures des poxvirus. ©Swiss Institute of Bioinformatics

Les avipoxvirus sont les poxvirus qui possèdent les plus gros génomes, avec toutefois une grande variabilité puisque leurs génomes mesurent de 266 kpb à 365 kpb avec 244 à 328 cadres ouverts de lecture (ORF) (9–12). Seuls cinq génomes complets d'avipoxvirus sont actuellement publiés. Quatre sont des virus FWPV-like : une souche pathogène de fowlpox virus (FPVUS) (9), une souche de fowlpox virus atténuée sur fibroblastes embryonnaires de poulet (FP9)(12), une souche virulente isolée sur un pigeon biset domestique (*Columba livia*) (FeP2) et une souche virulente isolée sur un manchot du Cap (*Spheniscus demersus*) (PEPV)(11). Le génome complet d'un seul virus CNPV-like est publié, celui d'une souche pathogène de canarypox virus (CNPVATCC VR-111) (10). Parmi les génomes de ces cinq avipoxvirus, 179 gènes conservés sont systématiquement retrouvés (11), alors que 90 seulement le sont parmi les *Chordopoxvirinae* et 49 seulement parmi tous les poxvirus (13) (Figure 2). Les gènes conservés, indispensables aux fonctions virales de base telles que la réplication, la transcription ou l'assemblage de la particule virale, sont localisés dans la partie centrale du génome et les gènes codant pour les facteurs de pathogénicité et de spectre d'hôte sont situés vers les extrémités du génome (14,15) Classiquement, chez les poxvirus, la région centrale est ainsi relativement conservée alors que les parties distales sont plus variables, ceci a notamment bien été montré chez les virus du genre *Orthopoxvirus* (sous-famille des *Chordopoxvirinae*) (13,15). Chez les avipoxvirus cependant, trois

parties centrales du génome présentent de profonds remaniements avec des inversions, transpositions et délétions de groupes de gènes impliqués dans l'interaction virus-hôte (10,15), cela même entre virus d'un unique clade (11). Ainsi, au sein des virus FWPV-like, le génome de FeP2 présente une délétion de 16 kpb par rapport à celui de FVPUS. Une seconde particularité du génome des avipoxvirus, et qui peut expliquer leur grande taille, est l'existence de dix familles de gènes<sup>2</sup> qui représentent jusqu'à 49% du génome chez CNPVATCC VR-111 (38% chez FVPUS) (10). Il s'agit notamment de gènes codant pour des protéines à répétitions ankyrine (31 à 51 copies chez les virus non atténués), de gènes orthologues des gènes codant pour la protéine N1R du virus du fibrome de Shope ou pour la protéines p28 de l'Ectromelia virus (gène Serpin ; 8 à 26 copies), et de gènes orthologues du gène du virus de la vaccine codant pour la protéine B22R (4 à 6 copies) (11). La perte de gènes codant pour les protéines à répétitions ankyrine jouerait un rôle dans l'atténuation des virus comme cela a été montré chez le fowlpox virus de la souche FP9 qui, après 438 passages sur fibroblastes embryonnaires de poulets, ne possède plus que 22 de ces gènes contre 31 chez la souche pathogène FVPUS (12). Les fowlpox virus ont la particularité de pouvoir intégrer dans leur génome des séquences complètes du rétrovirus de la réticuloendothéliose (REV) (16). Cette intégration semble ancienne et elle n'est pas retrouvée chez les avipoxvirus des autres clades, ni chez tous les virus FWPV-like (17,18). On l'observe dans les génomes de virus pathogènes alors que seules des séquences incomplètes de REV, correspondant aux répétitions terminales longues du génome rétroviral, sont retrouvées dans les souches vaccinales (17). Ces observations suggèrent un rôle de ces séquences rétrovirales dans la pathogénicité des virus, notamment à travers le développement d'une immunosuppression chez l'hôte (19). L'origine de cette intégration n'est pas connue, mais on suppose qu'elle s'est faite par échange de matériel génétique à l'occasion de coïnfections. Il a en effet aussi été trouvé dans le génome d'un fowlpox virus une ORF codant pour une protéine similaire à une protéine codée par le virus de la maladie de Marek<sup>3</sup> et, à l'inverse, des homologues d'ORF de fowlpox virus ont été retrouvés dans les génomes de virus de la maladie de Marek (20).

---

<sup>2</sup> On appelle famille de gènes un ensemble de gènes qui se sont formés par duplications successives depuis un gène ancestral unique.

<sup>3</sup> Le virus de la maladie de Marek est un herpesvirus du genre *Mardivirus*.

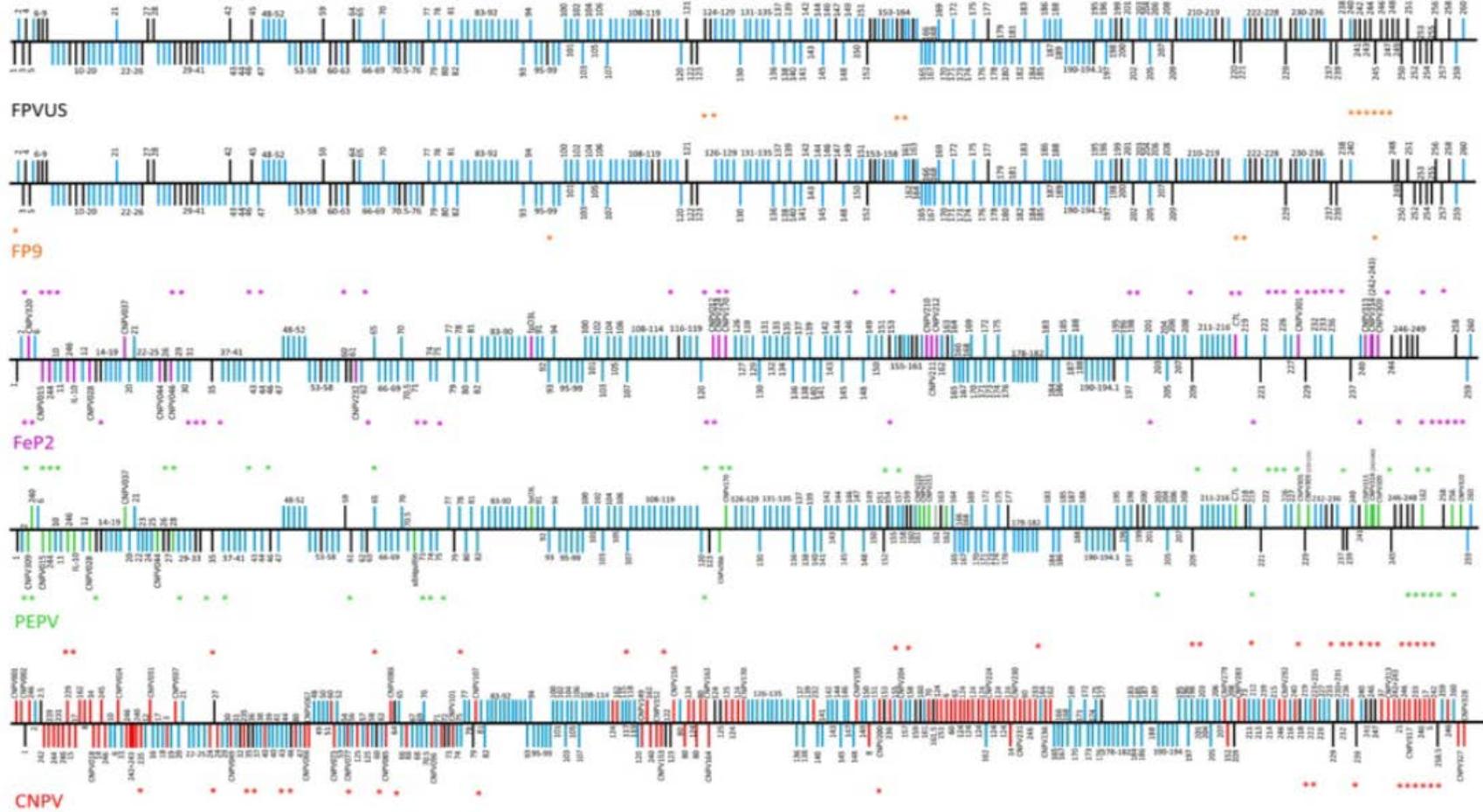


Figure 2. Génomes des cinq avipoxvirus séquencés, d'après Offerman *et al.* 2014 (11).

Le génome du virus FPVUS sert de référence. Pour chaque génome, les barres verticales orientées vers le haut représentent les gènes transcrits vers la droite, celles orientées vers le bas, les gènes transcrits vers la gauche. Les gènes partagés par les cinq génomes sont en bleu et ceux partagés par au moins deux génomes sont en noir. Les différences pour chaque génome par rapport à FPVUS sont de la couleur du nom du génome et un astérisque montre les délétions par rapport à FPVUS.

La réplication des poxvirus est originale dans le fait que la synthèse et l'encapsidation de l'ADN sont cytoplasmiques et utilisent par conséquent un grand nombre de protéines d'origine virale. Les différentes phases de la réplication des avipoxvirus sont très similaires à celles des autres poxvirus (4), quel que soit le type cellulaire aviaire (18) (Figure 3). La première étape d'absorption, de fusion des enveloppes virales avec la membrane cytoplasmique et d'internalisation de la nucléocapside se produit une heure post-infection lors d'infection de l'épithélium cutané, et deux heures post-infection s'il s'agit d'infection de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM). La décapsidation commence alors et s'accompagne de la transcription des gènes précoces grâce à des enzymes et des facteurs de transcriptions contenus dans la nucléocapside. Avec la fin de la décapsidation, débutent la réplication de l'ADN et l'expression des gènes intermédiaires puis tardifs, permettant ainsi la production de l'ensemble des protéines structurales et le début de l'assemblage des particules virales (21). La visualisation des premières particules immatures est possible environ 12 heures post-infection dans les usines virales de la cellule. Ces usines grossissent à partir de 16 heures post-infection et davantage de particules virales immatures y sont visibles. Cependant peu de particules matures sont visibles avant 47 heures post-infection. L'accumulation de ces particules matures près de la membrane cytoplasmique permet la visualisation au microscope d'inclusions intracytoplasmiques éosinophiles typiques (appelées également corps de Bollinger), dès 72 heures post-infection lors d'infection de l'épithélium cutané, et dès 96 heures post-infection lors d'infection de CAM. Les formes EV acquièrent une enveloppe supplémentaire et sont expulsées hors de la cellule en premier (6). Le virus peut également sortir de la cellule sous forme de MV, ayant la capacité à infecter d'autres cellules, lors de lyse cellulaire (21). Plus généralement, la production virale suit deux étapes : une hyperplasie cellulaire durant les 72 premières heures de l'infection puis une seconde phase qui commence vers 60 heures post-infection et durant laquelle la synthèse d'ADN viral et la production de particules virales matures augmentent nettement.

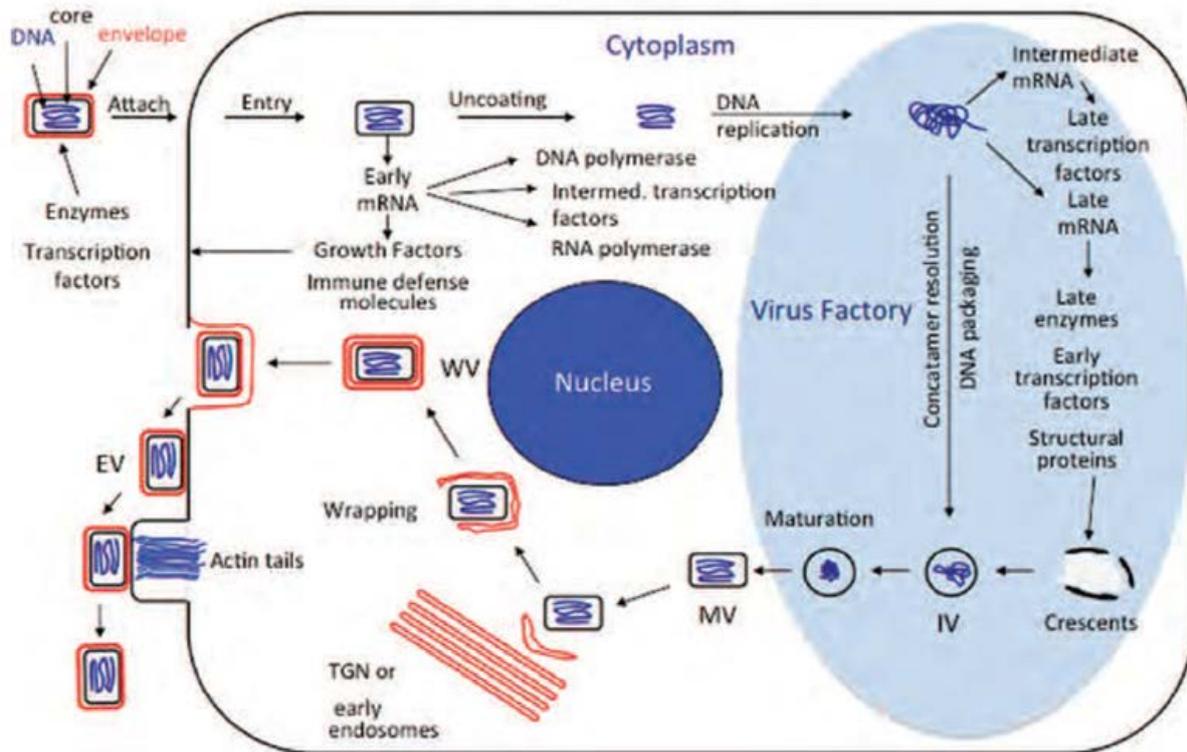


Figure 3. Cycle de répllication du virus de la vaccine, d'après Moss 2013 (4).

Le cycle de répllication des avipoxvirus est très proche de celui du virus de la vaccine. Abréviations utilisées : EV, enveloped virion ; IV, immature virion ; MV, mature virion ; WV, wrapped virion.

Les avipoxvirus se répliquent généralement bien sur différents types de cellules aviaires primaires : fibroblastes embryonnaires de poulet, de canard, cellules rénales de poulet (...), et aux moins deux lignées cellulaires immortalisées permettent la croissance de certains avipoxvirus : une lignée cellulaire de caille (QT35) et une lignée cellulaire tumorale hépatique de poulet (LMH) (20,22). Il est parfois nécessaire de réaliser une adaptation du virus par plusieurs passages sur cellules avant d'observer des effets cytopathiques. Certains auteurs notent cependant que certaines souches issues d'oiseaux sauvages échouent à croître sur cellules, malgré des passages répétés (23–25). De nombreuses lignées cellulaires de mammifères ont également été testées avec différents avipoxvirus et, à de rares exception près (26), aucune croissance virale n'y est observée (21,27). Les avipoxvirus sont capables d'initier leur cycle de répllication en pénétrant dans la cellule mammifère, initiant la transcription de gènes et la répllication de l'ADN viral, mais les particules virales sont incapables de devenir matures et donc de quitter la cellule sous une forme compétente (21). Le cycle incomplet des avipoxvirus dans la très grande majorité des cellules de mammifères, leur capacité à intégrer des gènes étrangers et l'absence à priori d'immunité préalable chez les mammifères en font

des outils particulièrement intéressants pour le développement de vaccins vectorisés chez les mammifères, notamment l'homme, mais également chez les oiseaux (20,28,29).

## 2. Taxonomie, évolution et phylogénie

La famille des *Poxviridae* comprend deux sous-familles, celle des *Chordopoxvirinae* qui regroupent les poxvirus infectant les vertébrés et celle des *Entomopoxvirinae* dont les représentants infectent les insectes. De nombreuses études ont analysé les relations entre poxvirus et ont essayé de définir leur taxonomie. Le nombre croissant de génomes complets disponibles (les génomes de 25 à 29 espèces de poxvirus sont totalement séquencés et, pour certaines espèces, des génomes de plusieurs souches sont disponibles) a permis d'affiner ces analyses et les différentes approches utilisées ont fourni des classifications relativement similaires (Figure 4) (14,15,30,31). Parmi les *Chordopoxvirinae*, dix genres sont actuellement identifiés : *Orthopoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Crocodylipoxvirus* et *Avipoxvirus* (31). Le genre *Orthopoxvirus* est d'importance majeure en santé humaine puisque qu'il comprend le virus de la variole et celui de la vaccine. L'évolution générale des poxvirus reste sujette à discussion. Une étude a montré que l'ensemble des poxvirus aurait divergé d'un ancêtre commun il y a environ 500000 ans et que le genre *Orthopoxvirus* aurait émergé il y a 300000 ans, donnant naissance aux espèces actuelles il y a 14000 ans et ce à un taux de substitutions par site et par an de 0,9 à  $1,2 \times 10^{-6}$  (32). Les évolutions des virus de la variole et de la myxomatose, un leporipoxvirus, ont davantage été étudiées et les vitesses d'évolution sont étonnamment rapides pour des virus à ADN double-brin, avec des taux estimés  $10^{-5}$  substitutions par site et par an (33,34). Chez les orthopoxvirus au moins, l'évolution et la spéciation se seraient faites par pertes de gènes à partir d'un ancêtre commun (35,36).

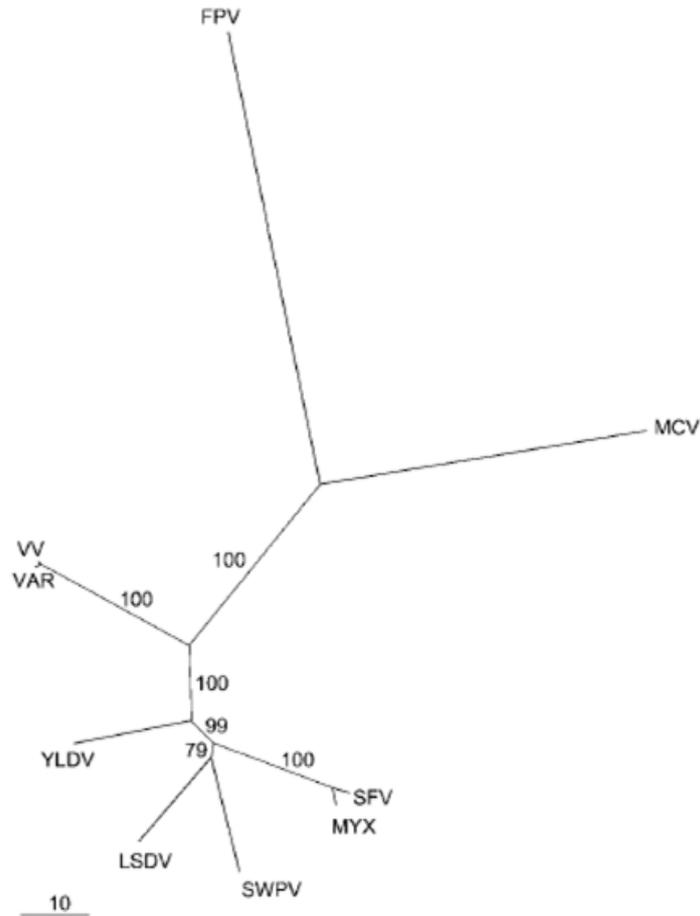


Figure 4. Arbre phylogénétique des chordopoxvirus construit à partir des séquences en acides aminés de 17 protéines conservées, d'après Gubser *et al.* 2004 (15).

Abréviations utilisées : VV, *Vaccinia virus* ; VAR, *Variola virus* ; YLDV, *Yaba-like disease virus* ; LSDV, *Lumpy skin disease virus* ; SWPV, *Swinepox virus* ; MYX, *Myxoma virus* ; SFV, *Shope fibroma virus* ; MCV, *Molluscum contagiosum virus* ; FPV, *Fowlpox virus*. Les genres représentés sont les suivants : *Orthopoxvirus* (VV et VAR), *Yatapoxvirus* (YLDV), *Leporipoxvirus* (MYX et SFV), *Capripoxvirus* (LSDV), *Suipoxvirus* (SWPV), *Molluscipoxvirus* (MCV) et *Avipoxvirus* (FPV). Les genres *Cervidpoxvirus*, *Parapoxvirus* et *Crocodylipoxvirus* ne sont pas représentés.

Dans le genre *Avipoxvirus*, dix espèces sont actuellement reconnues par le Comité International sur la Taxonomie des virus (ICTV) (37) : *Canarypox virus*, *Fowlpox virus* (espèce type du genre), *Juncopox virus*, *Mynahpox virus*, *Pigeonpox virus*, *Psittacinpox virus*, *Quailpox virus*, *Sparrowpox virus*, *Starlingpox virus* et *Turkeypox virus*. Elles ont été définies à partir de critères phénotypiques et génétiques longtemps utilisés pour distinguer les différents avipoxvirus : espèces hôtes et protections croisées, caractéristiques pathologiques sur l'hôte et de croissance sur CAM et cellules aviaires, et profils de restriction du génome (38–40). Malgré cela, la démarcation entre espèces reste floue et la description de toujours plus d'avipoxvirus implique une révision de ces critères (28). Depuis une dizaine d'année, l'application d'outils de génotypage à l'identification des avipoxvirus a permis de commencer à construire la phylogénie de ces

virus. L'utilisation d'une séquence d'environ 578 nucléotides du gène *FPV167/CNPV240*, orthologue du gène *A3L* du virus de la vaccine et qui code pour la protéine de nucléocapside 4b (appelé P4b dans le reste du manuscrit), est actuellement considérée comme l'outil de référence pour identifier et caractériser un avipoxvirus (1-3,41-43). Ce gène présente l'avantage d'être bien conservé parmi les avipoxvirus (83% d'identité entre les séquences en acides aminés de FPVUS et CNPVATCC VR-111) (10) et désormais, l'amplification et le séquençage de P4b sont presque systématiquement réalisés lors d'isolement de nouveaux virus. A l'heure actuelle au moins 368 séquences de P4b sont disponibles sur GenBank (44). Les analyses phylogénétiques de P4b donnent toutes des résultats similaires et permettent la définition des trois clades mentionnés précédemment : clade A (FWPV-like), clade B (CNPV-like) et clade C (PSPV-like) (1-3). Le clade C, dont peu de représentant sont décrits, semble le plus distant alors que les clades A et B descendraient d'un ancêtre commun. Sept sous-clades sont décrits dans le clade A et trois dans le clade B (2) (Figure 5).

Plus récemment, d'autres loci ont été utilisés afin de préciser la phylogénie des avipoxvirus. Un premier locus appelé *fpv140* encadre le gène *FPV140/CNPV186* en s'appuyant sur les gènes *FPV139/CNPV184* et *FPV141/CNPV187* (1). Il a l'avantage de présenter une discrimination par la taille entre les séquences des virus FWPV-like (environ 2 kpb) et CNPV-like (environ 3 kpb), ces derniers intégrant un gène supplémentaire (*CNPV185*) dans la séquence. Les gènes *FPV140* et *CNPV186*, orthologues du gène *H3L* du virus de la vaccine et qui codent pour une protéine d'enveloppe immunodominante du MV (cf. p20), sont assez variables (seulement 57% d'identité entre les séquences en acides aminés de FPVUS et CNPVATCC VR-111) et permettent une meilleure discrimination que P4b dans certains clades ou sous-clades (45,46). Toutefois il semblerait que les amorces actuellement utilisées pour amplifier *fpv140* ne permettent pas d'amplifier l'ADN de certains avipoxvirus, notamment les virus PSPV-like (1,47).

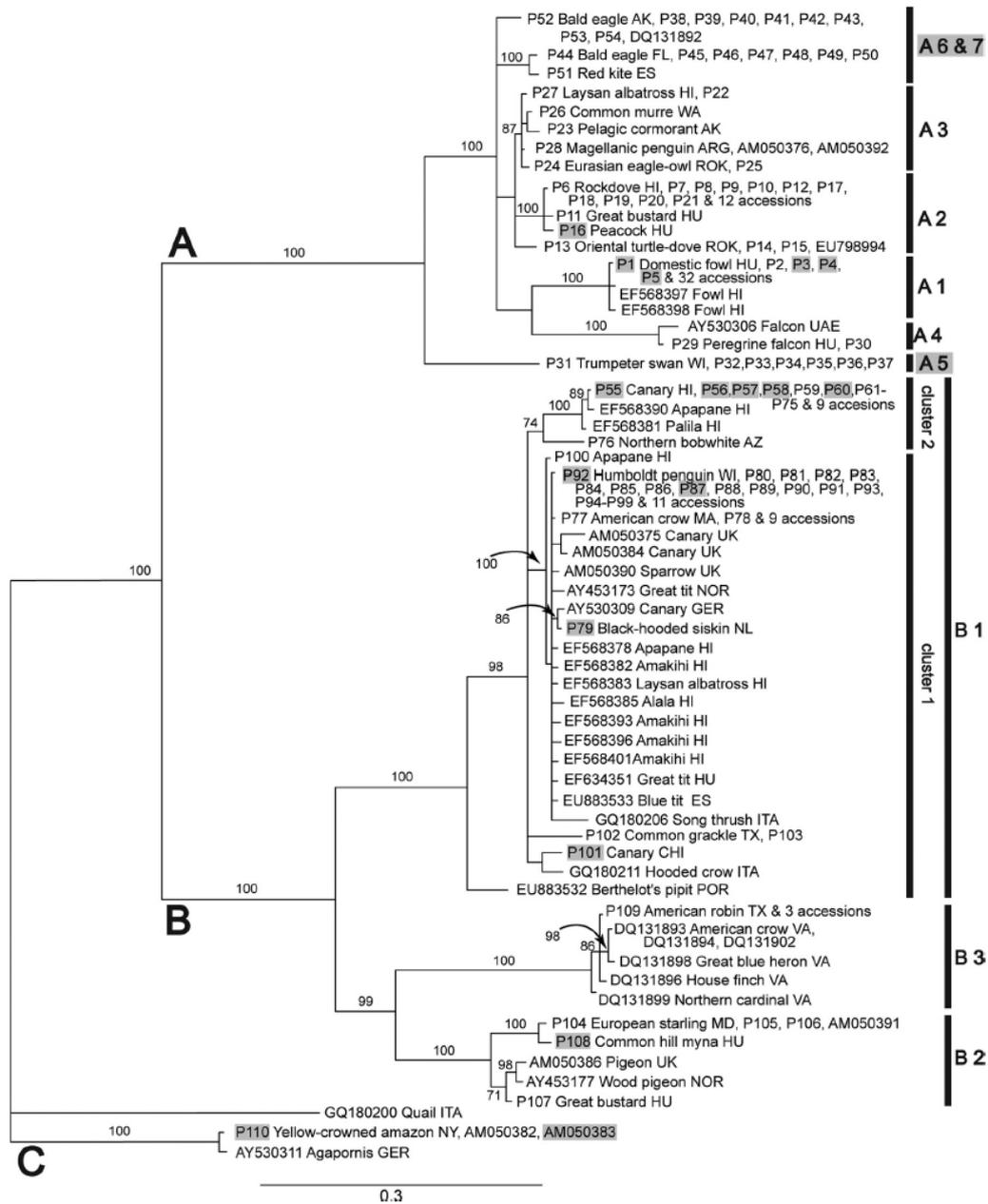


Figure 5. Phylogénie des avipoxvirus construite à partir du locus P4b, d'après Gyuranecz *et al.* 2013 (2).

Les autres loci qui ont été utilisés sont un locus de 4,5 kpb qui s'appuie sur les gènes *FPV193/CNPV267* et *FPV203/CNPV274* (48), un locus de 5,9 kpb qui s'appuie sur les gènes *FPV109/CNPV136* et *FPV117/CNPV145* (49), un locus de 700 pb qui s'appuie sur les gènes *FPV175/CNPV248* et *FPV176/CNPV249*, un locus de 700 pb correspondant à une partie du gène *FPV126/CNPV171* (45) et enfin un locus appelé DNA pol qui correspond à une partie du gène *FPV094/CNPV121* (2). A l'exception de ce dernier locus, qui a été utilisé sur un grand nombre d'avipoxvirus et qui s'est montré efficace pour construire des arbres phylogénétiques très proches de ceux obtenus avec P4b (2), les autres loci n'ont été testés que sur un nombre restreint d'avipoxvirus, appartenant à un

nombre limité de clades et sous-clades et peu de séquences sont donc disponibles dans les bases de données. Toutefois, l'étude de ces loci supplémentaires a permis de confirmer la diversité existante au sein du genre *Avipoxvirus*. L'analyse de ces différents loci et des cinq génomes complets montrent une telle diversité que certains auteurs suggèrent une révision taxonomique qui placerait les avipoxvirus dans une sous-famille distincte de celle des *Chordopoxvirinae* (1,10,28). Par ailleurs, l'utilisation de divers loci a permis de commencer à explorer les phénomènes d'émergence de nouvelles souches virales. Au moins deux études mentionnent de possibles recombinaisons entre virus d'un même clade mais de deux sous-clades différents (2,49), les phénomènes de recombinaison étant par ailleurs connus chez d'autres chordopoxvirus (50–52). De même, l'émergence de souches de fowlpox virus virulentes est régulièrement rapportée (53–55) et a été notamment attribuée à l'intégration de séquences complètes de REV dans le génome de ces virus (55,56).

La dénomination des clades et espèces du genre *Avipoxvirus* s'appuie sur une apparente spécificité d'hôtes de ces virus, justifiée par des observations de terrain et divers études d'infections expérimentales (38,39,57–59). La plupart des auteurs la considèrent comme acquise, au moins chez la majorité des espèces aviaires (2,48), bien que certains la critiquent (1,47). Il semblerait cependant que cette spécificité soit le cadre général et qu'une espèce, ou une famille d'espèces hôtes, soit préférentiellement, mais pas seulement, infectée par des virus d'un même sous-clade, ces derniers pouvant lui être spécifiques. Par exemple, chez les sturnidés (étourneaux et mainates) seuls des virus CNPV-like du sous-clade B2 ont été isolés, ces derniers n'ayant été par ailleurs que très rarement isolés sur d'autres espèces d'oiseaux (2). Dans certaines circonstances (mélange en captivité de différentes espèces aviaires « exotiques », prédation de proies infectées...) un hôte pourrait aussi être infecté par un virus d'un autre sous-clade voire d'un autre clade et développer des lésions mais ces cas constitueraient des culs-de-sac épidémiologiques. Des auteurs se sont interrogés sur les mécanismes de spéciation et d'adaptation des poxvirus à leurs hôtes et au moins 12 familles de gènes ont été identifiées comme étant impliquées dans la spécificité d'hôte (31). Parmi celles-ci, seules les trois familles de gènes ANK/F-Box (gènes codant pour des protéines à répétitions ankyrine), p28/N1R et Serpin sont retrouvées chez les avipoxvirus. D'autres gènes de spécificité d'hôtes, comme les gènes E3L et K3L du virus de la vaccine, n'ont pas d'équivalent chez les avipoxvirus. Aucune étude des mécanismes d'adaptation des avipoxvirus à leurs hôtes n'a été réalisée, et seule la comparaison du génome d'une

souche de fowlpox atténué (FP9) avec celui d'une souche pathogène (FPVUS) a permis d'émettre quelques hypothèses (12). Après 438 passages sur cellules, la perte chez FP9 de 39% des gènes de la famille ANK/F-Box a permis aux auteurs de suggérer que ces gènes pouvaient jouer un rôle dans l'adaptation du virus à son hôte, rejoignant ainsi les conclusions de travaux menés sur d'autres poxvirus (60,61).

### 3. Variole aviaire

La variole aviaire a été décrite vers le milieu du 19<sup>ème</sup> siècle, suite aux premiers cas cliniques rapportés dans la littérature et à l'observation au microscope en 1873 par Bollinger de larges inclusions intracytoplasmiques éosinophiles contenant des particules virales typiques de la variole aviaire (les corps de Bollinger) (62,63). Par la suite, plusieurs noms ont été utilisés pour décrire la maladie : épithélioma contagieux, diphtérie aviaire, variola gallinarum. Désormais, le terme variole aviaire (*avian pox*) est largement utilisé bien qu'on puisse encore trouver le terme poxvirose aviaire dans certains articles de vulgarisation.

#### Épidémiologie

Les agents responsables de la variole aviaire sont tous les virus du genre *Avipoxvirus*. La maladie est rapportée sur un grand nombre d'espèces sauvages et domestiques. Des cas de variole aviaire spontanés ont été décrits sur au moins 278 espèces (pour environ 9800 décrites) appartenant à 20 ordres (64). Il est possible que toutes les espèces d'oiseaux soient sensibles aux infections par des avipoxvirus bien que, comme mentionné précédemment, une certaine spécificité d'hôte existe. Une espèce aviaire donnée peut présenter des sensibilités différentes suivant les souches d'avipoxvirus qui l'infectent, et même être réfractaire à certaines souches. Des cas de variole aviaire ont été rapportés sur tous les continents, aussi bien dans des milieux continentaux qu'insulaires (2,45).

La contamination par un avipoxvirus se fait par pénétration du virus dans une brèche cutanée ou lors de son contact avec une muqueuse, les cellules des muqueuses orales, respiratoires supérieures, cloacales et oculaires étant particulièrement sensibles. Si le virus entre au contact d'une peau saine, il ne sera pas capable d'y pénétrer, mais même une faible abrasion lui permettra d'infecter les cellules épithéliales. Les avipoxvirus sont assez résistants dans le milieu extérieur, particulièrement dans les matières sèches comme les poussières de plume ou les croûtes où ils peuvent rester infectieux de plusieurs mois à plusieurs années (20). Le portage mécanique du virus par

divers supports inertes étant possible, la transmission peut s'effectuer par contact entre une plaie ou une muqueuse et un objet contaminé comme du matériel d'élevage ou d'insémination, les mains d'un manipulateur....(64,65) En élevage, le confinement des oiseaux et les fortes densités peuvent générer des aérosols de poussières de plumes qui peuvent être inhalés, provoquant une contamination de l'appareil respiratoire supérieur et l'apparition de lésions diphtériques dans la cavité oro-pharyngée et la trachée (20,64). Dans les autres contextes (oiseaux sauvages, élevages extensifs...), l'apparition de lésions diphtériques sur les muqueuses est moins bien expliquée mais pourrait, par exemple, être due chez les jeunes oiseaux au nourrissage à la main (66).

Toutefois, tous les auteurs s'accordent pour dire que le mode de transmission le plus fréquent se fait par les insectes piqueurs (20,64,66), même si aucune étude épidémiologique n'a permis d'apprécier l'importance relative des différents modes de transmission, et que relativement peu d'auteurs ont étudié expérimentalement le rôle des insectes piqueurs (67-69). Les quelques études, datant de plusieurs dizaines d'années, concluent toutes que les insectes joueraient uniquement un rôle de vecteur mécanique, le virus ne s'y multipliant pas. Pour devenir porteur, les moustiques doivent se nourrir sur la lésion ou à sa proximité immédiate et ils sont capables de transmettre le virus à un nouvel hôte jusqu'à quatre semaines après s'être contaminés (68,69). Au moins 11 espèces de diptères ont été identifiées comme vecteurs possibles (20). Le portage étant mécanique, il est probable qu'un beaucoup plus grand nombre d'espèces, même non piqueuses, puisse l'être également, par exemple en entrant en contact avec une lésion ulcérée puis en se nourrissant sur la plaie d'un individu sain (68).

L'importance du rôle des insectes, et notamment des culicidés, dans l'épidémiologie de la variole aviaire a été surtout démontrée indirectement. Il a par exemple été montré que les variations d'incidence de la variole aviaire étaient souvent saisonnières et qu'elles suivaient les courbes d'abondance de diverses espèces de culicidés (64,70,71). De même, les abondances géographiques de certains vecteurs sont corrélées avec les variations de prévalence de la maladie (71,72). Enfin, d'autres observations, comme la diminution d'incidence lors d'utilisation de volières imprégnées d'insecticides (73), ou les corrélations positives entre hémoparasitisme et présence de lésions varioliques (72,74), sont aussi en faveur d'un rôle des insectes dans la transmission des avipoxvirus. Ces diverses études ont ainsi permis d'identifier des périodes et circonstances à risque : climat humide et chaud propice aux insectes, forte densité, proximité de gîtes larvaires... Divers facteurs de risque individuels ont aussi été

évoqués. Alors que le sexe n'a jamais été identifié comme tel, l'âge peut être un facteur de risque. Plusieurs études rapportent des taux de morbidité ou de mortalité plus importants chez les jeunes oiseaux (73,75), bien que ce ne soit pas systématique (76–79). Une corrélation positive entre variole aviaire et infections par d'autres agents pathogènes est également régulièrement observée. Ces corrélations ont particulièrement été étudiées pour les infections par des plasmodiums et des avipoxvirus sur certains passereaux à Hawaï (74) et en Nouvelle Zélande (80), et sur des pipits de Berthelot (*Anthus berthelotii*) sur les îles de la Macaronésie (81).

La variole aviaire est assez répandue dans les élevages industriels de poulets (*Gallus gallus domesticus*) et surtout de dindes (*Meleagris gallopavo*), et elle persiste voire se répand dans certaines régions, malgré les programmes vaccinaux. Cela a, par exemple, été observé ces dernières années aux États-Unis ou en Chine (20,55). La morbidité est généralement modérée et la mortalité réduite mais peu de données existent quant aux prévalences exactes. Les quelques rapports qui sont publiés font état de taux de morbidité pouvant aller de moins de 1% avec une létalité nulle (82), à 100%, avec une létalité de 100% sur des poulets non vaccinés (55). Sur la volaille de basse-cour, des taux de morbidité de 79% ont été rapportés au Mexique (83) et, au Nigéria, la séroprévalence a été estimée à 23% (84). Sur ces espèces la variole aviaire peut avoir un impact économique par les pertes qu'elle cause mais également par les retards de croissance et les chutes de ponte induits (20).

Lors d'introduction d'avipoxvirus dans des élevages d'oiseaux exotiques, les incidences sont généralement plus élevées, probablement du fait que les oiseaux sont naïfs par rapport à la souche virale introduite. Une morbidité importante sans mortalité peut être notée, comme cela a été observé dans un élevage d'œdicnèmes criards (*Burhinus oedicephalus*) (85), mais souvent une mortalité est associée. Ainsi, un épisode de variole aviaire sur des poussins de paons (*Pavo cristatus*) a permis d'enregistrer des taux de morbidité et de mortalité respectivement de 45% et 27% (73). Dans un élevage d'inséparables à face rose (*Agapornis roseicollis*), les taux de mortalité ont atteint 38% sur les juvéniles sans dépasser 3% chez les adultes (75), et dans un élevage de canaris (*Serinus canaria*), 65% des individus ont péri lors d'une épizootie (86). À ce titre, la variole aviaire peut être une menace pour le succès d'élevages conservatoires d'espèces menacées, comme cela a été par exemple décrit dans un élevage de faucons pèlerins (*Falco peregrinus*), en Allemagne (23). Dans d'autres contextes de captivité, comme celui des parcs zoologiques et des centres de sauvegarde de la faune sauvage, le mélange et la

promiscuité de diverses espèces sont propices à l'apparition d'épizooties de variole aviaire (64,87).

Sur les oiseaux sauvages, la plupart des cas de variole aviaire rapportés sont des observations fortuites de cas ponctuels. Toutefois, plusieurs études ont été menées sur diverses espèces, notamment en milieux insulaires, pour évaluer la prévalence de la maladie et mesurer son impact sur la survie et les succès de reproduction. Dans les environnements où le virus est présent depuis longtemps, une adaptation des espèces hôtes indigènes s'est mise en place, et la variole aviaire est généralement endémique à des prévalences relativement faibles, de l'ordre de 0,5% à 1,5% (64,88). Quelques études rapportent des prévalences plus élevées, de 2% à 6% sur diverses espèces de passereaux (89,90) à 37% sur des colins de Virginie (*Colinus virginianus*) (88) et jusqu'à 100% sur des dindons sauvages à certaines périodes de l'année (70). Récemment, la description en Angleterre d'une épizootie de variole aviaire due à une souche CNPV-like, qui semble s'étendre sur le continent européen et qui concerne exclusivement les mésanges charbonnières (*Parus major*), pose de nombreuses questions quant à l'apparition et à la diffusion de nouvelles souches virales (76,91). Quelques études apportent des éléments de réponse en montrant que les modifications anthropiques des milieux comme l'agriculture (92) et l'urbanisation (93) peuvent jouer un rôle en augmentant artificiellement la densité d'oiseaux (concentration sur les points de nourrissage artificiels) ou en immunodéprimant les individus (stress, utilisation de pesticides...), permettant ainsi à des souches virales de diffuser plus efficacement. Dans les milieux insulaires, les introductions de nouvelles souches virales, de nouvelles espèces d'insectes vecteurs ou d'espèces hôtes non-indigènes représentent des risques majeurs pour les espèces indigènes qui sont généralement naïves vis-à-vis de souches « exotiques », voire parfois vis-à-vis des avipoxvirus en général (64,71). Diverses études menées aux Galápagos (94), à Hawaï (72,74), dans les îles Canaries (79) et en Nouvelle Zélande (80) montrent que les avipoxvirus peuvent largement contaminer certaines espèces et causer leur déclin. Par exemple, des prévalences de 17% à 35% sur diverses espèces de passereaux à Hawaï et de 50% sur des alouettes piskolettes (*Calandrella rufescens*) dans les îles Canaries ont été notées et sont corrélées à une diminution des populations. La variole aviaire a un impact sur ces espèces en les rendant plus sensibles à la prédation (95) ou à des infections secondaires, en réduisant leur succès de reproduction (96,97) ou en causant leur mort.

La variole aviaire a été décrite l'Outarde houbara dès l'apparition des premiers projets de conservation de l'espèce il y a une trentaine d'année. De par la taille restreinte des premiers élevages, la variole aviaire était prise en considération au cas par cas, sans qu'aucune réelle étude épidémiologique ne soit menée. Récemment, l'épidémiologie de cette maladie a pu être étudiée dans trois élevages conservatoires d'outardes de grande échelle au Maroc (ECWP) et aux Emirats Arabes Unis (NARC et SKHBC-AD) par Guillaume LE LOC'H (98). Il a montré que malgré un protocole de prophylaxie stricte, la maladie est présente de façon quasi permanente, avec des fluctuations saisonnières suivant à priori le cycle des insectes piqueurs, renforçant l'idée d'une transmission par ces insectes via un rôle de vectorisation mécanique. Aucune information concernant les interactions virus-vecteur, vecteur-hôte ni l'identification de ces vecteurs n'a pu toutefois être objectivée. Des épisodes épizootiques de plusieurs mois ont également été observés durant lesquels les formes cutanées dominent, avec une mortalité faible comme cela avait déjà été observé chez les outardes, même si la prise en charge précoce au cas par cas ne permet pas de suivre une réelle évolution naturelle de la maladie. Il a également été montré que l'âge et le statut vaccinal des oiseaux étaient de probables facteurs de risque. En effet, les individus juvéniles sont beaucoup plus infectés que les adultes au Maroc, ce qui n'est toutefois pas le cas aux Emirats Arabes Unis où jeunes et adultes sont autant infectés les uns que les autres. Le statut vaccinal des oiseaux peut expliquer cette observation. En effet, les adultes dans l'élevage émirati sont vaccinés avec une souche vaccinale de canarypox virus. Ils ne sont donc pas protégés contre les FWPV-like. Les hypothèses émises pour l'élevage marocain sont :

- Une vaccination inefficace des jeunes, qui sont vaccinés entre 30 et 60 jours. Une possible interaction avec les anticorps maternels pourrait rendre la vaccination inefficace. Le protocole vaccinal peut aussi être la cause de cette inefficacité
- Une immunité des juvéniles par infection spontanée, due à une vaccination inefficace quel que soit l'âge des outardes. Ainsi, les juvéniles acquerraient une protection probablement due à une infection par piqure d'insectes vecteurs, qui les protégeraient une fois adulte. Seul une partie de ces juvéniles déclarerait des signes cliniques.
- Le type d'élevage différent entre adultes et juvéniles : les adultes sont élevés en cage individuelle sur litière artificielle, alors que les juvéniles le sont sur sol naturel et en groupe, avec présence de végétation. Celle-ci étant propice à

la présence d'insectes vecteurs, les juvéniles y sont exposés plus que les adultes, favorisant ainsi une possible infection naturelle qui serait absente ou moins fréquente chez les adultes. Cela est à corrélérer avec le mode de vie naturel de l'Outarde, qui vit en petits groupes, dans un environnement semi-aride à aride non propice au développement d'une végétation et donc à la multiplication d'insectes vecteurs, au contraire des conditions d'élevage que nous connaissons. Ainsi, aucun oiseau sauvage infecté n'a été observé lors des études de terrain (99). Il a également été observé que la prévalence de la maladie croît avec la densité de population, ce qui est également en faveur d'une plus grande infection des juvéniles qui vivent en groupes de quelques individus que des adultes élevés en cage individuelle.

### *Clinique*

Les durées d'incubation rapportées pour la variole aviaire sont généralement de quatre à dix jours lors d'infection naturelles, durées confirmées lors d'infections expérimentales. Deux études démontrent pourtant que cette durée peut être beaucoup plus longue allant jusqu'à un mois (38) et même 43 jours lors d'infection expérimentale d'amakihis familiers (*Hemignathus virens*) avec un virus CNPV-like non atténué (100). Les lésions peuvent ensuite persister plusieurs semaines avant une possible guérison spontanée. Un auteur rapporte la persistance de lésions varioliques sur un pic flamboyant (*Colaptes auratus*) pendant 13 mois (101).

La variole aviaire se présente sous trois formes : cutanée (ou sèche), diphtérique (ou humide), et septicémique (Figure 6). La forme cutanée est la plus couramment rencontrée. Elle se manifeste par l'apparition de lésions prolifératives sur les régions cutanées aptères (bec, cire, paupières, crête, barbillons, pattes) (20,64). Ces lésions dues à une hyperplasie des cellules épithéliales se présentent d'abord comme des papules qui deviennent enflammées et grossissent. Des vésicules apparaissent à leur surface et grossissent jusqu'à devenir confluentes puis percer, donnant à la lésion un aspect de masse ulcérée qui va progressivement évoluer vers une masse très vascularisée et couverte d'une croûte plus ou moins volumineuse. En cas d'évolution favorable, la lésion se dessèche progressivement et la croûte tombe, laissant place à du tissu cicatriciel sain (20). La forme diphtérique est la seconde forme la plus courante. Elle peut être observée seule ou en association avec la forme cutanée et se manifeste par l'apparition de lésions diphtériques, généralement sur les muqueuses orales, respiratoires supérieures, cloacales et oculaires. Les lésions se présentent comme des papules enflammées qui

grossissent, deviennent confluentes et se couvrent d'une pseudomembrane nécrotique jaunâtre. Le retrait de cette pseudomembrane fait apparaître des ulcères hémorragiques. Les lésions peuvent s'étendre aux sinus et les obstruer (20). La forme septicémique, beaucoup plus rare, est très majoritairement observée chez les canaris. En élevage, elle se manifeste par des dyspnées soudaines sur une grande partie du cheptel, rapidement suivi par une mortalité importante (>70%) (66). Dans ce cas de figure, des lésions peuvent être observées dans l'appareil respiratoire profond (présence d'exsudats dans la trachée et les sinus, induration des poumons, épaissement des sacs aériens) mais également dans d'autres organes comme le thymus ou le foie (86). Enfin, des localisations atypiques de lésions ont été sporadiquement décrites sur des régions plumées du corps possiblement suite à des lésions de picage (102,103), dans le cloaque suite à des inséminations contaminées (65) et sous forme de lésions pseudo-tumorales sur des os de la face et d'autres parties du corps (75). Microscopiquement, une hypertrophie et une hyperplasie de l'épithélium associées à un processus inflammatoire sont observées. Les cellules infectées apparaissent ballonnées et contiennent des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles caractéristiques (20) (Figure 6).

Les raisons du développement d'une forme de variole aviaire plutôt que d'une autre ne sont pas connues, mais il est certain que la souche virale et la sensibilité de l'hôte sont des facteurs déterminants. Les infections expérimentales utilisant une inoculation transcutanée ou intradermique ont très majoritairement échoué à induire des lésions à distance du point d'inoculation. En revanche, une étude ayant utilisé une inoculation par voie intraveineuse a permis d'induire une forme cutanée avec de multiples lésions et d'objectiver une virémie entre trois et sept jours post-infection (104). La morbidité et la mortalité lors de variole aviaire sont dues à la gêne physique occasionnée par les lésions : locomotion altérée lors de forme cutanée, difficulté de préhension des aliments et obstruction des voies digestive et aériennes supérieures lors de forme diphtérique, cette dernière étant par conséquent plus débilitante (20,64).

Les lésions de variole aviaire, bien que relativement caractéristiques, ne suffisent pas à confirmer le diagnostic de la maladie, d'autres maladies pouvant induire des lésions relativement similaires : abcès, infections par des papillomavirus, parasitoses externes ou tumeurs pour la forme cutanée (105), et candidose, capillariose, carence en vitamine A ou trichomonose pour la forme diphtérique (64). Les examens de choix pour confirmer un cas de variole aviaire sont classiquement : (i) l'histologie qui permet, après coloration par la méthode de Gimenez (106) ou par le colorant de Wright, la

visualisation des corps de Bollinger dans les cellules épithéliales infectées, (ii) la microscopie électronique et (iii) l'isolement du virus sur CAM ou sur cellules. Des méthodes moléculaire permettent maintenant un diagnostic beaucoup plus rapide : polymorphisme de taille des fragments de restriction, utilisation de sonde ADN, PCR (réaction en chaîne par polymérase) et PCR quantitative (20,64). L'amplification du locus P4b (cf. p26) est désormais l'outil le plus utilisé pour confirmer le diagnostic de variole aviaire. Ce locus offre l'avantage de pouvoir être amplifié pour la très grande majorité des souches d'avipoxvirus (2,42), mais il est nécessaire de séquencer l'amplicon pour préciser la souche virale alors que le locus fpv140 permet une discrimination par la taille sur gel entre les virus CNPV-like et FWPV-like (1).

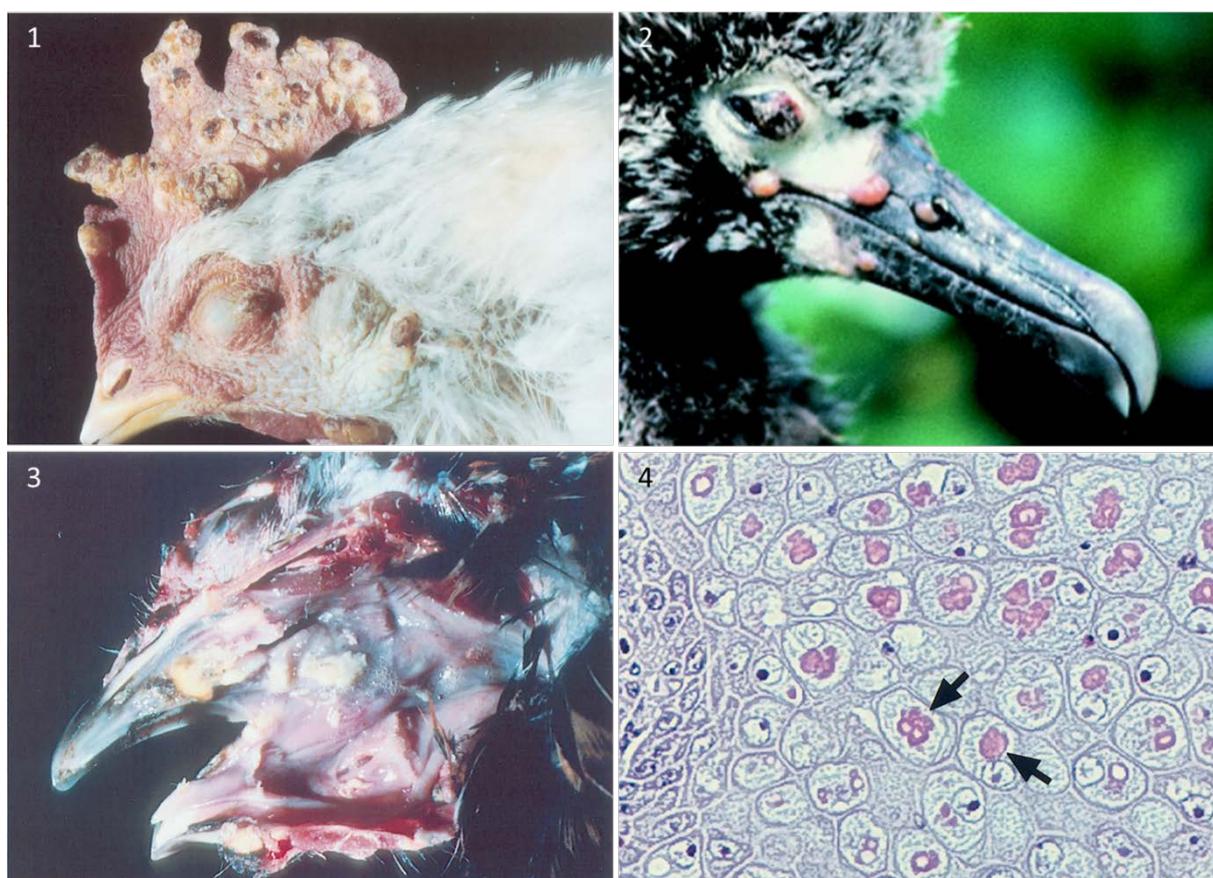


Figure 6. Lésions de variole aviaire : formes cutanées (1 et 2) et diphtérique (3), cellules ballonnées contenant des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles caractéristiques (4), d'après Friend *et al.* 1999 (105) et Tripathy *et al.* 2013 (20).

Le diagnostic immunologique de la variole aviaire est également possible et c'est surtout la réponse humorale qui est mesurée. Divers outils, aucun n'ayant été commercialisés, ont été développés et utilisés dans le cadre d'études de protections croisées entre souches virales ou pour évaluer des séroprévalences : immunodiffusion sur gel d'agarose, séroneutralisation virale et divers ELISA indirects ou compétitifs

(19,20,57,80,107,108). Parmi ces nombreuses études, peu se sont intéressées à la cinétique de la production en anticorps. Des infections expérimentales ont montré que des anticorps circulants sont détectables, ce que nous avons voulu vérifier sur les outardes houbara dans le cadre de cette thèse, avec la réalisation d'infections expérimentales. Très peu d'études se sont intéressées à la réponse cellulaire pourtant considérée comme importante lors de variole aviaire (20). Une étude expérimentale a montré une réponse lymphoproliférative entre deux et quatre semaines post-infection (111), mais une autre étude sur des poussins de un jour a montré, au contraire, une diminution de la réponse lymphocytaire dès une semaine post-infection, les auteurs suggérant que la présence de séquences intégrales de REV dans les souches soit la cause de l'immunodépression (19). Il semblerait qu'une immunité protectrice cellulaire ou humorale puisse dans certains cas perdurer jusqu'à un an post-infection (66) et on ne sait pas si un individu peut rester porteur du virus sans présenter de signes d'infection.

Lors de forme cutanée de variole aviaire, un traitement de l'oiseau peut être entrepris, consistant en l'exérèse des lésions et leur cautérisation avec de la povidone iodée ou à l'azote liquide par exemple (64). Il est plus difficile d'agir lors de lésions diphtérique, mais un traitement de support peut être administré : antibiotiques locaux ou systémiques contre les surinfections et supplémentation en vitamine A afin de favoriser la cicatrisation des épithéliums. En cas d'épizootie ou de présence endémique de variole aviaire dans un élevage, un nettoyage et une désinfection de l'environnement et des équipements doivent être effectués, des mesures de lutte contre les vecteurs entreprises et les oiseaux infectés doivent être isolés.

La prévention de la variole aviaire passe également par la vaccination qui est pratiquée depuis plus de 70 ans. Des vaccins composés de souches de fowlpox virus et pigeonpox virus ont largement été utilisés pour vacciner des élevages de poulets et de dindes en zone d'endémie, et des vaccins composés de souches de canarypox virus ont été utilisés dans des élevages de canaris. Tous sont des vaccins vivants atténués sur CAM ou cellules et administrés généralement par transfixion de la membrane alaire (ou patagium). Leur administration induit une forme bénigne de la maladie et la prise vaccinale est évaluée par l'apparition d'un gonflement ou d'une petite croûte (*take*) au point d'inoculation, sept à dix jours après la vaccination (112). Une mauvaise administration du vaccin, comme son application sur une muqueuse, peut provoquer l'apparition d'une forme plus grave de la maladie. L'immunité conférée peut durer entre six et douze mois (20).

Depuis quelques dizaines d'années des épizooties de variole aviaire sont observées dans des élevages de poulets et de dindes vaccinés. Ces échecs vaccinaux sont attribués à la présence de séquences complètes de REV dans les génomes des souches virulentes alors que ces séquences sont absentes dans les souches vaccinales, probablement suite à l'adaptation du virus lors de son atténuation sur cellule (17,18,55,56). Sur les espèces « exotiques », la vaccination doit être entreprise avec beaucoup de prudence car se pose la question de l'innocuité de la souche vaccinale et de la protection croisée qu'elle offre vis-à-vis d'une infection par une souche antigénétiquement différente (64). Une étude expérimentale a montré qu'une souche vaccinale du sous-clade B1 (virus CNPV-like) provoquait des formes sévères de la maladie pouvant aller jusqu'à la mort sur des amakihis familiers. Sur les oiseaux immunisés ayant survécu, la protection s'est montrée efficace lors d'infection avec une souche génétiquement très proche de la souche vaccinale mais a échoué quand une autre souche du sous-clade B1 plus éloignée était utilisée (113). D'autres études de protection croisée ont été réalisées utilisant divers modèles aviaires et divers virus et leurs conclusions sont contradictoires. Alors que la plupart ne montrent pas d'immunité croisée entre virus de clades différents, voire au sein d'un même clade (25,39,56), au moins une étude récente conclut à une protection croisée entre une souche CNPV-like et une souche FWPV-like (109).

La diversité des souches d'avipoxvirus responsables d'infections chez l'Outarde en captivité est élevée, avec 11 génotypes identifiés pour le locus P4b, 19 pour le gène FPV140/CNPV186 et 31 pour le locus fpv140, et cela malgré un contexte d'élevage (isolement, biosécurité) à priori peu propice à des introductions répétées de virus (98). Les fortes interactions homme/oiseau, notamment l'intervention de techniciens possédant pour la plupart des volailles chez eux, jouent certainement un rôle. L'observation chez les outardes de virus FWPV-like génétiquement proches de virus isolés sur des dindes renforce cette hypothèse. Malgré cette grande diversité de souches virales, aucune coïnfection n'a cependant été mise en évidence. Il est pourtant connu que des recombinaisons dues à des coïnfections sont un processus évolutif des poxvirus aboutissant à l'apparition de souches virulentes (50–52). Guillaume LE LOC'H a également montré qu'au sein des élevages d'outardes, la circulation des virus est relativement faible, certainement de par la prise en charge précoce et individuelle des oiseaux présentant des signes cliniques (98). Cela peut d'ailleurs expliquer la diversité des souches observées, car les cycles viraux étant stoppés, aucune souche ne peut

réellement prendre le dessus et masquer la présence des autres comme cela a été montré en Virginie (Etats-Unis d'Amérique) (87).

Cette diversité virale peut aussi expliquer en partie les échecs vaccinaux. En effet, la souche vaccinale utilisée pour vacciner les outardes dans l'élevage au Maroc appartient au sous-clade B1, dans lequel seul 47% des souches isolées dans ce même élevage se groupent. De plus, il a été montré qu'une vaccination avec une souche de canarypox appartenant au sous-clade B1 permettait d'avoir une protection vis-à-vis de souches génétiquement très proches, mais que cela échouait pour des souches génétiquement plus éloignées, même si elles appartiennent au même sous-clade (113). Les juvéniles sont beaucoup plus touchés que les adultes à ECWP. Ces oiseaux subissent une pression infectieuse forte et sont élevés sur sol naturel avec une végétation et donc une présence de vecteurs beaucoup plus importante que les adultes qui sont, eux, élevés en cage individuelle.

## B. L'Outarde houbara

### 1. Taxonomie et distribution

L'Outarde houbara est une espèce paléarctique appartenant à l'ordre des *Otidiformes* et à la famille des *Otididae* (114). Longtemps considéré comme ne comprenant qu'une seule espèce divisée en trois sous-espèces, le genre *Chlamydotis* est désormais scindé en deux espèces distinctes, sur la base de critères génétiques et comportementaux (115–118) (Figure 7) : l'Outarde houbara asiatique ou Outarde de Macqueen (*Chlamydotis macqueenii*) (119), dont l'aire de répartition s'étend de la vallée du Nil, en Égypte, au désert de Gobi, en Chine, et l'Outarde houbara nord-africaine (*Chlamydotis undulata*), elle-même divisée en deux sous-espèces : *C. undulata undulata* (120) dont l'aire de répartition s'étend de la Mauritanie à l'Égypte et *C. undulata fuerteventurae* (121) endémique des îles Canaries en Espagne. Dans la suite du manuscrit, les termes « outarde » et « outarde houbara » font référence, sauf mention contraire, aux deux espèces du genre *Chlamydotis*.



Figure 7. Outarde houbara nord-africaine (*C. undulata*) à gauche et Outarde houbara asiatique (*C. macqueenii*) à droite. © IFHC

### 2. Biologie

L'Outarde est un oiseau adapté aux environnements désertiques, qui se distribue dans l'ensemble des régions arides à semi-arides (entre 50 et 400 mm de précipitations

annuelles) (122) de son aire de répartition. Elle est retrouvée des plaines côtières aux hauts plateaux et fréquente généralement les régions à faible densité humaine (123).

L'Outarde est qualifiée d'omnivore et d'opportuniste, se nourrissant d'une grande variété de végétaux, d'invertébrés et plus rarement de petits vertébrés. Son régime alimentaire s'adapte aux variations locales et saisonnières des ressources (124,125). Ainsi, durant l'hiver, les plantes constituent la part principale du régime tant chez l'espèce asiatique (125,126) que chez l'espèce africaine (127). L'opportunisme de ces oiseaux peut les conduire à se nourrir dans des champs de céréales et de légumineuses (128,129) notamment lorsque les ressources naturelles sont très pauvres.

Le système socio-sexuel de l'Outarde est un système de type lek diffus<sup>4</sup> (130,131) et seules les femelles prennent part à l'élevage des jeunes. La saison de reproduction de l'Outarde est longue. Les mâles commencent à parader en janvier et les femelles initient les pontes quelques semaines plus tard. Les périodes de ponte varient selon les régions. Alors qu'en Afrique du Nord les femelles peuvent pondre de février à juin (132), les périodes de ponte sont plus courtes pour les populations migratrices d'Asie, s'étalant de mars à mai. En Oman, elles peuvent durer d'octobre à mai suivant les années (133). Les pontes sont généralement composées de 2 à 3 œufs chez l'espèce africaine et de 3 à 4 œufs chez l'espèce asiatique (133). Les pontes de remplacement sont fréquentes et, en cas de conditions environnementales propices, certaines femelles peuvent élever deux couvées successives (131). Les œufs, pondus à même le sol dans une simple dépression, sont couvés par la femelle seule pendant 22 à 24 jours (132). Les poussins nidifuges sont nourris au bec par la mère durant les premiers jours et ils restent avec celle-ci pendant environ trois mois, bien qu'étant capables de voler dès l'âge d'un mois (124,133).

L'Outarde présente un comportement grégaire en période inter-nuptiale formant généralement de petits groupes de deux à dix individus souvent peu denses (122). De récentes études ont montré que l'espèce africaine, qui était encore considérée il y a quelques années comme sédentaire, pouvait être qualifiée de migratrice partielle (131)). Ses mouvements sont différents suivant le sexe et la saison. Les femelles, caractérisées par un domaine vital multimodal, sont capables de parcourir plusieurs centaines de kilomètres entre les sites de reproduction et d'hivernage alors que les mâles sont majoritairement sédentaires avec un domaine vital unimodal (130). Les jeunes oiseaux

---

<sup>4</sup> Un lek est un agrégat de mâles reproducteurs que les femelles visitent dans l'unique but de fertiliser leurs œufs. Le terme diffus caractérise les leks pour lesquels les distances inter-mâles sont élevées.

présentent des mouvements de dispersion variables, en fonction notamment de leur condition corporelle et de facteurs climatiques (134,135). L'espèce asiatique présente un schéma de migration plus complexe puisque seules les populations du nord de l'Asie (du Kazakhstan à la Mongolie) migrent. Les populations se reproduisant à l'ouest du Kazakhstan contournent la mer Caspienne et hivernent en Iran, en Irak et au nord de l'Arabie Saoudite alors que celles se reproduisant plus à l'est traversent le Turkménistan, l'Ouzbékistan et le nord-ouest de l'Inde pour hiverner en Afghanistan, en Iran, au Pakistan et dans la péninsule Arabe. (136,137). Toutefois, des populations résidentes existent dans la plupart des pays d'Asie centrale ainsi que dans certains pays du Moyen Orient et de la péninsule arabe, conduisant ainsi des populations migratrices et sédentaires à se côtoyer à certaines périodes de l'année.

Très peu d'informations sur les agents pathogènes présents chez les outardes sauvages existent et les rares données disponibles sont généralement des observations ponctuelles réalisées lors d'études en écologie ou lors de suivi des chasses des fauconniers arabes. L'imputation de mortalité à des maladies infectieuses est difficile à objectiver car les cadavres sont souvent trouvés en mauvais état, plusieurs jours après le décès de l'oiseau. Ainsi, seules les causes de mortalité évidentes (prédation, électrocution, trafic) peuvent être déterminées. Les maladies virales et bactériennes ont été très peu explorées sur les outardes sauvages. Une seule étude portant sur six outardes asiatiques capturées pour être équipées d'émetteurs satellites a permis de détecter des anticorps anti-avipoxvirus sur un oiseau et des anticorps anti-paramyxovirus de type 1 sur un autre, mais aucun virus n'a pu être isolé (138). Des études sur le parasitisme d'individus sauvages ont montré que les oiseaux sont largement parasités par différentes espèces d'helminthes (139,140), certaines étant à priori propres à l'Outarde (141).

### **3. Conservation**

Les densités d'outardes sont mal connues et seules des informations parcellaires existent. En 2014, selon BirdLife International, la population asiatique était estimée entre 79000 et 97000 individus, plus de la moitié des oiseaux se reproduisant dans le sud du Kazakhstan (118). L'état des populations de cette espèce est également mal connu et les données les plus fiables viennent d'études menées au Kazakhstan et qui permettent d'estimer la diminution des effectifs dans le pays entre 26 et 36% de 2000 à 2009 (142), avec cependant de fortes disparités géographiques, certaines zones ayant paradoxalement connu une augmentation des populations. Plus généralement, les taux

de déclin actuels sont estimés autour de 25% pour la population occidentale de l'espèce asiatique et entre 40 à 50% pour sa population orientale (143). Au milieu des années 1990, la population de l'espèce africaine était estimée à 9800 individus (144) principalement distribués en Algérie et au Maroc. Le déclin de cette espèce a été estimé autour de 25% entre 1984 et 2004 (143), mais grâce aux efforts de conservation mis en œuvre au Maroc les populations ont tendance à augmenter localement ces dernières années à un taux estimé entre 1 et 10%. Malgré cela, l'espèce africaine, comme l'espèce asiatique (145), reste classée comme vulnérable sur la liste rouge de l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) et figure en annexe I de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction (CITES), ceci car les tendances à l'échelle de l'Afrique du Nord sont encore mal connues et parce que l'impact des efforts de conservation reste à évaluer à long terme (146).

De nombreux facteurs expliquent le déclin généralisé des populations d'Outardes. Les principales causes sont la chasse intensive, le braconnage et la dégradation des habitats (118,147-149). La chasse au faucon est pratiquée par les peuples arabes depuis plusieurs siècles, quand l'outarde constituait une source de subsistance pour les peuples nomades. L'attachement à cette tradition est resté fort dans les pays arabes du Golfe et l'intensification de la chasse sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'outarde à la faveur de moyens logistiques plus accessibles en font la principale menace pour les populations d'outardes (118). Une autre conséquence de l'intensification de la chasse est le besoin important d'outardes qu'ont les fauconniers pour entraîner leurs faucons. Cette demande se traduit par un fort braconnage et un trafic d'oiseaux, principalement depuis le Pakistan et l'Iran vers les pays du Golfe. Dans les années 1980, il était estimé que jusqu'à 2000 outardes pouvaient être vendues annuellement aux Émirats Arabes Unis (EAU) (147). La chasse et le braconnage seraient ainsi responsables de plus de 70% de la mortalité observée sur certaines zones d'hivernage (150). La dégradation des habitats a également une conséquence importante sur les populations d'outardes. Ainsi, le surpâturage modifie la disponibilité en ressources animales et végétales, provoque un dérangement des femelles pendant l'incubation et réduit le couvert végétal. Aux Émirats Arabes Unis, la dégradation des habitats pourrait être à l'origine de l'absence d'observations récentes d'oiseaux hivernant (136).

Face au déclin des populations sauvages d'outardes, des programmes de conservation ont été développés depuis quelques dizaines d'années (Figure 8). Le premier projet a été créé en 1986 au National Wildlife Research Center (NWRC) à Taïf, en Arabie Saoudite et le développement d'autres projets a suivi en Afrique du Nord, au Moyen Orient et en Asie centrale. Afin de fédérer et d'unir les efforts de recherche et de conservation de l'Outarde menés par divers projets, le Cheikh Mohammed bin Zayed al Nahyan, prince héritier d'Abou Dhabi fonde l'International Fund for Houbara Conservation (IFHC) en 2006. Les objectifs de l'IFHC sont la protection des populations d'outardes, la prise de conscience de leur fragilité et la mise en œuvre d'efforts de conservation sur l'ensemble de leurs aires de répartition via une coopération internationale (151). Actuellement l'IFHC finance quatre projets de conservation :

- Le National Avian Research Center (NARC) aux Émirats Arabes Unis, créé en 1989 ;
- L'Emirates Center for Wildlife Propagation (ECWP) au Maroc, créé en 1995 ;
- Le Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center au Kazakhstan (SKHBC-KZ), créé en 2008 ;
- Le Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center aux Émirats Arabes Unis (SKHBC-AD), créé en 2012.

L'IFHC a confié la gestion de ses projets à la société RENECO for Wildlife Preservation, fondée en 1986 pour apporter une expertise technique et scientifique à la conservation de l'Outarde. En plus de ces quatre projets, la société RENECO gère également deux projets financés par d'autres bailleurs de fonds arabes :

- L'Emirates Centre for Houbara Conservation (ECCH) en Ouzbékistan, fondé en 2007 par le Sheikh Mohammed Bin Rashid Al Maktum, prince héritier de Dubaï ;
- Le Rawdat Al Faras Houbara Breeding Center (RAF-HBC) au Qatar, crée en 2013 et financé par le Qatar.

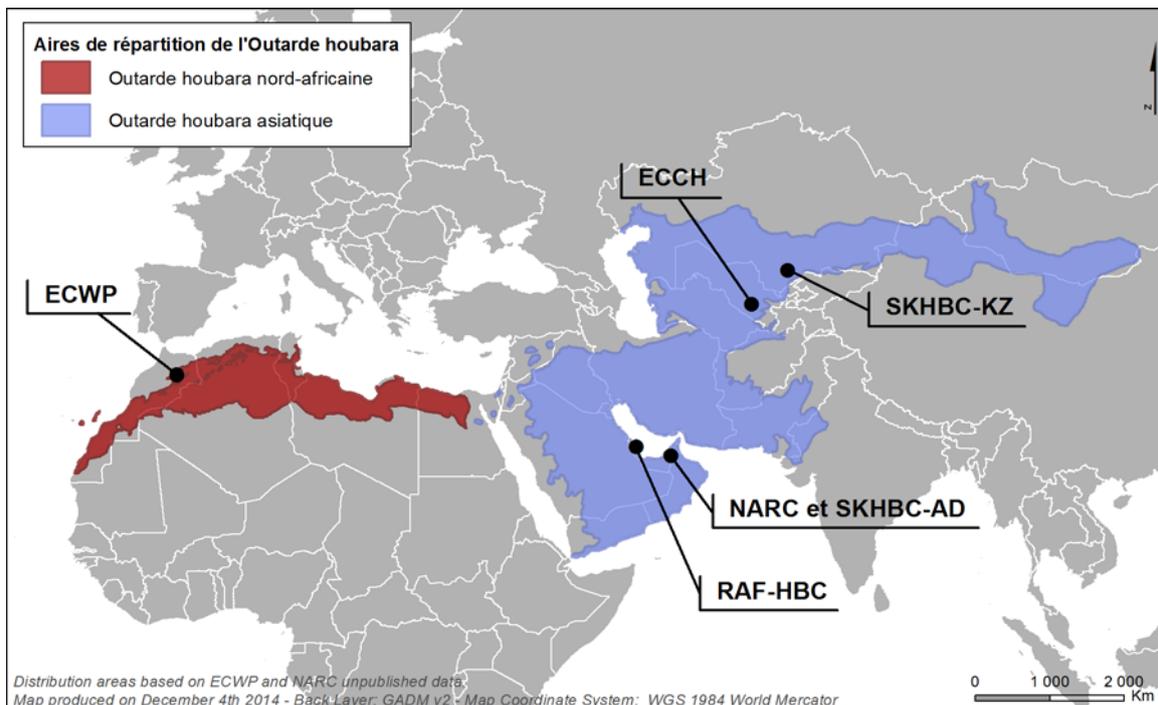


Figure 8. Aires de répartition des deux espèces d'Outarde houbara et distribution des projets de conservation étudiés.

RENECO s'efforce de mener une stratégie de conservation cohérente sur l'ensemble des projets dont elle a la gestion. Cette stratégie a d'abord été développée à l'ECWP avec l'objectif principal de permettre le maintien de populations viables d'Outardes dans l'Oriental marocain, compatible avec la persistance d'une chasse traditionnelle, sous couvert d'une gestion cohérente des populations (152). Les quatre axes majeurs de cette stratégie, qui suivent les recommandations de l'IUCN (153) relatives à la réintroduction et au renforcement des populations, sont :

1. Entreprendre des recherches sur le terrain pour acquérir les connaissances essentielles à la biologie des espèces et évaluer la distribution des populations et leur statut.
2. Maintenir une population captive viable capable de produire des individus susceptibles d'être relâchés, tout en maintenant le potentiel génétique initial.
3. Identifier les zones favorables à la création de réserves naturelles et au renforcement des populations existantes.
4. Renforcer les populations sauvages par des relâchers réguliers.

Les autres projets gérés par RENECO s'appuient sur cette stratégie pour se développer et mener à bien la conservation de l'Outarde dans les régions où ils sont implantés. Par ailleurs, dans les pays où la communauté de fauconniers est importante,

un axe supplémentaire s'ajoute, qui consiste à lutter contre le braconnage et le trafic illégal d'Outardes par la mise à disposition pour les fauconniers d'Outardes issues d'élevages et destinées à l'entraînement des faucons. Depuis leur création, ces projets ont permis de relâcher 99302 outardes africaines et 37071 outardes asiatiques. Au Maroc, un taux de survie relativement important (plus de 50% de survie un an après le relâcher) (154) et la capacité des oiseaux à se reproduire dans la nature, combinée aux mesures de protection des populations (gestion de la chasse), ont permis de rétablir des populations viables au sein des zones d'intervention de l'ECWP. Les relâchers effectués par les autres projets sont encore trop récents pour évaluer correctement leur impact.

#### 4. Élevage

Des élevages d'outardes ont été développés dans les six projets de conservation susmentionnés. Les caractéristiques de ces élevages en termes d'effectif et de production d'oiseaux sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des élevages conservatoires d'outardes houbara.

Projet	Pays	Date de création	Espèce reproduite	Reproducteurs présents en 2014	Poussins produits en 2014
NARC SKHBC-AD	EAU	1989 2012	<i>C. macqueenii</i>	9211	23680
ECWP <sup>1</sup>	Maroc	1995	<i>C. undulata</i> <sup>2</sup>	9276	20109
ECCH	Ouzbékistan	2007	<i>C. macqueenii</i>	1653	1153
SKHBC-KZ	Kazakhstan	2008	<i>C. macqueenii</i>	1625	1253
RAF-HBC	Qatar	2013	<i>C. macqueenii</i>	1395	1272

<sup>1</sup> L'ECWP est constitué de deux sites d'élevage : Enjil et Missouri, distants de 50 km.

<sup>2</sup> *C. macqueenii* a également été élevée et reproduite à ECWP de 2006 à 2012 afin de constituer un stock de reproducteurs transféré intégralement aux Émirats Arabes Unis en 2012.

Les élevages sont implantés dans des pays de l'aire de répartition de l'Outarde et, à l'exception du projet kazakh, sur des zones où des populations d'outardes sont présentes naturellement. Ils sont tous construits dans des zones désertiques (NARC, RAF-HBC et SKHBC-AD) dont la végétation est extrêmement clairsemée ou dans des zones steppiques (ECWP, ECCH et SKHBC-KZ) dont la végétation est rase et éparse (Figure 9). Les climats de ces zones sont qualifiés de semi-aride à aride et les élevages sont construits dans des zones à très faible densité humaine et loin des grandes agglomérations.

La mise en défens systématique des sites ainsi que les modifications anthropiques liées à leurs aménagements (zone d'irrigation, de détente pour le

personnel résident, cultures de luzerne pour nourrir les outardes...) ont permis à la végétation de se développer et de former un couvert plus dense qu'à l'extérieur des sites, offrant des ressources et des zones de refuge et de reproduction à diverses espèces animales, vertébrées et invertébrées.



Figure 9. Photo aérienne du site d'Enjil, à l'ECWP, au Maroc. ©ECWP

Les sites sont conçus avec toutes les infrastructures nécessaires à une certaine autonomie et différentes zones peuvent y être distinguées : les zones administratives et logistiques (bureaux, garages, buanderies), les zones privées et récréatives (logement du personnel, restaurants, lieux de détente, jardins...) et enfin les zones d'élevage (bâtiments et unités d'élevage, incubation, clinique, laboratoire, élevages d'insectes et cultures de luzerne). Les structures d'élevage à proprement parler sont divisées géographiquement et fonctionnellement en unités dédiées chacune à des phases d'élevages et des filières différentes. Suivant l'unité d'élevage et le site, les oiseaux peuvent être hébergés en bâtiment ou à l'extérieur, dans des batteries, des cages ou des grandes volières extérieures (Figure 10). D'une manière générale, les juvéniles<sup>5</sup> sont élevés par groupe de 6 à 12 individus dans des cages ou des volières et les adultes<sup>6</sup> individuellement dans des batteries ou des cages. Les densités d'oiseaux dans les unités

---

<sup>5</sup> Le terme juvénile désigne ici un oiseau depuis sa naissance jusqu'à son relâcher dans la nature ou, pour un oiseau destiné à être reproducteur, à son transfert dans le stock de reproducteurs, ceci correspondant à un âge moyen de 9 mois.

<sup>6</sup> Le terme adulte désigne ici un oiseau qui a quitté la phase juvénile.

d'élevage restent relativement faibles par rapport à ce qui est observé en élevage avicole classique.



Figure 10. Cages de reproducteurs en extérieur (1) et en bâtiment (2), batteries de reproducteurs (3), volières pour la préparation des oiseaux au relâcher (4). ©ECWP et IFHC

Les populations captives de chaque projet sont issues de populations fondatrices constituées suite à des collectes d'œufs autorisées et réalisées plusieurs années de suite en Algérie et au Maroc pour l'ECWP, au Pakistan, en Iran, au Yémen et au Kazakhstan pour le NARC, le RAF-HBC et le SKHBC-AD, au Kazakhstan pour le SKHBC-AD et en Ouzbékistan pour l'ECCH. La gestion génétique de ces populations captives vise à maximiser la représentation des fondateurs. En d'autres termes, tous les efforts sont faits pour éviter la sélection de certains génotypes et pour préserver la diversité génétique d'origine (155). À partir de ces populations fondatrices, la première phase de développement des projets de conservation a été d'augmenter la population captive afin d'obtenir, en un nombre limité de générations, un nombre suffisant de reproducteurs captifs permettant une production importante d'oiseaux destinés à renforcer les populations sauvages. Cette phase, toujours en cours au SKHBC-KZ et à l'ECCH, est terminée à l'ECWP, au NARC, au RAF-HBC et au SKHBC-AD qui produisent désormais un surplus important d'individus destinés à renforcer les populations sauvages et dans une moindre mesure à être donnés aux fauconniers afin de lutter contre le braconnage et le trafic d'oiseaux sauvages.

Afin d'optimiser la gestion génétique et la reproduction des outardes en captivité, des techniques de reproduction et d'élevage artificiels sont utilisées (124). Durant la saison de reproduction, qui s'étale de janvier à juin, la semence des mâles est collectée et analysée avant d'être utilisée pour inséminer les femelles. Les œufs pondus sont prélevés et incubés artificiellement afin de provoquer chez la femelle une ponte de remplacement. Cette technique permet une production de quatre à cinq pontes par saison de reproduction, le pic de ponte étant observé entre avril et mai suivant les sites. Les poussins sont ensuite élevés à la main suivant un protocole adapté à leur devenir :

- Oiseaux destinés à renforcer les populations sauvages : ils sont élevés avec pour objectif d'être relâchés dans la nature entre les âges de trois mois et d'un an tout en ayant des chances de survie maximales. Pour ce faire, le contact avec ces oiseaux est limité au maximum et tout le protocole d'élevage est orienté vers l'acquisition d'un comportement sauvage, l'apprentissage de la recherche de nourriture, et une habitude physiologique à l'absence de source d'eau libre. Ces oiseaux sont, dès l'âge d'un mois, placés par petits groupes dans de grandes volières extérieures sur sol naturel et avec une intervention humaine limitée. Les oiseaux destinés à être donnés aux fauconniers pour l'entraînement de leurs oiseaux sont élevés selon ce même protocole.
- Oiseaux destinés à renouveler le cheptel de reproducteurs captifs : ils reçoivent dès leur éclosion une imprégnation forte et sont habitués à la présence humaine. L'objectif est d'habituer ces oiseaux aux conditions de captivité et de les rendre aptes à la reproduction artificielle. Ces oiseaux sont constamment maintenus en cage ou batterie, sur litière artificielle et les interventions humaines sont importantes.

L'élevage des poussins à la main durant les premières semaines de vie ainsi que la gestion artificielle de la reproduction et de l'incubation impliquent un nombre très important d'intervenants sur la plupart des phases d'élevage. À titre d'exemple, ECWP a employé pendant le premier semestre 2014 plus de 650 personnes dédiées uniquement à l'élevage des oiseaux. Malgré le grand nombre de reproducteurs maintenus en captivité et la production importante de poussins sur chaque projet, les oiseaux sont tous suivis individuellement. Chaque individu a un identifiant qui lui est propre et toutes les données relatives à sa croissance, ses performances de reproduction, ses

déplacements et son état de santé sont collectées selon des protocoles stricts, et archivées dans une base informatique dédiée.

## 5. Gestion sanitaire

Depuis la création du premier projet de conservation en 1986 en Arabie Saoudite, diverses maladies des outardes en captivité ont été décrites et ont fait l'objet d'assez nombreuses publications (138,156–161). Il est admis que les outardes, lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions de captivité adéquates, sont davantage sujettes aux traumatismes et maladies métaboliques qu'aux maladies infectieuses (138,156,159). Ainsi en 2013 au NARC et au SKHBC-AD, les maladies infectieuses ne comptaient chez les juvéniles et les adultes reproducteurs que pour 26% des diagnostics ante-mortem établis (162) ; à ECWP ces taux étaient respectivement de 13% chez les juvéniles et 20% chez les adultes reproducteurs (163). Parmi les causes infectieuses, une large majorité est attribuable à des infections bactériennes secondaires (colibacilloses, infections à *Enterococcus* spp. et à *Staphylococcus* spp., salmonelloses dues à des sérovars autres que *Salmonella Pullorum/Gallinarum*...) et les infections primaires, qu'elles soient virales ou bactériennes, sont en général relativement rares.

Cependant, à certaines occasions, les maladies infectieuses peuvent provoquer une morbidité et une mortalité très importantes sur des outardes captives ou présenter un risque majeur pour les projets de conservation. Trois cas de figure sont à considérer. Le premier, qui est décrit depuis longtemps, concerne les oiseaux issus du braconnage et du trafic illégal (138,156). Transportés et maintenus dans des conditions sanitaires pauvres, au contact d'autres espèces aviaires, et soumis à un stress important, ces oiseaux deviennent particulièrement sensibles à diverses maladies, la maladie de Newcastle et la variole aviaire étant les plus communément décrites (164). C'est d'ailleurs sur un groupe d'outardes asiatiques illégalement importés en Arabie Saoudite pour l'entraînement de faucons qu'ont été décrits les seuls cas d'influenza aviaire hautement pathogènes à H5N1 sur cette espèce (165). Le second cas de figure concerne l'introduction d'agents infectieux dans des lots d'oiseaux captifs particulièrement sensibles, généralement des poussins. Ainsi en 2012, l'introduction d'origine inconnue d'une souche de *Salmonella* Enteritidis sur un lot de poussins à l'éclosion à NARC a provoqué la mort de plus de 45% des poussins durant leurs deux premières semaines de vie (166). Enfin le troisième cas de figure, plus spéculatif mais devant être pris en considération, concerne l'apparition de manquements ou de défauts dans les mesures de biosécurité, et ce particulièrement lors d'augmentation de taille et d'intensification des

élevages. Dans cette situation des agents infectieux, même modérément pathogènes, pourraient pénétrer, disséminer et persister au sein des élevages. Cette dernière situation est d'autant plus préoccupante que la grande majorité des données acquises sur les outardes l'ont été sur des effectifs limités, ne permettant pas une évaluation correcte de l'impact potentiel de ces maladies et l'obtention de données épidémiologiques solides. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'aucune étude épidémiologique n'a été publiée sur l'Outarde, la plupart des publications ne faisant que rapporter des cas cliniques sur de petits groupes d'individus.

Afin de prévenir l'introduction, l'apparition et la persistance de maladies infectieuses dans les élevages conservatoires, une stratégie sanitaire a été définie et est appliquée et régulièrement évaluée sur les sites d'élevage. Cette stratégie s'appuie sur deux axes principaux.

### *Épidémiosurveillance*

Un programme d'épidémiosurveillance est mis en place avec pour objectifs d'évaluer les risques sanitaires auxquels sont exposés les élevages, de détecter précocement l'apparition de maladies et de démontrer l'absence ou à défaut d'évaluer l'importance de certaines maladies dans les élevages. Ce programme est appliqué sur les oiseaux captifs, l'avifaune sauvage et à terme la volaille domestique, ainsi que sur l'environnement (infrastructures, aliments, eau, personnel). Divers outils sont utilisés pour répondre à ces objectifs :

- Programme de dépistage et surveillance événementielle ciblant les principales maladies infectieuses avérées ou potentiellement préoccupantes chez l'Outarde (maladie de Newcastle, variole aviaire, influenza aviaire hautement pathogène, mycoplasmoses, salmonelloses, mycobactérioses aviaires).
- Surveillance non spécifique reposant sur l'analyse des bases de données et le calcul de différents indicateurs (taux de morbidité et mortalité, distribution des diagnostics...) et sur la réalisation d'hygiénogrammes sur l'environnement.
- Développement de laboratoires in-situ et création d'un réseau de laboratoires partenaires permettant d'une part de réaliser les analyses prévues par les programmes et d'autre part d'explorer efficacement toute anomalie détectée.

## *Prophylaxie*

La prophylaxie appliquée sur les sites d'élevage vise à limiter l'introduction, la dissémination et la persistance d'agents pathogènes pour l'Outarde. Afin de répondre à ces objectifs, différentes mesures sont mises en place. La conception et l'organisation des élevages permettent de définir des unités épidémiologiques regroupant les oiseaux par filières et catégories d'âge. Ces unités sont séparées géographiquement et possèdent chacune du personnel et du matériel dédié. Leur accès se fait via des vestiaires et l'utilisation de vêtements spécifiques. Chaque unité est elle-même divisée en sous-unités hébergeant un nombre plus limité d'oiseaux et offrant ainsi la possibilité de confiner une zone contaminée. Les flux d'oiseaux, de matériel, de personnel et des divers extrants (déchets, litières sales, cadavres...) sont identifiés et contrôlés entre unités et sous-unités et à l'interface élevage / extérieur. Ces flux sont contrôlés via l'application de marches en avant, l'utilisation de sas, de véhicules dédiés et l'application de mesures de désinfection aux interfaces entre unités. L'utilisation de protocoles de nettoyage et désinfection, un programme de lutte contre les espèces nuisibles, l'application de vides sanitaires réguliers et des efforts pour limiter l'accès aux infrastructures à l'avifaune sauvage complètent ces mesures.

À cette prophylaxie sanitaire, s'ajoute un programme de prophylaxie médicale ciblant la maladie de Newcastle, la variole aviaire et les helminthoses intestinales. Tous les juvéniles reçoivent une première vaccination et un premier traitement antiparasitaire à l'âge d'un mois puis un rappel à deux mois. Un rappel annuel est administré à tous les reproducteurs (juvéniles et adultes) en fin d'année. La vaccination contre la maladie de Newcastle utilise un vaccin vivant atténué (souche HB1) ou inactivé, suivant le projet, pour la primo-vaccination puis uniquement un vaccin inactivé pour les rappels de primo-vaccination et annuels. Pour la vaccination contre la variole aviaire, un vaccin vivant atténué (souche canarypox virus KP) est utilisé pour toutes les vaccinations. Enfin, les molécules utilisées pour les traitements antiparasitaires dépendent des contextes locaux à chaque projet et sont choisies en fonction des parasitismes rencontrés.

### **6. Variole aviaire et Outarde houbara**

Le premier cas de variole aviaire sur une Outarde a été décrit dans un élevage conservatoire en Arabie Saoudite en 1989 (115). L'oiseau infecté, âgé de trois mois, présentait des lésions diphtériques dans la cavité orale et la trachée et une congestion

trachéale, pulmonaire, hépatique et splénique. Un avipoxvirus a été isolé par culture sur CAM à partir des lésions trachéales et un paramyxovirus aviaire de type 1 été isolé sur œuf embryonné à partir des lésions pulmonaires et spléniques. Des coïnfections bactériennes ont également été notées sur cet oiseau. L'auteur conclut qu'il s'agit du premier cas de coïnfection variole aviaire / maladie de Newcastle et de la première description de cette forme de variole aviaire sur une Outarde. Il rapporte cependant que des cas de variole aviaire cutanée ont toujours été observés dans l'élevage sous forme « d'infections latentes », suggérant que la maladie est observée chez cette espèce depuis la création du projet de conservation en 1986. En revanche, il mentionne qu'à cette époque, aucune observation de variole aviaire n'avait été faite sur des outardes sauvages (157). D'autres auteurs suggèrent que la présence de variole aviaire sur les outardes captives dans les pays du Golfe est connue depuis de nombreuses années (167) et rapportent le cas d'un oiseau sauvage séropositif pour des anticorps anti-avipoxvirus bien que ne présentant aucun signe de variole aviaire (168). À travers les rapports décrivant ces cas (

Tableau 2), deux situations générales apparaissent : l'existence endémique de la maladie dans certains élevages conservatoires, avec une morbidité et une mortalité faibles (169,170), et l'apparition d'épizooties avec une mortalité importante sur des lots d'oiseaux braconnés en Asie et importés illégalement dans les pays du Golfe (164,167). Une épizootie avec une mortalité importante sur des juvéniles (49%) a toutefois été rapportée dans un élevage conservatoire, à Agadir au Maroc en 2004 mais l'auteur ne précise pas les conditions zootechniques ni le statut vaccinal des oiseaux, suggérant seulement que les densités d'oiseaux étaient assez élevées (171).

Tableau 2. Synthèse des principaux épisodes publiés de variole aviaire sur des outardes houbara.

Année	Pays	Origine et nombre d'oiseaux	Forme de variole aviaire	Morbidité	Mortalité	Références
1989-1994	Arabie Saoudite	Élevage conservatoire	Cutanée, rarement diphtérique	Faible	Faible	(157,166)
1992-1994	EAU	Élevage conservatoire, n=278	Cutanée	2%	-	(155)
1992-1994	EAU	Trafic illégal, n=208	-	43%	-	(155)
1993	Bahreïn	Trafic illégal, n=123	Cutanée	-	100%	(167)
1996	Pakistan	Trafic illégal, n=1500	-	-	25%	(171)
1997	Pakistan	Trafic illégal, n=1400	-	-	22%	(171)
1998	EAU	Trafic illégal, n=34	Cutanée, diphtérique et septicémique	-	47%	(163)

1998	EAU	Trafic illégal, n=95	-	-	49%	(171)
2004	Maroc	Élevage conservatoire, n=1520	Cutanée, diphtérique et septicémique	-	2% (adultes) à 49% (juvéniles)	(170)

Les facteurs de risque de la variole aviaire chez l'Outarde qui sont rapportés dans ces publications sont de mauvaises conditions zootechniques et sanitaires, de fortes densités, le stress, l'âge, les traumatismes cutanés et les coïnfections, celles-ci ayant été diagnostiquées dans la majorité des épizooties (trichomonose, aspergillose, salmonellose, maladie de Newcastle, réovirose, adénovirose...) (171,172). Hors épizootie, la variole aviaire est surtout observée sous sa forme cutanée avec des lésions « classiques » sur les pattes, le bec et les paupières. Lors d'une épizootie ayant causé la mort de tous les oiseaux infectés, une forme cutanée particulière ne se manifestant que par des lésions prolifératives sur les paupières a été rapportée (167). Il est intéressant de noter que dans au moins deux épizooties, dont celle d'Agadir en 2004, les trois formes de variole aviaire ont été diagnostiquées, la forme septicémique ayant auparavant été très peu décrite sur d'autres espèces que les canaris. À cette occasion des lésions de broncho-pneumonie proliférative, de pancréatite granuleuse avec présence de corps de Bollinger et d'hépatite ont été observées sur les oiseaux morts de la forme septicémique (164,171). Outre une mortalité brutale causée par cette forme, les lésions varioliques peuvent entraver la locomotion lors d'atteintes des pattes ou gêner la prise alimentaire quand les paupières ou la cavité orale sont atteintes, provoquant un amaigrissement progressif pouvant aller jusqu'à l'inanition et la mort (157,167).

Des recherches d'anticorps anti-avipoxvirus ont été effectuées à quelques occasions sur des oiseaux morbides et sains par immunodiffusion sur gel d'agarose et séroneutralisation virale (164,168,173). Outre le fait que des oiseaux puissent montrer une séroconversion sans présenter de lésions, la principale conclusion de ces études est que la durée pendant laquelle des anticorps sont détectables par ces méthodes est assez courte, à priori moins de trois mois, et que certains individus peuvent se re-positiver quelques mois plus tard, suggérant ainsi qu'ils peuvent se débarrasser du virus puis être réinfectés (164). Ces tests sérologiques ont également permis d'apporter quelques éléments d'identification des souches virales infectant l'Outarde. Lors de l'épizootie de Bahreïn en 1993 (

Tableau 2), aucune réaction n'a été obtenue entre le virus isolé et des sérums anti-fowlpox, pigeonpox, canarypox et sparrowpox virus alors qu'un virus isolé en 1998 en Arabie Saoudite à partir d'une lésion cutanée sur une outarde a réagi avec un sérum anti-canarypox virus mais pas avec celui dirigé contre un fowlpox virus (157), mettant en évidence une proximité de cette souche avec les virus CNPV-like.

À partir de ces conclusions un test de protection croisée a été réalisé sur des canaris afin de valider la protection conférée par une souche vaccinale de canarypox virus (souche Kanapox) vis-à-vis de l'infection par la souche isolée (170). Les résultats du test ont montré une bonne protection sur les canaris et ont conduit à une modification des protocoles vaccinaux en élevages conservatoires d'outardes. L'utilisation d'une souche vaccinale de fowlpox virus pour la vaccination (174) a donc été remplacée par la généralisation de la vaccination avec une souche vaccinale de canarypox virus et, au moins dans certains élevages, l'efficacité de ce changement a été

validée par la disparition totale de variole aviaire sur les outardes (159). Suite à l'épizootie d'Agadir en 2004, un nouveau vaccin a été développé à partir d'une souche dénommée DuHoPo, isolée sur une outarde en 1998. Des infections expérimentales sur des outardes ont permis de valider ce vaccin vis-à-vis de la souche responsable de cette épizootie. Cependant aucune information précise sur la souche utilisée n'est disponible, notamment quant à son originalité par rapport à la souche vaccinale de canarypox virus (173). Il est à noter à ce propos que jusqu'ici, très peu d'informations étaient disponibles sur les souches d'avipoxvirus isolées sur des outardes et seules deux séquences étaient disponibles sur GenBank (44) : une séquence du locus P4b d'un virus isolé sur une outarde aux Émirats Arabes Unis et une séquence du locus fpv140 d'un virus isolé sur une outarde au Maroc. Toutes deux se positionnent dans le sous-clade B1 où l'on retrouve la majorité des souches isolées sur canaris, confirmant les résultats sérologiques obtenus sur le virus isolé en 1998 en Arabie Saoudite.

L'impact économique de la variole aviaire dans les élevages avicoles est important. Or, la mortalité dans les élevages d'outardes est négligeable avec des formes cutanées souvent peu graves et un traitement précoce et individuel des oiseaux permettant de limiter l'impact de la maladie. Les effets sur la parade des mâles (indicateur fiable de la qualité reproductive et de leur statut immunitaire) et sur la ponte des femelles est généralement négligeable (98). Ces observations ont été faites sur un faible nombre de cas étant donné la faible morbidité due à la maladie, et une étude sur plusieurs années avec un nombre de cas plus élevé permettrait de les confirmer. De plus, les conditions de captivité ont certainement influencé de manière positive la ponte des femelles par rapport aux conditions sauvages, avec notamment une disponibilité systématique et aisée des ressources alimentaires. Un impact positif de l'infection a même été étonnamment observé, bien que cela soit probablement dû à la manière dont la maladie a été gérée plutôt qu'à la maladie elle-même, avec un suivi plus attentif des oiseaux infectés qui a pu renforcer leur imprégnation et diminuer ainsi leur stress, souvent responsable d'une baisse de l'immunité (175–177). La nécessité d'une prise en charge individuelle et précoce est ici mise en exergue puisqu'elle permet de stopper le cycle viral et de limiter les impacts de la maladie.

Ces impacts peuvent en effet s'avérer dramatiques, notamment à cause de la réintroduction d'outardes infectées dans leur habitat naturel, mais ne présentant pas ou pas encore de signes cliniques. En effet, il a été montré que des espèces naïves pouvaient

être infectées, et que cela pouvait se traduire par une forte mortalité (64,71,113). Ainsi, un test sérologique permettant une détection précoce de l'infection avant l'apparition de signes cliniques, et permettant de suivre la cinétique en anticorps serait un atout majeur pour éviter le relâché d'oiseaux porteurs, et pour avoir plus d'informations sur la production d'anticorps des individus malades.

Dans le cadre d'investigations sur les avipoxvirus, des amplifications virales sur cellules peuvent être réalisées. Cela est un bon support d'étude pour les tests sérologiques, avec la disponibilité d'antigènes d'avipoxvirus sur cellules aviaires. Ces antigènes peuvent servir à mettre en évidence la présence d'anticorps chez des individus infectés avec des techniques sérologiques comme des réactions d'immunofluorescence (IFI), des radioimmunosorptions (RIA), ou des tests ELISA. Nous avons donc tenté de mettre en place une technique adaptée à nos expérimentations permettant de mettre en évidence la présence d'anticorps chez des outardes atteintes de variole aviaire. En effet, cela s'est avéré difficile jusqu'ici, la réponse immunitaire principale de l'Outarde face à cette maladie semblant être de type cellulaire (7,19,56). Ainsi, cette technique pourrait être une première étape dans la réalisation de tests plus reproductibles et utilisables sur le terrain, comme des tests ELISA par exemple, et servir de référence pour des comparaisons. Nous avons utilisé une réaction d'immunopéroxydase, dont le principe repose sur la détection d'anticorps sanguins anti-avipoxvirus par des anticorps secondaires couplés à une peroxydase. Ces complexes anticorps primaires-anticorps secondaires, liés à des antigènes provenant de virus amplifiés *in vitro* sur cellules aviaires, forment des amas visibles au microscope sous la forme de points noirs. Ainsi, la présence d'anticorps peut être détectée précocement. Le but est également de suivre la cinétique en anticorps au cours du temps, afin de mettre en évidence la durée de persistance de ces anticorps sanguins, information utile à des enquêtes épidémiologiques ou études de protection. Des protocoles vaccinaux plus précis, notamment en termes de fréquence et de nombre de rappels nécessaires pourraient également être mis en place grâce à ces informations.

### **C. Objectifs de recherche**

Cette thèse s'inscrit dans le cadre général de l'acquisition de connaissances sur la biologie de l'Outarde en captivité, dans le but de pérenniser les efforts de conservation de ces espèces en améliorant et en sécurisant des élevages conservatoires. Elle est complémentaire à la thèse effectuée par Guillaume LE LOC'H traitant de l'épidémiologie

moléculaire des avipoxvirus chez l'Outarde houbara (98). Bien que la variole aviaire soit connue chez les outardes depuis la création des premiers projets de conservation, peu de travaux ont été menés pour étudier la maladie chez ces espèces et, jusqu'il y a une dizaine d'année, un consensus existait quant au fait que la maladie n'était qu'une préoccupation sur les oiseaux issus du braconnage et du trafic illégal (172). *A contrario*, il était considéré que bien que présente dans la majorité des élevages conservatoires, elle ne s'y manifestait que de façon sporadique, son apparition étant probablement liée à l'abondance saisonnière d'insectes vecteurs, et que la protection des oiseaux à l'aide une souche vaccinale de canarypox virus était une mesure efficace et suffisante pour contrôler la maladie (159,170). La description en 2004 à Agadir d'une épizootie de variole aviaire a cependant montré que cette maladie pouvait également être une préoccupation en élevage (171), bien que peu d'enseignements aient finalement été tirés de cette épizootie.

Depuis quelques dizaines d'années, la taille des élevages conservatoires d'Outardes a considérablement augmentée et certaines structures hébergent maintenant jusqu'à 9000 adultes reproducteurs et produisent annuellement 20000 poussins. Cette augmentation de taille s'est accompagnée d'une amélioration des processus d'élevage mais également d'une standardisation indispensable de ces élevages, les rapprochant par certains aspects des élevages avicoles industriels. La gestion sanitaire de troupeaux a ainsi fait son apparition, la gestion clinique individuelle perdurant mais étant désormais insuffisante pour garantir la sécurité sanitaire des élevages, bien qu'il ait été montré qu'elle s'avérait indispensable malgré un contexte d'intensification grandissante. La connaissance de l'épidémiologie de la variole aviaire dans les élevages à grande échelle a été étudiée dans la thèse de Guillaume LE LOC'H (98) à laquelle cette thèse est associée. Les données collectées à travers le travail quotidien des équipes vétérinaires ont permis de dresser un état des lieux en précisant les grandes caractéristiques de la variole aviaire chez les deux espèces d'Outarde : importance de la maladie, temporalité, différences géographiques et catégories d'oiseaux concernés ; ceci afin d'identifier de potentiels facteurs de risque et d'ajuster en conséquence la stratégie sanitaire. Il a ainsi été montré que malgré l'utilisation systématique d'une souche vaccinale de canarypox virus pour protéger les oiseaux, des épisodes de variole aviaire étaient régulièrement observés, posant ainsi la question de l'efficacité de la stratégie sanitaire, et notamment de la souche vaccinale utilisée. La variole aviaire fait l'objet d'une gestion sanitaire et médicale stricte depuis de

nombreuses années : vaccination de tous les oiseaux, prise en charge, isolement et traitement de chaque individu malade. Les impacts financier et logistique de cette gestion sont connus. L'impact direct de la maladie sur les oiseaux et donc sur le succès des programmes de conservation a également été évalué, et il a été montré qu'il était mineur, tout comme la morbidité et la mortalité, avec toutefois des disparités entre adultes et juvéniles dans certains élevages.

La phylogénie et l'évolution des avipoxvirus ont également été étudiées dans la thèse de Guillaume LE LOC'H (98), afin d'apporter des éléments de compréhension de ces échecs vaccinaux et plus généralement de mieux connaître la diversité des souches virales circulant dans les différents projets de conservation. Cela a fourni des pistes de réflexion sur les ajustements à apporter à la gestion sanitaire de la variole aviaire chez l'Outarde captive.

Pour préciser les possibles causes des échecs vaccinaux et plus généralement pour dépasser les limites de l'analyse rétrospective des données d'élevages et biologiques collectées sur les différents projets de conservation, il est apparu que l'expérimentation était indispensable afin d'acquérir d'avantage de connaissance sur cette maladie. Cette thèse s'est attachée à étudier et caractériser l'une des souches virales responsable de formes cutanées de variole aviaire chez l'Outarde houbara captive, cette forme étant la plus couramment rencontrée.

Dans un premier temps, l'objectif a été d'isoler et d'amplifier différents virus d'intérêt afin d'en disposer pour réaliser les infections expérimentales. Des séquençages P4b et fpv140 ont également été réalisés afin de caractériser ces virus.

Dans un second temps, un modèle expérimental de variole aviaire chez l'Outarde houbara en captivité a été développé en utilisant un des virus précédemment isolé, et des outils de diagnostic et de suivi de l'infection *in vivo* et *ex vivo* ont été mis en œuvre. Ce modèle a permis d'acquérir des connaissances supplémentaires sur la biologie de l'infection et ainsi de disposer de nouveaux éléments de compréhension de l'épidémiologie de la variole aviaire chez l'Outarde houbara.

Il est apparu évident qu'une détection précoce de la variole aviaire était nécessaire à sa prise en charge et à son endiguement au sein d'un élevage. Or, bien que la maladie soit détectée dès les premiers signes cliniques, et prise en charge suffisamment tôt, ce qui permet d'en limiter l'impact, il semble logique qu'une détection

avant l'apparition des premiers signes cliniques serait un avantage certain. Ainsi, un test utilisant une technique d'immunopéroxydase a été abordé dans une troisième partie, avec pour but de mettre en place un outil diagnostique de suivi de l'immunité humorale. Ceci offre aussi la possibilité de mener des études de protection vaccinale.

Les différents enseignements acquis permettent de fournir des recommandations sur la stratégie médicale et sanitaire de prophylaxie de la variole aviaire en élevages conservatoires d'Outardes, ce qui est discuté dans la dernière partie.

## Chapitre II : Partie expérimentale :

Les divers virus étudiés étant génétiquement différents, leur ADN a été extrait afin d'être séquencé. Ces virus n'ayant jamais été amplifié *in vitro* auparavant, plusieurs types cellulaires ont été testés et des cinétiques de croissance virale des différentes souches d'avipoxvirus étudiées ont été effectuées afin de connaître le système d'amplification viral le plus efficace. Le type cellulaire le plus adapté à l'amplification virale a ainsi pu être mis en évidence.

La problématique était ensuite de caractériser l'un des virus responsable de cas de variole chez l'Outarde houbara en effectuant une infection expérimentale. Pour cela, le virus a été extrait de lésions de variole provenant d'une outarde houbara élevée au Maroc puis amplifié *in vitro*. Une fois amplifié, le virus a été partiellement purifié afin de produire un inoculum pour l'infection expérimentale. Suite à cela, des études sérologiques ont été faites et un test utilisant une technique d'immunopéroxydase a été mis en place afin de permettre la détection d'oiseaux infectés.

### A. Extraction du virus, amplification virale et cinétique de croissance

#### 1. Contexte, problématique et objectifs

Des lésions caractéristiques de formes cutanées de variole aviaire observées sur des oiseaux élevés dans les différents centres de conservation de l'espèce, notamment au Maroc sur les sites d'Enjil et de Missouri, ont été prélevées et envoyées au laboratoire de l'équipe de virologie de l'UMR IHAP, à l'ENVT, afin d'en isoler les virus.

La problématique était ici de produire *in vitro* les virus en quantité suffisante pour pouvoir d'une part étudier leur cinétique d'amplification, et d'autre part de produire des inoculums utilisables pour réaliser des infections expérimentales sur des oiseaux de l'ECWP, (centre d'Enjil, au Maroc). Pour ce second objectif la suspension contenant le virus devait être la plus pure possible, afin d'éviter tout signe clinique résultant d'un élément autre que le virus de l'inoculum.

#### 2. Matériel et méthodes

##### Choix des souches virales

##### (a) Travaux de laboratoire :

Des cinétiques de multiplication virale sur cellule *in vitro* ont été effectuées sur plusieurs souches virales. Ces souches ont été choisies afin de balayer au mieux les

différents scénarii observés dans les différents centres de conservation, que ce soit au Maroc ou dans les autres pays du Golfe. Ainsi, des souches virales de différents clades ont été sélectionnées sur la base d'une discrimination par les gènes P4b (Figure 11) et fpv140 (Figure 12).

Parmi celles-ci, sept souches virales ont été étudiées. Concernant la discrimination par le gène P4b, trois sous-clades différents ont été couverts avec ces sept virus, comme résumé dans la Figure 11:

- APV1 (CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009/LK021658), APV7 (CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011/LK021660) responsables d'une forme cutanée de variole aviaire chez des outardes marocaines, faisant respectivement partie des sous-clades B1 et B2 (toutes deux Canarypoxvirus-like) ;
- APV24 et APV66 (FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/066/201Z/LK021662), responsables respectivement d'une forme diphtérique de variole aviaire sur une outarde marocaine, et de formes cutanée et diphtérique sur une outarde émiratie, appartenant tous deux au sous-clade A2 (Fowlpox-like) ;
- APV64 et APV87(CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010/LK021650), respectivement responsables de formes cutanée et diphtérique de variole aviaire chez une outarde émiratie, et d'une forme cutanée de variole aviaire chez une outarde marocaine, appartenant toutes deux au sous-clade B1 (Canarypox-like) ;
- CPV-V (KC018038), la souche vaccinale, appartenant au sous-clade B1 (Canarypox-like).

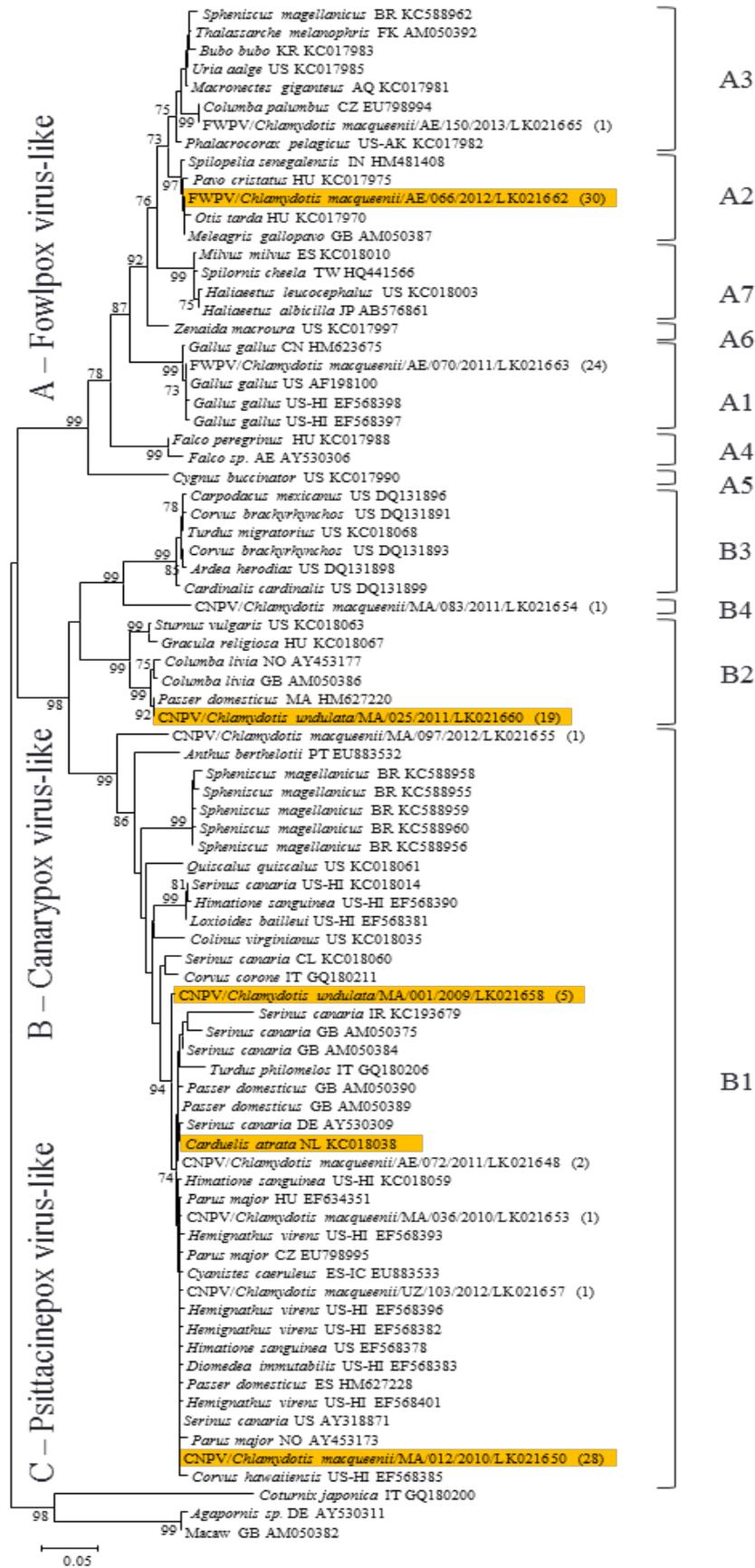


Figure 11: Arbre phylogénétique des avipoxvirus construit suivant une discrimination par le gène P4b

Concernant la discrimination par le gène fpv140, quatre sous-clades ont été couverts avec ces sept virus, comme résumé dans la Figure 12.

- APV1 (CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009/LK021677) et APV7 (CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/006/2011/LK021668) font toutes deux partie du sous-clade B2 (Canarypoxvirus-like) ;
- APV24 (FWPV/*Chlamydotis undulata*/MA/024/2011/LK021685) et APV66 (FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/066/2012/LK021681), appartenant respectivement au sous-clade A2 et A3 (Fowlpox-like) ;
- APV64 (CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/031/2010/LK021671) et APV87 (CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/077/2009/LK021680), appartenant toutes deux au sous-clade B1 (Canarypox-like) ;
- CPV-V (AM071513), la souche vaccinale, appartenant au sous-clade B1 (Canatypox-like).

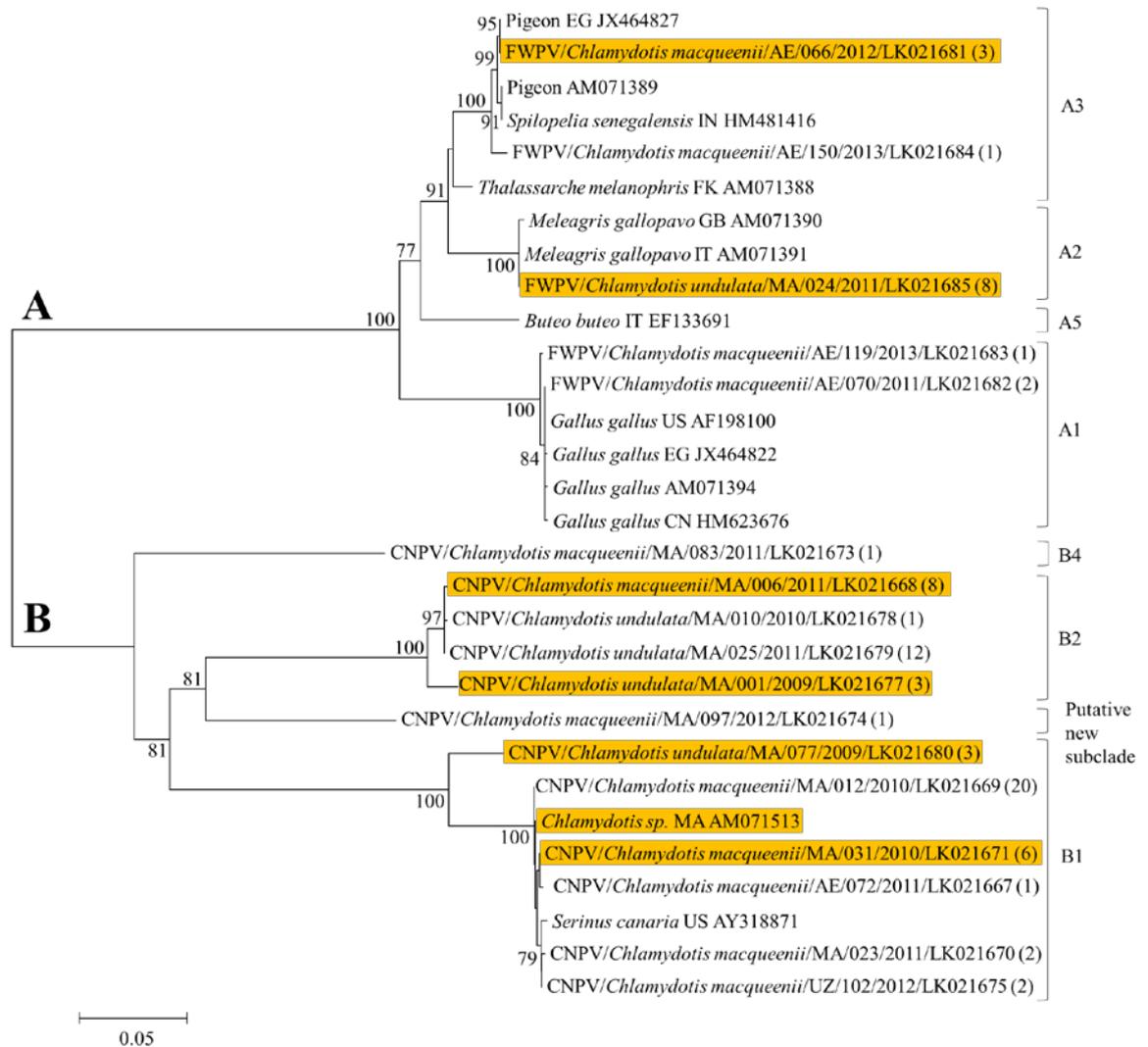


Figure 12: Arbre phylogénétique des avipoxvirus construit suivant une discrimination par le gène fpv140

Ainsi, nous balayons des souches fréquemment rencontrées au sein des élevages conservatoires marocains et des Emirats Arabes Unis, c'est-à-dire canarypox-like et fowlpox-like, appartenant à des sous-clades différents. Certaines souches virales étudiées sont identiques, mais isolées à partir de lésions d'outardes élevées dans des centres différents (au Maroc et aux EAU pour APV1 et APV7), ou responsables de signes cliniques différents (cutané et/ou diphtérique pour APV24 et APV66 d'une part, et APV64 et APV87 d'autre part).

Le Tableau 3 résume l'appartenance des différents virus étudiés à leurs clades et sous-clades suivant les différentes discriminations (gène P4b ou fpv140), ainsi que leur provenance et la forme de variole aviaire dont ils sont responsables.

Tableau 3: Résumé des caractéristiques des virus étudiés

Isolat	Clade	sous-clade P4b	sous-clade fpv140	Site	Espèce hôte	Forme de variole aviaire
APV001	CNPV	B1	B2	Maroc	<i>C. undulata</i>	cutané
APV007	CNPV	B2	B2	Maroc	<i>C. undulata</i>	cutané
APV024	FWPV	A2	A2	Maroc	<i>C. undulata</i>	diphthérique
APV064	CNPV	B1	B1	Emirats Arabes Unis	<i>C. macqueenii</i>	cutané et diphthérique
APV066	FWPV	A2	A3	Emirats Arabes Unis	<i>C. macqueenii</i>	cutané et diphthérique
APV087	CNPV	B1	B1	Maroc	<i>C. undulata</i>	cutané
CPV-V	CNPV	B1	B1	Vaccin	-	-

(b) Infection expérimentale :

L'infection expérimentale a été faite sur une unique souche virale. Cette souche devait répondre à plusieurs critères afin d'atteindre nos objectifs.

- La forme cutanée de variole aviaire étant la plus observée sur les outardes, la souche devait avoir été isolée à partir de lésions cutanées (Figure 13).
- L'étude se faisant au Maroc sur l'espèce africaine, une souche provenant des centres de conservation marocains élevant l'espèce africaine a été choisie. Toutefois, il était intéressant de sélectionner une souche identifiée sur les deux espèces d'Outarde;
- Appartenance au clade le plus fréquemment identifié chez l'Outarde, soit le clade B (virus CNPV-like) qui a été identifié sur tous les projets et est majoritaire au Maroc ;
- Proximité avec des souches sauvages. À ce titre, un seul avipoxvirus a été identifié sur un oiseau sauvage (un moineau domestique) au Maroc et il appartient au sous-clade B2 dans lequel on retrouve 24% des virus identifiés sur les outardes au Maroc;
- Souche se développant sur culture cellulaire et dont la croissance pouvait être évaluée ;
- Disponibilité du matériel biologique, c'est-à-dire souche issue d'une lésion importante permettant plusieurs isolements successifs si possible.

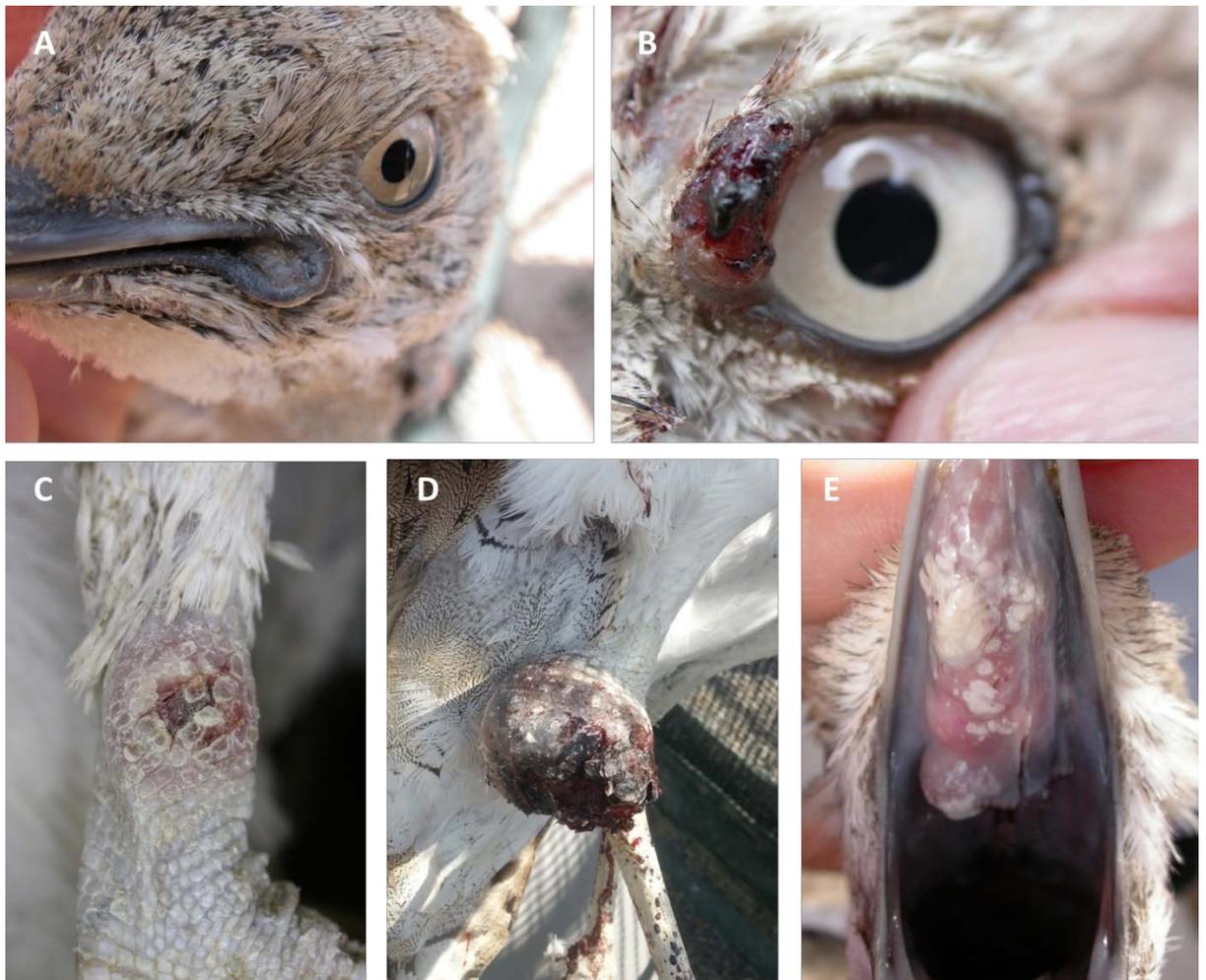


Figure 13: Lésions de variole aviaire chez des outardes houbara. Petite lésion cutanée à l'angle de la bouche (A), sur la paupière (B) et la patte (C), grosse lésion cutanée sur une patte (D) et lésion diphtérique sur les muqueuses de la cavité buccale (E).

Le choix s'est ainsi porté sur la souche CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/007/2011 identifiée sur le site de Missouri au Maroc en 2011 à partir d'une lésion cutanée d'une outarde africaine d'un an et appelée APV 7 dans cette thèse (cf. Figure 11).

#### *Extraction du virus à partir de lésions de variole aviaire*

Afin de produire un inoculum utilisable pour une infection expérimentale sur des outardes houbara au Maroc, des virus ont été extraits à partir de lésions de variole aviaire prélevées sur des outardes provenant de divers projets. Pour ce faire, une fois l'exérèse d'une lésion effectuée, celle-ci a été coupée en petits morceaux sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une lame de scalpel stérile, puis saupoudrée de sable de Fontainebleau et broyée à l'aide d'un pilon et d'un mortier. L'équivalent poids-poids de milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté de pénicilline (400 U/mL), streptomycine (400µg/mL) amphotéricine B (250µg/mL) a été utilisé pour faire

un premier lavage. Le mélange a été centrifugé 10 minutes à 500g. Le surnageant contenant les virus a alors été récupéré et identifié, et le culot éliminé (débris cellulaire et sable de Fontainebleau).

### *Amplification virale*

L'amplification virale a d'abord été effectuée dans des boîtes de six ou douze cupules de différentes tailles (respectivement P6<sup>7</sup> et P12<sup>8</sup>) tapissées d'une unique couche cellulaire, puis dans des flasques de surfaces croissantes au fur et à mesure des passages (F25<sup>9</sup>, F75<sup>10</sup>, Maxi<sup>11</sup>, Supermaxi<sup>12</sup>), elles aussi tapissées d'une unique couche cellulaire.

Systématiquement, des témoins négatifs (inoculation avec du milieu seul) et des témoins positifs (inoculation avec une souche vaccinale : souche canarypox virus KP, Poulvac P Canary, Pfizer) ont été effectués afin d'écartier tout biais d'interprétation.

Quatre types cellulaires différents ont été testés pour amplifier les virus *in vitro*, ceci afin d'identifier les cellules sur lesquelles chaque virus s'adaptait le mieux et pour lesquelles leur multiplication était la plus efficace. Ont été utilisés des cellules tumorales de caille (Quail Tumor 6 appelées QT6), des cellules de rein d'oie (Goose Kidney Toulouse appelées GKT), des fibroblastes embryonnaires de poussin (Chick Embryo Fibroblast, appelées CEF) et des fibroblastes embryonnaires de canard (Duck Embryo Fibroblast, appelées DEF). Pour chaque type cellulaire, les protocoles d'inoculation et le suivi de l'infection étaient identiques.

Des virus ont été prélevés sur différentes lésions, provenant de différents oiseaux et ont été nommés APVx dans un souci de simplification, où APV signifie « avipoxvirus » et x est un nombre donné. Pour l'amplification, APV1 et APV7 ont été utilisés, ainsi que CPV-V qui est la souche vaccinale utilisée comme témoin positif.

---

<sup>7</sup> Chaque puit a une surface de 9,6 cm<sup>2</sup>. Le volume final de milieu de culture utilisé est de 2 mL par cupule.

<sup>8</sup> Chaque puit a une surface de 4,8 cm<sup>2</sup>. Le volume final de milieu de culture utilisé est de 1 mL par cupule.

<sup>9</sup> Les F25 sont des flasques de 25 cm<sup>2</sup> de surface. Le volume final de milieu de culture utilisé est de 8 mL.

<sup>10</sup> Les F75 sont des flasques de 75 cm<sup>2</sup> de surface. Le volume final de milieu de culture utilisé est de 25 mL.

<sup>11</sup> Les « Maxi » sont des flasques de 175 cm<sup>2</sup> de surface. Le volume final de milieu de culture utilisé est de 40 mL.

<sup>12</sup> Les « Supermaxi » sont des flasques de 300 cm<sup>2</sup> de surface. Le volume final de milieu de culture utilisé est de 80 mL.

Suite à l'isolement de ces premiers virus, d'autres cinétiques ont été réalisées afin de tester l'efficacité des différents systèmes. Pour cela, des virus provenant d'autres lésions ont également été utilisés : APV24, APV64, APV66 et APV87. Cela sera développé dans une partie dédiée.

#### (a) Inoculation virale

Les inoculations ont été effectuées qu'une fois la confluence des cellules dans le support (boîte ou flacon) suffisante, c'est-à-dire autour de 80%. Le milieu de culture des cellules a alors été précautionneusement retiré sous hotte à flux laminaire à l'aide de pipettes et pipeteurs électriques. La quantité d'inoculum variait en fonction de la surface du tapis cellulaire (150  $\mu$ L pour une P12, 300  $\mu$ L pour une P6, 1 mL pour une F25, 3 mL pour une F75, 5 mL pour une Maxi, 10 mL pour une Supermaxi). Après avoir confirmé que l'inoculum recouvrait la totalité de la surface cellulaire, les boîtes et les flasques ont été incubés durant 2h à 37°C. Du milieu DMEM supplémenté de sérum de veau foetal (SVF ; concentration finale de 2%) et complété comme précédemment avec de la pénicilline, de la streptomycine et de l'amphotéricine B a ensuite été introduit dans chaque cupule afin d'avoir un volume final adapté à chaque boîte (1 ml par cupule pour une P12, 2 mL par cupule pour une P6 et 8 mL dans un F25, 25 mL dans un F75, 40 mL dans une Maxi et 80 mL dans une Supermaxi). Les boîtes et flasques infectées ont été incubées à 37°C.

#### (b) Récolte et traitement des récoltes

Chaque boîte et flasque était quotidiennement observée au microscope et comparée avec les cupules ou flacons témoins négatifs (milieu de culture seul) et positifs (CPV-V) afin de noter la présence d'effets cytopathiques (ECP) ainsi que leur évolution. Ceux-ci se présentaient comme des amas plus ou moins circulaires de cellules colorées et rondes s'étendant au fil du temps, ainsi que des cellules rondes décollées du tapis cellulaire et flottant dans le milieu de culture (Figure 14). Le tapis cellulaire était parfois fortement dégradé par le virus et se décollait par lambeaux.

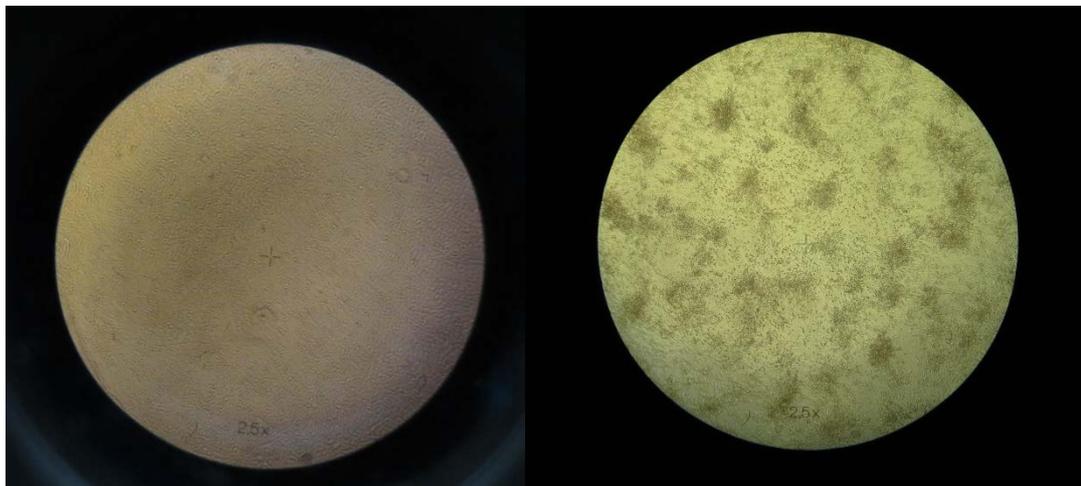


Figure 14: Cupule avant inoculation par CPV-V (gauche) et présentant des ECP (droite) plusieurs jours post-inoculation, vu au microscope, grossissement x10

Quand l'ECP était total ou que les tapis cellulaires n'étaient plus viables, les boîtes et flacons étaient congelés puis décongelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  trois fois afin de faire éclater les cellules, puis grattés et récoltés sous hôte. La suspension ainsi obtenue subissait plusieurs lavages successifs afin d'obtenir un nouvel inoculum avec lequel d'autres passages infectieux *in vitro* ont été effectués. Pour ce faire, le contenu des boîtes était centrifugé une première fois pendant 10 minutes à 300g et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant (S1) était à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. On obtenait alors le « surnageant net » et le culot C2. Le culot issu de la première centrifugation (C1) était lavé dans 10 mL de PBS 1x puis centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. On obtenait un culot C3 et un surnageant S2 utilisé pour rincer C2 avant une nouvelle centrifugation toujours dans les mêmes conditions, qui donnait un surnageant S3 et un culot C4 repris dans 4 mL de solution de TL10 (Tris pH 8,6 1 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L) avec inhibiteur de protéases. Le culot C3 était lui aussi repris dans 4 mL de solution de TL10 avec inhibiteur de protéase. Au final, on obtenait un « surnageant net », un surnageant S3 issu du lavage des culots et 2 culots C3 et C4 repris dans du TL10. Le « surnageant net » servait de nouvel inoculum pour d'autres passages d'infection sur cellules. Les culots étaient conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  afin de subir un passage au dounce dans le but de récupérer un maximum de virus.

### (c) Passage au dounce

Les culots récupérés sont traités au dounce afin d'éclater mécaniquement le reste des cellules et ainsi récupérer un maximum de virus. Pour ce faire, les culots repris dans du TL10 avec inhibiteurs de protéases sont laissés dans la glace à  $4^{\circ}\text{C}$  toute une

nuit (2 heures minimum sont nécessaires), le tout était ensuite broyé au douce dans la glace puis centrifugé 10 minutes à 3000 rpm et 4°C. Les culots ainsi composés uniquement de débris cellulaires étaient jetés et les surnageants conservés.

*Mise en place d'un outil d'étude de la cinétique de croissance virale : la PCR quantitative :*

Afin de suivre la cinétique de croissance virale lors des amplifications des différentes souches virales sur cellules, des PCR quantitatives utilisant une chimie SYBR-green ont été mises en place. Deux couples d'amorces différents ont été utilisés : pour APV7, un premier couple d'amorces a été dessiné pour amplifier une séquences de 162 nucléotides de l'ORF *CNPV185* (locus *fpv140*) commune à tous les avipoxvirus d'outardes du sous-clade B2 (98) : C185\_01F (5'-GGTGTAAACGTTAGGTCATCACA-3') et C185\_01R (5'-AGCATTACTTAGCGCATATCCT-3'). Pour CPV-V et APV1, les amorces utilisées ont été dessinées pour amplifier une séquence de 135 nucléotides de l'ORF *CNPV184* (locus *fpv140*) : C184\_02F (5'-AAACACGCCGCTCTAAACAG-3') et C184\_02R (5'-CCATCCGTCTCCTTCTCCTC-3').

Après une étape d'amplification par PCR à partir de l'inoculum avec les amorces C185\_01F et C185\_01R pour APV7 et C184\_02F et C184\_02R pour CPV-V et APV1, un amplicon de chaque virus a été cloné avec le kit StrataClone PCR Cloning (Agilent Technologies, La Jolla, USA) en suivant les instructions du fabricant. Trois clones, pour lesquels l'intégration de l'amplicon a été confirmée par PCR, ont été repiqués dans du milieu LB (Luria broth) additionné d'ampicilline (50 µg/mL). Après douze heures d'incubation à 37 °C, les plasmides ont été extraits avec le kit Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel, Düren, Germany) en suivant les instructions du fabricant puis dosés sur fluoromètre QuBit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Une gamme de plasmides allant de 10<sup>8</sup> à 10<sup>0</sup> plasmides/2 µL a ensuite été préparée par dilution sériée au 1/10<sup>ème</sup>.

La mise en place de la PCRq a été validée en testant la gamme préparée et en incluant deux témoins négatifs (eau) et un témoin positif (ADN extrait de l'inoculum). Chaque échantillon a été passé en duplicat. Les réactions ont été réalisées en utilisant le kit LigthCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany) sur un thermocycleur en temps réel LigthCycler 480 (Roche). Brièvement, 0,2µL de chaque amorce (10 µmol/L) ont été mélangés à 5 µL de Master Mix et 2,6 µL d'eau, et 2 µL d'ADN cible ont été ajoutés. Les conditions de réaction ont consisté en une dénaturation

initiale de 10 min à 95°C suivie de 40 cycles composés d'une dénaturation de 15 s à 95 °C et d'une étape commune d'hybridation et d'élongation de 40 s à 60 °C. Les courbes de dissociation ont ensuite été obtenues en appliquant aux amplicons un gradient de température de 65 °C à 97 °C. Par la suite, les PCR quantitatives ont été réalisées en incluant systématiquement au moins un témoin d'extraction, un témoin de contamination du mix de PCR et la gamme de plasmides. Tous les échantillons ont été dupliqués.

Les amorces utilisées pour CPV-V ont également été utilisées pour APV64 et APV87. Une gamme de plasmides allant de  $10^6$  à  $10^2$  copies de plasmide pour 2  $\mu$ L par des dilutions au 1/10<sup>ème</sup> a été préparée.

Pour APV24, la gamme a été préparée selon le même protocole que les deux gammes précédentes à partir du clonage d'un amplicon préalablement amplifié par PCR à partir de l'inoculum avec les amorces APV4b\_F et APV4b\_R. Ces amorces ont été dessinées pour amplifier une séquence de 550 nucléotides du gène fpv167 (locus P4b) commune à tous les avipoxvirus (42) : APV4b\_F : (5'-CAGCAGGTGCTAAACAACAA-3') et APV4b\_R : (5'-CGGTAGCTTAACGCCGAATA-3'). Une gamme de plasmides allant de  $10^8$  à  $10^2$  copies de plasmide pour 2  $\mu$ L par des dilutions sériées au 1/10<sup>ème</sup> a été préparée.

#### *Cinétique de croissance*

Afin de tester les cinétiques de croissance des virus sur différents types cellulaires, 50  $\mu$ L de surnageant de culture ont été prélevés chaque jour de J1 post inoculation jusqu'à récolte des P6. Ceci a été fait pour CPV-V, APV 1 et APV 7 sur QT6 et GKT dans un premier temps, puis pour CPV-V, APV 7, APV 24, APV 64, APV 66 et APV 87 sur QT6 et CEF dans un second temps.

##### (a) Première série de cinétique : CPV-V, APV1 et APV7 sur QT6 et GKT

Pour la première série de cinétique, seul un passage a été testé. Les amplifications ont été interrompues au bout de 7 jours pour les QT6 et 5 jours pour les GKT, et chaque boîte a été congelée puis décongelée à trois reprises à - 80°C afin de faire éclater les cellules et de libérer les virus, puis grattée et traitée au dounce selon le protocole précédemment décrit. Chaque prélèvement a ensuite subi une extraction d'ADN avec le kit One-4-all Genomic DNA miniprep (Bio Basic, Markham, Canada), en suivant les instructions du fabricant, puis une PCR quantitative en temps réel (PCRq) a été mise en place en utilisant une chimie SYBR-green comme décrit dans le paragraphe précédent (Chapitre II :A.2.iv)

(b) Seconde série de cinétique : CPV-V, APV7, APV24, APV64, APV66 et APV87 sur QT6 et CEF

Dans la seconde série, chaque virus a été passé trois fois sur chaque type cellulaire. Les cellules infectées ont été congelées lorsque l'ECP observé était maximal et au plus tard après 10 jours post inoculation pour le premier passage, 7 jours pour le second passage et 20 jours pour le troisième passage. La récolte a ensuite été faite comme pour la première série de cinétique (paragraphe précédent). Puis chaque prélèvement a subi une extraction d'ADN avec le kit One-4-all Genomic DNA miniprep (Bio Basic, Markam, Canada), en suivant les instructions du fabricant. Une PCRq a été mise en place en utilisant une chimie SYBR-green comme décrit dans le paragraphe précédent (Chapitre II :A.2.iv).

Les ADN extraits ont ensuite été amplifiés par PCR quantitative en utilisant une chimie SYBR-green. Les amorces utilisées pour les différentes souches virales sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Amorces utilisées pour les PCRq de chaque souche virale étudiée.

<b>Virus</b>	<b>Amorces</b>
CPV-V	C184_02F ; C184_02R
APV 1	C184_02F ; C184_02R
APV 7	C185_01F ; C185_01R
AVP 24	APV4b_F ; APV4b_R
APV 64	C184_02F ; C184_02R
APV 87	C184_02F ; C184_02R

### **3. Résultats**

#### *Amplification virale*

Pour l'inoculation, le protocole de départ incluait de répartir l'inoculum sur la surface des cupules pendant les 2 heures d'incubation à 37°C en faisant des mouvements circulaires toutes les dix minutes avec les plaques. Ceci a pour but d'éviter l'évaporation de l'inoculum ainsi que sa bonne répartition sur toute la surface cellulaire. Après les deux heures d'incubation, l'inoculum devait être retiré puis le milieu de culture ajouté.

Or, avec cette méthode, le tapis cellulaire se décollait et n'était plus viable et donc plus propice à l'amplification virale. Il a donc été décidé de bien répartir l'inoculum sur la totalité de la surface cellulaire lors de son incorporation dans les cupules et de ne pas faire les mouvements circulaires toutes les dix minutes. Au bout des deux heures d'incubation, le milieu était directement ajouté aux cupules sans retirer l'inoculum. Aucune évaporation n'a été observée, celle-ci étant absente ou trop peu importante pour être vu. Les ECP observés l'étaient de façon homogène sur toute la surface cellulaire, sans réelle concentration sur les bords des cupules par rapport au centre. Cette technique a donc été validée.

Les durées moyennes d'apparition des ECP en fonction de la souche virale, de la dilution de l'inoculum et du type de tapis cellulaire utilisé sont résumées dans le Tableau 5. Assez souvent, les ECP n'étaient pas clairement visualisés et la question de savoir si l'aspect des cellules était dû à leur fragilité, notamment pour les GKT, ou à l'action du virus s'est souvent posée. Finalement, quand l'aspect des cupules ou des boîtes infectées était différent des cupules ou des boîtes témoins négatifs, il a été considéré que l'aspect abîmé des cellules était dû à l'action du virus, même lorsque les ECP n'étaient pas clairement visibles. Quand ceux-ci étaient clairement visibles, les ECP observés étaient similaires à ceux décrits dans la littérature (39), avec des cellules rondes en amas de couleur foncée, qui finissent par se détacher du tapis cellulaire pour flotter dans le milieu de culture.

Il semble que les virus testés ne s'amplifient pas sur DEF, ou dans des délais beaucoup plus longs que sur les autres cellules. Les cellules sur lesquelles les virus testés s'amplifient le mieux sont les GKT et les QT6. Etant donné la grande fragilité des GKT observée sur les cupules ou sur les boîtes témoins, les QT6 ont été plus largement utilisées pour l'amplification virale.

Tableau 5: Délais moyens d'apparition en jours des ECP pour différentes souches virales et sur différents types cellulaires

	<b>QT6</b>	<b>GKT</b>	<b>CEF</b>	<b>DEF</b>
<b>APV1 pur</b>	7,2 (8)	6,5 (7)	5 (2)	12 (2)
<b>APV1 ½</b>	7,5 (2)	7 (2)	ND	ND
<b>APV1 1/10</b>	9,7 (3)	ND	ND	ND
<b>APV7 pur</b>	8,5 (3)	4,3 (3)	7,5 (3)	>14
<b>APV7 1/10</b>	9 (4)	ND	ND	ND
<b>APV 24 pur</b>	8,3 (3)	4,6 (3)	8 (3)	>14
<b>APV 64 pur</b>	8,3 (3)	4,6 (3)	8 (3)	>14
<b>APV 66 pur</b>	8,3 (3)	4,6 (3)	8 (3)	>14
<b>APV 87 pur</b>	8,3 (3)	4,6 (3)	9,7 (3)	>14
<b>CPV-V</b>	7,5 (3)	4,3 (3)	8 (3)	>14

Les inoculum des différents virus ont été utilisés à différentes dilutions pour infecter les cellules : pur (noté « pur »), dilué au demi (noté « ½ ») ou dilué au dixième (noté « 1/10 »). « ND » signifie qu'il n'y a pas eu d'infection réalisée pour le virus donné, à la dilution donnée et sur le type cellulaire donné. Les chiffres entre parenthèse représentent le nombre maximal de passage réalisé pour le virus à la dilution donnée et sur le type cellulaire donné.

En effet, celles-ci deviennent rapidement confluentes, sont relativement résistantes et restent viables assez longtemps après l'apparition des premiers ECP. De plus, il était plus facile de différencier les ECP avec les QT6 étant donné les différences notables observées entre les cupules ou boîtes infectées et les témoins, ce qui était moins évident avec les GKT. Concernant les CEF, des ECP semblables dans des temps légèrement plus long pour CPV-V, ou moins long pour les souches virales sauvages ont été observés. La plus grande disponibilité des QT6 nous a amené à les choisir préférentiellement pour l'amplification virale et la préparation de l'inoculum de l'infection expérimentale.

La grande fragilité des tapis cellulaires nous a posé beaucoup de problèmes notamment pour l'interprétation des observations microscopiques. L'action virale a dû jouer un rôle dans cette fragilité cellulaire mais l'observation des cupules témoins souvent fragiles également nous pose la question de savoir si des ECP plus clairs auraient été visibles avec des cellules plus « résistantes ».

(a) Première série de cinétique

Les courbes d'amplification ont été obtenues avec la gamme de plasmides. Elles sont apparues au 10<sup>ème</sup> cycle pour le point le plus concentré de la gamme (10<sup>8</sup> plasmides) et au 37<sup>ème</sup> cycle pour le point le moins concentré de la gamme (10<sup>0</sup> plasmides) avec des espacements d'environ 3,3 cycles entre chaque point de la gamme (Figure 15). Pour le point le moins concentré, seul un des échantillons a été amplifié, signifiant probablement que la limite de détection a été atteinte à cette concentration. Le seuil de détection a donc été fixé à 10 copies de génome viral. Aucun témoin négatif n'a montré d'amplification, démontrant notamment l'absence de dimères d'amorces.

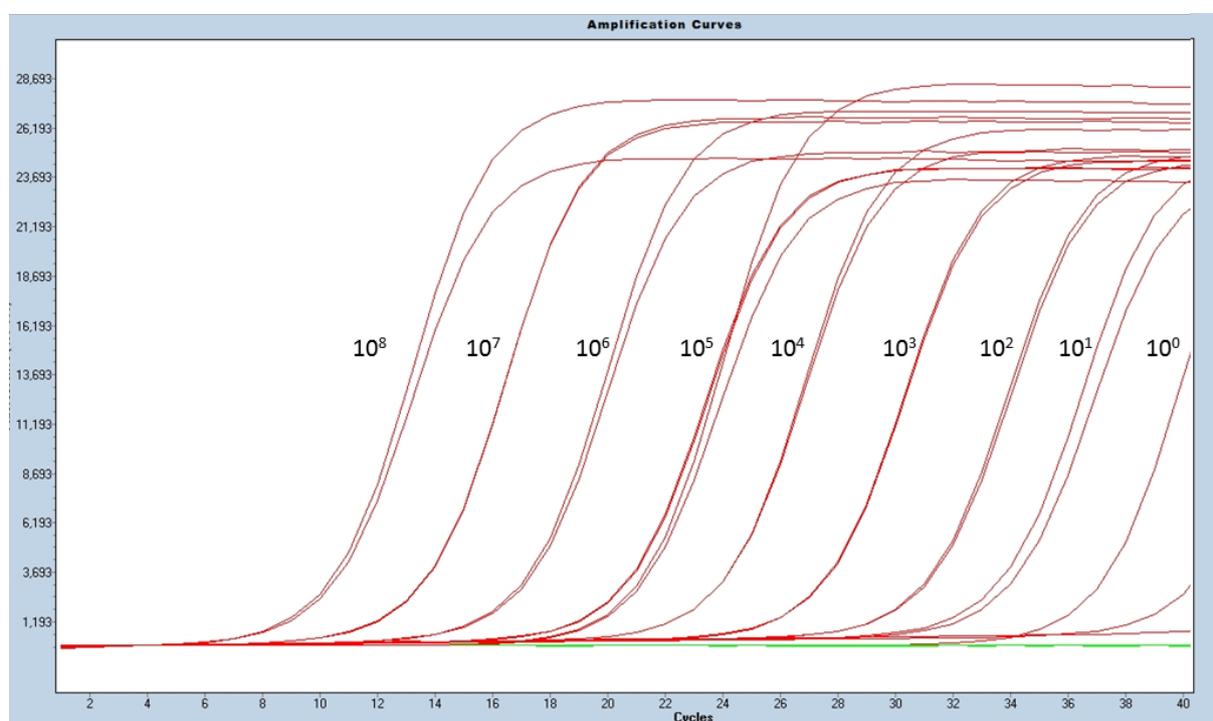


Figure 15. Courbes d'amplification de la gamme de la PCR quantitative ciblant une séquence de l'ORF *CNPV185* des virus du sous-clade B2.

Les nombres indiquent les quantités de plasmide dans chaque point de la gamme. Chaque échantillon a été passé en duplicata. Les courbes d'amplification du témoin positif sont superposées avec celles du point de la gamme contenant 10<sup>5</sup> plasmides.

(b) Seconde série de cinétique

La PCRq ciblant le locus P4b a été validée en testant la gamme de plasmides préparée. Les courbes d'amplification sont apparues au 14<sup>ème</sup> cycle pour le point le plus concentré de la gamme (10<sup>6</sup> plasmides/2 $\mu$ L) et au 32<sup>ème</sup> cycle pour le point le moins concentré de la gamme (10<sup>2</sup> plasmides/2 $\mu$ L) avec des espacements d'environ 3,3 cycles

entre chaque point de la gamme (Figure 16). Pour le point le moins concentré ( $10^2$  plasmides), l'un des échantillons sort plus tardivement (36 cycles), signifiant probablement que la limite de détection a été atteinte à cette concentration. Le seuil de détection a donc été fixé à  $10^2$  copies de génome viral.

Aucun témoin négatif n'a montré d'amplification, démontrant notamment l'absence de dimères d'amorces.

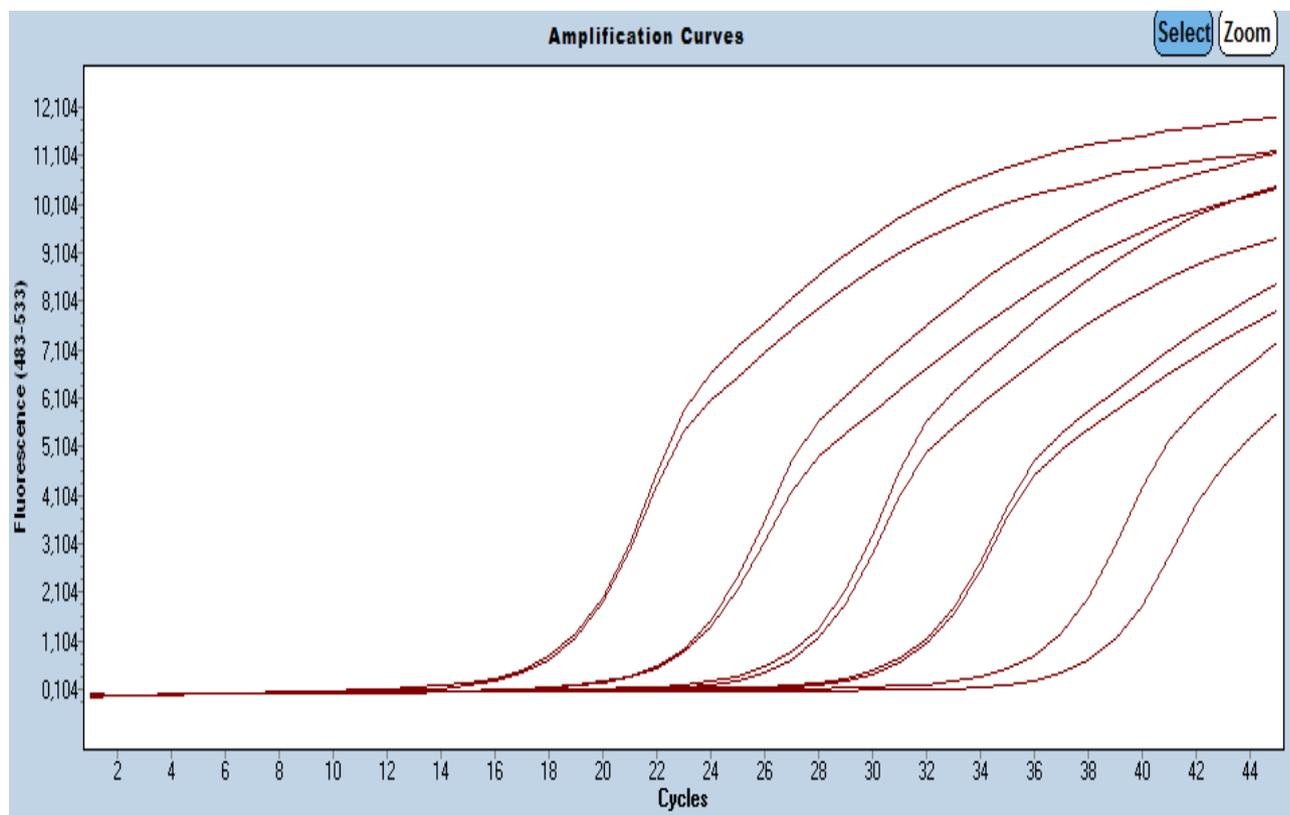


Figure 16: Courbes d'amplification de la gamme de la PCR quantitative ciblant une séquence de l'ORF FPV167 des avipoxvirus. Chaque échantillon a été passé en duplicata.

#### i Cinétique d'amplification virale par PCRq

##### (a) Première série de cinétique : CPV-V, APV1 et APV7 sur QT6 et GKT

Pour la première cinétique effectuée, les résultats sont résumés dans le graphique présenté à la Figure 17.

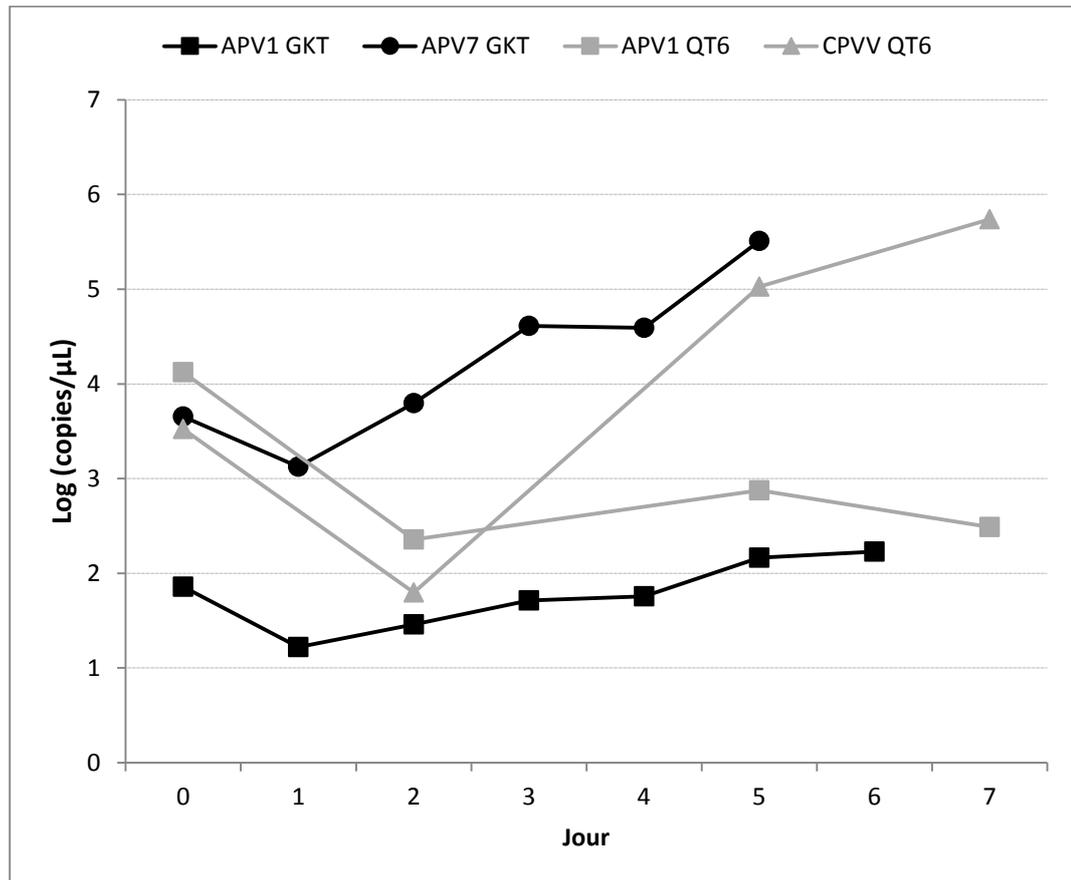


Figure 17: Nombre de copies génome dans les surnageants de culture en fonction du temps par amplification sur tapis cellulaire in vitro.

Hormis APV1 amplifié sur QT6 qui présente une diminution du nombre de copies génomes en fonction du temps, les autres souches virales, à savoir APV7 sur GKT, CPV-V sur QT6 et APV1 sur GKT, ont un nombre de copies génomes croissant au cours de l'infection. APV1 semble cependant moins s'amplifier sur GKT qu'APV7 sur GKT comme sur QT6, ou la souche vaccinale CPV-V sur QT6. Le premier jour, on observe une diminution du nombre de copie dans le surnageant, relative à l'entrée des virus dans les cellules, puis une augmentation progressive. Il serait intéressant étant donné ces résultats de poursuivre l'amplification plus longtemps afin d'avoir une cinétique qui nous renseigne sur la durée maximale de multiplication virale. Toutefois, la fragilité des tapis cellulaires était un frein à cela.

Ont également été comparées les quantités de copies génomes dans les cellules seules, dans les cellules + surnageants et dans les surnageants seuls. Les résultats de cette cinétique sont résumés dans le graphique de la Figure 18.

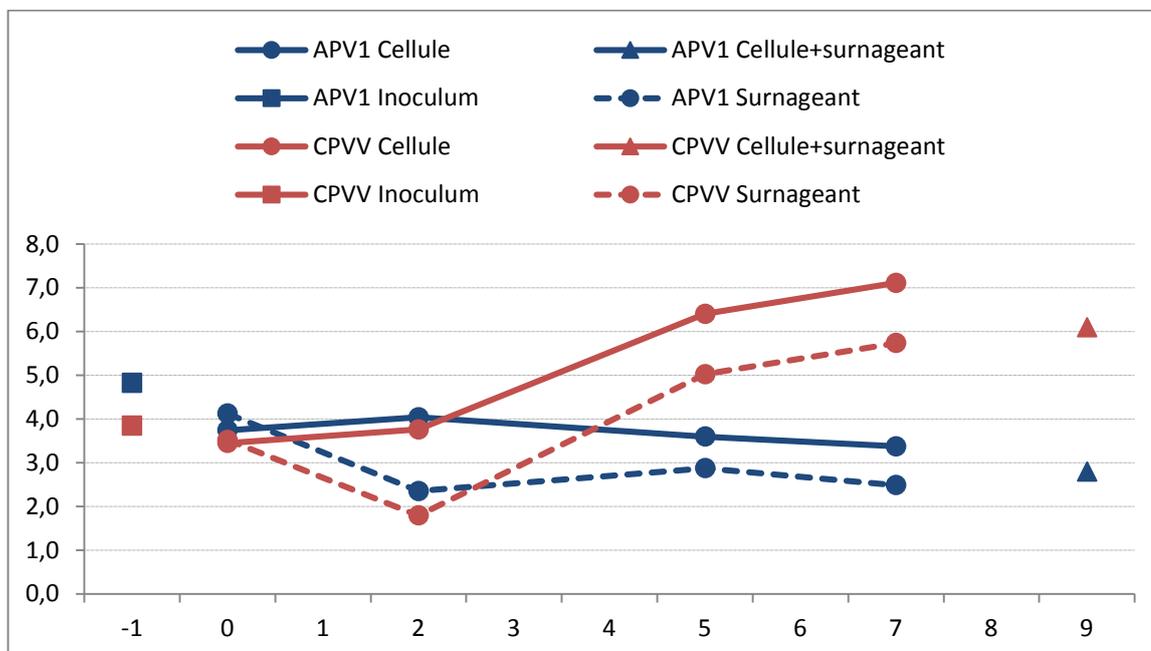


Figure 18: Nombre de copie génome en fonction du temps après inoculation d'un tapis cellulaire de QT6 par deux virus.

Ici aussi, APV1 ne semble pas s'amplifier, avec une décroissance du nombre de copies génome observée, contrairement à CPV-V. Le nombre de copies de CPV-V dans les cellules et le surnageant présente le même taux de croissance mais est plus élevé dans les cellules que dans surnageant, ce qui semble logique. Notons une très légère augmentation du nombre de copies pour CPV-V dans les cellules lors des premières 48 heures, alors que ce nombre décroit dans le surnageant, ce qui correspond à l'inclusion du virus dans les cellules avant le début de l'amplification. Cette légère élevation du nombre de copies dans les cellules est également observée pour APV1, ce qui nous conduit à émettre l'hypothèse qu'APV1 n'a pas de problème pour entrer dans les cellules, mais pour se multiplier une fois cela fait.

Que ce soit dans les cellules ou dans le surnageant, le nombre de copies est plus élevé pour CPV-V en fin d'amplification que dans l'inoculum, ce qui montre l'efficacité de cette amplification *in vitro*.

(b) Seconde série de cinétique : CPV-V, APV7, APV24, APV64 et APV87 sur QT6 et CEF

La seconde série de cinétique a été motivée afin de savoir sur quelles cellules les virus s'amplifiaient le mieux, et si plusieurs passages permettaient aux virus de s'adapter aux cellules, ceci afin d'avoir une amplification plus efficace. Il était aussi intéressant de comparer la multiplication de différents virus sur un même type

cellulaire. Les CEF ont naturellement été choisie par rapport à leur large utilisation dans la littérature. Des GKT et des DEF ont également été testées (résultats non disponibles). Les résultats sont résumés dans les Figure 19 à Figure 22.

Deux tendances se sont dégagées lors de cette seconde série de cinétique: d'une part, CPV-V s'est multiplié sur CEF et sur QT6, d'autres part, une diminution du nombre de copies génome au cours du temps a pu être observée pour toutes les autres souches virales, quel que soit le type cellulaire infecté.

Intéressons-nous tout d'abord à CPV-V sur CEF. Malgré l'observation d'une décroissance du nombre de copies génome lors des 5 premiers jours du premier passage (passage de  $1,94.10^4$  copies génomes/2  $\mu$ L à  $3,21.10^3$  copies génome/2  $\mu$ L), due probablement à un faible relargage viral dans le surnageant, on note ensuite une augmentation du nombre de copies génome dans le surnageant jusqu'à la fin du premier passage, la concentration finale étant de  $2,17.10^5$  copies génome/2 $\mu$ L. Le second passage montre une multiplication virale efficace ( $8,4.10^3$  copies génome/2  $\mu$ L au début à  $1,27.10^5$  copies génome/2  $\mu$ L), avec un ECP total arrivant plus tôt (au bout de 7 jours contre 10 jours le premier passage).

Lors du troisième passage, la multiplication virale est présente et constante, bien que moins importante que lors des deux premiers passages, ce qui pourrait expliquer pourquoi les cellules survivent plus longtemps (ECP total au bout de 20 jours). On observe à partir du 13<sup>ème</sup> jour une diminution du nombre de copies génome dans le surnageant.

Ainsi, concernant l'amplification de CPV-V sur CEF, on note que les deux premiers passages ont une vitesse de multiplication virale similaire (pentes des courbes similaires). La seule différence notable est l'absence de diminution du nombre de copies génome observée lors des cinq premiers jours du premier passage, suggérant une adaptation du virus aux cellules.

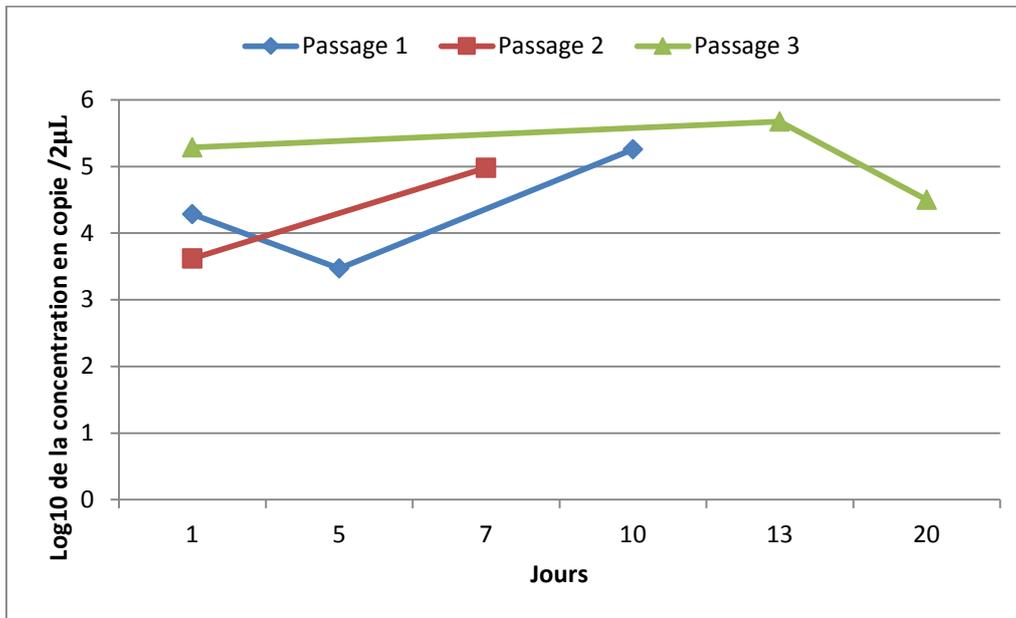


Figure 19: Nombre de copies génome de CPV-V en fonction du temps après inoculation d'un tapis cellulaire de CEF.

Concernant l'amplification de CPV-V sur QT6, on observe le même temps d'adaptation du virus lors des cinq premiers jours du premier passage. Toutefois, la multiplication virale qui s'en suit est moins importante que sur CEF, et atteint en moyenne  $1,85 \cdot 10^4$  copies génome/2 µL. Cette multiplication virale est encore moins marquée lors du second passage même si, comme lors de la cinétique sur CEF, il n'y a plus de temps d'adaptation. En revanche, la grosse différence avec la culture sur CEF se situe dans le troisième passage. Dès le premier jour, la quantité de copies génome dans le surnageant est beaucoup plus basse que sur CEF, à 13 copies génome/2 µL en moyenne.

L'observation faite sur CEF au bout de 13 jours d'infection n'est donc pas observée ici, les cellules n'étant plus viables au bout de seulement 4 jours.

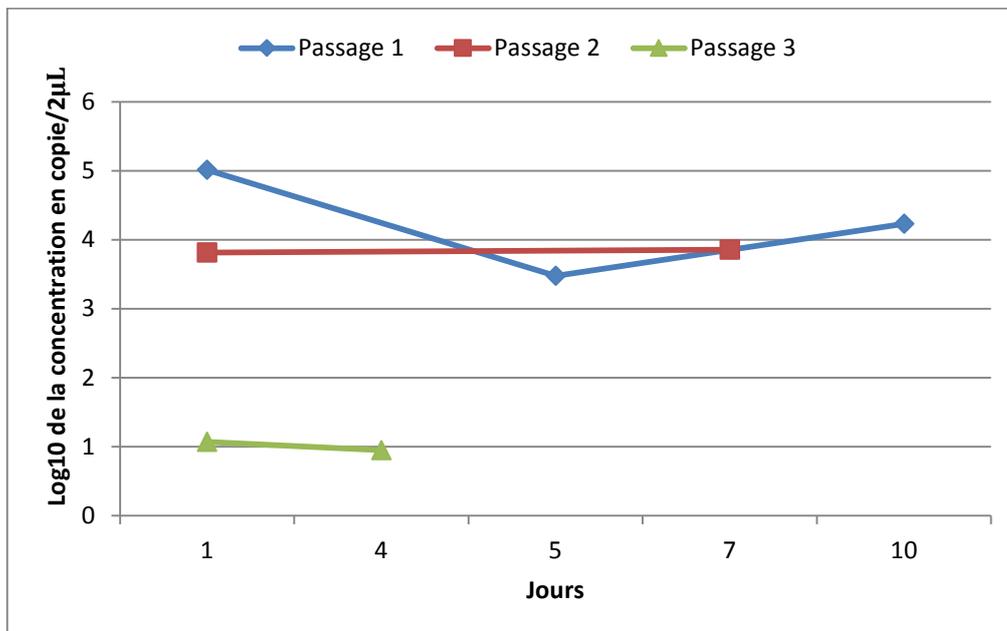


Figure 20: Nombre de copies génome de CPV-V en fonction du temps après inoculation d'un tapis cellulaire de QT6.

La seconde tendance dégagée lors de cette seconde série de cinétique concerne toutes les autres souches virales sur les deux types cellulaires, hormis APV24 sur CEF. Les graphiques des Figure 21 et Figure 22 illustrent ce phénomène avec l'exemple de APV7, utilisé pour l'infection expérimentale.

Lors de la culture de APV7 sur QT6, on observe une diminution du nombre de copies génome quel que soit le passage, et cela avec la même vitesse ou presque (on note une légère diminution de la pente lors du troisième passage, ce qui suggère une diminution plus rapide de copies génome dans le surnageant). Cela montre qu'il n'y a eu aucune multiplication virale de APV7 sur QT6.

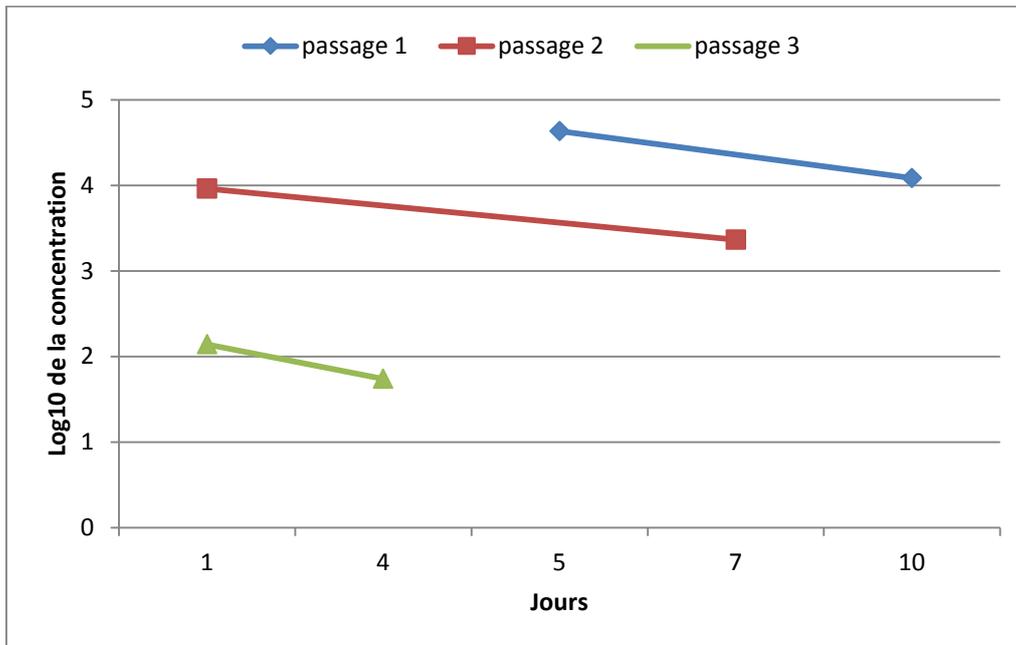


Figure 21: Nombre de copies génome de APV7 en fonction du temps après inoculation d'un tapis cellulaire de QT6.

Ces résultats sont encore plus flagrants sur les CEF. La diminution du nombre de copies génome lors du premier passage est plus marquée, et la concentration virale est quasi nulle pour les second et troisième passages. Cela est en faveur d'une non permissivité des CEF vis-à-vis de APV7. Toutefois, ces observations sont à nuancer du fait du manque de quantification au dixième jour du premier passage et au premier jour du second passage. Ainsi, nous ne connaissons pas l'évolution de la multiplication virale lors des cinq derniers jours du premier passage.

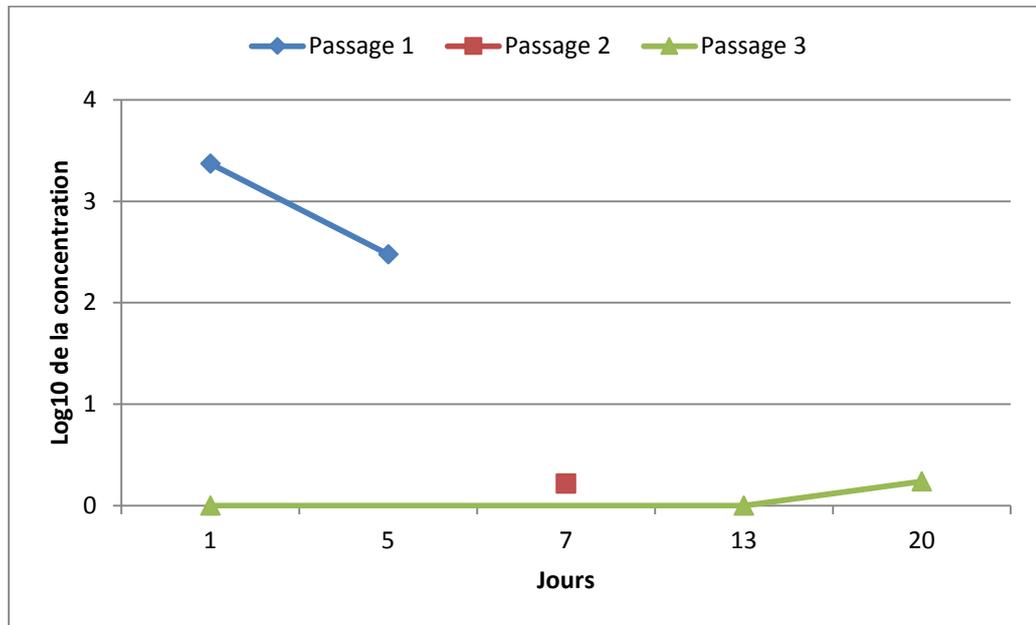


Figure 22: Nombre de copies génome de APV7 en fonction du temps après inoculation d'un tapis cellulaire de CEF.

## **B. Choix de la souche virale et préparation d'un inoculum pour l'infection expérimentale**

### **1. Choix de la souche virale pour l'infection expérimentale**

Il a été décidé de ne tester dans un premier temps qu'une seule souche virale. La souche choisie devait répondre à plusieurs critères :

- La forme cutanée de variole aviaire étant la plus observée sur les outardes, la souche devait avoir été isolée à partir de lésions cutanées ;
- Souche identifiée sur les deux espèces d'Outarde et si possible au Maroc ;
- Appartenance au clade le plus fréquemment identifié chez l'Outarde, soit le clade B (virus CNPV-like) qui a été identifié sur tous les projets et est majoritaire au Maroc ;
- Proximité avec des souches sauvages. À ce titre, un seul avipoxvirus a été identifié sur un oiseau sauvage (un moineau domestique) au Maroc et il appartient au sous-clade B2 dans lequel on retrouve 24% des virus identifiés sur les outardes au Maroc ;
- Souche se développant sur culture cellulaire et dont la croissance pouvait être évaluée ;
- Disponibilité du matériel biologique, c'est-à-dire souche issue d'une lésion importante permettant plusieurs isolements successifs si possible.

Le choix s'est ainsi porté sur la souche CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/007/2011 identifiée et isolée sur le site de Missour au Maroc en juin 2011 à partir d'une lésion cutanée d'une outarde africaine d'un an naturellement infectée (bague U10M05909), et appelée APV 7 dans cette thèse. Cette souche virale a été utilisée pour toutes les infections expérimentales. La caractérisation moléculaire de cette souche avait été réalisée dans le cadre de l'étude de la diversité des avipoxvirus infectant l'Outarde dans la thèse universitaire de Guillaume LE LOC'H et elle est similaire pour les loci P4b et fpv140 à la souche CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/006/2011 (98). Le virus a été récupéré et amplifié comme décrit dans le chapitre II.A.1 de cette thèse puis récolté et semi-purifié comme décrit dans les paragraphes II.A.2.ii.(b) et II.B de cette thèse.

Lors de la première série d'infections en 2013 nous avons utilisé le virus semi-purifié sur coussin de sucrose à 36% après deux passages sur cellules QT6 (cellules tumorales de caille ; protocole de la semi-purification Chapitre II :B.2.i). Toutefois, la

quantification du virus après la semi-purification a montré que l'inoculum était très peu concentré. Lors de la seconde série d'infections, réalisées en 2014, nous avons décidé d'utiliser directement un broyat de la lésion sauvage comme inoculum, afin d'éviter une possible atténuation du virus après plusieurs passages en culture cellulaire et pour ne pas avoir recours à une étape de semi-purification virale pour laquelle nous suspicions un très faible rendement.

## **2. Semi-purification du virus d'épreuve et préparation des broyats**

Afin d'éliminer un maximum d'impuretés dans la suspension contenant le virus, un protocole décrivant une technique de semi-purification d'une suspension du virus de la myxomatose sur gradient de saccharose a été utilisé. En effet, il était important d'éliminer un maximum de sources d'infections autres que celle de la variole, ou tout élément pouvant causer une inflammation ou tout autre signe clinique avant d'inoculer la suspension virale aux outardes. Le problème majeur rencontré ici a été la perte d'une grande quantité de virus lors de cette étape. La charge virale minimale susceptible de provoquer des signes cliniques semble toutefois être peu importante compte tenu du mode de transmission. Par exemple, il ne semble pas y avoir de multiplication du virus dans les insectes vecteurs, ces derniers étant en effet des supports mécaniques pour la transmission. Bien que cela n'ait jamais été démontré, quelques études abondent dans ce sens (67–69,98).

### *Matériel et Méthodes*

Suite à l'amplification, un protocole de broyage au dounce (Chapitre II :A.2.iii(c)) a été appliqué. Des coussins de sucrose à 36% ont ensuite été réalisés en coulant 5 mL de saccharose 36% en TL10 dans 2 tubes à ultracentrifuger de 12 mL. Puis le surnageant récupéré suite au passage au dounce, contenant le virus, a été déposé sur le coussin de saccharose, à raison de 6mL par tube environ. Les tubes devant être pleins, ils ont été complétés avec du TL10. Une ultracentrifugation à 160000g pendant 2h à 4°C a ensuite été réalisée puis les surnageants ont été éliminés et les culots repris dans 6 mL de TL10. Une nouvelle ultracentrifugation a été réalisée dans les mêmes conditions et les culots repris dans 500 µL de TL10.

L'hypothèse que la semi-purification diminue le nombre de particules virales disponibles a voulu être testée. Pour cela, des PCR quantitatives ont été mises en place avant et après semi-purification, selon le même protocole que ceux utilisés pour les cinétiques d'amplification virale.

Lors de la seconde infection expérimentale, une suspension virale issue directement du broyat de lésion a été utilisée en tant qu'inoculum, sans amplification sur cellule ni semi-purification. Ce nouvel inoculum a été obtenu en suivant le protocole décrit au Chapitre II :A.2.ii concernant l'extraction du virus à partir d'une lésion de variole aviaire, suivit d'une centrifugation à 500g et 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant prélevé a ensuite été conservé à -20°C. Une dilution de ce surnageant au 1/10<sup>ème</sup> constituait l'inoculum.

Cet inoculum a été quantifié par PCR quantitative afin d'estimer sa concentration en génome viral, en utilisant une chimie SYBR-green pour APV7 comme décrit dans le paragraphe (Chapitre II :A.2.iv).

### *Résultats*

Après amplification sur cellules et avant tout traitement, 4,08.10<sup>10</sup> copies/mL (soit 16,07 µg) de génome viral a été trouvé. Le rendement du surnageant après broyage au dounce et centrifugation était de 39,5% (1,61.10<sup>10</sup> copies/mL soit 6,34 µg) puis de 9,4% dans le culot après ultracentrifugation (1,52.10<sup>9</sup> copies/mL soit 0,60 µg). Le rendement total entre amplification sur cellules et semi-purification était donc de 3,7% de virus. La semi-purification est essentielle pour séquencer l'ADN viral mais fait perdre énormément de virus. Or, le séquençage n'est théoriquement possible qu'à partir d'une quantité minimale de virus ici non atteinte après semi-purification.

Le dosage par PCR quantitative de l'inoculum tel qu'il a été utilisé pour la seconde série d'infections expérimentales (c'est-à-dire tel issu d'un broyat de lésion et dilué au 1/10<sup>ème</sup>), a permis d'estimer sa concentration en génome viral à 4.10<sup>7</sup> copies/mL.

## C. Infection expérimentale

### 1. Contexte

Depuis la mise en évidence des premiers cas de variole aviaire, de nombreux modèles d'infection expérimentale ont été développés afin d'acquérir davantage de connaissances sur la maladie. Ce type d'étude a d'abord été utilisé à des fins diagnostiques, pour valider et quantifier la virulence de souches isolées à partir de cas cliniques, souvent en complément de l'isolement sur œufs embryonnés (25,39,59,178–180). En infectant différentes espèces hôtes taxonomiquement éloignées, des auteurs ont aussi essayé de caractériser la pathogénicité d'un certain nombre de souches, d'élaborer les premières classifications parmi les avipoxvirus et de définir leur spectre d'hôtes (38,181).

Avec l'avènement des techniques de phylogénie moléculaire, le recours aux infections expérimentales a diminué. Pourtant il s'agit d'un outil précieux pour valider les résultats moléculaires et les confronter à la réalité de l'infection *in vivo*. Par exemple, les conséquences de l'intégration de séquences rétrovirales dans le génome de certains fowlpox virus ont été mesurées en comparant les expressions cliniques et les réponses immunitaires induites par des souches intégrant ou non ces séquences (19,56). De même, l'immunisation, puis l'infection d'oiseaux avec différents virus, est le seul moyen d'évaluer les vaccinations et les protections croisées entre souches (53,54,170,182). Les génomes des avipoxvirus ne sont en effet pas encore assez largement connus et compris pour appréhender les mécanismes moléculaires qui caractérisent l'adaptation d'une souche à un hôte particulier, ainsi que les relations antigéniques entre souches. Ces mécanismes ne sont d'ailleurs que partiellement connus chez d'autres poxvirus comme les orthopoxvirus (31,60,61). Quelques études ont évalué les protections croisées entre souches et leurs résultats ne peuvent pas s'expliquer avec les connaissances moléculaires que nous avons actuellement de ces virus. Par exemple, des amakihis familiers immunisés avec une souche du sous-clade B1 n'ont pas été protégés lors d'infection avec une souche du même sous-clade mais génétiquement différente (113) alors que dans une autre étude, des diamants mandarins (*Taeniopygia guttata*) vaccinés avec une souche FWPV-like ont été protégés lors d'infection avec une souche CNPV-like (109).

La compréhension des mécanismes de l'infection par les avipoxvirus a aussi justifié divers travaux expérimentaux. Quelques-uns se sont intéressés à reproduire un

mode d'inoculation conduisant à des manifestations cliniques proches de celles rencontrées spontanément ou reproduisant la contamination par des insectes vecteurs. Outre la scarification de zones cutanées aptères ou la transfixion du patagium, largement utilisées (19,39,56,182), ont également été testées la ponction des coussinets plantaires (100,109) et les inoculations par voie intraveineuse, intramusculaire, intratrachéale et oculaire (59,104,178,183). Enfin, d'autres études expérimentales, en permettant par exemple de préciser la nature des réponses immunitaires humorale et cellulaire lors d'infection par un avipoxvirus (19,56,57,184), essaient d'apporter des éléments de compréhension de l'épidémiologie de la variole aviaire.

## **2. Problématique et objectifs**

Un manque de connaissances existe concernant certains aspects importants de l'infection des outardes par les avipoxvirus. En effet, il serait intéressant de connaître la temporalité de l'infection (temps d'incubation, durée de l'expression clinique, persistance de l'infection, portage asymptomatique...), l'impact de l'infection sur la physiologie et les performances zootechniques des oiseaux (comme cela a été fait par Guillaume LE LOC'H (98)) et la sensibilité et l'immunité de l'Outarde vis-à-vis de différentes souches virales.

Pour cela, la réalisation d'infections expérimentales chez l'Outarde pourrait être d'un grand secours. Jusqu'à récemment, il n'était concevable de réaliser sur des outardes captives que des études ne portant pas atteinte à la santé des oiseaux, comme des études vaccinales (185-187). Des infections expérimentales n'étaient en revanche pas envisageables pour des raisons éthiques (espèces menacées) et à cause de la grande valeur de chaque individu captif. D'autres espèces devaient donc être utilisées pour étudier les agents infectieux de l'Outarde (170). Considérant désormais la grande taille des effectifs captifs (plus de 40000 poussins produits en 2014 par les projets ECWP, NARC et SKHBC-AD) et l'encadrement sanitaire strict des élevages, il semble raisonnable de pouvoir proposer, dans un cadre scientifique et éthique strict, la réalisation d'infections expérimentales sur de petits effectifs d'oiseaux captifs. À partir de la bibliographie disponible l'objectif de cette partie a donc été la mise en place d'un modèle expérimental de variole aviaire chez l'Outarde, préliminaire à toute étude plus poussée. Plus précisément, nous avons mené deux séries d'infections tout d'abord pour valider les conditions permettant de reproduire expérimentalement une forme naturelle de variole aviaire chez l'Outarde, puis pour évaluer certaines caractéristiques cliniques de l'infection : temps d'incubation, durée et évolution spontanée des lésions, que ce soit

d'un point de vue clinique strict (macroscopique) que d'un point de vue histopathologique, recherche de virémie.

Lors de ces mêmes infections expérimentales, Guillaume LE LOC'H s'est également intéressé à l'évaluation des impacts physiologiques que pouvait avoir la variole aviaire sur les outardes houbara, tels que des impacts sur les poids et consommations des oiseaux, une recherche de modifications de paramètres hématologiques, avec entre autre la réalisation d'électrophorèses (98).

### **3. Démarche expérimentale**

L'étude a été menée à ECWP car c'est le projet sur lequel l'hébergement et le suivi d'oiseaux expérimentaux étaient les plus simples. Aucun cadre réglementaire n'existe pour l'expérimentation animale au Maroc. En revanche, le projet ECWP est détenteur d'une autorisation d'exercice de l'activité avicole (attestation n° 01-16/VV et OAC/2007/E et AC/Ou/Rp du 18/05/2007), conformément à la loi 49-99 du 13 juin 2002 relative à la protection sanitaire des élevages avicoles, et est donc soumis, à ce titre, à un contrôle régulier de la part des autorités sanitaires.

#### *Choix des oiseaux*

L'espèce africaine d'Outarde a été choisie, étant la seule élevée à ECWP au moment de l'étude. Il a été montré que, chez cette espèce, les oiseaux juvéniles, particulièrement avant l'âge de neuf mois, étaient beaucoup plus infectés que les adultes (98). Nous avons donc travaillé sur cette catégorie d'oiseaux. Bien que les cas de variole aviaire surviennent au sein des élevages sur des oiseaux généralement vaccinés, nous avons décidé de ne pas vacciner les oiseaux expérimentaux contre la variole aviaire afin d'éviter toute interaction entre immunité acquise et infection. La condition que les oiseaux n'aient aucun antécédent médical a aussi été posée. Les oiseaux expérimentaux ont été choisis parmi les oiseaux destinés à être donnés aux fauconniers (oiseaux dont les génotypes sont surreprésentés dans la population captive). Pour éviter un biais lié à l'âge, ils ont été sélectionnés à partir d'un lot de poussins éclos le même jour. Afin de limiter au maximum le stress dû aux conditions expérimentales, les oiseaux ont été élevés dès l'éclosion selon le protocole destiné aux futurs reproducteurs (imprégnation forte, manipulations fréquentes, élevage en cage ou batterie).

## Choix du mode opératoire

Nous avons décidé de reproduire expérimentalement une forme cutanée de variole aviaire, celle-ci étant beaucoup plus souvent observée chez les outardes captives (98). Les études qui ont utilisé des voies d'inoculation autres que cutanées n'ont jamais réussi à reproduire une forme cutanée simple de la maladie : soit des lésions cutanées et diphtériques multiples ont été induites, associées à des létalités importantes (59,104), soit aucune lésion cutanée n'a pu être provoquée (178,183,184). Nous avons donc choisi d'inoculer le virus par voie cutanée et plus précisément par voie intradermique afin de mimer au mieux l'inoculation du virus par un insecte piqueur. Lors de la première série d'infections, nous avons comparé deux modalités d'administration : la scarification et la ponction. Nous n'avons utilisé que cette dernière lors de la seconde série d'infections. Le virus a été inoculé au niveau des pattes, qui est la localisation la plus fréquente des lésions chez les outardes des projets de conservations (environ 50%, (98)). En 2013, les infections avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale ont été réalisées sur la face latérale de la jambe, juste au-dessus de l'articulation inter-tarsienne. Cependant, à cette localisation la vascularisation importante et le tissu sous-cutané assez abondant rendent difficile une inoculation intradermique stricte. En 2014, les infections avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion ont été réalisées sous l'articulation inter-tarsienne où la peau est presque directement apposée sur le tarsométatarse.

## Matériel et méthodes

### (a) Oiseaux et infections

Au moins une semaine avant le début des infections, tous les oiseaux ont été installés en batterie individuelle dans une pièce close à l'ambiance contrôlée et dont l'accès se fait par des vestiaires avec application des mesures de biosécurité standards à ECWP (changement de vêtements et de chaussures, lavage et désinfection des mains). Au moment de leur installation, les oiseaux ont été pesés et minutieusement inspectés afin de déceler toute anomalie, dont la présence de lésions pouvant évoquer la variole aviaire. Aucune lésion de ce type n'a été observée et seules quelques petites plaies d'abrasion ont été notées sur les poignets et les cires. Pendant toute la durée de l'étude, la ration alimentaire a été distribuée sur une base quotidienne comme suit : granulé « outarde » distribué *ad libitum*, 20 g de luzerne fraîche et 5-10 g de vers de farine. L'eau a été distribuée *ad libitum*.

La première partie de l'étude, menée en 2013 avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale, a consisté en l'infection de 24 oiseaux âgés de 90 jours : 18 ont été infectés avec l'inoculum et 6 avec du DMEM seul. Les inoculations ont été réalisées aux deux pattes, sur la face latérale de la jambe, juste au-dessus de l'articulation inter-tarsienne. Une goutte d'environ 20 µL d'inoculum a été déposée sur la peau puis, pour la patte gauche, une scarification a été réalisée avec une aiguille de 25 gauges en « entraînant » la goutte. Sur la patte droite, cinq ponctions successives ont été réalisées à travers la goutte avec une aiguille du même diamètre. Dans les deux cas, il a été permis à la goutte d'adsorber pendant 30 s, puis l'excédent a été essuyé avec une compresse afin d'éviter la dissémination du virus sur d'autres parties de l'oiseau ou dans l'environnement. La seconde partie de l'étude, menée en 2014 avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion et dilué au 1/10<sup>ème</sup>, a consisté en l'infection de 12 oiseaux âgés de 69 jours : 9 ont été infectés avec l'inoculum et 3 ont été infectés avec du DMEM. Les inoculations des deux pattes, sur la face latérale du métatarse environ deux centimètres sous l'articulation inter-tarsienne ont été réalisées par ponction comme la première fois à l'exception du nombre de ponctions (dix au lieu de cinq).

#### (b) Suivi des oiseaux

Les oiseaux ont été suivis pendant trois mois complets à partir de la date d'inoculation. Les quantités de granulés consommés ont été calculées quotidiennement et les oiseaux ont été pesés au moins une fois par semaine pendant toute la durée de l'étude. Tous les jours, les oiseaux ont été observés à distance afin de détecter d'éventuelles anomalies puis capturés pour un examen minutieux de la cavité orale, des paupières, du bec et des pattes. Lorsqu'une lésion a été détectée, celle-ci a été mesurée et décrite afin de pouvoir suivre son évolution. Certaines lésions ont été prélevées pour analyses moléculaires et histologiques. Après avoir anesthésié l'oiseau, la lésion a été excisée de manière aseptique et une partie a été immédiatement congelée à -20 °C. Le reste de la lésion a été stocké dans du formol 10% tamponné.

Lors des infections de 2013, des prises de sang ont été réalisées tous les trois jours pendant les deux premières semaines post-inoculation puis une fois par semaine. Lors des infections de 2014, les prises de sang ont été réalisées une fois par semaine. À chaque prise de sang, environ 5 mL de sang ont été prélevés à la veine jugulaire droite à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 21 gauges. Après retrait de l'aiguille le sang a été immédiatement transféré dans des tubes de prélèvement traités le jour même ou stockés, suivant les analyses prévues (Tableau 6). Les sérums et plasma ont été

récupérés après centrifugation à 4500 g pendant 5 min. Pour neufs oiseaux infectés en 2013 les leucocytes ont également été séparés des autres fractions sanguines à l'aide du kit Ficoll-Plaqué (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), en suivant les instructions du fabricant.

Tableau 6. Analyses réalisées à partir des prélèvements sanguins lors des deux séries d'infections expérimentales.

Inoculum	Tube EDTA	Tube hépariné	Tube sec
<b>Semi-purification virale (2013)</b>	-	2 mL. Plasma extrait pour stockage et leucocytes extraits pour recherche de virémie par PCR quantitative <sup>1</sup> .	3 mL. Sérum extrait pour stockage.
<b>Broyat de lésion (2014)</b>	1 mL. Numération formule sanguine.	1 mL. Plasma extrait pour électrophorèse des protéines.	3 mL. Sérum extrait pour stockage.

<sup>1</sup> Les leucocytes n'ont été extraits que sur neufs oiseaux infectés et jusqu'à sept semaines post-inoculation.

#### (c) PCR quantitative

L'ADN des inoculums, des leucocytes et des lésions ont été extraits avec le kit One-4-ALL Genomic DNA Miniprep (Bio Basic, Markam, Canada) en suivant les instructions du fabricant. Pour les leucocytes, l'ADN des deux fractions présentes dans les tubes (culot et surnageant) a été extrait séparément. L'ADN viral des inoculums, des lésions et des leucocytes a été amplifié par PCR quantitative selon le protocole décrit dans la partie dédiée au suivi des croissances virales sur cellules pour APV 7 (Chapitre II :A.2.iv).

#### (d) Hématologie et électrophorèse des protéines plasmatiques

Les modifications haematologiques des outardes infectées par APV7 ont été évaluées dans la thèse d'université de Guillaume LE LOC'H (98). L'hématocrite a été mesuré, et des numérations de formules ont été effectuées. Les formules leucocytaires ont été réalisées en suivant des protocoles publiés (188), les numérations leucocytaires ont aussi été faites, puis les concentrations de chaque type cellulaire calculées. Afin d'identifier les différentes fractions protéiques plasmatiques, des électrophorèses de protéines ont été mise en place, puis la concentration des protéines plasmatiques mesurée.

#### (e) Histologie

Après fixation dans du formol 10% tamponné, les lésions ont été incluses en blocs de paraffine, puis des sections de 4 µm colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ont été observées au microscope.

#### (f) Analyses statistiques

Cette thèse d'intéressant d'abord aux modifications cliniques observées sur les outardes après infection expérimentale par APV7, nous ne parlerons que brièvement des impacts de la maladie sur les performances des oiseaux. Cet aspect a été étudié plus spécifiquement par Guillaume LE LOC'H (98). Les poids, croissances, consommations, hématocrites et concentrations absolues et relatives des différentes leucocytes et fractions protéiques ont été analysées statistiquement afin de déterminer si le statut (infecté - contrôle) avait un effet sur l'un de ces paramètres.

### **4. Résultats**

#### *Infections avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale*

Après semi-purification le dosage par PCR quantitative de l'inoculum a montré que le titre viral était très faible, à la limite de détection. Seul un des duplicatas a été amplifié et sa concentration en génome viral estimé à  $7 \times 10^3$  copies/mL. Il a quand même été décidé de procéder aux infections expérimentales avec cet inoculum, partant du principe que lors d'infections naturelles, le portage du virus par les insectes vecteurs étant uniquement mécanique, la dose infectieuse pouvait être très faible.

#### (a) Expression clinique

Aucune lésion de variole aviaire n'a été observée sur les 6 oiseaux contrôles. Parmi les 18 oiseaux infectés, 67% de morbidité a été observée, 12 oiseaux ayant présenté des lésions cutanées au niveau d'au moins un des points d'inoculation, et 19 lésions ont été observées (Tableau 7).

Tableau 7. Lésions induites par l'inoculum issu d'une semi-purification virale.

Oiseau	Stade final de la lésion	Patte	Incubation (jours)	Évolution (jours)	Taille maximale (mm)
U13M12917	masse croûteuse <sup>1</sup>	gauche	30	-	12
	papule	droite	36	38	5
U13M12924	papule <sup>1</sup>	droite	33	37	5
	papule	droite	36	-	5,5
U13M12939	masse croûteuse <sup>1</sup>	droite	16	51	13
U13M12954	papule	droite	42	-	7
U13M12967	papule	gauche	53	17	9
	papule	droite	46	21	5
U13M12980	papule	droite	56	35	5
	papule	gauche	60	31	12
U13M12982	papule <sup>1</sup>	droite	39	-	11
U13M13014	masse croûteuse	droite	19	62	11
U13M13021	papule	droite	63	-	5
	papule	droite	67	-	5
U13M13028	papule	gauche	28	32	7
U13M13032 <sup>2</sup>	papule <sup>1</sup>	droite	39	-	5,5
	papule	droite	42	-	3,5
U13M13035	papule	droite	32	42	4,5
	papule <sup>1</sup>	droite	39	-	5

<sup>1</sup> Lésion prélevée (exérèse, aspiration ou écouvillonnage de l'exsudat).

<sup>2</sup> Cet oiseau est mort 56 jours après l'inoculation, suite à une rupture de la veine jugulaire droite.

Toutes les lésions ayant été observées à proximité immédiate (<1 cm) des points d'inoculation, nous avons considéré que les formes de variole aviaire induites étaient localisées aux sites d'infection et que nous pouvions ainsi analyser chaque patte indépendamment, et les comparer. Ainsi, 61% des pattes infectées par ponction (patte droite, n=11) et 22% des pattes infectées par scarification (patte gauche, n=4) ont développé des lésions. La différence d'efficacité entre les deux modes d'inoculation est significative (test du chi-deux,  $p < 0,05$ ). Pour analyser les temps d'incubation nous avons considéré la première lésion apparue sur chaque patte. Les temps moyens d'incubation sont de 38 jours pour la patte droite et de 43 jours pour la patte gauche (Figure 23). Pour les lésions qui ont pu être suivies jusqu'à la guérison (n=10), la durée d'évolution moyenne a été de 37 jours et les minimum, médiane et maximum respectivement de 17, 36 et 62 jours.

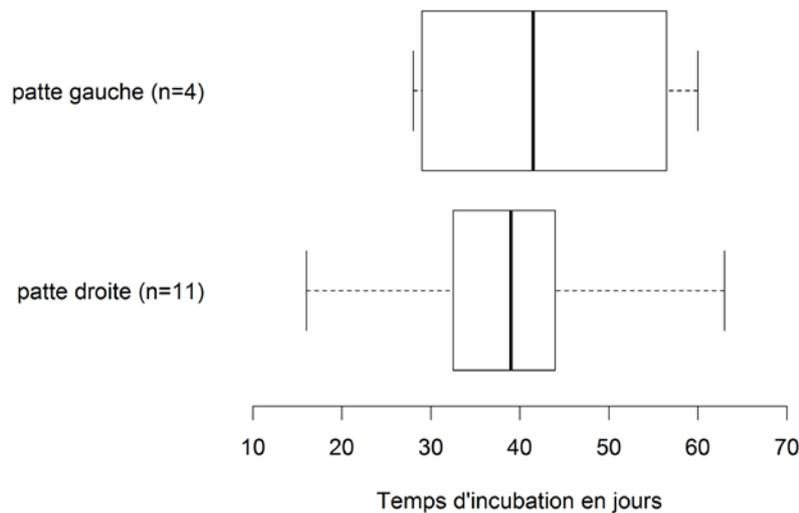


Figure 23. Distribution des temps d'incubation pour chaque patte.

Les moustaches indiquent les minimum et maximum.

Parmi les 19 lésions observées, seules 16% (n=3) ont évolué vers le stade de masse croûteuse (Figure 24) selon le schéma classique (20) : papule → vésicules → ulcérations → masse croûteuse. Elles ont atteint une taille moyenne de 12 mm avant que la croûte ne tombe et ne laisse place à un épithélium neuf. Pour les 16 autres lésions, seules des papules caractérisées par une surélévation locale de la peau et d'une taille moyenne de 6 mm ont été observées. Ces papules ont pris des aspects allant de lésions fermes au toucher et accompagnées d'une inflammation bien visible au niveau de l'épiderme (Figure 24), à des lésions intéressant davantage le tissu sous-cutané, ayant une consistance plus fluctuante et ne montrant pas d'inflammation visible. Toutes ces lésions ont régressé spontanément sans évoluer jusqu'à l'ulcération et la formation de croûtes.

Aucun oiseau n'a montré, pendant les trois mois de l'expérience, de baisse d'activité ou d'atteinte de son état général et les analyses statistiques n'ont pas montré d'effet significatif du traitement sur le poids et la consommation des oiseaux.



Figure 24. Lésions induites par l'inoculum issu d'une semi-purification virale.

Vues de face (1) et de côté (2) de deux papules n'ayant pas évolué vers le stade de masse croûteuse et vues de face (3) et de côté (4) d'une lésion ayant atteint le stade de masse croûteuse.

#### (b) Virémie

Les leucocytes ont été extraits tous les trois jours durant les deux premières semaines d'infection puis une fois par semaine jusqu'à sept semaines post-infection à partir du sang de neuf oiseaux infectés (soit dix prélèvements par oiseau). Parmi ceux-ci, six ont développé des lésions dont un seul jusqu'au stade de masse croûteuse. Les PCR quantitatives réalisées sur l'ADN extrait des leucocytes n'ont pas permis de détecter d'ADN viral au seuil de détection de 5 copies/ $\mu$ L.

#### (c) Analyses moléculaires et histologiques des lésions

L'observation microscopique des sections des tissus lésionnels de quatre lésions (trois papules et une masse croûteuse) n'a mis en évidence qu'un processus inflammatoire. Aucun effet cytopathique et aucune inclusion intracytoplasmique éosinophile caractéristique de la variole aviaire n'ont été observés. En revanche, les amplifications par PCR quantitatives ont mis en évidence de l'ADN viral dans cinq des six

lésions prélevées (trois papules et deux masses croûteuses). Ainsi, le nombre de copies génome moyen a été de  $1,4 \cdot 10^6$  copies/ $2 \mu\text{L}$  et les minimum, médiane et maximum étaient respectivement de  $5,2 \cdot 10^1$  copies/ $2 \mu\text{L}$ ,  $1,5 \cdot 10^3$  copies/ $2 \mu\text{L}$  et  $5,6 \cdot 10^6$  copies/ $2 \mu\text{L}$ .

À la suite des résultats de cette première série d'infections, une seconde série d'infections a été réalisée en ajustant les paramètres suivants :

- Utilisation d'un broyat de lésion comme inoculum ;
- Généralisation de l'inoculation par ponction / abandon de la scarification ;
- Choix d'un site d'inoculation moins vascularisé ;
- Recherche de modifications hématologiques plutôt que de virémie (absente à priori).

#### i Infections avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion

Le dosage par PCR quantitative de l'inoculum, issu d'un broyat de lésion et dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  (c'est-à-dire tel qu'utilisé pour les infections), a permis d'estimer sa concentration en génome viral à  $4 \times 10^7$  copies/mL.

#### (a) Expression clinique

Aucune lésion de variole aviaire n'a été observée sur les 3 oiseaux contrôles. Parmi les 9 oiseaux infectés, 78% de morbidité a été observée, 7 oiseaux ayant présenté des lésions cutanées au niveau d'au moins un des points d'inoculation, et 12 lésions ont été observées (Tableau 8). Comme lors de la première série d'infections, elles ont toutes été observées à proximité immédiate ( $<1$  cm) des points d'inoculation et nous avons donc considéré chaque patte indépendamment. Ramené au nombre de pattes, la morbidité est de 50% (12/24). Le temps d'incubation moyen a été de 39 jours et les minimum, médiane et maximum respectivement de 20, 34 et 63 jours.

Parmi les 12 lésions observées, seules 17% ( $n=2$ ) ont évolué vers le stade de masse croûteuse selon le schéma classique, atteignant une taille de 10 et 31 mm (Figure 25). Elles ont été prélevées et leur exérèse a révélé la présence d'un tissu de granulation sous les masses croûteuses, celles-ci n'étant pas adhérentes aux tissus profonds. Pour les dix autres lésions, seules des papules d'une taille moyenne de 7 mm ont été observées. Elles se sont toutes présentées sous la forme d'une surélévation locale de la peau, ferme au toucher, et accompagnée d'une inflammation bien visible au niveau de l'épiderme. Cinq de ces lésions ont été prélevées, deux étant adhérentes aux tissus profonds. L'une

d'elles a d'ailleurs récidivé après exérèse. Les cinq lésions qui n'ont pas été prélevées ont régressé spontanément sans évoluer jusqu'à l'ulcération et la formation de croûtes.

Tableau 8. Lésions induites par l'inoculum issu d'un broyat de lésion.

Oiseau	Stade final de la lésion	Patte	Incubation (jours)	Taille maximale (mm)
U14M20021	papule <sup>1</sup>	droite	23	9
U14M20023	papule	gauche	24	4
	masse croûteuse <sup>1</sup>	droite	27	10
U14M20027	masse croûteuse <sup>1</sup>	droite	35	31
	papule	gauche	57	5
U14M20032	papule <sup>1</sup>	droite	52	9
	papule	gauche	63	4
U14M20033	papule	gauche	20	7,5
	papule	droite	33	4,5
U14M20034	papule <sup>1</sup>	droite	26	9
U14M20037 <sup>2</sup>	papule <sup>1</sup>	droite	51	7
	papule <sup>1</sup>	gauche	56	7

<sup>1</sup> Lésion prélevée par exérèse.

<sup>2</sup> Cet oiseau a été euthanasié 71 jours après l'inoculation, suite à une fracture du tibiotarse gauche.

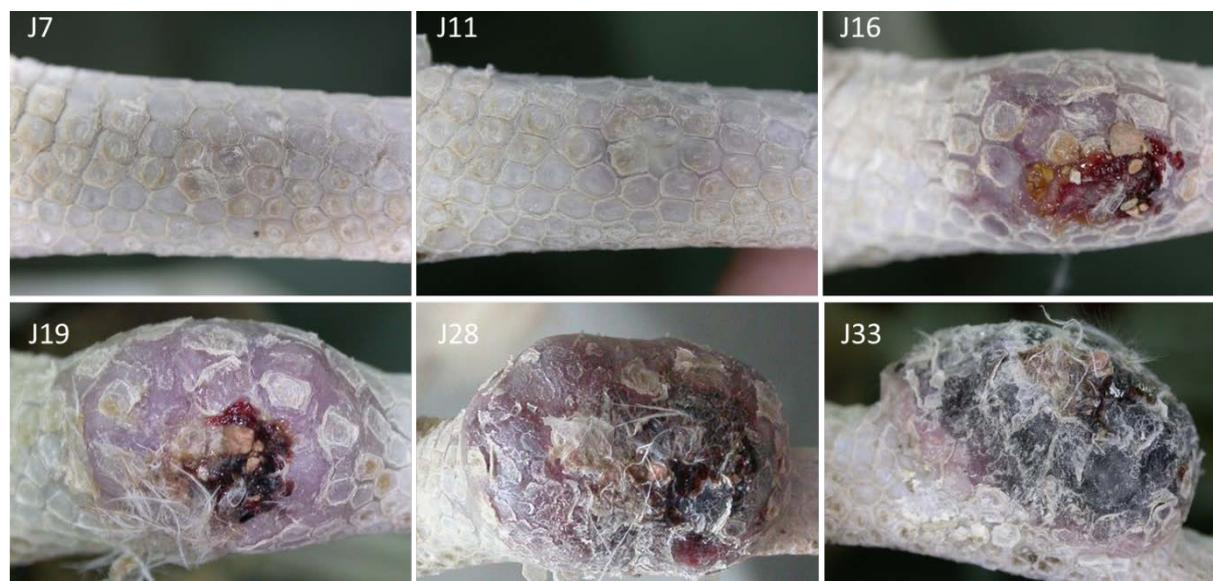


Figure 25. Évolution d'une lésion expérimentale depuis le stade de papule jusqu'au stade de masse croûteuse.

J7 (7 jours post-inoculation) : début de papule avec inflammation ; J11 : augmentation de l'inflammation ; J16 : desquamation de plusieurs écailles et début d'ulcération ; J19 : apparition d'une croûte au centre de la lésion ; J28 : progression de la croûte ; J 33 : stabilisation de l'inflammation et assèchement de la lésion.

#### (b) Poids et consommations d'aliments

Il a été montré que, bien qu'aucune baisse d'activité ou d'atteinte de l'état général n'ait été visuellement observée durant les trois mois de l'étude, des différences de poids et de consommation de granulés ont été notées entre oiseaux infectés et contrôles (98). Il a également été montré que l'infection a eu un effet significativement négatif sur les poids et les consommations.

#### (c) Paramètres hématologiques

Un effet sur les paramètres hématologiques a été testé de la même manière que pour les poids et consommations d'aliments. Des effets significatifs ont été mesurés sur les concentrations absolues et relatives en granulocytes basophiles et en alpha-2 globulines (98).

#### (d) Analyses moléculaires et histologiques des lésions

L'observation microscopique des sections des tissus lésionnels de six lésions (quatre papules et deux masses croûteuses) a surtout mis en évidence des lésions imputables à des surinfections bactériennes : lésions de dermatite pustuleuse avec présence de micro-abcès, caractérisées au niveau épidermique par une migration et une agrégation de granulocytes hétérophiles et, au niveau dermique, par des infiltrats de cellules mononuclées (macrophages, lymphocytes, plasmocytes) et de granulocytes (hétérophiles). Malgré tout, et bien que ces lésions gênent l'observation d'effets cytopathiques, des lésions typiques de variole aviaire ont pu être observées sur quelques tissus lésionnels : gonflement et vacuolisation des cellules, associés à la présence d'inclusions intracytoplasmiques éosinophiles caractéristiques (Figure 26).

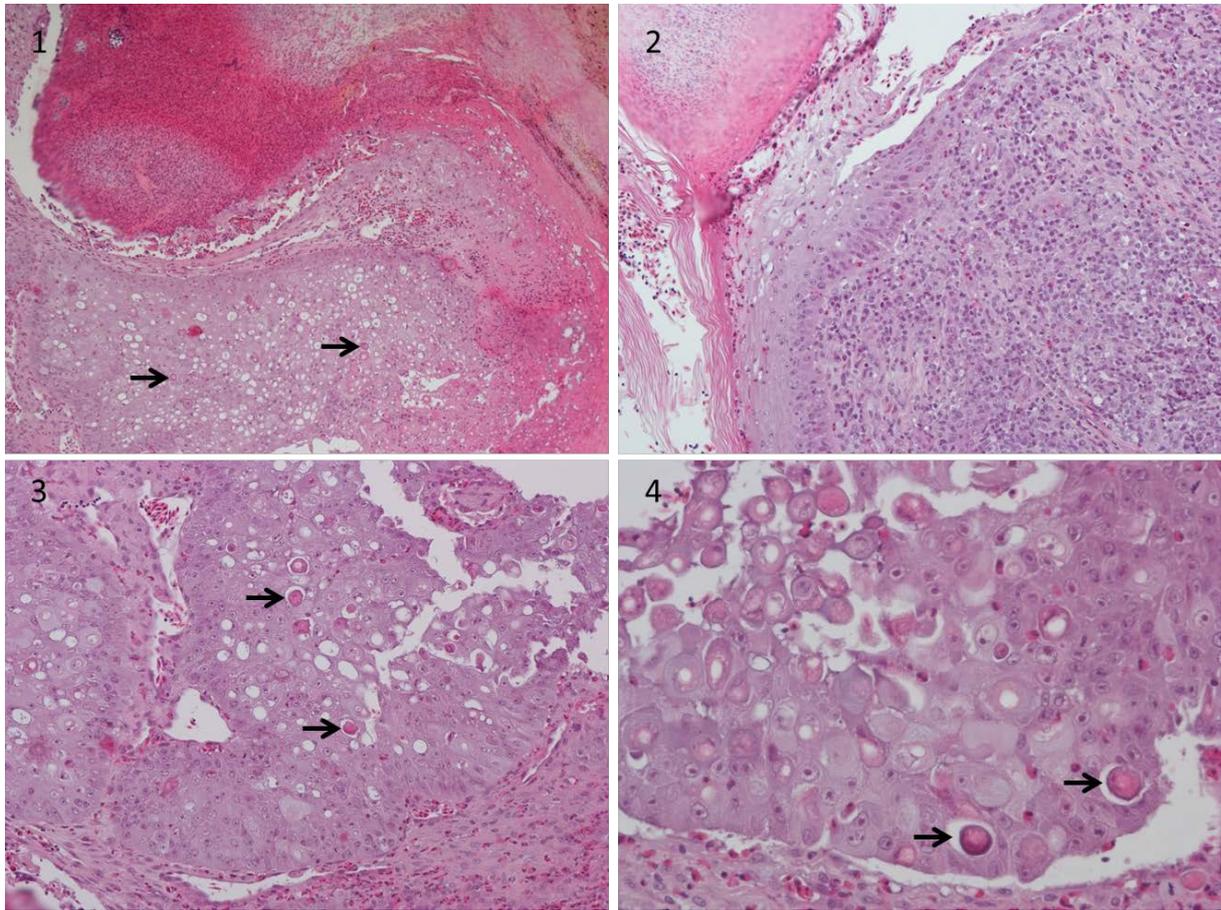


Figure 26. Examen histologique des lésions induites par l'inoculum issu d'un broyat de lésion.

1 (x100) : lésions vésiculaires avec gonflement et vacuolisation épidermique, inclusions intracytoplasmiques éosinophiles dans les kératinocytes et dépôts croûteux et micro-abcès intra-épidermiques ; 2 (x200) : micro-abcès épidermiques avec agrégats de granulocytes hétérophiles et infiltrats dermiques de cellules mononuclées (macrophages, lymphocytes, plasmocytes) et de granulocytes hétérophiles ; 3 (x200) et 4 (x400) : gonflement et vacuolisation des cellules avec inclusions intracytoplasmiques éosinophiles. Les flèches indiquent les inclusions intracytoplasmiques éosinophiles.

Les amplifications par PCR quantitatives ont mis en évidence de l'ADN viral dans les six lésions prélevées (quatre papules et deux masses croûteuses), bien que les titres soient en limite de détection pour trois papules. Ainsi, le nombre de copies génome moyen a été de  $4,6 \cdot 10^5$  copies/ $2 \mu\text{L}$  et les minimum, médiane et maximum étaient respectivement de 2 copies/ $2 \mu\text{L}$ ,  $1,3 \cdot 10^3$  copies/ $2 \mu\text{L}$  et  $1,4 \cdot 10^6$  copies/ $2 \mu\text{L}$ .

À l'issue des trois mois d'expérimentation, les oiseaux ont intégré des volières de réforme et ont continué à être suivi selon les protocoles standard d'ECWP. Plusieurs mois après la fin de l'étude, aucune récurrence n'avait été notée sur les oiseaux.

## 5. Conclusion

Le modèle expérimental de variole aviaire mis en place lors de ce travail constitue une étape importante dans l'étude de la variole aviaire chez l'Outarde et

apporte quelques données supplémentaires à la compréhension de son épidémiologie. Si certains résultats peuvent être considérés comme acquis (temps d'incubation, chronologie des lésions), d'autres soulèvent de nouvelles questions. La répétition sur de plus grands effectifs des infections réalisées ici doit donc être la priorité avant de pouvoir tester d'autres méthodes d'infection ou de comparer la virulence de différentes souches. La mise en place d'une étude sérologique serait également une étape clé pour valider différentes hypothèses et notamment pour évaluer les taux d'infections et les comparer aux taux d'expression clinique. L'appréciation de l'impact de la maladie, ou justement de l'infection sur certains paramètres zootechniques, est un enjeu important pour les élevages conservatoires, et les premiers résultats obtenus doivent désormais être confirmés.

## D. Essai de mise au point d'un test sérologique de type immunopéroxydase

### 1. Contexte

Il n'existe pas de test sérologique permettant de détecter le statut infecté ou non des outardes houbara vis-à-vis de la variole aviaire. Dans un contexte de surveillance et de prise en charge des cas de variole aviaire pour mieux comprendre la maladie et le statut immunitaire des outardes par rapport à cette maladie, il serait intéressant d'avoir un outil simple permettant de savoir si un oiseau, qu'il soit vacciné ou non, est infecté par un avipoxvirus. C'est avec cet objectif que nous avons tenté de mettre en place un test utilisant une réaction d'immunopéroxydase permettant de détecter de manière semi-quantitative la présence d'anticorps anti-avipoxvirus. Cet essai a été effectué sur la souche vaccinale canarypox de variole aviaire (CPV-V).

### 2. Matériel et méthodes

#### *i. Travail préliminaire*

Afin de tester la méthode, une réaction d'immunopéroxydase a été effectuée sur des P6 avec tapis cellulaire de RK13 infectées avec le virus de la myxomatose (souche SG33 utilisée à une MOI de 2). Ce type cellulaire a été choisi en raison de l'efficacité connue de la multiplication du virus de la myxomatose sur RK13. Les P6 étaient infectées comme montré sur la Figure 27.

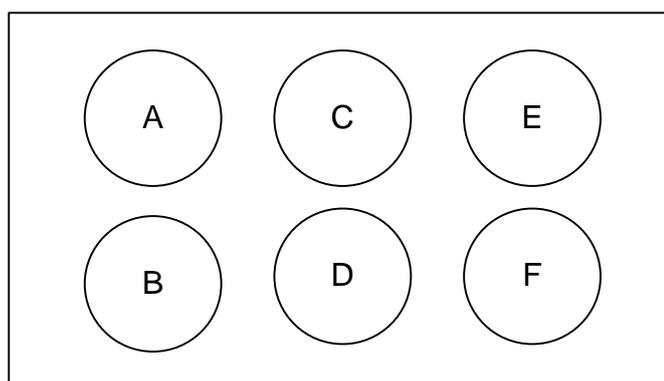


Figure 27: Réaction d'immunopéroxydase sur une P6 RK13 infectée avec un virus de la myxomatose.

A : cupule témoin négatif, réaction suivant le protocole complet ; B : cupule témoin négatif, réaction sans anticorps primaire ; C : cupule infectée, réaction sans traitement à l'eau oxygénée ; D : cupule infectée, réaction sans anticorps primaire ; E : cupule infectée, réaction sans anticorps secondaire ; F : cupule infectée, réaction suivant le protocole complet.

Lors de ce test, la cupule A était un témoin négatif, c'est-à-dire inoculée avec du milieu de culture, traitée avec le protocole normal de la réaction d'immunopéroxydase ; la cupule B était un témoin négatif traitée sans anticorps primaire ; la cupule C était infectée mais la réaction d'immunopéroxydase n'incluait pas le traitement à l'eau oxygénée ; la cupule D était infectée et traitée sans anticorps primaire ; la cupule E était infectée et traitée sans anticorps secondaire ; la cupule F était infectée et traitée selon le protocole complet.

Les résultats de ce test étant concluants, avec notamment l'observation d'agrégats de complexes antigènes-anticorps primaires-anticorps secondaires pour la cupule F, observables sous la forme de points noirs, il pouvait être utilisé pour notre avipoxvirus. Ce résultat nous a montré premièrement que la réaction fonctionnait, mais aussi que chaque étape du protocole, et notamment le traitement à l'eau oxygénée + méthanol, était nécessaire. Le protocole complet est décrit dans le paragraphe suivant.

#### *ii. Réaction d'immunopéroxydase sur CPV-V*

Ne connaissant pas le seuil de détection des anticorps de cet outil, trois P24 de QT6 ont été infectées avec une suspension de CPV-V diluée au 1/10 suivant le protocole d'inoculation décrit dans cette thèse (Chapitre II :A.2.iii(a)). Toutes les P24 ont été infectées le même jour et chaque plaque a été congelée à différents moments de l'amplification : la première à J3, la seconde à J8 et la dernière à J12 post infection. Immédiatement, les P24 étaient fixées puis congelées selon le protocole suivant en attendant d'être traitées par la réaction d'immunopéroxydase. Sous hôte, 400 µL de paraformaldéhyde 4% (PFA) ont été ajoutés au milieu de chaque cupule et celles-ci ont été conservées à température ambiante pendant 10 min. Le mélange milieu + PFA était ensuite retiré, puis un rinçage avec 1 mL de PBS 1X par cupule était effectué. Du méthanol pur glacé (300µL) a ensuite été ajouté et laissé pendant 5 min avant d'être retiré. Enfin, 1 mL de PBS 1X pH 7,2 était ajouté avant congélation à -80°C en attendant la réaction d'immunopéroxydase.

Cette réaction a été faite le même jour pour toutes les plaques. Pour cela, et après un stockage minimum de 24 h à -80°C post fixation, le PBS a été retiré et chaque cupule a été traitée avec une solution d'eau oxygénée et de méthanol (3 mL de H2O2 30% et 97 mL de méthanol pur) en quantité suffisante pour bien recouvrir toute la surface cellulaire (400 µL environ ont été utilisés). S'en est suivi un lavage au PBS. Des anticorps non marqués ont ensuite été ajoutés à différentes dilutions (plan de plaque Figure 28) et

les P24 ont été incubées 60 min à 37°C dans une chambre humide. Ces anticorps venaient de mélange de sérum d'outardes vaccinées pour les anticorps primaires positifs, et de mélange de sérum d'outardes saines non vaccinées pour les anticorps primaires négatifs. Cela fait, trois lavages successifs avec une solution à 0,1 % de Tween 20 dans du PBS ont été effectués avant l'ajout des anticorps secondaires conjugués à une horseradish peroxydase (HRP). Ceux-ci ont été produits sur des oies et sont dirigés contre les immunoglobulines Y (IgY) des colombes, canards, moineaux et poules. Un Western-blot avait été auparavant réalisé au laboratoire de microbiologie de l'ENVT sur des immunoglobulines d'œuf non fécondés d'Outarde houbara, purifiées au Maroc avec le kit Pierce™ Chicken IgY Purification Kit (Thermo Scientific) en suivant les instructions du fabricant, afin de montrer que cet anticorps secondaire reconnaissait aussi des immunoglobulines d'Outarde houbara. Les P24 ont ensuite été incubées 45 min à 37°C dans une chambre humide avant trois nouveaux lavages successifs avec la même solution de Tween 20 + PBS. Pour la révélation, 0,05 % de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ont été ajoutés et laissés pendant 10 à 15 min avant que la réaction d'immunopéroxydase ne soit stoppée en enlevant la solution de DAB et en ajoutant de l'eau du robinet.

Vingt-quatre cupules par plaques ont été utilisées, dont 4 cupules témoins numérotés T1 à T4. Au total, nous disposons donc de 12 cupules témoins non infectées et 20 cupules infectées avec CPV-V dilué au 1/10 pour chaque date (J3, J8 et J12 post infection). Il a donc été possible de tester plusieurs cas de figure résumés dans la Figure 28.

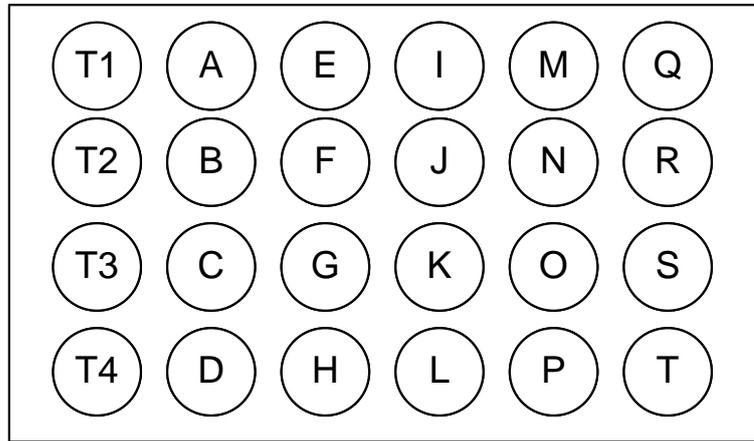


Figure 28: Réaction d'immunopéroxydase sur P24 QT6 infectées avec CPV-V.

Les différents scénari suivants ont été testés : pour les P24 à J3 et J8 (identiques): T1 : anticorps (Ac) primaires positifs dilués au 1:100 ; T2 : Ac primaires négatifs dilués au 1:100 ; T3 : Ac primaires positifs dilués au 1:500 ; T4 : Ac primaires négatifs dilués au 1:500 . Pour les P24 à J12 : T1 : sans Ac ; T2 : sans Ac primaires ; T3 : Ac primaires positifs dilués au 1:100 et sans Ac secondaires ; T4 : Ac primaires négatifs dilués au 1:100 et sans Ac secondaires. Pour les autres cupules, quel que soit le jour post infection : A, E et I : Ac primaires positifs dilués au 1:100 ; B, F et J : Ac primaires négatifs dilués au 1:100 ; C, G et K : Ac primaires positifs dilués au 1:500 ; D, H et L : Ac primaires négatifs dilués au 1:500 ; M, N, O et P : sans Ac primaires ; Q, R, S et T : sans Ac secondaires.

Les trois plaques ont été infectées de manière identique. Le traitement par immunopéroxydase est exactement le même pour les P24 à J3 et J8 mais diffère pour la P24 à J12 en ce qui concerne les cupules témoins. Ceci a été fait avec la volonté de tester un maximum de possibilité sur les cupules témoins.

P24 à J3 et J8 :

- T1 : Anticorps primaires positifs (issu d'un oiseau vacciné avec la souche vaccinale CPV-V) dilués au 1:100
- T2 : Anticorps primaires négatifs (issu d'un oiseau sain non vacciné) dilués au 1:100
- T3 : Anticorps primaires positifs dilués au 1 :500
- T4 : Anticorps primaires négatifs dilués au 1 :500

P24 à J12 :

- T1 : Sans anticorps
- T2 : Sans anticorps primaires
- T3 : Anticorps primaires positifs dilués au 1:100 et sans anticorps secondaires
- T4 : Anticorps primaires négatifs dilués au 1:100 et sans anticorps secondaires

Les autres cupules (de A à T) sont traitées de la même façon suivante :

- A, E, I : Anticorps primaires positifs dilués au 1 :100
- B, F, J : Anticorps primaires négatifs dilués au 1 :100
- C, G, K : Anticorps primaires positifs dilués au 1 :500
- D, H, L : Anticorps primaires négatifs dilués au 1 :500
- M, N, O, P : Sans anticorps primaires
- Q, R, S, T : Sans anticorps secondaires

### **3. Résultats :**

Cette expérience a été menée deux fois. Une première fois avec du DAB en poudre, utilisé pour la première fois au laboratoire, avec lequel aucun signal n'a été observé. Il a donc été décidé de recommencer avec cette fois-ci du DAB en tablette, mieux connu au laboratoire.

Concernant la P24 à J3, aucun signal n'a été observé. A J8, aucun signal clair n'a été observé. La réaction d'immunopéroxydase avait grandement abîmé les tapis cellulaires, ce qui rendait l'observation quasiment impossible. En revanche, concernant la P24 à J12, les cupules A, E et I (avec anticorps positifs dilués au 1 :100), des points noirs ont été observés, correspondant aux complexes antigène-anticorps primaires-anticorps secondaires, de même que pour les cupules C, G et K (anticorps positifs dilués au 1/500) de manière toutefois moins flagrante. Ces points noirs étaient similaires à ceux observés lors du test sur le virus de la myxomatose amplifié sur RK13, ce qui nous a conforté dans la positivité de ces résultats. Sur les cupules témoins ou celles pour lesquelles un anticorps (primaire ou secondaire) a été évincé, aucun signal n'a été observé.

## Chapitre III : Discussion et perspectives

Ce travail de thèse s'intègre dans un travail plus vaste concernant l'épidémiologie moléculaire des avipoxvirus chez l'Outarde houbara (thèse universitaire de Guillaume LE LOC'H). Il a permis la caractérisation d'une souche virale d'avipoxvirus responsable de variole aviaire chez l'Outarde houbara dans un contexte d'élevage conservatoire. En effet, cette maladie touchant une espèce menacée apparaît régulièrement sous forme de pics épizootiques, et est durablement présente au sein des élevages étudiés malgré les protocoles de prophylaxie mis en place.

Il y a encore beaucoup à apprendre sur ce virus, notamment de par la complexité et la diversité des avipoxvirus touchant les outardes. Des éléments de réponse précieux ont été apportés dans différents travaux (98) et donnent de nombreuses pistes pour des travaux ultérieurs.

### A. Isolement et traitement *in vitro*

Les avipox virus ne peuvent s'isoler que sur des cellules aviaires (8). Ici, nous voulions savoir sur quels types cellulaires différents avipoxvirus d'outardes s'isoleraient le mieux. Nous avons pour cela extrait des virus à partir de lésions cliniques puis montré qu'il était parfois possible d'isoler ces virus *in vitro* sur différents types cellulaires. La réalisation de cinétiques de multiplication virale sur différents types de cellules aviaires et à partir de différentes souches virales nous a permis de montrer que la souche vaccinale CPV-V se multipliait mieux sur CEF et QT6 que sur les autres types cellulaires étudiés. Les CEF sont d'ailleurs couramment utilisées dans l'étude des avipoxvirus (27,110,194,195). APV7 se multiplie correctement sur GKT. Les autres souches virales que nous avons testées, c'est-à-dire APV1, APV24, APV64, APV66 et APV87, n'ont pas montré de multiplication efficace sur l'ensemble des cellules testées. Les GKT, prometteuses pour APV1 et APV7, ont été testées dans la seconde série de cinétiques, mais les échantillons n'ont pas pu être dosés par PCRq. Les avipoxvirus s'adaptent en général bien sur différents types de cellule aviaire, les plus couramment utilisées étant les CEF et les QT35 (24,27,53,110,194,195). Il a toutefois été montré que certaines souches d'avipoxvirus se multiplient peu voire pas du tout *in vitro*, et ce quelque soit le type cellulaire (23,47). Il a également été montré que des fowlpox virus isolés sur des corbeaux d'Hawaï (*Corvus hawaiiensis*) se cultivaient mieux sur LMH (cellules de foie de

poulet) que sur QT35 (24). D'autres types de cellules ont été testés dans cette thèse, et de nombreuses autres sont encore à évaluer.

## **B. Cinétiques d'amplification virale sur cellules aviaire *in vitro* :**

La seconde série de cinétique réalisée lors de cette thèse avait pour but de trouver le couple virus-cellules le plus efficace pour une amplification virale *in vitro*. Lors de ces cinétiques, nous avons d'abord noté une multiplication efficace de CPV-V sur CEF, avec tout d'abord une décroissance du nombre de copies génomes les cinq premiers jours du premier passage, décroissance qui n'est pas observée lors du second passage. Il est possible que le virus issu directement de lésion n'était pas adapté à la multiplication sur CEF et qu'il ait mis plusieurs jours avant de se répliquer efficacement. Lors du troisième passage, une décroissance du nombre de copies génome est observable à partir du 13<sup>ème</sup> jour post infection. Cela peut être expliqué par une perte de permissivité des cellules après 13 jours d'infection. Le virus ne peut alors plus se répliquer, d'où la diminution du nombre de copies génome. Une hypothèse intrinsèque aux cellules elle-même est également possible. En effet, nous ne connaissons pas l'historique des CEF. Contrairement aux QT6 par exemple, leur origine n'est pas unique, les tapis cellulaires de chaque boîte ou flasque étant faits à partir de cellules primaires. Ainsi, il est possible qu'une sélection de cellules non permissives ait été faite de manière non intentionnelle, ce qui pourrait également expliquer nos résultats. L'hétérogénéité des CEF ainsi utilisées expliqueraient la différence dans les résultats des différents passages. L'absence d'informations concernant l'historique des cellules ne nous permet pas non plus de connaître leur âge, le nombre de passages qu'elles ont subis.... Autant de facteurs qui peuvent influencer nos résultats. Ceux-ci seraient à confirmer en refaisant des cultures de CPV-V sur CEF tout en maîtrisant l'historique de ces cellules.

Concernant l'amplification de CPV-V sur QT6, la plus grosse différence notable avec les CEF est une quantité de copies génome beaucoup moins importante dans le surnageant dès le premier jour du troisième passage. Il serait ici intéressant de connaître le nombre de copies génome à J0 afin de vérifier la quantité de virus dans l'inoculum issu du second passage. L'hypothèse la plus probable à ce phénomène est une perte du pouvoir infectieux de CPV-V après deux passages sur QT6. Or, lors des 4 jours du troisième passage, on observe une très légère diminution du nombre de copies génome dans le surnageant, bien moindre que lors du premier passage, et avec un ECP total. Dès lors, il est possible qu'il y ait eu un effet viral toxique de CPV-V sur les QT6,

entraînant la mort de nombreuses cellules et l'impossibilité au virus de se multiplier. Cette hypothèse va de pair avec la courte période d'apparition d'un ECP total, qui est de 4 jours contre 20 lors du troisième passage de CPV-V sur CEF, ainsi qu'avec l'absence de multiplication virale.

Pour toutes les autres souches virales, illustrées par l'exemple de APV7, aucune augmentation du nombre de copies génome n'a été observée. Au contraire, comme le montre la culture de APV7 sur QT6, on observe une diminution du nombre de copies génome quel que soit le passage, et cela avec la même vitesse ou presque. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, les cellules utilisées ne sont peut-être pas permissives vis-à-vis de APV7, rendant sa réplication impossible. Le virus a peut-être besoin de plus de passages pour s'adapter aux cellules. Il serait alors intéressant de faire d'autres passages afin de voir si cela influe sur la multiplication virale. Les cultures cellulaires pour APV7 ont été stoppées lorsque les cellules étaient considérées comme non viables et donc non propices à la multiplication virale. Or, l'aspect des cellules des cupules témoins par rapport aux cupules infectées était similaire, bien que la détérioration du tapis cellulaire fût plus avancée sur les cellules des cupules infectées. Il est ici justifié de se demander si le virus a joué un réel rôle sur l'état des cellules. Il est en effet possible que les cellules n'étaient pas capables de survivre sans que le virus en soit responsable. Cela est en accord avec les résultats de la cinétique de APV7 sur QT6.

Ces résultats sont encore plus marquants lors de l'amplification de APV7 sur CEF. Parce que nous ne connaissons pas le nombre de copies génome à J0 de chaque passage, nous ne pouvons émettre que des hypothèses. Toutefois, il est possible que, comme pour CPV-V, le virus APV7 ait mis 5 jours pour s'adapter aux cellules avant qu'il y ait multiplication virale. Pour le second passage, nous savons qu'après 7 jours la quantité de copies génome était très basse, mais nous ne pouvons dire s'il y a eu multiplication virale ou au contraire diminution du nombre de copies génome lors des sept premiers jours du second passage, ces points nous manquant (problème technique probablement dû à un défaut de stockage ; en effet, les tubes contenant les ADN extraits ont été conservés pendant 6 mois à +4°C avant d'être traités). Dans l'hypothèse où une multiplication virale n'aurait pas eu lieu lors de la première semaine du second passage, il n'y aurait pas eu d'adaptation du virus aux cellules lors du premier passage. Dans le cas où il y aurait eu multiplication virale lors des 7 premiers jours du second passage, le fait qu'il n'y ait presque pas de copies génome au septième jour du second passage tend

à montrer que cette multiplication virale aurait été très faible d'une part, ou qu'un problème lors de la préparation de l'inoculum du second passage soit survenu d'autre part.

### **C. Choix de la souche virale pour l'infection expérimentale :**

Comme mentionné précédemment, plusieurs critères ont orienté le choix de la souche utilisée pour l'inoculum. Il nous semblait plus judicieux de développer un premier modèle en utilisant un virus CNPV-like car, même si des virus FPWV-like peuvent localement être responsables d'une morbidité plus importante sur les outardes (Émirats Arabes Unis), ils ne sont pas retrouvés sur tous les projets de conservation, notamment en Asie centrale. Par ailleurs, les infections par les virus CNPV-like ont été moins étudiées (100,113) que celles causées par des virus FWPV-like, ces derniers étant davantage préoccupants en élevages avicoles (19,53,54,111,184). Notre choix s'est ensuite orienté vers un virus du sous-clade B2, qui présente un triple intérêt épidémiologique : (i) il s'agit du seul sous-clade identifié à la fois sur des outardes captives (Maroc, Émirats Arabes Unis et Ouzbékistan), sur d'autres espèces captives des mêmes projets de conservation (œdicnèmes criards au Maroc) et sur un oiseau sauvage capturé sur un site d'élevage (un moineau domestique au Maroc) ; (ii) ce sont les virus qui ont le plus souvent été identifiés sur l'avifaune sauvage au Maroc (105) ; (iii) le sous-clade B2 est un des sous-clade parent du virus recombinant identifié au Maroc (98). Suite à ces considérations épidémiologiques, nous avons sélectionné, dans le sous-clade B2, un virus qui avait été responsable de formes cutanées de variole aviaire, pour lequel nous disposions de suffisamment de matériel biologique de départ (lésion) et dont l'isolement sur culture cellulaire était possible et quantifiable, ces dernières caractéristiques n'étant pas systématiques chez les avipoxvirus (23,24,113).

### **D. Semi-purification :**

La réalisation d'une semi-purification semblait nécessaire à la formation d'un inoculum le plus sûr possible, afin de limiter le nombre de paramètres susceptibles de causer des signes cliniques aux outardes faisant l'objet de l'infection expérimentale. Or, une grande perte de matériel viral s'en est suivie, avec un rendement de 3,7% seulement. Ces pertes importantes, confrontées aux résultats de la première infection expérimentale, nous ont conduits à la réitérer avec un inoculum non purifié. Les résultats obtenus furent plus significatifs.

Dès lors, plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la grande perte de matériel viral lors cette semi-purification. Celle-ci est composée de plusieurs centrifugations lors de la récupération des virus à partir des flasques de culture cellulaire, afin d'éliminer les débris cellulaires, puis les dernières impuretés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose. En effet, de multiples manipulations et rinçages pendant lesquels du matériel viral peut être « oublié » ont été mis en œuvre. Il est également possible que du matériel viral soit perdu lors de la réalisation même de l'ultracentrifugation sur coussin de saccharose. En effet, suite à celle-ci, le surnageant est éliminé, suivant l'hypothèse que le virus passe à travers les coussins de saccharose. Or, si le virus ne passe pas dans les différentes couches du gradient de sucrose, il peut être éliminé avec le surnageant. Ainsi, une grosse partie du matériel viral peut être perdue. Une autre hypothèse serait que les particules virales soient liées à des débris cellulaires, et ainsi éliminées en même temps. Dans le cas où les virus seraient endommagés, ils ne migreraient pas dans la bande correspondant car leur densité serait moins élevée. Ils seraient ainsi éliminés comme les autres impuretés.

## **E. Infections expérimentales**

La mise en place d'un modèle expérimental, qui est un préliminaire nécessaire à toute étude plus approfondie, doit répondre à deux objectifs principaux :

- L'infection doit pouvoir induire la maladie, et ce de manière répétable et reproductible ;
- La maladie reproduite expérimentalement doit avoir une expression clinique et épidémiologique proche de(s) forme(s) observée(s) naturellement.

L'étude présentée ici a permis, avec un certain succès, de répondre à ces objectifs et nous a donné l'occasion de préciser certaines caractéristiques de la variole aviaire chez l'Outarde. Des lésions cutanées ont été observées sur 67% (inoculum issu d'une semi-purification virale) et 78% (inoculum issu d'un broyat de lésion) des oiseaux infectés alors qu'aucun oiseau contrôle n'a développé la maladie. Toutefois, seuls 17% et 22% des oiseaux ont développé des lésions caractéristiques d'une forme de variole aviaire observée naturellement chez les outardes.

### **1. Reproduction de la maladie**

Le choix de la dose infectieuse est un paramètre important à prendre en compte lors d'infection expérimentale. Dans notre étude, les concentrations en génome viral des

inoculums ont été estimées à moins de  $10^4$  copies/mL pour l'inoculum issu d'une semi-purification virale et à  $4 \times 10^7$  copies/mL pour celui issu d'un broyage de lésion. Les concentrations ont été mesurées par PCR quantitative car les effets cytopathiques produits par le virus n'étaient pas suffisamment nets pour être utilisés pour une quantification. La PCR quantitative présente l'intérêt de pouvoir mesurer plus précisément les concentrations mais ne fournit qu'une estimation indirecte du nombre de particules virales puisqu'elle dose des copies de séquences nucléotidiques. Dans la plupart des études qui se sont intéressées aux avipoxvirus, les inoculums ont été quantifiés en PFU (plaque-forming unit ou pock-forming unit suivant que le titrage a été effectué sur cellules ou CAM) ou en EID50 (fifty percent embryo infective dose). Les titres rapportés vont de  $10^5$  à  $3 \times 10^8$  PFU/mL (54,104). Beaucoup de ces travaux s'appuient sur la seule étude qui ait comparé différentes concentrations d'inoculums (112), et considèrent qu'une concentration de  $10^5$  PFU/mL correspond au minimum infectieux. Cependant, l'étude en question n'a porté que sur des souches vaccinales, donc avirulentes, en évaluant l'apparition d'une prise vaccinale alaire et la protection conférée vis-à-vis d'une infection. Dans une autre étude utilisant une souche virulente, et qui a quantifié en cours d'infection la charge virale au point d'inoculation en la corrélant au stade lésionnel, les lésions apparaissent quand le titre viral dans la lésion dépasse  $10^5$  PFU/g. On peut aussi s'interroger sur les quantités de virus qui sont réellement administrées lorsque les inoculations utilisent une voie transcutanée ou intradermique. D'ailleurs les volumes administrés sont rarement mentionnés dans les publications. Que ce soit en effet par transfixion du patagium à l'aide d'une aiguille trempée dans l'inoculum, ou par application d'un écouvillon imbibé contre une lésion de scarification, le volume et donc la quantité de virus administrés sont probablement très faibles, en tout cas difficilement quantifiables. Dans notre étude, malgré les concentrations très différentes des deux inoculums, la morbidité est identique (calculée pour chaque patte infectées par ponction : 2013, 61% ; 2014, 50%, test du chi-deux,  $p > 0,1$ ) et les manifestations cliniques très similaires. La question de la dose infectieuse se pose aussi quand on connaît le mode de transmission des avipoxvirus. En effet la vectorisation par les insectes, qui semble une des voies majeures de contamination, est uniquement mécanique. On peut donc supposer que les quantités de virus transportées par les vecteurs sont faibles mais suffisent pour provoquer la maladie. Cela est connu pour d'autres virus à vectorisation mécanique, comme celui du syndrome dysgénésique et

respiratoire porcin pour lequel une dose de 20 particules virales peut être suffisante pour provoquer la maladie (190).

L'objectif de notre étude étant de reproduire une forme cutanée de variole aviaire, nous avons uniquement testé des voies d'inoculation cutanées. Trois sont décrites dans la littérature : (i) transfixion du patagium, (ii) scarification d'une zone aptère (barbillon, crête) ou déplumée (cuisse, zone pectorale) et (iii) ponction des coussinets plantaires. Nous n'avons pas voulu utiliser la transfixion du patagium car même si cette voie pouvait fonctionner, elle aurait induit des lésions à une localisation atypique pour les outardes. Dans un premier temps, nous avons donc testé la scarification et la ponction. Bien que cette dernière ait été peu rapportée dans la littérature, elle nous a semblé, dans notre cas, être la voie la plus « naturelle », car les observations de terrain nous ont montré que peu de lésions étaient associées à des plaies (abrasion, picage, traumatisme) sur les outardes.

## **2. Expression clinique et modifications physiologiques**

La production d'un inoculum à partir de virus amplifiés sur cellules puis semi-purifiés a permis de réaliser une infection expérimentale concluante d'un point de vue clinique, avec la présence de lésions spécifiques de la forme cutanée de variole aviaire sur certaines outardes (masses croûteuses), mais moins d'un point de vue histologique où aucun corps de Bollinger n'a été observé, probablement en raison de la faible quantité de virus présent dans l'inoculum à cause du faible rendement de la semi-purification. Une forte réaction inflammatoire locale ainsi que des lésions de surinfection ont également été observées, ce qui a également pu masquer les corps de Bollinger. D'autres lésions moins spécifiques de la variole aviaire ont également été observées (nodules...). Toutefois, la présence de lésions cutanées typiques nous fait supposer une production virale importante, comme montré par les PCRq effectuées sur les lésions. Ainsi, les oiseaux atteints de petites lésions comme des nodules régressant spontanément, moins typiques de la variole aviaire chez l'Outarde, pourraient être dues principalement à autre chose que l'action directe du virus (inflammation, surinfection de la plaie d'inoculation...).

Il a alors été décidé de produire l'inoculum directement à partir d'une lésion, sans amplification sur cellules, et sans semi-purification, afin d'avoir une quantité de virus plus importante dans l'inoculum. La seconde infection expérimentale était alors plus

concluante à tous points de vue et nous a permis de montrer que le virus extrait des lésions (APV7) était bien responsable de la maladie.

La variole aviaire est très majoritairement observée sous sa forme cutanée sur les outardes des projets étudiés, et les observations en élevage rapportent que, dans la plupart des cas, les oiseaux ne présentent qu'une seule lésion cutanée. Aussi, c'est cette forme que nous voulions reproduire expérimentalement et, en effet, seules des lésions cutanées ont été induites, et ce uniquement aux points d'inoculation. Toutefois, tous les oiseaux n'ont pas développé de lésions et on peut s'interroger sur les causes de ces échecs. Il est largement admis que la sensibilité d'une espèce hôte aux avipoxvirus varie selon les souches virales, certaines n'étant pas capables d'induire une infection clinique (38). Dans notre cas, il est cependant peu probable que la nature du virus soit en cause puisque la souche est issue d'une lésion cutanée massive prélevée sur une outarde. De plus, lors de la seconde série d'infections, un broyat de lésion a été utilisé directement comme inoculum, excluant ainsi la possibilité que la virulence de la souche ait pu être modifiée. Par contre, la voie d'inoculation a certainement un rôle dans le succès des infections. Nous avons pu le constater en comparant deux voies d'inoculation lors de la première série d'infection, la scarification s'étant montrée significativement moins efficace que la ponction. On peut se demander si la présence de sang au site d'inoculation ne diluerait pas l'inoculum. La peau des outardes étant en effet très fine, il est difficile de réaliser des inoculations strictement cutanées et la plupart du temps, du sang perle empêchant probablement les particules virales de rester suffisamment de temps au contact des cellules épithéliales, ceci étant particulièrement vrai lors de scarification.

Les conditions expérimentales elles-mêmes pourraient être une cause des échecs apparents d'infection de certains oiseaux. Ceux-ci ont en effet été élevés dans des conditions environnementales leur procurant un maximum de confort et dans un cadre sanitaire contrôlé. Cette situation est quelque peu différente des conditions classiques d'élevage dans lesquelles les cas de variole aviaire sont rencontrés. Les oiseaux peuvent alors être soumis à différents facteurs de stress (climatique, autres infections...) qui sont des facteurs de sensibilisation à la maladie (100). De même, nous n'avons pas pu tester chez les oiseaux expérimentaux l'absence préalable d'immunité acquise par manque d'outils adéquats. Mais les sérums collectés le jour de l'infection pourront être ultérieurement analysés pour répondre à cette question. Il serait aussi intéressant d'analyser le reste des sérums collectés au cours de l'étude afin d'évaluer la proportion

d'oiseaux qui auraient été infectés sans manifestation clinique, cette situation pouvant exister (112).

Lors de la première série d'infections, la recherche de virémie par PCR quantitative n'a pas été concluante. Parmi les quelques études qui ont recherché la présence de virémie, seule l'une d'elles a mis en évidence, après inoculation intraveineuse, une virémie très transitoire entre les troisième et septième jours post-inoculation, associée au développement de multiples lésions cutanées (104). L'observation dans notre étude de lésions circonscrites aux points d'inoculation est peu en faveur d'une diffusion du virus dans l'organisme et est donc cohérente avec l'absence de virémie détectée. D'ailleurs, les études expérimentales ayant utilisé des voies d'infection cutanées ont souvent échoué à induire des lésions à distance du point d'inoculation.

Parmi ces lésions, moins de 20% se sont présentées sous une forme similaire à celle observée naturellement (masse croûteuse), les autres s'étant manifestées sous forme de papules de moins d'un centimètre qui ont régressé spontanément en un peu plus d'un mois. Plusieurs études expérimentales ont publié des résultats assez similaires, notamment lors de transfixions du patagium où seules des prises vaccinales alaires ont été observées (sans plus de précision sur leur aspect) (57,184). Afin d'obtenir davantage de lésions « classiques », la méthode d'inoculation a été ajustée lors de la seconde série d'infections. En choisissant un site d'inoculation permettant une inoculation cutanée plus stricte, plus aucune lésion « profonde » n'a été observée bien que la proportion de papules soit restée importante. Des inclusions virales n'ont aussi été observées que dans les lésions de la seconde série d'infections, validant le choix du site d'inoculation. Bien que le mode opératoire puisse être en cause, il se pourrait aussi que des lésions de ce type (papules) soient présentes lors d'infection naturelle mais ne soient pas détectées car trop petites ou non identifiées comme lésions varioliques. Malgré le suivi quotidien de chaque outarde captive, les oiseaux ne sont pas capturés tous les jours et il est réaliste que des lésions comme celle figurant sur la Figure 24 (cf. p100, images 1 et 2) puissent passer inaperçues. On conçoit aussi très bien qu'en élevage avicole, ce type de lésions ne soit jamais rapporté.

L'étude présentée ici a permis de préciser certaines caractéristiques épidémiologiques de la variole aviaire chez l'Outarde. Notamment, nous avons pu évaluer les temps d'incubation de la maladie qui sont en moyenne de 38 à 39 jours dans nos conditions expérimentales. Cette durée est plus élevée que la plupart de celles

rapportées par les autres études, situées entre 3 et 10 jours post-inoculation (56,104,109,113,191). Seule une étude, qui est d'ailleurs une des rares à avoir comme nous utilisé la ponction comme voie d'inoculation, rapporte des temps d'incubation proches des nôtres, de 21 à 43 jours (100). Les durées d'évolution des lésions que nous avons observées concordent davantage avec celles publiées (37 jours en moyenne dans notre cas). Ici encore, on peut se demander si la concentration de l'inoculum peut être une cause de ces temps d'incubation étonnamment longs. Mais comme nous l'avons discuté auparavant, lors d'infection par un insecte vecteur, les doses infectieuses sont probablement faibles. De plus nous obtenons les mêmes temps d'incubation avec deux inoculums de concentration différente. Lorsqu'on s'intéresse uniquement aux cinq lésions typiques de variole aviaire cutanée (masse croûteuse) qui ont été produites dans notre étude, le temps d'incubation moyen est de 25 jours, donc plus de deux fois supérieur aux temps retrouvés dans la littérature. On peut donc penser que ces temps d'incubation sont davantage liés à la souche et à l'espèce hôte et il semble raisonnable de considérer que de tels temps d'incubation puissent être retrouvés lors d'infection naturelle. Ceci a une importance double. Tout d'abord il faut désormais considérer cette donnée pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie. Ainsi l'analyse de facteurs de risques comme le contact avec un oiseau infecté ou malade doit prendre en considération la période et donc la position de chaque individu lorsqu'il a été contaminé et il faudra alors soustraire non pas 4 à 10 jours mais plus de 25 jours à la date de détection des lésions (et même probablement plus si l'on considère que les lésions ne sont détectées que lorsqu'elles atteignent une certaine taille). Ensuite, cette donnée a une importance capitale dans la gestion sanitaire des élevages, par exemple sur l'appréciation des risques ou le choix des durées de quarantaine. On peut ainsi rétrospectivement se demander si des outardes asiatiques importées aux NARC depuis ECWP et qui ont développé des lésions plus d'un mois après leur arrivée n'avaient pas, en fait, été infectées au Maroc.

Ce modèle expérimental nous a ainsi permis d'en savoir plus sur la variole aviaire chez l'Outarde houbara, notamment d'un point de vue clinique et épidémiologique (temps d'incubation, chronologie des lésions...). Des pistes ont été données en vue d'infections expérimentales ultérieures notamment dans la conduite à tenir et dans la méthode d'inoculation. Nous avons tenté de reproduire par la ponction ce qu'il se passe dans la nature avec la transmission de la maladie par les insectes piqueurs. Il serait

intéressant d'essayer de reproduire une infection expérimentale à partir d'insectes piqueurs directement, préalablement infectés. L'intérêt serait ici d'avoir plus d'information sur le fonctionnement de la maladie hors élevage, notamment pour les temps d'incubation et si le caractère très ponctuel des lésions observées lors de notre expérimentation est vérifié. De plus, cela permettrait de vérifier l'hypothèse selon laquelle les insectes piqueurs sont bien les vecteurs de la maladie. Cela nécessiterait de mettre en place un système d'infection des insectes, en les mettant par exemple en contact avec des outardes infectées, avant de les mettre au contact d'outardes saines. Cela permettrait aussi de quantifier la quantité de virus présent dans les insectes, ce qui nous donnerait une idée de la dose infectieuse de l'inoculum nécessaire à la manifestation de la maladie dans la nature. L'hypothèse selon laquelle les insectes piqueurs ne sont que vecteurs mécaniques pourrait aussi être appréhendée, avec la caractérisation des virus présents dans leurs différents organes.

#### **F. Tests sérologiques : approche de la méthode**

Les résultats de notre réaction d'immunopéroxydase nous montrent que cette méthode est techniquement réalisable. L'étape de neutralisation des réactions endogènes par un traitement à l'eau oxygénée est indispensable. Le problème majeur rencontré ici était la grande fragilité des tapis cellulaires qui rendait difficile l'amplification virale dans un premier temps, et l'observation d'éventuels signaux suite à la réaction d'immunopéroxydase dans un second temps. En effet, les différents lavages et manipulations (congélation/décongélation) abimaient fortement les tapis cellulaires. Ainsi, nous pouvons dire qu'à J3 post infection *in vitro*, aucun signal n'est émis, et qu'un signal peut être observé à J12 post infection. Un doute subsiste toutefois à J8. Il serait intéressant de mener cette expérience sur des plaques fixées tous les jours entre J4 et J12 afin de voir à quel moment un signal apparaît, et si cela est reproductible.

L'outil diagnostique le plus largement utilisé pour le diagnostic de la variole aviaire est la PCR. D'autres techniques ont été testées et certaines comparées à la PCR, notamment l'histopathologie, des tests sérologiques, la culture sur CAM ou sur cellules, la microscopie électronique... (6,22,23,27,58,63,74,79,82,85,89,102,110, 157,164,167,168,196,197-203) et se sont avérées longues et coûteuses, là où la PCR montrait une plus grande sensibilité (42). En effet, la PCR peut détecter un très faible nombre de copies d'acides nucléiques viraux, et combinée à un profil de restriction, est

l'outil diagnostique le plus performant (3). Toutefois, les PCR ne sont pas discriminantes d'un virus infectieux seul et peuvent détecter des particules virales non infectantes présentes dans l'échantillon. Elles nécessitent également un matériel coûteux. D'autres techniques se fondant sur la méthode PCR peuvent aussi être utilisées pour détecter des coinfections, comme cela a été fait via la technologie Multiplex PCR (coinfection papillomavirus/avipox virus ou avipoxvirus de clades différents sur des oiseaux (105,201)), mais permettent également de distinguer différentes souches virales dans tous les clades existants (105).

Le diagnostic immunologique de la variole aviaire est possible et c'est surtout la réponse humorale qui est mesurée. Divers outils, aucun n'ayant été commercialisés, ont été développés et utilisés dans le cadre d'études de protections croisées entre souches virales ou pour évaluer des séroprévalences : immunodiffusion sur gel d'agarose, séroneutralisation virale et divers ELISA indirects ou compétitifs (19,20,57,80,107,108). Parmi ces nombreuses études, peu se sont intéressées à la cinétique de la production en anticorps. Des infections expérimentales ont montré que des anticorps circulants sont détectables dès une à deux semaines post-infection et que leur taux atteint un pic vers quatre semaines post-infection (19,109) ou continue à augmenter plusieurs semaines de suite (110). La détection d'anticorps est possible jusqu'à au moins 30 semaines post-infection (110). La réponse humorale dépend de la souche virale utilisée et au moins une étude montre que la présence de séquence intégrale de REV dans des souches FWPV-like modulerait cette réponse (56). Il n'y a pas d'évidence dans la littérature qu'un transfert d'immunité in-ovo puisse exister.

Dans le cadre de notre étude, nous avons tenté de développer un outil alternatif permettant de détecter le statut infectieux des outardes vis-à-vis des avipoxvirus. Bien que compliquée à mettre en place, notamment de par la grande fragilité des tapis cellulaires utilisés et cela sur toutes nos tentatives, nous avons montré que la réaction d'immunopéroxydase fonctionne. Cette méthode avait déjà été tentée avec succès sur des autruches en 2002, mais jamais sur l'Outarde houbara (179). Celle-ci est certes peu pratique, et ne peut être réalisée que sur un nombre d'individus limité, mais l'absence d'antigènes en quantité suffisante nous a contraint à renoncer à élaborer un test ELISA. Nos travaux ont en revanche montré que l'utilisation de la réaction d'immunoméroxydase peut servir de travail préliminaire à la mise en place d'autres tests sérologiques. En effet, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase choisie dans notre étude reconnaît les immunoglobulines d'outardes vaccinées avec un avipoxvirus

atténué, et pourrait ainsi être utile à des travaux ultérieurs de mise au point d'un test ELISA.

Nos résultats doivent être confirmés en répétant les essais (reproductibilité), et développés afin de mettre en place un test fiable permettant de détecter des infections par différentes souches virales par exemple. Ainsi, tester cette technique après infection par APV 7 au lieu de CPV-V, APV 7 étant une souche causant une forme cutanée de variole aviaire chez l'Outarde houbara, forme la plus fréquemment observée, et dont nous connaissons désormais les manifestations, serait intéressant. De plus, il a été montré que des souches virulentes de fowlpox induisent une meilleure réponse en anticorps spécifiques que les souches les moins virulentes sur des poulets (19), et cela même lorsque le virus intègre un REV. La souche vaccinale étant atténuée, il est possible qu'une meilleure réponse soit observée avec APV7 ou toute autre souche virulente.

Le développement d'une technique sérologique ELISA simple, rapide, économique, sensible et reproductible avait déjà été mise en place pour le diagnostic de la variole aviaire sur des poulets en 1987 (7). Bien que cette technique s'avère sensible pour détecter des taux sanguins en anticorps élevés, les avipoxvirus sont connus pour diminuer la réponse immunitaire de l'hôte, notamment s'ils intègrent des REV (19). Il a toutefois été montré que malgré des réponses humorales et CMI diminuées, la réponse en anticorps d'un test ELISA n'était pas affectée. Ainsi, l'intégration de REV dans le génome d'un avipox virus ne réduit pas toutes les réponses immunitaires de l'hôte infecté, et une production en anticorps spécifiques contre les protéines virales est toujours possible, ce qui fait de l'ELISA une bonne méthode diagnostique.

Ce test pourrait aider à la détection des oiseaux infectés par des avipoxvirus notamment dans le cadre d'une sélection des individus destinés aux relâchés. Des informations sur la prévalence de la variole aviaire, du taux d'oiseaux porteurs sains ou sub-cliniques seraient également accessibles. Cela pourrait être fait au sein des élevages conservatoires, mais également au sein des populations sauvages. En effet, lors de captures d'outardes sauvages, des prises de sang suivies de test sérologiques peuvent renseigner sur la prévalence de l'infection hors élevages, et donc dans des contextes différents (pression infectieuse différente due à des densités de population différentes, à une densité d'insectes piqueurs plus faible que dans les élevages....). Ce test sérologique peut également permettre la mise en place de contrôles de la quantité d'anticorps sanguins chez les outardes à la suite de vaccination. Ainsi, les protocoles vaccinaux

pourraient être mis à jour en terme de fréquence, de nombre de rappels, et de souche vaccinale utilisée, afin qu'ils apportent une meilleure protection.

## **G. Applications sur le terrain**

Nos infections expérimentales n'ont pas montré de caractère transmissible de la maladie sans contacts directs ou indirects des oiseaux entre eux ou sans vecteurs. Il n'y aurait donc pas de transmission de l'infection par aérosol. Toutefois, bien que supposé, le mode de transmission, à savoir l'intervention d'insectes piqueurs comme jouant le rôle de vecteurs mécaniques, n'a pas été vérifié. Sa compréhension aiderait à mettre en place des programmes préventifs plus efficaces. En effet, malgré des mesures de lutte contre les insectes piqueurs, la variole aviaire reste largement répandue dans les élevages. D'autres formes de transmission sont donc à l'œuvre, certainement causées par le mode d'élevage (interaction avec l'homme et le matériel, densité d'oiseaux plus important que dans la nature, ...). De plus, lors de blessures ou d'abrasions, le virus pourrait être transmis par une plus grande diversité de vecteurs, les insectes piqueurs n'étant à priori pas nécessaires en cas de lésion de l'épiderme (rôle de vecteur mécanique uniquement).

Il a également été montré sur d'autres espèces d'oiseaux qu'il pouvait exister des coinfections (papillomavirus/poxvirus (105)), et des interactions entre poxvirus et d'autres agents pathogènes, notamment les plasmodiums (24). Les conséquences de ces interactions ne sont apparemment pas graves bien qu'encore mal connues, mais d'autres interactions avec d'autres virus ou une évolution dans les interactions déjà présentes sont à craindre. Il a aussi été démontré que d'autres agents infectieux (virus, parasites) dont le pouvoir pathogène ne s'exprime pas normalement, peuvent, *via* leurs interactions avec les avipoxvirus, jouer un rôle significatif dans la relation entre l'hôte et le virus (100). Il est donc important d'éviter la dissémination de la variole aviaire tant dans les élevages conservatoires d'outardes que dans la nature où d'autres espèces pourraient être infectées. En effet, la spécificité d'hôte des avipoxvirus, bien qu'elle existe (38,48) a été plusieurs fois remise en question (1,47,98), ce qui nous pousse à penser que la dissémination du virus dans la nature par le relâché d'outardes infectées aurait des conséquences potentiellement graves sur d'autres espèces, notamment les espèces naïves. En effet, il a été montré que la variole aviaire était bien souvent mortelle sur ces dernières (113) Ne relâcher aucun oiseau infecté, en écartant les oiseaux infectés ou douteux, semble donc la meilleure des solutions

Pour cela, détecter la maladie le plus précocement possible semble indispensable. Cela permettrait aussi de limiter ses impacts sur les performances des outardes même s'il a déjà été montré qu'ils étaient peu importants voire négligeables sur certaines performances de reproduction (98), des mesures thérapeutiques et de prévention de la propagation étant mises en place rapidement afin d'éviter la dissémination du virus dans l'élevage. Par exemple, les temps d'incubation mis en évidence lors des infections expérimentales réalisées dans notre étude ont montré qu'une quarantaine de deux mois minimum est nécessaire pour les oiseaux infectés. De plus, un test diagnostique permettant la détection de l'infection avant l'apparition de signes cliniques permettrait d'éviter la dissémination du virus par le relâché d'outardes infectées.

En élevage, les oiseaux sont quasi-systématiquement vaccinés. Or de nombreux échecs vaccinaux ont été observés dans différents élevages, à cause d'une application inefficace ou insuffisante ou d'un pouvoir immunogène faible du vaccin utilisé. L'ELISA est une technique simple, rapide et efficace pour détecter la présence d'anticorps post-vaccination, et ainsi détecter au plus vite les échecs vaccinaux. La manifestation de signes cliniques peut alors être limitée et la propagation du virus au sein de l'élevage endiguée. Les vaccins utilisés sont créés en atténuant le virus par culture sur CAM ou sur cellules. Il serait peut-être plus intéressant de diminuer la virulence par des manipulations génétiques, comme des délétions de facteurs de pathogénicité identifiés par exemple. Le problème ici est que nous connaissons mal les facteurs de virulence des avipoxvirus. De plus, la résurgence de la variole aviaire dans des élevages dans lesquels la vaccination était efficace depuis plus de 50 ans est due à de nouvelles souches virales ou à l'introduction de REV dans le génome des avipoxvirus (50). Ne connaissant pas les protéines antigéniques majeures, nous ne sommes pas capables de mettre en place un vaccin réellement efficace, les trois protéines virales des avipoxvirus les plus abondantes n'étant apparemment pas les plus immunogènes (7)

Dans tous les cas, la prise en charge des oiseaux déclarant une clinique se fait de manière individuelle, ce qui nécessite beaucoup de temps, de moyens et de manipulations des oiseaux. Malgré les mesures d'hygiène et de sécurité, cela peut favoriser la propagation du virus, et induire un stress supplémentaire aux oiseaux, diminuant ainsi leurs défenses immunitaires (176,177) et l'entrée dans un cercle vicieux.

## H. Conclusion

Cette thèse, qui s'inscrit dans le cadre général de l'acquisition de connaissances sur la biologie de l'Outarde en captivité, a permis d'aborder un problème infectieux concret concernant les élevages conservatoires d'espèces menacées.

Différentes techniques ont été mise en œuvre afin de produire un inoculum capable de reproduire les signes cliniques d'une forme cutanée de variole aviaire sur l'Outarde houbara. L'infection expérimentale fut un succès, avec un protocole efficace, mais ne concernait que l'une des nombreuses souches virales isolées à partir de lésions de variole. Or ces souches peuvent produire des manifestations cliniques variées dans un contexte expérimental. Par exemple, une inoculation d'une souche virale responsable de la forme diphtérique de variole aviaire sur des pingouins (*Spheniscus magellanicus*) au Brésil n'a eu pour effet qu'une forme cutanée légère lors d'infection expérimentale (204). Notre travail préliminaire s'étant avéré efficace et riche en enseignements, il peut servir de base à des infections expérimentales de souches causant une forme cutanée différente, mais aussi à des infections expérimentales avec des souches responsables de formes diphtériques, voire systémiques. Le mode d'inoculation naturel étant supposé mais non connu, des infections expérimentales utilisant la même souche virale mais des voies d'inoculation différentes, ou utilisant des souches responsables de formes diphtériques ou systémiques avec le même protocole que celui utilisé dans cette thèse, nous fourniraient beaucoup d'informations notamment sur le lien entre forme clinique, souche virale, voie d'inoculation, et également sur le fait qu'une souche puisse causer différentes formes cliniques.... La voie intraveineuse semble intéressante à étudier si on prend en compte que le virus est administré par les insectes piqueurs, ce qui n'est probablement pas la seule voie d'inoculation.

Tester les vaccins par des inoculations expérimentales permettrait également de voir d'éventuels signes cliniques et de faire un suivi sérologique sur plusieurs mois afin d'adapter un protocole vaccinal concret et correct.

La technique de détection des anticorps par réaction d'immunopéroxydase semble fonctionner également, bien que d'autres tests sur des souches autres que la souche vaccinale permettraient de le confirmer. Afin de détecter la présence du virus dans un élevage le plus précocement possible, il serait bon d'étendre cette technique à la détection d'anticorps dirigés contre des souches virales pathogènes.

Néanmoins, dans le cadre du suivi des élevages conservatoires, sous condition de disposer d'antigènes d'avipoxvirus en quantité suffisante, et au vu du nombre important d'individus à tester, la mise en place d'un test sérologique ELISA semble indispensable (automatisation, résultats quantitatifs). Sa mise au point serait une suite logique à ce travail.

## Bibliographie

1. Jarmin S, Manvell R, Gough RE, Laidlaw SM, Skinner MA. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. *J Gen Virol.* 2006;87:2191–201.
2. Gyuranecz M, Foster JT, Dan A, Ip HS, Egstad KF, Parker PG, et al. Worldwide phylogenetic relationship of avian poxviruses. *J Virol.* 2013;87(9):4938–51.
3. Lüscho D, Hoffmann T, Hafez H. Differentiation of Avian Poxvirus Strains on the Basis of Nucleotide Sequences of 4b Gene Fragment. *Avian Dis.* 2004;48(3):453–62.
4. Moss B. Poxviridae. In: *Fields virology.* 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. p. 2129–59.
5. Condit RC, Moussatche N, Traktman P. In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. *Adv Virus Res.* 2006;66:31–124.
6. Boulanger D, Smith T, Skinner MA. Morphogenesis and release of fowlpox virus. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 3):675–87.
7. Mockett APA, Southee DJ, Tomley FM, Deuter A. Fowlpox virus: its structural proteins and immunogens and the detection of viral-specific antibodies by ELISA. *Avian Pathol.* 1987;16(3):493–504.
8. Boulanger D, Green P, Jones B, Henriquet G, Hunt LG, Laidlaw SM, et al. Identification and characterization of three immunodominant structural proteins of fowlpox virus. *J Virol.* 2002;76(19):9844–55.
9. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. The Genome of Fowlpox Virus. *J Virol.* 2000;74(8):3815–31.
10. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. The Genome of Canarypox Virus. *J Virol.* 2004;78(1):353–66.
11. Offerman K, Carulei O, van der Walt AP, Douglass N, Williamson A-L. The complete genome sequences of poxviruses isolated from a penguin and a pigeon in South Africa and comparison to other sequenced avipoxviruses. *BMC Genomics.* 2014;15(1):463.
12. Laidlaw SM, Skinner MA. Comparison of the genome sequence of FP9, an attenuated, tissue culture-adapted European strain of Fowlpox virus, with those of virulent American and European viruses. *J Gen Virol.* 2004;85:305–22.
13. Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *J Virol.* 2003 Jul 1;77(13):7590–600.
14. Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res.* 2006 Apr;117(1):105–18.

15. Gubser C, Hué S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol*. 2004;85:105–17.
16. Hertig C, Coupar BEH, Gould AR, Boyle DB. Field and Vaccine Strains of Fowlpox Virus Carry Integrated Sequences from the Avian Retrovirus, Reticuloendotheliosis Virus. *Virology*. 1997 Sep;235(2):367–76.
17. Singh P, Schnitzlein WM, Tripathy DN. Reticuloendotheliosis Virus Sequences within the Genomes of Field Strains of Fowlpox Virus Display Variability. *J Virol*. 2003;77(10):5855–62.
18. Kim TJ, Tripathy DN. Reticuloendotheliosis virus integration in the fowl poxvirus genome: not a recent event. *Avian Dis*. 2001;45(3):663–9.
19. Wang J, Meers J, Spradbrow PB, Robinson WF. Evaluation of immune effects of fowlpox vaccine strains and field isolates. *Vet Microbiol*. 2006;116:106–19.
20. Tripathy DN, Reed WM. Pox. In: *Diseases of poultry*. 13th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons; 2013. p. 333–50.
21. Weli SC, Tryland M. Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *Virol J*. 2011;8(49):1–15.
22. Gelenczei EF, Lasher HN. Comparative studies of cell-culture-propagated avian pox viruses in chickens and turkeys. *Avian Dis*. 1968 Feb;12(1):142–50.
23. Krone O, Essbauer S, Wibbelt G, Isa G, Rudolph M, Gough RE. Avipoxvirus infection in peregrine falcons (*Falco peregrinus*) from a reintroduction programme in Germany. *Vet Rec*. 2004;154:110–3.
24. Tripathy DN, Schnitzlein WM, Morris PJ, Janssen DL, Zuba JK, Massey G, et al. Characterization of poxviruses from forest birds in Hawaii. *J Wildl Dis*. 2000;36(2):225–30.
25. Kim T, Schnitzlein WM, McAloose D, Pessier AP, Tripathy DN. Characterization of an avianpox virus isolated from an Andean condor (*Vultur gryphus*). *Vet Microbiol*. 2003;96:237–46.
26. Weli SC, Nilssen Ø, Traavik T. Avipoxvirus multiplication in a mammalian cell line. *Virus Res*. 2005 Apr;109(1):39–49.
27. Stannard LM, Marais D, Kow D, Dumbell KR. Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin. *J Gen Virol*. 1998;79:1637–46.
28. Boyle DB. Genus Avipoxvirus. In: Andrew A. Mercer AS a. OW, editor. *Poxviruses*. Basel/Switzerland; 2007. p. 217–51.
29. Graham BS, Crowe JE, Ledgerwood JE. Immunization Against Viral Diseases. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. p. 374–413.
30. Bratke KA, McLysaght A, Rothenburg S. A survey of host range genes in poxvirus genomes. *Infect Genet Evol*. 2013 Mar;14:406–25.

31. Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol.* 2014 Jan;21:15–40.
32. Babkin IV, Shchelkunov SN. Time scale of Poxvirus evolution. *Mol Biol.* 2006 Jan;40(1):16–9.
33. Kerr PJ, Ghedin E, DePasse JV, Fitch A, Cattadori IM, Hudson PJ, et al. Evolutionary History and Attenuation of Myxoma Virus on Two Continents. Levin BR, editor. *PLoS Pathog.* 2012 Oct 4;8(10):e1002950.
34. Firth C, Kitchen A, Shapiro B, Suchard MA, Holmes EC, Rambaut A. Using Time-Structured Data to Estimate Evolutionary Rates of Double-Stranded DNA Viruses. *Mol Biol Evol.* 2010 Sep 1;27(9):2038–51.
35. Hendrickson RC, Wang C, Hatcher EL, Lefkowitz EJ. Orthopoxvirus Genome Evolution: The Role of Gene Loss. *Viruses.* 2010 Sep 15;2(9):1933–67.
36. Hatcher EL, Hendrickson RC, Lefkowitz EJ. Identification of Nucleotide-Level Changes Impacting Gene Content and Genome Evolution in Orthopoxviruses. *J Virol.* 2014 Dec 1;88(23):13651–68.
37. Virus Taxonomy: 2013 Release [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses. [cited 2014 Dec 2]. Available from: <http://ictvonline.org/>
38. Kirmse P. Host Specificity and Pathogenicity of Pox Viruses from Wild Birds. *Bull Wildl Dis Assoc.* 1969;5:376–86.
39. Boosinger TR, Winterfield RW, Feldman DS, Dhillon AS. Psittacine pox virus: virus isolation and identification, transmission, and cross-challenge studies in parrots and chickens. *Avian Dis.* 1982;26(2):437–44.
40. Annuar BO, Mackenzie JS, Lalor PA. Isolation and Characterization of Avipoxvirus from Wild Birds in Western Australia. *Arch Virol.* 1983;76:217–29.
41. Binns MM, Boursnell MEG, Tomley FM, Campbell J. Analysis of the fowlpoxvirus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. *Virology.* 1989 May;170(1):288–91.
42. Lee LH, Lee KH. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J Virol Methods.* 1997;63:113–9.
43. Weli SC, Traavik T, Tryland M, Coucheron DH, Nilssen O. Analysis and comparison of the 4b core protein gene of avipoxviruses from wild birds: Evidence for interspecies spatial phylogenetic variation. *Arch Virol.* 2004;149:2035–46.
44. GenBank [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [cited 2014 Nov 28]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
45. Offerman K, Carulei O, Gous TA, Douglass N, Williamson A-L. Phylogenetic and histological variation in avipoxviruses isolated in South Africa. *J Gen Virol.* 2013 Oct 1;94(Pt\_10):2338–51.

46. Abdallah FM, Hassanin O. Detection and molecular characterization of avipoxviruses isolated from different avian species in Egypt. *Virus Genes*. 2013 Feb;46(1):63–70.
47. Manarolla G, Pisoni G, Sironi G, Rampin T. Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. *Vet Microbiol*. 2010;140:1–8.
48. Mondal SP, Lucio-Martinez B, Buckles EL. Molecular Characterization of a Poxvirus Isolated from an American Flamingo (*Phoeniconais ruber ruber*). *Avian Dis*. 2008;52(3):520–5.
49. Thiel T, Whiteman NK, Tirape A, Baquero MI, Cedeno V, Walsh T, et al. Characterization of Canarypox-like Viruses Infecting Endemic Birds in the Galapagos Islands. *J Wildl Dis*. 2005;41(2):342–53.
50. Upton C, Macen JL, Maranchuk RA, Delange AM, McFadden G. Tumorigenic poxviruses: Fine analysis of the recombination junctions in malignant rabbit fibroma virus, a recombinant between Shope fibroma virus and myxoma virus. *Virology*. 1988 Sep;166(1):229–39.
51. Gershon PD, Paul Kitching R, Hammond JM, Black DN. Poxvirus Genetic Recombination during Natural Virus Transmission. *J Gen Virol*. 1989 Feb 1;70(2):485–9.
52. Camus-Bouclainville C, Gretillat M, Py R, Gelfi J, Guérin JL, Bertagnoli S. Genome Sequence of SG33 Strain and Recombination between Wild-Type and Vaccine Myxoma Viruses. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(4):633–8.
53. Fatunmbi OO, Reed WM. Evaluation of a Commercial Quail Pox Vaccine (Bio-Pox Q) for the Control of “Variant” Fowl Poxvirus Infections. *Avian Dis*. 1996;40(4):792–7.
54. Fatunmbi OO, Reed WM. Evaluation of a commercial modified live virus fowl pox vaccine for the control of “variant” fowl poxvirus infections. *Avian Dis*. 1996;40(3):582–7.
55. Zhao K, He W, Xie S, Song D, Lu H, Pan W, et al. Highly Pathogenic Fowlpox Virus in Cutaneously Infected Chickens, China. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jul;20(7):1208–10.
56. Singh P, Kim JH, Tripathy DN. Re-emerging fowlpox: Evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol*. 2000;29(5):449–55.
57. Kim T, Tripathy DN. Evaluation of Pathogenicity of Avian Poxvirus Isolates from Endangered Hawaiian Wild Birds in Chickens. *Avian Dis*. 2006;50:288–91.
58. Weli SC, Okeke MI, Tryland M, Nilssen O, Traavik T. Characterization of avipoxviruses from wild birds in Norway. *Can J Vet Res*. 2004;68:140–5.
59. Giddens WE, Swango LJ, Henderson JD, Lewis RA, Farner DS, Carlos A, et al. Canary pox in sparrows and canaries (*Fringillidae*) and in weavers (*Ploceidae*). Pathology and host specificity of the virus. *Vet Pathol*. 1971;8(3):260–80.
60. Perkus ME, Goebel SJ, Davis SW, Johnson GP, Limbach K, Norton EK, et al. Vaccinia virus host range genes. *Virology*. 1990 Nov;179(1):276–86.

61. Sonnberg S, Fleming SB, Mercer AA. Phylogenetic analysis of the large family of poxvirus ankyrin-repeat proteins reveals orthologue groups within and across chordopoxvirus genera. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 11):2596–607.
62. Bollinger O. Ueber Epithelioma contagiosum beim Haushuhn und die sogenannten Pocken des Geflügels. *Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med.* 1873;58:349–61.
63. Bolte AL, Meurer J, Kaleta EF. Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathol.* 1999;28:415–32.
64. Van Riper C, Forrester DJ. Avian pox. In: *Infectious diseases of wild birds.* Ames, Iowa: Blackwell Pub; 2007. p. 131–76.
65. Metz AL, Hatcher L, Newman JA, Halvorson DA. Venereal Pox in Breeder Turkeys in Minnesota. *Avian Dis.* 1985 Jul;29(3):850.
66. Ritchie BW. Poxviridae. In: *Avian viruses: function and control.* Lake Worth, Fla: Wingers Pub; 1995. p. 285–311.
67. Kligler IJ, Muckenfuss RS, Rivers TM. Transmission of Fowl-pox by Mosquitoes. *J Exp Med.* 1929;49(4):649–60.
68. DaMassa AJ. The Role of *Culex tarsalis* in the Transmission of Fowl Pox Virus. *Avian Dis.* 1966;10(1):57–66.
69. Akey BL, Nayar JK, Forrester DJ. Avian Pox in Florida Wild Turkeys: *Culex nigripalpus* and *Wyeomyia vanduzeei* as Experimental Vectors. *J Wildl Dis.* 1981;17(4):597–9.
70. Wright EJ, Nayar JK, Forrester DJ. Interactive effects of turkeypox virus and *Plasmodium hermani* on turkey poults. *J Wildl Dis.* 2005;41(1):141–8.
71. Van Riper C, Van Riper SG, Hansen WR. Epizootiology and effect of avian pox on hawaiian forest birds. *The Auk.* 2002;119(4):929–42.
72. Aruch S, Atkinson CT, Savage AF, LaPointe DA. Prevalence and distribution of pox-like lesions, avian malaria, and mosquito vectors in Kipahulu valley, Haleakala National Park, Hawaii, USA. *J Wildl Dis.* 2007;43(4):567–75.
73. Khan A, Yousaf A, Khan MZ, Siddique M, Gul ST, Mahmood F. Cutaneous form of pox infection among captive peafowl (*Pavo cristatus*) chicks. *Avian Pathol.* 2009;38(1):65–70.
74. Atkinson CT, Lease JK, Dusek RJ, Samuel MD. Prevalence of pox-like lesions and malaria in forest bird communities on Leeward Manua Loa Volcano, Hawaii. *The Condor.* 2005;107:537–46.
75. Tsai SS, Chang TC, Yang SF, Chi YC, Cher RS, Chien MS, et al. Unusual lesions associated with avian poxvirus infection in rosy-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). *Avian Pathol.* 1997 Mar;26(1):75–82.

76. Lachish S, Lawson B, Cunningham AA, Sheldon BC. Epidemiology of the Emergent Disease Paridae pox in an Intensively Studied Wild Bird Population. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e38316.
77. Illera JC, Emerson BC, Richardson DS. Genetic characterization, distribution and prevalence of avian pox and avian malaria in the Berthelot's pipit (*Anthus berthelotii*) in Macaronesia. *Parasitol Res*. 2008;103:1435–43.
78. Buenestado F, Gortazar C, Millan J, Hofle U, Villafuerte R. Descriptive study of an avian pox outbreak in wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*) in Spain. *Epidemiol Infect*. 2004;132:369–74.
79. Smits JE, Tella JL, Carrete M, Serrano D, Lopez G. An Epizootic of Avian Pox in Endemic Short-toed Larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's Pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain. *Vet Pathol*. 2005;42:59–65.
80. Ha HJ, Banda M, Alley MR, Howe L, Gartrell BD. The seroprevalence of avipoxvirus and its association with avian malaria (*Plasmodium* spp.) infection in introduced passerine birds in the southern regions of the North Island of New Zealand. *Avian Dis*. 2013;57(1):109–15.
81. Spurgin LG, Illera JC, Padilla DP, Richardson D. Biogeographical patterns and co-occurrence of pathogenic infection across island populations of Berthelot's pipit (*Anthus berthelotii*). *Oecologia*. 2011;11.
82. Hess C, Maegdefrau-Pollan B, Bilic I, Liebhart D, Richter S, Mitsch P, et al. Outbreak of cutaneous form of poxvirus on a commercial turkey farm caused by the species fowlpox. *Avian Dis*. 2011 Dec;55(4):714–8.
83. Estrella-Tec JE, Gutiérrez-Ruiz EJ, Ramírez-González S, Aranda-Cirerol F, Santos-Ricalde R, Puerto-Nájera JL. Evaluation of a commercial vaccine against avian poxvirus in turkeys kept in the backyard system in the state of Yucatan, Mexico. *Avian Pathol*. 2013 Sep 27;42(6):536–40.
84. Adebajo MC, Ademola SI, Oluwaseun A. Seroprevalence of Fowl Pox Antibody in Indigenous Chickens in Jos North and South Council Areas of Plateau State, Nigeria: Implication for Vector Vaccine. *ISRN Vet Sci*. 2012;2012:1–4.
85. Lierz M, Bergmann V, Isa G, Czerny CP, Lueschow D, Mwanzia J, et al. Avipoxvirus Infection in a Collection of Captive Stone Curlews (*Burhinus oedicnemus*). *J Avian Med Surg*. 2007;21(1):50–5.
86. Shivaprasad HL, Kim T, Tripathy DN, Woolcock PR, Uzal F. Unusual pathology of canary poxvirus infection associated with high mortality in young and adult breeder canaries (*Serinus canaria*). *Avian Pathol*. 2009;38(4):311–6.
87. Adams CJ, Feldman SH, Sleeman JM. Phylogenetic analysis of avian poxviruses among free-ranging birds of Virginia. *Avian Dis*. 2005;49:601–5.
88. Davidson WR, Kellogg FE, Doster GL. An epornitic of avian pox in wild bobwhite quail. *J Wildl Dis*. 1980;16(2):293–8.

89. Kulich P, Roubalova E, Dubska L, Sychra O, Smid B, Literak I. Avipoxvirus in blackcaps (*Sylvia atricapilla*). *Avian Pathol.* 2008;37(1):101–7.
90. Ellison KS, Hofmeister EK, Ribic CA, Sample DW. Relatively High Prevalence of Pox-Like Lesions in Henslow’s Sparrow Among Nine Species of Migratory Grassland Passerines in Wisconsin, USA. *J Wildl Dis.* 2014 Aug 14;
91. Lawson B, Lachish S, Colvile KM, Durrant C, Peck KM, Toms MP, et al. Emergence of a Novel Avian Pox Disease in British Tit Species. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e40176.
92. Zylberberg M, Lee KA, Klasing KC, Wikelski M. Variation with Land Use of Immune Function and Prevalence of Avian Pox in Galapagos Finches. *Conserv Biol.* 2013;27(1):103–12.
93. Giraudeau M, Mousel M, Earl S, McGraw K. Parasites in the City: Degree of Urbanization Predicts Poxvirus and Coccidian Infections in House Finches (*Haemorrhous mexicanus*). *Brown JD, editor. PLoS ONE.* 2014 Feb 4;9(2):e86747.
94. Parker PG, Buckles EL, Farrington H, Petren K, Whiteman NK, Ricklefs RE, et al. 110 Years of Avipoxvirus in the Galapagos Islands. *Davis T, editor. PLoS ONE.* 2011 Jan 13;6(1):e15989.
95. Laiolo P, Serrano D, Tella JL, Carrete M, Lopez G, Navarro C. Distress calls reflect poxvirus infection in lesser short-toed lark *Calandrella rufescens*. *Behav Ecol.* 2007 May 1;18(3):507–12.
96. Kleindorfer S, Dudaniec RY. Increasing prevalence of avian poxvirus in Darwin’s finches and its effect on male pairing success. *J Avian Biol.* 2006;37:69–76.
97. Lachish S, Bonsall MB, Lawson B, Cunningham AA, Sheldon BC. Individual and Population-Level Impacts of an Emerging Poxvirus Disease in a Wild Population of Great Tits. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e48545.
98. Le Loc’h G. Épidémiologie moléculaire des avipoxvirus chez l’Outarde houbara [Thèse de doctorat d’université]. [Toulouse]: Institut National Polytechnique de Toulouse; 2015.
99. Le Loc’h G, Paul MC, Camus-Bouclainville C, Bertagnoli S. Outbreaks of Pox Disease Due to Canarypox-Like and Fowlpox-Like Viruses in Large-Scale Houbara Bustard Captive-Breeding Programmes, in Morocco and the United Arab Emirates. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2015 Feb [cited 2015 Feb 5]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12330>
100. Jarvi SI, Triglia D, Giannoulis A, Farias M, Bianchi K, Atkinson CT. Diversity, origins and virulence of Avipoxviruses in Hawaiian Forest Birds. *Consev Genet.* 2008;9:339–48.
101. Kirmse P. Host Specificity and Long Persistence of Pox Infection in the Flicker (*Colaptes auratus*). *Bull Wildl Dis Assoc.* 1967;3:14–20.
102. Senties-Cue CG, Charlton BR, Woolcock P, Bickford AA, Cooper G, Bland M. Atypical distribution of fowl pox lesions in broilers. *Avian Dis.* 2010;54(4):1316–8.

103. Hsieh YC, Chen SH, Wang CW, Lee YH, Chung WC, Tsai MC, et al. Unusual pox lesions found in Chinese jungle mynahs (*Acridotheres cristatellus*). *Avian Pathol.* 2005;34(5):415-7.
104. Minbay A, Kreir JP. An experimental Study of the Pathogenesis of Fowlpox Infection in Chickens. *Avian Dis.* 1973;17(3):532-9.
105. Perez-Tris J, Williams RA, Abel-Fernandez E, Barreiro J, Conesa JJ, Figuerola J, et al. A multiplex PCR for detection of poxvirus and papillomavirus in cutaneous warts from live birds and museum skins. *Avian Dis.* 2011;55(4):545-53.
106. Tripathy DN, Hanson LE. A Smear Technique for Staining Elementary Bodies of Fowlpox. *Avian Dis.* 1976;20(3):609-10.
107. Singh P, Kim T, Tripathy DN. Identification and characterization of fowlpox virus strains using monoclonal antibodies. *J Vet Diagn Invest.* 2003;15:50-4.
108. Isa G, Pfister K, Kaaden OR, Czerny CP. Development of a Monoclonal Blocking ELISA for the Detection of Antibodies Against Fowlpox Virus. *J Vet Med B.* 2002;49:21-3.
109. Ha HJ, Alley M, Howe L, Gartrell B. Evaluation of the pathogenicity of avipoxvirus strains isolated from wild birds in New Zealand and the efficacy of a fowlpox vaccine in passerines. *Vet Microbiol.* 2013;165(3-4):268-74.
110. Buscaglia C, Bankowski RA, Miers L. Cell-Culture Virus-Neutralization Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Evaluation of Immunity in Chickens against Fowlpox. *Avian Dis.* 1985;29(3):672-80.
111. Singh P, Tripathy DN. Fowlpox virus infection causes a lymphoproliferative response in chickens. *Viral Immunol.* 2003;16(2):223-7.
112. Winterfield RW, Hitchner SB. The response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowl pox viruses. *Avian Dis.* 1965 May;9(2):237-41.
113. Atkinson CT, Wiegand KC, Triglia D, Jarvi SI. Reversion to virulence and efficacy of an attenuated Canarypox vaccine in Hawai'i 'Amakihi (*Hemignathus virens*). *J Zoo Wildl Med.* 2012;43(4):808-19.
114. Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RC, Braun EL, Braun MJ, et al. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *science.* 2008;320(5884):1763-8.
115. Broders O, Osborne T, Wink M. A mtDNA phylogeny of bustards (family Otididae) based on nucleotide sequences of the cytochrome b-gene. *J Für Ornithol.* 2003;144(2):176-85.
116. D'Aloia M-A. Studies on the population structure of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* in the Middle East with DNA analysis techniques. *Zool Middle East.* 2001 Jan;22(1):25-35.

117. GAUCHER P, PAILLAT P, CHAPPUIS C. Taxonomy of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* subspecies. [cited 2015 Sep 28]; Available from: [http://www.researchgate.net/profile/Michael\\_Wink/publication/227705530\\_Taxonomy\\_of\\_the\\_Houbara\\_Bustard\\_Chlamydotis\\_undulata\\_subspecies\\_considered\\_on\\_the\\_basis\\_of\\_sexual\\_display\\_and\\_genetic\\_divergence/links/0deec514a1610cf248000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Michael_Wink/publication/227705530_Taxonomy_of_the_Houbara_Bustard_Chlamydotis_undulata_subspecies_considered_on_the_basis_of_sexual_display_and_genetic_divergence/links/0deec514a1610cf248000000.pdf)
118. BirdLife International. Review of the global conservation status of the Asian Houbara Bustard *Chlamydotis macqueenii*. Cambridge, UK: BirdLife International; 2014 p. 45.
119. Gray JE. *Otis macqueenii*. Harswickes Illus Indian Zool. 1832;2.
120. Jacquin. *Psophia undulata*. Beytr Gesch Vogel. 1784;24(9).
121. Rothschild W, Hartert E. On a new bustard from the Palearctic region. *Nov Zool*. 1894;1(689).
122. Cramp S, Simmons K, editors. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa: the birds of the Western Palearctic. Oxford [Eng.]; New York: Oxford University Press; 1980. 1 p.
123. Osborne PE, Launay F, Gliddon D. Wintering habitat use by houbara bustards *Chlamydotis undulata* in Abu Dhabi and implications for management. *Biol Conserv*. 1997 Jul;81(1-2):51-6.
124. Saint Jalme M, Van Heezik Y, editors. Propagation of the houbara bustard. London; New York: New York: Kegan Paul International jointly with the National Wildlife Research Center, National Commission for Wildlife Conservation and Development, Riyadh, Saudi Arabia; Distributed by Columbia University Press; 1996. 110 p.
125. Tigar BJ, Osborne PE. Invertebrate diet of the Houbara Bustard *Chlamydotis [undulata] macqueenii* in Abu Dhabi from calibrated faecal analysis. *Ibis*. 2000;142(3):466-75.
126. Nadeem MS, Ali F, Akhtar MS. Diet of Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* in Punjab, Pakistan. *Forktail*. 2004;20:91-3.
127. BOURASS K, ZAIME A, QNINBA A, BENHOUSSA A, IDRISSE HR, HINGRAT Y. Evolution saisonnière du régime alimentaire de l'Outarde houbara nord-africaine, *Chlamydotis undulata undulata*. *Bull Inst Sci Rabat*. 2012;34:29-43.
128. Aghainajafi-Zadeh S, Hemami MR, Karami M, Dolman PM. Wintering habitat use by houbara bustard (*Chlamydotis macqueenii*) in steppes of Harat, central Iran. *J Arid Environ*. 2010 Aug;74(8):912-7.
129. Medina FM. Foraging use of cultivated fields by the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata fuertaventurae* Rothschild and Hartert, 1894 on Fuerteventura (Canary Islands). *Bird Conserv Int*. 1999 Dec;9(04):373-86.

130. Hingrat Y, Jalme MS, Ysnel F, Lacroix F, Seabury J, Rautureau P. Relationships between home-range size, sex and season with reference to the mating system of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata undulata*. *Ibis*. 2004;146(2):314–22.
131. Hingrat Y. Sélection de l'habitat et structure sociale chez l'Outarde houbara. Apports à la conservation d'une population menacée au Maroc. [Thèse de doctorat d'université]. [Paris]: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle; 2005.
132. Gaucher P. Breeding biology of the houbara bustard *Chlamydotis undulata undulata* in Algeria. *Alauda*. 1995;63:291–8.
133. Combreau O, Qiao J, Lawrence M, Gao X, Yao J, Yang W, et al. Breeding success in a Houbara Bustard *Chlamydotis [undulata] macqueenii* population on the eastern fringe of the Jungar Basin, People's Republic of China. *Ibis*. 2002;144(2):E45–56.
134. Hardouin LA, Nevoux M, Robert A, Gimenez O, Lacroix F, Hingrat Y. Determinants and costs of natal dispersal in a lekking species. *Oikos*. 2012 Jun;121(6):804–12.
135. Hardouin LA, Robert A, Nevoux M, Gimenez O, Lacroix F, Hingrat Y. Meteorological conditions influence short-term survival and dispersal in a reinforced bird population. Pettorelli N, editor. *J Appl Ecol*. 2014 Jun;n/a – n/a.
136. Combreau O, Riou S, Judas J, Lawrence M, Launay F. Migratory Pathways and Connectivity in Asian Houbara Bustards: Evidence from 15 Years of Satellite Tracking. Getz WM, editor. *PLoS ONE*. 2011 Jun 8;6(6):e20570.
137. Launay F, Combreau O, Bowardi MA. Annual migration of Houbara Bustard *Chlamydotis undulata macqueenii* from the United Arab Emirates. *Bird Conserv Int*. 1999 Jun;9(02):155–61.
138. Bailey TA, Nicholls PK, Samour JH, Naldo J, Wernery U, Howlett JC. Postmortem Findings in Bustards in the United Arab Emirates. *Avian Dis*. 1996 Apr;40(2):296.
139. Ouhmama R. Etude du parasitisme intestinal chez l'Outarde houbara (*Chlamydotis undulata*) sauvage au Maroc. *Missour, Maroc: ECWP*; 2007 p. 55.
140. Jones A, Bailey TA, Nothelfer HB, Gibbons LM, Samour JH, Bowardi M Al, et al. Parasites of wild houbara bustards in the United Arab Emirates. *J Helminthol*. 1996;70:21–5.
141. Seurat LG. Sur un nouveau parasite de l'Outarde houbara. Nord S d. h. n. d. l. A d., editor. *Bull Société Hist Nat Afr Nord*. 1914;5:117–9.
142. Riou S, Judas J, Lawrence M, Pole S, Combreau O. A 10-year assessment of Asian Houbara Bustard populations: trends in Kazakhstan reveal important regional differences. *Bird Conserv Int*. 2011 Jun;21(02):134–41.
143. BirdLife International. Species factsheet: *Chlamydotis undulata* [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 25]. Available from: <http://www.birdlife.org>
144. Goriup PD. The world status of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata*. *Bird Conserv Int*. 1997 Dec;7(04):373–97.

145. BirdLife International. *Chlamydotis macqueenii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3 [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 25]. Available from: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
146. BirdLife International. *Chlamydotis undulata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3 [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 25]. Available from: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
147. Bailey T, Samour JH, Bailey TC. Hunted by Falcons, Protected by Falconry: Can the Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*) Fly into the 21st Century? *J Avian Med Surg.* 1998;12(3):190–201.
148. Le Cuziat J, Lacroix F, Roche P, Vidal E, Médail F, Orhant N, et al. Landscape and human influences on the distribution of the endangered North African houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) in Eastern Morocco. *Anim Conserv.* 2005 May;8(2):143–52.
149. Tourenq C, Combreau O, Lawrence M, Pole SB, Spalton A, Xinji G, et al. Alarming houbara bustard population trends in Asia. *Biol Conserv.* 2005 Jan;121(1):1–8.
150. Combreau O, Launay F, Lawrence M. An assessment of annual mortality rates in adult-sized migrant houbara bustards (*Chlamydotis [undulata] macqueenii*). *Anim Conserv.* 2001 May;4(2):133–41.
151. IFHC. International Fund For Houbara Conservation [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 25]. Available from: [www.houbarafund.org/](http://www.houbarafund.org/)
152. Lacroix F. The Emirates Center for Wildlife Propagation: developing a comprehensive strategy to secure a self-sustaining population of Houbara Bustards in eastern Morocco. *Houbara News.* 2003;5:2.
153. IUCN/SSC. Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission; 2013. viii +57.
154. Rautureau P, Hingrat Y, Lacroix F. Houbara bustard life history parameters. Released vs. recipient population: evaluation of reinforcement success. In Chicago, Illinois, United States; 2008.
155. Lesobre L. Structure génétique des populations menacées d'outardes houbara (*Chlamydotis undulata undulata*) au Maroc. Implications à la gestion d'un élevage conservatoire et au renforcement des populations [Thèse de doctorat d'université]. [Paris]: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle; 2008.
156. Bailey TA, Samour JH, Naldo JL, Howlett JC, Tarik M. Causes of Morbidity in Bustards in the United Arab Emirates. *Avian Dis.* 1996;40(1):121–9.
157. Ostrowski S, Dorrestein G, Ancrenaz M, Saint Jalme M. Debilitating Cutaneous Poxvirus Lesions on Two Captive Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*). *Avian Dis.* 1995;39:907–11.
158. Jones A, Bailey TA, Nicholls PK, Samour JH, Naldo JL. Cestode and Acanthocephalan infections in captive bustards: new host and location records, with

- data on pathology, control, and preventive medicine. *J Zoo Wildl Med.* 1996;27(2):201–8.
159. Stiévenart C, Mohammed OB. Current and emerging diseases in a captive flock of adult houbara bustards (*Chlamydotis macqueenii*). In: WDA Africa and Middle East Third Annual Meeting. 2004.
  160. Greth A, Andral B, Gerbermann H, Vassart M, Gerlach H, Launay F. Chlamydiosis in a Captive Group of Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*). *Avian Dis.* 1993;3:117–20.
  161. Bailey TA. Diseases and medical management of houbaras bustards and other otididae. Abu Dhabi, UAE: Tom A. Bailey; 2008. 494 p.
  162. National Avian Research Center and Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center in Abu Dhabi. Annual report 2013. NARC, Al Aïn, UAE; 2013.
  163. Emirates Center for Wildlife Propagation. Annual report 2013. ECWP, Missouri, Morocco; 2013.
  164. Bailey TA, Silvanose C, Manvell R, Gough RE, Kinne J, Combreau O, et al. Medical dilemmas associated with rehabilitating confiscated houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) after avian pox and paramyxovirus type 1 infection. *J Wildl Dis.* 2002;38(3):518–32.
  165. Khan OA, Shuaib MA, Rhman SSA, Ismail MM, Hammad Y Al, Baky MHA, et al. Isolation and Identification of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus from Houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) and contact falcons. *Avian Pathol.* 2009;38(1):35–9.
  166. Le Loc'h G. Salmonella spp. infections in NARC and SKHBC-AD during the breeding season 2012. NARC, Al Aïn, UAE; 2012.
  167. Samour JH, Kaaden OR, Wernery U, Bailey TA. An Eporntic of Avian Pox in Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*). *J Vet Med B.* 1996;43:287–92.
  168. Bailey TA, Wernery U, Gough RE, Manvell R, Samour JH. Serological survey for avian viruses in houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*). *Vet Rec.* 1996;139:238–9.
  169. Ostrowski S, Ancrenaz M, Saint Jalme M, Greth A. Concurrent avian pox and Newcastle disease infection in a Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*). *Avian Pathol.* 1995;24(3):573–7.
  170. Ostrowski S, Dorrestein GM, Burger L, Hémon S, Saint Jalme M. Cross-Protection Test of an Avian Poxvirus Isolated from Houbara Bustards. *Avian Dis.* 1996;40(4):762–9.
  171. Kinne J, Oliveros S, Joseph S, Manvell R, Wernery U. Severe outbreak of pox in captive Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata undulata*) in Morocco. In: 9th EAAV Conference. 2007. p. 78–85.

172. Bailey TA, Silvanose C, Naldo JL, Combreau O, Launay F, Wernery U, et al. Health considerations of the rehabilitation of illegally traded houbara bustards *Chlamydotis undulata macqueenii* in the Middle East. *Oryx*. 2000;34(4):325–34.
173. Wernery U, Basker VJ, Joseph S, Kinne J. An attenuated vaccine protects Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*) from systemic pox. *Wildl Middle East News*. 2007;2(3):4p.
174. Combreau O, Smith TR. Release techniques and predation in the introduction of houbara bustards in Saudi Arabia. *Biol Conserv*. 1998 May;84(2):147–55.
175. Claver JA, Quaglia AIE. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *J Exot Pet Med*. 2009 Apr;18(2):87–97.
176. Aapanius V. Stress and Immune Defense. *Adv Study Behav*. 1998;27:133–53.
177. Gomes AVS, Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Baskeville E, et al. Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases *Salmonella Enteritidis* invasion in broiler chickens. *Avian Pathol*. 2014 Jan 2;43(1):82–90.
178. Falluji MM Al, Tantawi HH, Al-Bana A, Al-Sheikhly S. Pox infection among captive peacocks. *J Wildl Dis*. 1979;15(4):597–600.
179. Shivaprasad HL, Kim T-J, Woolcock PR, Tripathy DN. Genetic and Antigenic Characterization of a Poxvirus Isolate from Ostriches. *Avian Dis*. 2002;46(2):429–36.
180. Terasaki T, Kaneko M, Mase M. Avian poxvirus infection in flamingos (*Phoenicopterus roseus*) in a zoo in Japan. *Avian Dis*. 2010 Jun;54(2):955–7.
181. Irons V. Cross-species transmission studies with different strains of bird-pox. *Am J Epidemiol*. 1934 Sep 1;20(2):329–51.
182. Hitchner SB. Canary Pox Vaccination with Live Embryo-Attenuated Virus. *Avian Dis*. 1981 Oct;25(4):874–81.
183. Eleazer TH, Harrell JS, Blalock HG. Transmission Studies Involving a Wet Fowl Pox Isolate. *Avian Dis*. 1983 Apr;27(2):542–4.
184. Hauck R, Prusas C, Hafez HM, Luschow D. Serologic response against fowl poxvirus and reticuloendotheliosis virus after experimental and natural infections of chickens with fowl poxvirus. *Avian Dis*. 2009;53(2):205–10.
185. Facon C, Guerin JL, Lacroix F. Assessment of Newcastle disease vaccination program in houbara bustard breeders (*Chlamydotis undulata undulata*). *J Wildl Dis*. 2005;41(4):768–74.
186. Le Loc'h G, Daudet-Le Loc'h A. Comparison between live and inactivated vaccines against Newcastle Disease in Houbara bustard chicks (*Chlamydotis undulata undulata*). In Marrakesh, Morocco; 2009.

187. Bailey TA, Wernery U, Samour JH, Naldo JL. Antibody response of Kori bustards (*Ardeotis kori*) and houbara bustards (*Chlamydotis undulata*) to live and inactivated newcastle disease vaccines. *J Zoo Wildl Med.* 1998;29(4):441–50.
188. Samour J. Diagnostic Value of Hematology. In: *Clinical avian medicine.* Palm Beach, Fla.: Spix Pub.; 2006. p. 587–609.
189. Roman Y. Mise en place de techniques électrophorétiques associées au diagnostic des pathologies d'oiseaux dans les élevages conservatoires [Thèse de doctorat d'université]. [Paris]: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle; 2008.
190. Rochon K, Baker RB, Almond GW, Watson DW. Assessment of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) as a Vector of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *J Med Entomol.* 2011 Jul 1;48(4):876–83.
191. Pages-Mante A, Majo N, March R, Jover A, Bentue M. Pathology and experimental prophylaxis of avian poxvirus in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Vet Rec.* 2004;155:307–8.
192. D'Aloia M-A, Samour JH, Howlett JC, Bailey TA, Naldo JL. Haemopathological Responses to Chronic Inflammation in the Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). *Comp Haematol Int.* 1994;4:203–6.
193. Melillo A. Applications of Serum Protein Electrophoresis in Exotic Pet Medicine. *Veterinary Clin North Am Exot Anim Pract.* 2013 Jan;16(1):211–25.
194. Fadly AM, Witter RL. Comparative Evaluation of In Vitro and In Vivo Assays for the Detection of Reticuloendotheliosis Virus as a Contaminant in a Live Virus Vaccine of Poultry. *Avian Dis.* 1997;41:695–701.
195. Tadese T, Reed C. Detection of specific reticuloendotheliosis virus sequence and protein from REV-integrated fowlpox virus strains. *J Virol Methods.* 2003;110:99–104.
196. Facon C. Maîtrise sanitaire de la reproduction chez l'Outarde houbara en captivité : évaluation des risques viraux et définition d'un schéma de vaccination raisonné [Thèse d'exercice, médecine Vétérinaire]. [Toulouse]: ENVT; 2002.
197. Zwartouw HT, Westwood JCN, Appleyard G. Purification of Pox Viruses by Density Gradient Centrifugation. *J Gen Microbiol.* 1962;29:523–9.
198. Boulanger D, Green P, Smith T, Czerny CP, Skinner MA. The 131-amino-acid repeat region of the essential 39-kilodalton core protein of fowlpox virus FP9, equivalent to vaccinia virus A4L protein, is nonessential and highly immunogenic. *J Virol.* 1998 Jan;72(1):170–9.
199. Catroxo MHB, Pongiluppi T, Melo NA, Milanelo L, Petrella S, Martins AMCPF, et al. Identification of Poxvirus Under Transmission Electron Microscopy During Outbreak Period in Wild Birds, in São Paulo, Brazil. *Int J Morphol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Nov 28];27(2). Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-95022009000200043&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022009000200043&lng=en&nrm=iso&tlng=en)

200. Gulbahar MY, Cabalar M, Boynukara B. Avipoxvirus Infection in Quails. *Turk J Vet Anim Sci.* 2005;29:449–54.
201. Prukner-Radovic E, Lüschow D, Ciglar Grozdanic I, Tisljar C, Mazija H, Vranesic D, et al. Isolation and Molecular Biological Investigations of Avian Poxviruses from Chickens, a Turkey, and a Pigeon in Croatia. *Avian Dis.* 2006;50(3):440–4.
202. Zhao G, Droit L, Tesh RB, Popov VL, Little NS, Upton C, et al. The Genome of Yoka Poxvirus. *J Virol.* 2011;85(19):10230–8.
203. Zimmermann D, Anderson MD, Lane E, van Wilpe E, Carulei O, Douglass N, et al. Avian Poxvirus Epizootic in a Breeding Population of Lesser Flamingos (*Phoenicopterus minor*) at Kamfers Dam, Kimberley, South Africa. *J Wildl Dis.* 2011;47(4):989–93.
204. Niemeyer C, Favero CM, Kolesnikovas CKM, Bhering RCC, Brandão P, Catão-Dias JL. Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. *Avian Pathol.* 2013 Oct 1;42(6):546–51.

**AUTHOR/AUTEUR :** Florian GRARD

**SUPERVISOR/DIRECTEUR DE THESE :** Stéphane BERTAGNOLI

**PLACE AND DATE OF VIVA VOCE/LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** Toulouse, le 11 Décembre 2015

---

**TITRE :** Variole aviaire chez l'Outarde houbara (*Chlamydotis undulata*) : étude d'une souche d'avipoxvirus

#### **RÉSUMÉ**

L'Outarde houbara (*Chlamydotis undulata*), qui est placée sur la liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature, fait l'objet d'élevages conservatoires en Afrique du Nord. Au sein de ces élevages, des cas de variole aviaire sont régulièrement observés malgré une vaccination systématique. Nous avons caractérisé l'une des souches virales d'avipoxvirus responsable de forme cutanée de variole aviaire chez des outardes houbara captives au Maroc. Dans un premier temps, nous avons mis en place des méthodes d'isolement et d'amplification viraux pour produire un inoculum susceptible de causer la maladie. Différents virus ont alors été testés sur plusieurs types cellulaires afin de trouver le couple virus-cellule le plus performant. Ensuite, des infections expérimentales utilisant une des souches isolées ont permis d'acquérir des informations sur ses caractéristiques cliniques. Enfin, nous avons essayé de développer un test sérologique qui permettrait de suivre la cinétique en anticorps lors d'infections par un avipoxvirus.

---

#### **MOTS-CLÉS**

*Avipoxvirus*, *Canarypox*, *Fowlpox*, Outarde houbara, *Chlamydotis undulata*, Elevage conservatoire, Isolement viral, Infection expérimentale, Immunopéroxydase, Sérologie.

---

**TITLE:** Avianpox disease on Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*): study on an avipoxvirus strain.

#### **ABSTRACT :**

The Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata*), a bird species placed on the red list of the International Union for Nature Preservation, is captive-bred for conservation purposes in North Africa. Inside these captive-flocks, avian pox disease is regularly reported despite systematic vaccination. We have characterized one of the avipoxvirus strains responsible for the avian pox disease in the Houbara Bustard in Morocco. First, we have designed virus isolation and amplification methods to produce an inoculum likely to cause the disease. Then, different viruses were tested on several cell types in order to find the most efficient virus-cell couple. Afterwards, some experimental infections using one of the isolated virus strains have permitted to acquire information about its clinical characteristics. Finally, we have tried to develop a serological test which could allow to follow the antibodies kinetics during avipoxvirus infections.

---

#### **KEYWORDS**

*Avipoxvirus*, *Canarypox*, *Fowlpox*, Houbara Bustard, *Chlamydotis undulata*, Conservative flocks, Virus isolation, Experimental infection, Immunoperoxydase, Serology.

---

#### **LABORATORY/LABORATOIRE**

UMR 1225 IHAP, ENVT, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex