



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 : 17631

To cite this version :

Lorenté, Fabien. *Identification et étude de prévalence du Columbid alphaherpesvirus-1 dans un élevage de faucons de chasse et dans des populations locales de pigeons au Maroc*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 113 p.

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

IDENTIFICATION ET ETUDE DE PREVALENCE DU COLUMBID ALPHAHERPESVIRUS-1 DANS UN ELEVAGE DE FAUCONS DE CHASSE ET DANS DES POPULATIONS LOCALES DE PIGEONS AU MAROC

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

LORENTE Fabien

Né, le 22 février 1991 à Nogent/Marne (94)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Stéphane BERTAGNOLI

M. Jean-Luc GUERIN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Guillaume LE LOC'H

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE 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. MILON Alain, *Microbiologie moléculaire*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. SCHELCHER 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*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. DUCOS Alain, *Zootchnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- 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 BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

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 **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **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. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **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*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités, Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

Virologie et Bactériologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse.

Remerciements et hommage respectueux.

A Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie et Infectiologie

Pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir accompagné toutes ces années au sein de l'ENVT;

Que votre disponibilité, votre curiosité et votre soif de transmettre accompagnent encore longtemps les futurs vétérinaires toulousains ;

Merci.

A Monsieur le Professeur Jean-Luc GUERIN

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Aviculture et Pathologie Aviaire

Pour avoir accepté d'être assesseur de cette thèse ;

Que votre énergie et votre pédagogie continuent d'alimenter les amphis de cette école.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Guillaume LE LOC'H

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Médecine zoologique et de la faune sauvage

Pour m'avoir proposé ce sujet d'étude et aidé à le réaliser;

Pour m'avoir accompagné dans mon projet professionnel depuis toutes ces années et donné de précieux conseils ;

Puisse votre projet pour la Clinique des Nacs et de la Faune Sauvage susciter des vocations et permettre à de nombreux futurs confrères et consœurs de prendre toujours un peu plus soin de toutes les bêtes qui nous entourent ;

Un grand merci.

Aux équipes de l'ECWP et du Laboratoire IHAP de l'ENVT

Sans vous et votre bonne humeur, la réalisation de ce travail n'aurait certainement pas donné les mêmes résultats...

Amicalement.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
Sommaire des figures	5
Sommaire des tableaux	8
Liste des Annexes	11
Liste des abréviations et acronymes utilisés dans le texte	12
Introduction	17
Partie I : Revue bibliographique	19
I. Introduction : histoire des herpesvirus chez les pigeons et les faucons	19
1. Découverte	19
2. Historique.....	20
a. Les travaux de Cornwell <i>et al.</i>	20
b. Les travaux de Maré, Graham <i>et al.</i>	20
c. Les travaux de Vindevogel, Pastoret <i>et al.</i>	21
d. De la biologie à l'analyse biomoléculaire	21
II. Description, Dénominations et Classifications des deux virus	23
1. Description des virus	23
2. Matériel génétique	28
3. Dénominations et classifications	32
a. L'Ordre des <i>Herpesvirales</i>	32
b. De l'agent des CIN au CoHV-1	33
III. Pathogénie	35
1. Symptomatologie	35
a. Chez le pigeon <i>Columba spp.</i>	35
c. Chez le faucon <i>Falco spp.</i>	36
d. Chez les autres espèces d'oiseaux.....	37
2. Tableau lésionnel	38

3. Histopathologie.....	40
4. Physiopathologie <i>in vivo</i>	42
IV. Mise en évidence	44
1. Lésions macroscopiques	44
2. Culture virale	44
3. Histopathologie.....	46
4. Microscopie électronique.....	47
5. Méthodes biomoléculaires :.....	47
a. Méthode sérologique	47
b. Directe.....	49
1- Analyse par digestion d'endonucléases de restriction.....	49
2- PCR :.....	51
Echantillons analysés	51
PCR uniplex	52
PCR multiplex.....	56
3- LAMP	56
4- Séquençage.....	59
V. Données épidémiologiques	61
1. Chez les pigeons <i>Columba</i> spp.	61
2. Chez les faucons <i>Falco</i> spp.....	62
3. Chez les autres espèces d'oiseaux.....	62
VI. Lutte	64
1. Traitement	64
2. Vaccination	64
Partie II : Etude de cas autour de L'élevage de faucons de chasse de l'ECWP d'Oumjniba.....	66
I. Contexte	66
1. Généralités	66
a. La région.....	66

b. L'organisation	67
c. L'élevage	67
1- <i>Origine des faucons</i>	68
2- <i>Modules d'élevage</i>	68
3- <i>Biosécurité</i>	69
4- <i>Alimentation</i>	70
2. Données épidémiologique	70
3. Risques éventuels d'infection par le CoHV-1	70
II. Cas cliniques et investigations	72
1. Cas cliniques.....	72
a. Clinique.....	72
b. Autopsie et Histopathologie.....	73
c. Examen de laboratoire	76
1- <i>PCR : Matériels et méthodes</i>	76
Extraction de l'ADN viral.....	76
PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».....	76
PCR ADN polymérase spécifique « CoHV-1 ».....	78
Séquençage	79
2- <i>Résultats</i>	79
3- <i>Discussion</i>	81
2. Etude de prévalence dans les différentes populations d'oiseaux	82
a. Echantillons	82
b. Prélèvements	83
c. Examens de laboratoire	84
1- <i>PCR quantitative : Matériels et méthodes</i>	84
PCR « Phusion High-fidelity » spécifique « CoHV-1 »	84
Séquençage	85
Elaboration d'une gamme référence	86
PCR quantitative spécifique CoHV-1	87

Vérification et séquençage	89
<i>2- Résultats</i>	89
Critères de positivité de la PCRq	89
Résultats de PCR quantitative spécifique « CoHV-1 »	93
Vérification et séquençage	94
<i>3- Discussion</i>	95
d. Interprétation épidémiologique	96
e. Analyse du risque : discussion	98
Conclusion	99
BIBLIOGRAPHIE	100
ANNEXES	105
ANNEXE 1	106
ANNEXE 2	111

SOMMAIRE DES FIGURES

- Figure 1** : Microscopie électronique (coloration négative) d'un virion de FHV S-18 montrant une nucléocapside complète (à droite) et des débris d'enveloppe virale altérée par la préparation. La structure homogène sur la gauche de la photographie correspond à un marqueur en latex de 88 nm de diamètre. (x 210 000) (Maré, Graham 1973)..... 24
- Figure 2** : Noyau d'un hépatocyte comportant de multiples particules virales non enveloppées. Une particule virale enveloppée est visible juste à l'extérieur du noyau (gauche de la photographie). (x 65 000) (Maré, Graham 1973) 25
- Figure 3** : Cliché de MET (coloration négative) d'une particule virale non purifiée : noter le virion entouré de son enveloppe (x 104 345) (Potgieter, Kocan, Kocan 1979)..... 25
- Figure 4** : Cliché de MET montrant de nombreuses capsides à différents stades de maturation à l'intérieur d'un noyau de CEF, 12h après inoculation. (x 42.395) (Potgieter, Kocan, Kocan 1979)..... 26
- Figure 5** : Cliché au MET d'un virus enveloppé mature isolé chez un pigeon domestique (barre = 200 nm) (Zhao *et al.* 2015)..... 26
- Figure 6** : Organisation du génome du FaHV-1. Cette carte génétique montre une structure génomique de classe E du génome du FaHV-1, et indique la localisation, l'orientation et la taille des ORF. Ceux-ci sont nommés et numérotés sur la base d'une homologie avec les gènes caractérisés chez le HHV-1 et les autres alphaherpesvirus aviaires. Les gènes sont numérotés de 5' à 3' et leur orientation est indiquée par la flèche. (Spatz, Volkening, Ross 2014)..... 31
- Figure 7** : Jeune femelle Faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) présentant un torticolis et une kératite. (Woźniakowski *et al.* 2013) 36
- Figure 8** : Lésions caractéristiques d'infection par le CoHV-1 : nécrose hépatique multifocale chez une femelle adulte Grand-Duc américain (1, Rose *et al.* 2012) et chez un faucon gerfaut hybride (2, Wernery, Joseph, Kinne 2001) ; splénite nécrosante chez un mâle juvénile Grand-duc américain (3, Rose *et al.* 2012)..... 40
- Figure 9** : Nécrose hépatocellulaire avec présence d'un corps d'inclusion nucléaire (flèche) dans un hépatocyte. (H&E) (*60) (Rose *et al.* 2012)..... 47
- Figure 10**: Détermination de la sensibilité de la PCRq selon (Woźniakowski *et al.* 2013). (A) Amplification d'échantillons de concentrations en ADN données contenant des dilutions successives au 10^{ème} de l'isolat standard de CoHV-1. (B) Amplification d'échantillons contenant un nombre donné de copies du plasmide cloné contenant la séquence cible du CoHV-1. ΔRn correspond à un index déterminant les variations de fluorescence au cours des cycles d'amplification. 55

Figure 11 : Schéma du déroulement d'une méthode d'amplification LAMP appliquée à la recherche de virus Influenza chez l'homme : l'écouvillon est trempé dans les réactifs d'extraction puis dans un tube contenant les réactifs d'amplification (Notomi <i>et al.</i> 2015)....	57
Figure 12 : Détail des amorces, ciblant l'ADN polymérase virale, utilisées dans la LAMP développée pour détecter le CoHV-1. (Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014).....	58
Figure 13 : Plan de la région (le nord est situé vers le haut de l'image) (Image : Google® Maps).....	66
Figure 14 : Logos de l'ECWP (gauche) et de RENECO for Wildlife preservation (droite). ..	67
Figure 15 : Principales structures de l'élevage d'Oum Jniba. Le nord est situé vers le haut de l'image. (Image : Google® Maps)	68
Figure 16 : Système de vidéosurveillance des modules d'élevage. (Photo: F. LORENTÉ)....	69
Figure 17 : Carcasse consommée du faucon F13M00184 (gauche) ; Traces de biliverdinurie péri-cloacale chez le faucon F13M00184 (droite). (Photo : Dr Rachida OUHMAMA, DMV, ECWP, Division Faucon).	73
Figure 18 : Aspect macroscopique des lobes hépatiques (gauche) et de la rate en coupe (droite) du faucon F13M00184 (Photo : Dr Rachida OUHMAMA, DVM, ECWP, Division Faucon).....	75
Figure 19 : Observation d'un CIN dans le foie (gauche) et la rate (droite) du premier faucon décédé (H&E, barre d'échelle = 50 µm) (Service d'Anatomie Pathologique, ENVN, France).	75
Figure 20 : Migration des produits de PCR ADN polymérase spécifique « CoHV-1 » des 3 faucons. Encadrés en jaune, les produits d'amplifications de taille comprise entre 200 et 300 pb, correspondant à la séquence spécifique du CoHV-1.....	80
Figure 21 : Migration des produits de PCR « Phusion High-fidelity » spécifique « CoHV-1 » des 3 faucons. Encadrés en jaune, les produits d'amplifications de taille comprise entre 200 et 300 pb, correspondant à la séquence spécifique du CoHV-1.....	85
Figure 22 : Résultats de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR « Phusion HF » spécifique « CoHV-1 » pour la vérification de l'insertion de la séquence d'intérêt dans les clones utilisés pour l'élaboration de la gamme.	86
Figure 23 : Représentation graphique des pics de fusion et détermination des T _m de la plaque référence du LC96. Les 2 premiers cadres en partant de la gauche correspondent à des produits d'amplification non-spécifiques ou des dimères d'amorces. Le cadre englobant les pics de fusion à droite du graphe correspondent aux produits d'amplification spécifique recherchés, permettant l'identification des T _m _{max}	89

Figure 24 : Représentation graphique de la fluorescence en fonction du cycle d'amplification de 4 échantillons de chaque point de gamme entre 10^1 et 10^8 copies, et 4 contrôles négatifs (issus de la plaque référence du LC96).	90
Figure 25 : Représentation graphique des pics de fusion (« Melting peaks ») et détermination des T_m de la plaque référence du LC480 (4 échantillons de chaque point de gamme entre 10^1 et 10^8 copies donnent un pic aux alentours de 86°C , et 4 contrôles négatifs donnent un pic vers 79°C).	90
Figure 26 : Représentation graphique de la fluorescence en fonction du cycle d'amplification (« Amplification curves ») de 4 échantillons de chaque point de gamme entre 10^1 et 10^8 copies (en rouge, à gauche), et 4 contrôles négatifs (en violet, à droite) issus de la plaque référence du LC480).	91
Figure 27 : Représentation graphique des $T_{m_{\max}}$ moyen (+ ou 2.6 SD, en $^\circ\text{C}$) des points de gamme de 10^1 à 10^9 copies des plaques références de chaque LC.	92
Figure 28 : Résultat de la digestion des différents ADN par EcoRI. Les encadrés de couleur mettent en avant les fragments qui diffèrent entre les souches les virus de pigeons et de faucons. Encadré jaune : fragment d'environ 8.5 kb présent chez les herpesvirus de pigeons (référence + isolats) et non chez les faucons. Encadré rouge : fragment d'environ 8 kb présent chez les herpesvirus des faucons et non chez les pigeons (référence + isolats) (Aini <i>et al.</i> 1993).	107
Figure 29 : Résultat de la digestion des différents ADN par HindIII. Les motifs des herpes de pigeons et faucons sont identiques, et bien différents des herpes de psittacidés (Aini <i>et al.</i> 1993).	108
Figure 30 : Résultat de la digestion des différents ADN par PstI. Les motifs des herpes de pigeons et faucons sont identiques, et bien différents des herpes de psittacidés. De plus, les herpes de psittacidés semblent bien différer entre eux (Aini <i>et al.</i> 1993).	109
Figure 31 : Résultat de la digestion des différents ADN par XbaI. Les motifs des herpes de pigeons et faucons sont identiques, et bien différents des herpes de psittacidés (Aini <i>et al.</i> 1993).	110

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des éléments morphologiques de CoHV-1/FaHV-1.....	24
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques du CoHV-1/FaHV-1.....	27
Tableau 3 : Caractéristiques du génome du FaHV-1 S-18 (Spatz, Volkening, Ross 2014)....	30
Tableau 4 : Systématique schématisée des herpesvirus (d'après (Davison <i>et al.</i> 2009; Davison 2010)).....	33
Tableau 5 : Dénominations et classifications du CoHV-1.....	34
Tableau 6 : Revue bibliographique des cas d'infection par le CoHV-1 chez les oiseaux autres que pigeons ou faucons.....	37
Tableau 7 : Revue du tableau lésionnel macroscopique compatible avec une infection par le CoHV-1.....	38
Tableau 8 : Revue des lésions microscopiques compatibles avec une infection par le CoHV-1 chez le pigeon et le faucon.....	41
Tableau 9 : Etude comparative in vitro entre le CoHV-1, l'ILTV et le <i>Pigeonpox virus</i> (Cornwell, Weir 1970).....	45
Tableau 10 : Exemple de protocole d'étude sérologique pour détecter le CoHV-1.....	48
Tableau 11 : Résultats de caractérisation antigénique de plusieurs herpesvirus aviaires. (+) index de neutralisation de 100 ou plus ; (?) index de neutralisation de 50 ; (-) absence de neutralisation. (Maré, Graham 1973).....	49
Tableau 12 : Origine des échantillons d'oiseaux dont les herpesvirus isolés ont été analysés après digestion par des endonucléases de restriction (Aini <i>et al.</i> 1993).....	50
Tableau 13 : Types de prélèvements utilisés pour une mise en évidence par PCR du CoHV-1.....	52
Tableau 14 : Revue des amorces spécifiques ciblant l'ADN polymérase des herpesvirus ou du CoHV-1 décrites dans la littérature utilisée en PCR uniplex. (s : « sens » ; as : « anti-sens »).....	54
Tableau 15 : Revue des amorces spécifiques ciblant l'ADN polymérase des herpesvirus ou du CoHV-1 décrites dans la littérature utilisée en PCRq uniplex. (s : « sens » ; as : « anti-sens »).....	55
Tableau 16 : Revue des séquences de CoHV-1 ou FaHV-1 disponibles dans la base de données GenBank.....	60
Tableau 17 : Tableau lésionnel des 3 faucons décédés au centre ECWP d'Oum Jniba.....	74
Tableau 18 : Identification et nature des prélèvements de faucons étudiés dans un premier temps.....	76

Tableau 19 : Amorces utilisés dans le cadre de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».	77
Tableau 20 : Composition du mix pour la PCR 1 de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».	77
Tableau 21 : Conditions d'amplifications de la PCR 1 de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».	77
Tableau 22 : Composition du mix pour la PCR 2 de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».	78
Tableau 23 : Amorces utilisées dans le cadre de la PCR ADN polymérase spécifique «CoHV-1».	78
Tableau 24 : Composition du mix pour la PCR ADN polymérase spécifique «CoHV-1».	79
Tableau 25 : Conditions d'amplifications de la PCR ADN polymérase spécifique «CoHV-1».	79
Tableau 26 : Séquence « Consensus 1 PiHV » et résultats de l'analyse BLAST. (en rouge souligné : substitutions silencieuses ; en vert souligné : substitution faux-sens)	81
Tableau 27 : Identification des différentes populations d'oiseaux prélevées.	83
Tableau 28 : Composition du mix pour la PCR «Phusion High-fidelity» spécifique «CoHV-1».	84
Tableau 29 : Conditions d'amplifications de la PCR «Phusion High-fidelity» spécifique «CoHV-1».	84
Tableau 30 : Conversion « g/μL » en « copies/μL ».	87
Tableau 31 : Détail des instruments et kit utilisés pour l'étude par PCRq des échantillons de pigeons, faucons et gangas.	87
Tableau 32 : Light Cycler ® 480 : Composition du mix pour la PCRq spécifique CoHV-1.	87
Tableau 33 : Light Cycler ® 480 : Conditions d'amplifications de la PCRq spécifique CoHV-1.	88
Tableau 34 : Light Cycler ® 96 : Composition du mix pour la PCRq spécifique CoHV-1.	88
Tableau 35 : Light Cycler ® 96 : Conditions d'amplifications de la PCRq spécifique CoHV-1.	88
Tableau 36 : Critères de positivité en termes de $T_{m_{max}}$.	92
Tableau 37 : Tableau récapitulatif des échantillons positifs ou douteux. (FLP : pigeon captif de Zaida ; FLPw : pigeon sauvage ; FLPC : pigeon congelé).	93
Tableau 38 : Séquences obtenues chez les pigeons prélevés. (en rouge souligné : mutation silencieuse ; en vert souligné : mutation faux-sens)	94

Tableau 39 : Résultats et estimation de la prévalence apparente du CoHV-1 dans les différentes populations étudiées (calculs réalisés grâce à l’outil disponible sur le site <http://epitools.ausvet.com.au>). 97

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Figures issues de (Aini *et al.* 1993).

ANNEXE 2 : Extraits traduits de (Mansour *et al.* 2015)

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

UTILISES DANS LE TEXTE

aa :	Acides aminés
Ac :	Anticorps
ADN = DNA :	Acide DésoxyriboNucléique = « DeoxyriboNucleic Acid »
Ag ::	Antigène
AnHV-1 :	Anatid herpesvirus 1
AOM :	Anticorps d'origine maternelle
aPMV-1:	Paramyxovirus aviaire
ARN = RNA:	Acide RiboNucléique = « RiboNucleic Acid”
BUdR :	Bromodésoxyuridine
CAM :	"Chorio-allantoic membrane" = Membrane chorio-allantoïdienne
CAV :	"Chicken anemia virus" = Virus de l'anémie du poulet
CEF :	"Chicken embryo fibroblasts" = Fibroblastes d'embryon de poulet
CEHC :	"Chicken embryo hepatic cells" = Cellules hépatiques d'embryon de poulet
CEK :	"Chicken embryonic kidney cells" = Cellules rénales d'embryon de poulet
CIN :	Corps d'inclusion nucléaire
CoHV-1 :	Columbid alphaherpesvirus 1
Ct :	« Cycle threshold » = valeur du cycle de PCRq correspondant au signal seuil
Cy :	Cyclophosphamide
DEF :	"Duck embryo fibroblasts" = Fibroblastes d'embryon de canard
DMEM :	"Dulbecco's modified essential medium"
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
dNTP :	Desoxynucléotide triphosphate

DOC : "Day-old cockerel" = Poussin d'un jour

DVE : "Duck viral enteritis" = Entérite virale du canard

EBM : Eagle basal medium

ECP : Effets cytopathiques

ECWP: Emirates Center for Wildlife Propagation

FAdV : Fowl adenovirus

FaHV-1 : Falconid herpesvirus 1

FCS : "Fetal calf serum" = Serum de veau fœtal

FHV = FaHV : Herpesvirus du faucon

GaHV-... : Gallid herpesvirus

GB : Globules blancs = leucocytes

H&E : Haematoxylin et Eosine

HAV : "Holland attenuated duck plague virus" = virus atténué de la Peste du canard

HHV : Human herpesvirus

HVT : "Herpesvirus of turkeys" = Herpesvirus de la dinde

IBDF : « Inclusion body disease of Falcons » = Maladie des corps d'inclusion du faucon

IBDV : "Infectious bursal disease virus " = - Virus de la maladie de Gumboro

IBV : "Infectious bronchitis virus " = - Virus de la bronchite infectieuse

ICTV : "International Committee on Taxonomy of Viruses" = Comité international sur la taxonomie des virus

IDU : 5-iodo-2'deoxyuridine

Ig : Immunoglobuline

ILT (V) = LIT (V): "Infectious laryngotracheitis" = Laryngotrachéite infectieuse (V = virus de)

IM : Voie Intra-musculaire

IN : Voie Intra-nasale

IOcc : Voie Intra-oculaire

IP : Voie intrapéritonéale

IT : Voie intra-trachéale

IV : Voie Intra-veineuse

LAMP : "Loop-mediated isothermal amplification" = Amplification en boucle isothermique

LC : « Light Cycler® »

LVCV : "Lake Victoria Cormoran Herpesvirus" = Herpesvirus du cormoran mis en évidence au Lac Victoria

MDEF : "Muscovi duck embryo fibroblasts" = fibroblastes d'embryon de canard de Muscovi

MDV : "Marek disease virus" = virus de la maladie de Marek

MeHV-1: Meleagrid herpesvirus

MET : Microscope électronique à transmission

NDV : Virus de la maladie de Newcastle

NTC : « Non template control » = contrôle négatif de la réaction

OHV : "Owl herpesvirus" = herpesvirus des strigiformes

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

ORF : "Open reading frame" = cadre de lecture ouvert

PBFD (V): "Psittacine Beak and Feather disease" = maladie du bec et des plumes des psittacidés (V = virus de)

PBS : "Phosphate buffered saline solution" = Solution tamponnée de phosphate salé

PCR : "Polymerase chain reaction" = réaction de polymérisation en chaîne

PCRq :	PCR quantitative
PEF :	"Pigeon embryo fibroblasts" = Fibroblastes d'embryon de pigeonneau
PEHC :	"Pigeon embryo hepatic cells " = Cellules hépatiques d'embryon de pigeon
PFA :	Phosphonoformate
Pfu :	"Plaque-forming unit" = Plaque formant unité
PHV = PiHV = PiHV-1 :	Herpesvirus du pigeon
PiCV :	Pigeon circovirus
PsHV-... :	"Psittacine herpesvirus" = Herpesvirus des psittacidés
RT-PCR:	"Real time PCR" = PCR en temps réel
SD :	Standard deviation
SiHV-1 :	Strigid herpesvirus 1
SPF :	"Specific pathogen-free" = indemne du pathogène spécifique
TBE :	tampon TRIS + Borate + EDTA
TCID ₅₀ :	"Tissue culture infective dose" 50 = dose infectant 50% du tissu de culture
Tm :	"melting temperature" = temperature du pic de fusion
VPN :	valeur prédictive négative
VPP :	valeur prédictive positive
WNV :	"West Nile virus " = Virus du West Nile
YPDS :	"Young pigeon disease syndrome" = Syndrome du jeune pigeon malade

La totalité des abréviations des virus cités dans ce texte sont disponibles dans les derniers rapports de l'ICTV ou sur le site internet www.ictvonline.org.

INTRODUCTION

La gestion des maladies infectieuses d'origine virale dans les élevages aviaires de production de denrées animales, à visée conservatoire ou de loisir est en constante évolution depuis plusieurs décennies. Les outils disponibles, notamment moléculaires, pour la mise en évidence directe ou indirecte des agents pathogènes s'améliorent d'année en année et permettent d'améliorer les connaissances des virus et de leurs impacts.

Plusieurs herpesvirus sont connus pour être responsables dans les populations aviaires d'une mortalité importante, particulièrement dans les élevages de volailles (virus de la Maladie de Marek, virus de la Laryngotrachéite infectieuse, virus de la peste du canard...). En ce qui concerne les oiseaux des ordres des columbiformes et falconiformes, la littérature nous renseigne sur un herpesvirus mis en évidence chez les animaux des deux entités taxonomiques et dont les connaissances sur les caractéristiques cliniques et moléculaires ont bien évolué depuis plus d'un demi-siècle. La classification et la dénomination même de ce virus, à ce jour le *Columbid alphaherpesvirus 1* (CoHV-1), sont encore aujourd'hui remises en question. L'hypothèse que le virus retrouvé chez les Colombiformes est significativement différent de celui mis en évidence chez les falconiformes est toujours d'actualité, d'où l'utilisation de la dénomination *Falconid herpesvirus 1* dans certains cas précis.

A partir des résultats obtenus lors de l'évaluation post-mortem de 3 cas de morts subites dans un élevage de faucon de chasse, ce projet de thèse se consacre à la détection moléculaire du CoHV-1 dans des élevages de faucons et de pigeons, ainsi que dans les populations de pigeons sauvages présents aux alentours du Centre d'élevage de l'organisation ECWP d'Oum Jniba au Maroc.

Dans un premier temps, nous mettrons en avant les principales informations disponibles dans la littérature scientifique concernant l'herpesvirus du Faucon et du Pigeon, nécessaire à la compréhension de l'étude de cas qui suit.

Dans un second temps, nous nous intéresserons à l'étude de la prévalence du CoHV-1 dans l'élevage d'Oum Jniba ; ceci en confirmant la présence du CoHV-1 dans les échantillons des faucons autopsiés, mais aussi en évaluant la prévalence de ce virus dans les populations de faucons et pigeons présents dans et aux alentours du Centre d'élevage. Nous décrirons les techniques moléculaires utilisées, nous préciserons les résultats et les enjeux qui en découlent pour les populations aviaires de la région d'Oum Jniba et du Centre d'élevage.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction : histoire des herpesvirus chez les pigeons et les faucons

1. Découverte

La première description scientifique disponible évocatrice d'infection par un herpesvirus intervient tout d'abord chez le Pigeon domestique *Columba livia* en 1945.

En effet, Smadel *et al.* (Smadel, Jackson, Harman 1945) décrivent les lésions majeures macroscopiques et microscopiques observées chez plusieurs pigeons de l'armée américaine morts lors d'une épizootie inattendue de « psittacose » - alors considérée comme une maladie virale - en 1942. La maladie est décrite dans un premier temps comme épizootique avec une mortalité importante, mais tendant peu à peu vers une expression enzootique, plutôt dans les populations de jeunes pigeons. Les principales lésions macroscopiques observées chez les pigeons autopsiés par la Virus Division sont de multiples foyers nécrotiques sur le foie, la rate et le pancréas. La mise en évidence microscopique d'inclusions intranucléaires éosinophiliques n'avait alors jamais été décrite dans des cas de « psittacose » chez le pigeon.

L'isolement d'un nouvel agent, appelé « Intranuclear inclusion agent » ou agent des Corps d'Inclusion (intra-) Nucléaire (CIN) est réalisée à partir du pigeon ET5, chez lequel seul le nouveau virus a été mis en évidence. Chez les autres pigeons, des indications d'infection seule ou de co-infection par l'agent de la « psittacose » sont rapportées par les auteurs. Des injections intra-cérébrales d'une suspension d'un mélange de tissus hépatique et splénique sont réalisées chez 6 souris et sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de 5 œufs de poule embryonnés de 10 jours d'âge. Chez les rongeurs, aucune maladie ne se développe, contrairement à ce qui est observé lors d'injection de l'agent de la psittacose ; de plus, aucune immunité croisée contre l'agent de la « psittacose » ne s'est mise en place (décès en 6 à 9 jours des souris exposées à une dose connue d'agent de la « psittacose »). Sur les CAM, les auteurs rapportent le développement de plages blanchâtres en relief appelées « pocks » qui, à l'examen histopathologique, révèlent la présence de CIN. Après passage dans de multiples filtres, l'ordre de grandeur du nouvel agent pathogène est estimé inférieur à 200-300 nm.

Ceci est la première mise en évidence d'un agent pathogène spécifique au pigeon, dont l'expression dans les populations a une tendance enzootique, qui serait à l'origine de lésions nécrotiques sur les viscères, et qui présenteraient des CIN dans les cellules affectées à

l'analyse microscopique. A partir de cette étude, l'hypothèse de l'existence d'un agent de type herpesvirus spécifique au pigeon est avancée.

2. Historique

a. Les travaux de Cornwell *et al.*

Les publications suivantes concernant l'agent des CIN du pigeon sont les travaux dirigés par Cornwell au début des années 1970 au Royaume-Uni (Cornwell, Wright 1970; Cornwell, Wright, McCusker 1970; Cornwell, Weir 1970). Les auteurs ont étudié les caractéristiques biologiques de ce nouvel agent pathogène pour le pigeon, classé par Cornwell, Weir et Follet dans le groupe des herpesvirus (Publication non disponible, citée dans Cornwell, Wright 1970). Tableau clinique, tableau lésionnel, caractérisation des CIN, culture sur CAM, morphologie du virus, caractérisation chimique sont déterminés dans un premier temps chez le pigeon. Aucune comparaison sérologique n'est effectuée avec les souches américaines, britanniques et danoises jusque là disponibles. L'agent pathogène est alors nommé pour la première fois « Pigeon herpesvirus » ou « PHV » (Cornwell, Wright 1970). L'étude de Cornwell, Wright, McCusker (1970) compare la pathogénicité du PHV chez le pigeon et le DOC (poussin d'un jour d'âge) par voie intra-trachéale et intra-péritonéale. La spécificité du PHV à ne développer la maladie que chez le pigeon est à nouveau suggérée. Enfin, Cornwell, Weir (1970) réalisent une analyse comparée des lésions sur CAM respectivement induites par le PHV sur CAM, un autre herpesvirus aviaire non-spécifique du pigeon, le virus de la Laryngotrachéite infectieuse (ILT), et un virus spécifique du pigeon non-herpes, le *Pigeonpox virus*. La technique d'inoculation et de culture sur CAM, associée à l'étude morphologique et histopathologique des pocks, permet une distinction des 3 virus. Il s'agit alors de la méthode de référence de mise en évidence du PHV chez le pigeon.

b. Les travaux de Maré, Graham *et al.*

Parallèlement, c'est aussi dans les années 1970 aux Etats-Unis que sont publiés les premiers articles décrivant l'agent étiologique d'une affection observée chez les faucons appelée « Maladie des corps d'inclusion des faucons » (IBDF). En effet, Mare et Graham (1973) observent tout d'abord des similitudes cliniques et lésionnelles lors de cas d'IBDF avec certaines herpesviroses aviaires – par exemple la nécrose hépatique présente lors de maladie de Pacheco et de peste du canard. Les premières suspicions d'infection par un herpesvirus chez des rapaces apparaissent en réalité chez des Strigiformes en Allemagne,

présentant une hépatosplénite fatale, mais dont les agents étiologiques n'avaient pas pu être déterminés. Les auteurs rapportent aussi un cas d'IBDF chez un Faucon de prairie *Falco mexicanus* mais dont l'agent étiologique n'avait là non plus pas pu être isolé. L'étude de Mare, Graham (1973) porte sur l'isolement d'un virus provenant de 5 cas mortels d'IBDF dans 3 espèces de faucons différentes (*Falco mexicanus*, *Falco chiquera*, *Falco peregrinus*), la caractérisation de ce virus, le développement en condition expérimentale *in vivo* de l'agent de l'IBDF chez le faucon de prairie *F. mexicanus*, le faucon crécerelle américain *Falco sparverius* et le faucon émerillon *Falco columbarius*, et enfin la comparaison sérologique du virus des faucons par rapport aux autres herpesvirus aviaires connus à cette époque. Les premières hypothèses quant à la proximité taxonomique, ou tout du moins antigénique, entre le FHV et le PHV, et le mode de contamination – par ingestion de proies infectées - des rapaces sont émises (Maré, Graham 1973; Graham *et al.* 1975).

c. Les travaux de Vindevogel, Pastoret *et al.*

Des travaux sur le PHV sont entrepris par les équipes belges de Vindevogel et Pastoret à la fin des années 1970 à l'Université de Liège sur le « Coryza du pigeon ». La Belgique est un pays où la pratique de la colombophilie est particulièrement développée et les populations de pigeons domestiques importantes. En 1975, une souche de PHV est isolée d'un élevage de pigeons de chair (Vindevogel *et al.* 1975). La séroprévalence du PHV dans les populations de pigeons en Belgique est estimée entre 50 et 80% (Publication non disponible). Les études suivantes des chercheurs belges tendent à déterminer plusieurs caractéristiques de la pathogénie du PHV : le développement de porteurs asymptomatiques après infection expérimentale, la transmission du virus chez le pigeon en condition naturelle, la détermination de certains facteurs favorisant ou prévenant l'infection ou le développement de la maladie (Vindevogel, Pastoret 1980, 1981; Vindevogel, Debruyne, Pastoret 1985). Ils tenteront de déterminer la possibilité et l'efficacité de traitements par plusieurs molécules antivirales (Schwers *et al.* 1980, 1981; Vindevogel, Pastoret, Aguilar-Setien 1982; Thiry *et al.* 1983). Ils seront les premiers à tenter une vaccination contre le PHV (Vindevogel, Pastoret, Leroy 1982).

d. De la biologie à l'analyse biomoléculaire

A partir des années 1990, le développement de la biologie moléculaire permet aux scientifiques de faire un bond en avant et d'élargir le champ de leurs connaissances des agents pathogènes. En ce qui concerne l'OHV (Herpesvirus des Strigiformes), le FHV et le PHV, les

premières analyses du matériel génétique de ces virus sont réalisées par Aini *et al.* en 1993 (Aini *et al.* 1993), par la technique de digestion de l'ADN virale par des enzymes de restriction. Cette étude appuiera l'hypothèse d'une forte proximité génétique de ces trois entités virales, cependant bien distinctes des herpesvirus des psittacidés.

L'extrapolation d'une étude menée sur les herpesvirus, entre autres humains (VanDevanter *et al.* 1996), sert de base à l'exploration et la mise en évidence du génome du PHV, du OHV ou du FHV (Ehlers *et al.* 1999; Gailbreath, Oaks 2008; Pinkerton *et al.* 2008; Rose *et al.* 2012).

Depuis, plusieurs publications utilisant des techniques de mise en évidence directe du PHV ou du FHV - par PCR (Ehlers *et al.* 1999; Raue *et al.* 2005; Freick, Müller, Raue 2008; Phalen *et al.* 2011; Stenzel *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2015) , RT-PCR (Woźniakowski *et al.* 2013; Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014), amplification LAMP (Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014)-, ou indirecte, par sérologie (Schettler *et al.* 2001; Zsivanovits *et al.* 2004), ont permis l'évolution des connaissances concernant ces virus.

La séquence complète du génome du PHV ou CoHV-1 *stricto sensu* n'est aujourd'hui pas connue. Par contre, une souche issue d'un faucon (FaHV-1 S-18) a elle été complètement séquencée (Spatz, Volkening, Ross 2014).

II. Description, Dénominations et Classifications des deux virus

1. Description des virus

La morphologie du CoHV-1 / FaHV-1 (absence de distinction dans cette partie, nous utiliserons la dénomination CoHV-1 dans la suite du manuscrit) a été établie progressivement suivant le développement des techniques et technologies à disposition des scientifiques.

Tout d'abord, la taille du virus fut estimée pour la première fois par Smadel *et al.* (Smadel, Jackson, Harman 1945) par des techniques de filtration, cherchant à isoler l'agent des CIN de l'agent responsable de la « psittacose ». Une suspension contenant de l'agent de CIN volontairement contaminé avec de l'agent de la « psittacose » fut passée par un filtre Berkefeld V. S'en suivit une estimation des effets pathogènes dus respectivement aux agents des CIN et de la « psittacose » chez des souris ayant reçu une injection intracérébrale de la suspension filtrée, et sur des CAM. Le « pouvoir » létal (classiquement attribué à l'agent de la « psittacose ») de la suspension filtrée chez les souris fut bien moindre que celui de la suspension initiale, alors que se développaient de nombreux pocks (attribués à l'agent de CIN) sur CAM. Smadel *et al.* en déduisirent alors que l'agent de CIN chez le pigeon se trouvait être de taille bien inférieure à celui de l'agent de la « psittacose », jusqu'à présent estimée entre 200 et 300 nm de diamètre.

Dans un second temps, la microscopie électronique et l'observation ultrastructurale des particules virales permirent de préciser les différents éléments morphologiques caractéristiques des herpesvirus (Tableau 1, Figure 1 à Figure 5). Le détail des techniques de traitement des échantillons sera précisé ultérieurement (Partie I, IV., Microscopie électronique).

Tableau 1 : Caractéristiques des éléments morphologiques de CoHV-1/FaHV-1.

Éléments	Caractéristiques	Références bibliographiques
Particule virale complète	Enveloppée	(Maré, Graham 1973; Potgieter, Kocan, Kocan 1979; Mozos <i>et al.</i> 1994; Pinkerton <i>et al.</i> 2008; Davison <i>et al.</i> 2009; Zhang <i>et al.</i> 2015)
	Diamètre : 160-170(210) nm	
	Bourgeonnement depuis la membrane nucléaire	
Nucléocapside	Icosaédrique	(Maré, Graham 1973; Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979; Kunkle, Duhamel 1991; Bernabé <i>et al.</i> 1994; Mozos <i>et al.</i> 1994; Pinkerton <i>et al.</i> 2008; Davison <i>et al.</i> 2009; Phalen <i>et al.</i> 2011; Zhang <i>et al.</i> 2015)
	Diamètre : 110-130 nm	
	Diamètre du cœur : 80 nm	
	Nombre de capsomère : estimation : proche de 162	
Capsomères	Allongés	(Maré, Graham 1973; Potgieter, Kocan, Kocan 1979)
	Cavitaires	
	Taille : 12 nm	

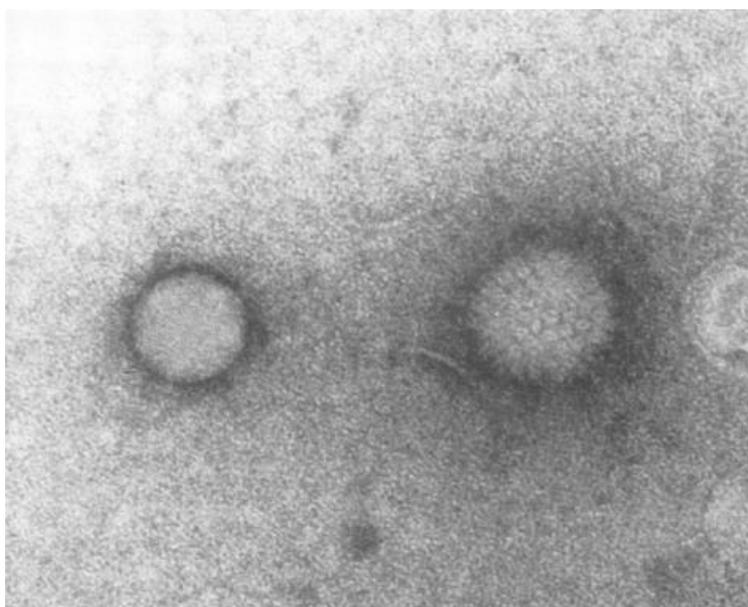


Figure 1 : Microscopie électronique (coloration négative) d'un virion de FHV S-18 montrant une nucléocapside complète (à droite) et des débris d'enveloppe virale altérée par la préparation. La structure homogène sur la gauche de la photographie correspond à un marqueur en latex de 88 nm de diamètre. (x 210 000) (Maré, Graham 1973)

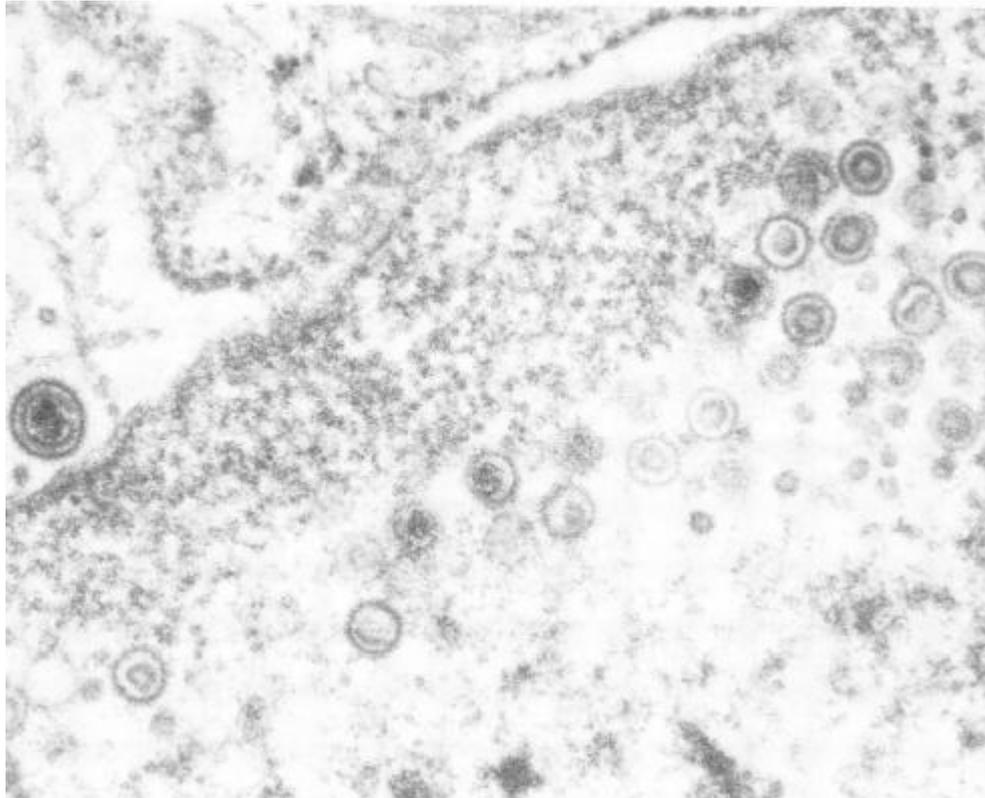


Figure 2 : Noyau d'un hépatocyte comportant de multiples particules virales non enveloppées. Une particule virale enveloppée est visible juste à l'extérieur du noyau (gauche de la photographie). (x 65 000) (Maré, Graham 1973)

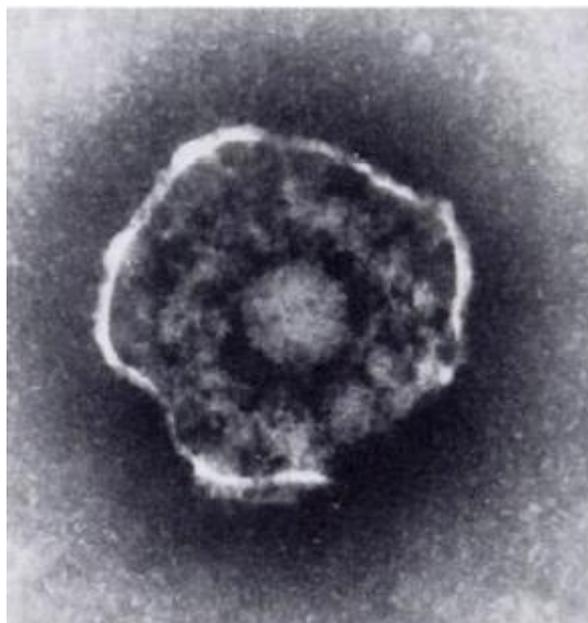


Figure 3 : Cliché de MET (coloration négative) d'une particule virale non purifiée : noter le virion entouré de son enveloppe (x 104 345) (Potgieter, Kocan, Kocan 1979)

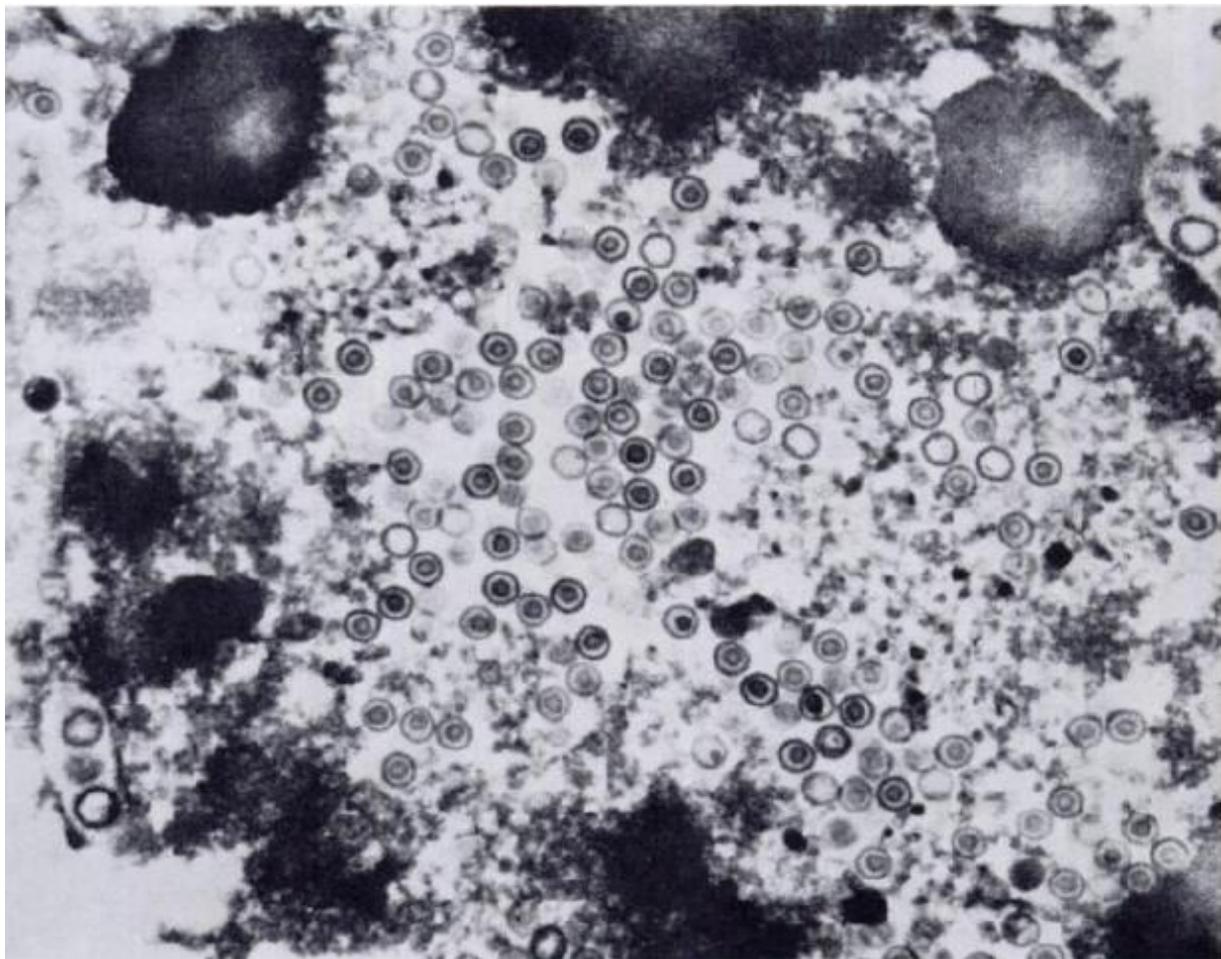


Figure 4 : Cliché de MET montrant de nombreuses capsides à différents stades de maturation à l'intérieur d'un noyau de CEF, 12h après inoculation. (x 42.395) (Potgieter, Kocan, Kocan 1979)

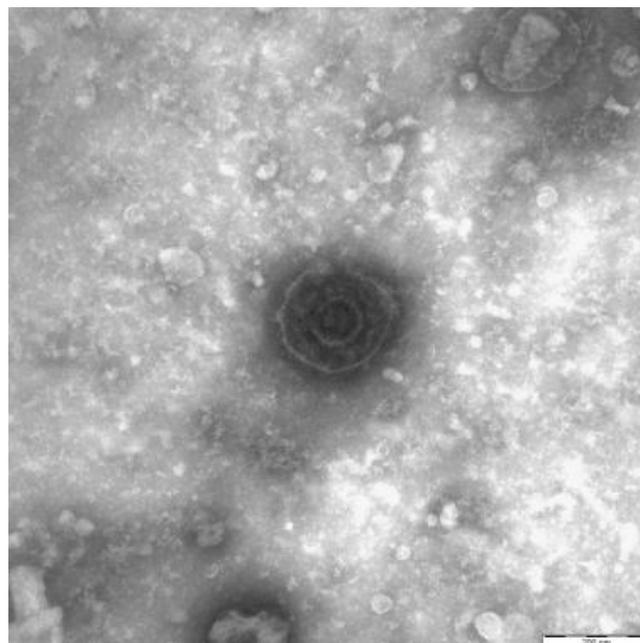


Figure 5 : Cliché au MET d'un virus enveloppé mature isolé chez un pigeon domestique (barre = 200 nm) (Zhao *et al.* 2015)

La description du CoHV-1 passe aussi par une étude de ses caractéristiques physico-chimiques. Celles-ci sont présentées dans le Tableau 2. Ces propriétés participent en partie à la classification du virus parmi les herpesvirus. Les propriétés biologiques du virus seront développées ultérieurement (Partie I, IV. Mise en évidence).

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques du CoHV-1/FaHV-1.

Paramètres physico-chimiques	Caractéristiques		Références bibliographiques	
pH	pH 4 (acide)	Sensible/Labile		(Cornwell, Wright 1970)
	Suspension de virus dans de l'EBM tamponné à pH 2.8 maintenu à 26°C pendant 2h Contrôle : Virus dans de l'EBM tamponné à pH 7.4 maintenus à 4 ou 26 °C pendant 2h	Titration des suspensions virales sur cultures de CEF	Inactivation et destruction du virus à pH 2.8.	(Maré, Graham 1973)
	1h - pH 4	Réduction de 2 log₁₀ du titre viral		(Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979)
Couple Temps-Température	30 min - 56°C	Infection expérimentale impossible		(Cornwell, Wright 1970)
	Suspensions virales de concentrations identiques plongées dans un bain à 4°C ou 56°C pendant 15min. Refroidissement à 4°C.	Titration des suspensions virales sur cultures de CEF.	Bain à 56°C : réduction de 2.5 log₁₀ du titre viral.	(Maré, Graham 1973)
	10 min – 50°C		Réduction de 4 log₁₀ du titre viral	(Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979)
	10 min – 56°C 2min – 60°C	Inoculation sur CAM	Inactivation	(Tantawi <i>et al.</i> 1981)
	4 mois - -70°C		Stable	
	4 mois - -20°C		Perte de 80% de son pouvoir infectant	
	3 mois - -10°C		Inactivation rapide	
Traitement aux deoxyuridines halogénées	Réplication virale inhibée		(Cornwell, Wright 1970)	
	Traitement au BUdR (100 µg/mL)	Réduction de 4 log₁₀ du titre viral	(Tantawi <i>et al.</i> 1981)	

Sensibilité à l'Ether	0.2 mL (10^4 TCID ₅₀ de virus) + 0.8 mL de Diethyl ether	Agitation Refroidissement à 4°C Conservation 18h Suppression de l'Ether Titrage du virus résiduel des tubes de cultures cellulaires de CEF	Inactivation complète du virus	(Maré, Graham 1973)
	Réduction de 5 log₁₀ du titre viral			(Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979)
Sensibilité au Chloroforme	Réduction de 4 log₁₀ du titre viral			(Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979)

En résumé, le CoHV-1 est un virus enveloppé d'une taille de l'ordre de 180 nm de diamètre. La nucléocapside est formée de 162 capsomères de forme allongée, formant un icosaèdre dont la cavité est de l'ordre de 80 nm de diamètre. Le virus est inactivé aux pH acides, aux hautes températures (> 50°, 15 min), et à l'éther. Le virus conservé à -70°C reste infectant au moins après 4 mois. Le virus semble perdre en pouvoir infectant en quelques semaines lorsqu'il est conservé à une température supérieure à -20°C.

2. Matériel génétique

Les connaissances concernant le matériel génétique des virus sont aujourd'hui centrales dans la compréhension de leur mode d'action, mais aussi pour leur mise en évidence et leur classification phylogénétique.

Les premières hypothèses concernant le type d'acide nucléique composant le matériel génétique du CoHV-1 sont émises par Cornwell *et al.* (Cornwell, Wright 1970) par l'analyse histopathologique des lésions observées sur les foies de pigeons atteints et les cultures sur CAM. Les CIN présentent des nuances de coloration selon le stade de maturation des virus en répllication typique des herpesvirus selon l'auteur, avec dans un premier temps l'ADN (sans ARN) apparaissant basophile, et dans un second temps, un stade éosinophilique dépourvu d'acide nucléique.

Les premiers travaux ayant déterminé le type d'acide nucléique présent dans le matériel génétique du CoHV-1 sont ceux de Maré et Graham (Maré, Graham 1973). Le principe de leur travail consista au titrage de virus isolés sur CEF en présence d'inhibiteur d'acides désoxyribonucléiques, la 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU). Le titre viral en présence

d'IDU (0.1 μ M d'IDU/mL d'EBM) se révéla 100 fois inférieur au titre viral en présence de solution contrôle (EBM). Ceci est la première confirmation que le CoHV-1 est un virus à ADN.

Depuis, plusieurs travaux ont utilisé les propriétés de l'organisation du matériel génétique du CoHV-1 pour déterminer les relations phylogénétiques avec d'autres virus (Aini *et al.* 1993; Ehlers *et al.* 1999; Cardoso *et al.* 2005; Gailbreath, Oaks 2008; Pinkerton *et al.* 2008; Phalen *et al.* 2011; Woźniakowski *et al.* 2013; Spatz, Volkening, Ross 2014; Zhang *et al.* 2015).

Les travaux de Spatz *et al.* (Spatz, Volkening, Ross 2014) ont permis de séquencer la totalité du génome du FaHV-1 S-18. Il s'agirait du plus long génome d'herpesvirus aviaire connu. Même si le décryptage de celui-ci en termes de fonctions des différentes protéines potentiellement traduites n'est pas totalement compris, il s'agit d'une avancée majeure dans l'étude de l'herpesvirus des faucons et des pigeons. **Aucune séquence complète d'un herpesvirus prélevé sur pigeon n'est actuellement, à notre connaissance, disponible dans les différentes bases de données scientifiques.**

Les principales informations concernant le FaHV-1 S-18 décrites dans l'article de Spatz *et al.* sont résumées dans le Tableau 3. Une représentation schématique du génome du FaHV-1 S-18 est présentée en Figure 6.

Tableau 3 : Caractéristiques du génome du FaHV-1 S-18 (Spatz, Volkening, Ross 2014).

Numéro d'accèsion du génome complet du FaHV-1 S-18	Base de données : GenBank	# KJ668231
Génome FaHV-1 S-18	Taille	204 054 pb Le plus long des génomes d'herpesvirus aviaires connus !
	Proportion de G/C	61.5 %
ORF	130 gènes potentiellement codants	84 gènes : unique copie 46 gènes : 2 copies (séquences redondantes)
	65 gènes orthologues dans la sous-famille des <i>Alphaherpesvirinae</i>	5 gènes spécifiques des alphaherpesvirus aviaires : - LORF1 - LORF2 - LORF3 - LORF5 - SORF3
Séquence longue unique : - U _L	79 gènes codants	6999-143 375 (61 % G/C)
	Blocs subgénomiques identifiés dans la séquence U _L	FaHV-1 : A : U _L 1-U _L 21 B : U _L 22-U _L 44 C : U _L 45-U _L 55
Séquence courte unique : - U _S	9 gènes codants	U _S : 172 271-182 157 (52 % G/C)
Séquences inversées longues redondantes/répétées : - TR _L - IR _L	5 gènes codants	TR _L : 1-6998 (67 % G/C) IR _L : 143 376-150 373 (67 % G/C)
Séquences inversées courtes redondantes/répétées (plus longue que chez les autres herpesvirus aviaires): - IR _S - TR _S	20 gènes codants	IR _S : 150 374-172 270 (64 % G/C) TR _S : 182 158-204 054 (64 % G/C)

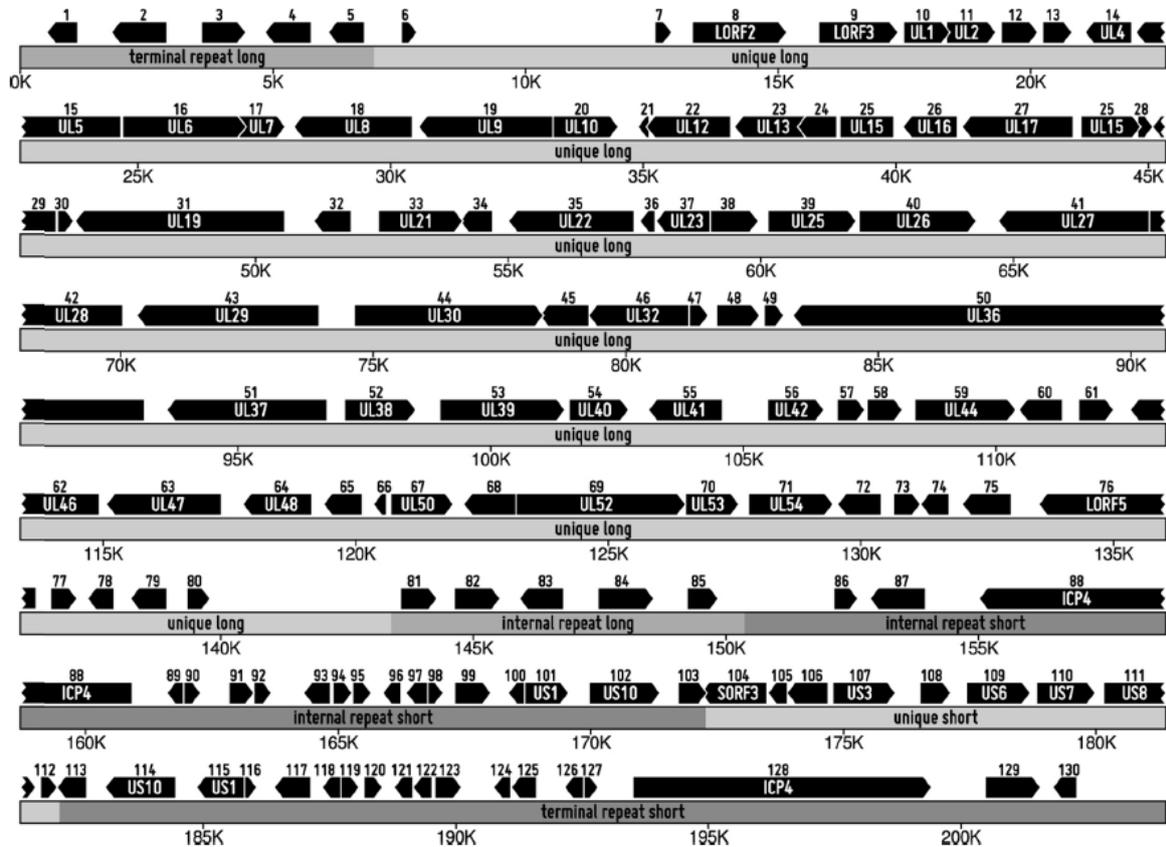


Figure 6 : Organisation du génome du FaHV-1. Cette carte génétique montre une structure génomique de classe E du génome du FaHV-1, et indique la localisation, l'orientation et la taille des ORF. Ceux-ci sont nommés et numérotés sur la base d'une homologie avec les gènes caractérisés chez le HHV-1 et les autres alphaherpesvirus aviaires. Les gènes sont numérotés de 5' à 3' et leur orientation est indiquée par la flèche. (Spatz, Volkening, Ross 2014).

De cette étude, Spatz *et al.* affirment qu'au moins un gène diffère significativement entre le FaHV-1 et le CoHV-1 d'après l'analyse comparée de la séquence obtenue et de celles d'herpesvirus prélevés sur des pigeons dont les séquences partielles sont disponibles sur les bases de données. Le gène U_{L43} diffère significativement entre le FaHV-1 et le CoHV-1. Une mutation non-sens (codon stop TGA) est incluse au milieu de la séquence du FaHV-1, contrairement aux autres alphaherpesvirus aviaires, dont le CoHV-1. Ce gène code chez le CoHV-1 pour une séquence de 430 aa. Les deux séquences codantes du FaHV-1 qui en découlent sont respectivement identiques à 99,5 % pour la portion N-terminale, et 99,5% pour la portion C-terminale par rapport à la séquence du Co-HV-1 correspondante. La fonction du gène U_{L43} est mal connue, mais n'est pas essentielle à la croissance en culture cellulaire chez le HHV-1 et le SuHV-1. Il a cependant été prouvé que ce gène joue un rôle dans la modulation du processus de fusion pendant l'infection.

3. Dénominations et classifications

a. L'Ordre des *Herpesvirales*

La classification et le choix du nom des virus se sont fondés sur différentes caractéristiques de ces entités biologiques, le but étant de préciser au maximum les critères de classification et de parvenir à des consensus quant à la phylogénie des virus. Les herpesvirus ne dérogent pas à ces concepts.

Dans un premier temps, n'étaient disponibles que des informations sur la biologie des virus : le/les hôtes, la pathogénie, l'épidémiologie... Puis la microscopie électronique a permis de déterminer la morphologie des virus. Les études sérologiques ont permis de compléter les informations sur la biologie et le phénotype des virus. Enfin, la comparaison du matériel génétique est aujourd'hui le principal discriminateur phylogénétique. L'analyse comparative des séquences de nucléotides ou des protéophénotypes peut être automatisée à l'aide de différents algorithmes, ce qui permet une analyse rapide et précise d'une grande quantité d'informations (Davison 2010).

Depuis une quarantaine d'années, la détermination de la taxonomie des virus est confiée à un comité scientifique international, appelé ICTV. Depuis 1971, 8 rapports ont été rédigés dans l'optique de centraliser les informations contenues dans la littérature scientifique pour parvenir à un consensus à l'échelle internationale quant à la classification des virus. Des groupes d'études – par Famille ou Ordre - soumettent au comité exécutif de l'ICTV leurs propositions. Une mise à jour annuelle est maintenant disponible sur le site internet www.ictvonline.org (Davison 2010).

En ce qui concerne les herpesvirus (dénomination générique), le premier rapport de Wildy en 1971 (Davison 2010) classe 23 virus dans 4 groupes selon leur nom d'usage dans le nouveau genre des *Herpesvirus*. Le deuxième rapport de Fenner en 1976 (Davison 2010) crée la famille des *Herpetoviridae*, mais de par la confusion engendrée avec le monde des reptiles et amphibiens, cette famille sera rebaptisée en 1979 par Matthews (Davison 2010) la famille des *Herpesviridae*. Les 89 virus appartenant à cette famille sont alors répartis dans 3 sous-familles – *Alpha-*, *Beta-* et *Gammaherpesvirinae* – et dans 5 genres non-nommés.

En 2000, dans le rapport de Minson *et al.* (Davison 2010) apparaît le concept virtuel « d'espèce virale ». La dénomination de l'espèce virale correspond à la dénomination officielle du virus : nom complet en écriture italique avec la première lettre en majuscule.

Toute référence par une abréviation ou par un nom vernaculaire se rattache à l'entité du réel qu'est le virus. Les méthodes de dénominations sont harmonisées et simplifiées :

- Pour les Primates et bovins : le nom du taxon finit en *-ine* (ex : « *Bovine* »)
- Autres : le nom de la famille des espèces hôtes se finit en *-id* (ex : « *Columbid* »)
- Les virus humain sont traités à part.
- A la suite, on rajoute le terme « *herpesvirus* »
- Exemples : Virus de la maladie d'Aujesky ou Pseudo-rage, se nomme le *Suid herpesvirus-1*.
- Quelques virus dont le nom vernaculaire est tellement reconnu conserve dans la littérature leur ancienne dénomination (exemple : virus d'Epstein-Barr)

Depuis 2016, une indication de la sous-famille chez les *Herpesviridae* est incluse dans leur dénomination (Davison, Pellett, Stewart 2015).

Les modifications les plus récentes concernant les herpesvirus sont notifiées dans le rapport de 2009 de Davison (Davison *et al.* 2009). Une schématisation de la classification décrite dans ce rapport est présentée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Systématique schématisée des herpesvirus (d'après (Davison *et al.* 2009; Davison 2010))

Ordre :	<i>Herpesvirales</i>				
Familles (hôtes)	<i>Herpesviridae</i> (mammifères, oiseaux et reptiles)			<i>Alloherpesviridae</i> (poissons et amphibiens)	<i>Malacoherpesviridae</i> (bivalves)
Sous-familles	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Gammaherpesvirinae</i>	-	-
Genres/espèces	17 genres / 90 espèces				

b. De l'agent des CIN au CoHV-1

Cette partie est destinée à référencer les appellations et classifications que l'on peut retrouver dans la littérature scientifique concernant l'herpesvirus du pigeon et du faucon (Tableau 5).

Notez que les appellations *Falconid herpesvirus 1* (FHV ou FaHV-1) ou *Strigid herpesvirus 1* (OHV ou StHV-1), sciemment utilisées dans ce travail, n'ont aucune valeur officielle quant à la classification des espèces virales selon l'ICTV. Ces dénominations n'ont qu'une visée pratique pour désigner ce qui est à ce jour encore considéré comme un *Columbid alphaherpesvirus 1* isolé ou mis en évidence respectivement chez un falconiforme ou un

Strigiforme. Jusqu'à ce jour, à notre connaissance, l'existence d'un véritable herpesvirus spécifique au faucon et d'un autre spécifique aux Strigiformes n'est pas prouvée, malgré quelques résultats qui iraient dans ce sens (Maré, Graham 1973).

Tableau 5 : Dénominations et classifications du CoHV-1.

Dénominations	Classification	Références bibliographiques
Agent des Corps d'inclusion nucléaire (traduction de « Intranuclear inclusion agent »)	-	(Smadel, Jackson, Harman 1945)
Pigeon herpesvirus	-	(Cornwell, Wright 1970)
	F. <i>Herpesviridae</i> sF. <i>Betaherpesvirinae</i>	(Kaleta 1990; Aini <i>et al.</i> 1993)
	F. <i>Herpesviridae</i> sF. <i>Alphaherpesvirinae</i>	(Ehlers <i>et al.</i> 1999)
<i>Columbid herpesvirus 1</i>	F. <i>Herpesviridae</i> sF. <i>Alphaherpesvirinae</i>	(Ehlers <i>et al.</i> 1999)
	O. <i>Herpesvirales</i> F. <i>Herpesviridae</i> sF. <i>Alphaherpesvirinae</i> G. <i>Mardivirus</i>	(Davison 2005; Davison <i>et al.</i> 2009; Davison 2010)
<i>Columbid alphaherpesvirus 1</i>	O. <i>Herpesvirales</i> F. <i>Herpesviridae</i> sF. <i>Alphaherpesvirinae</i> G. <i>Mardivirus</i>	(Davison, Pellett, Stewart 2015)

III. Pathogénie

1. Symptomatologie

Les tableaux cliniques présentés par les pigeons ou les rapaces chez qui du CoHV-1 a été mis en évidence diffèrent sensiblement.

a. Chez le pigeon *Columba* spp.

Lors d'une expression clinique de l'infection par le CoHV-1 chez le pigeon, ce qui n'est pas toujours le cas (Marlier, Vindevogel 2006), celle-ci est généralement peu spécifique et d'intensité variable (Cornwell, Wright 1970). L'expression de la maladie est plus fréquente chez les jeunes, on parle alors du syndrome YPDS ou du « jeune pigeon malade » (Vindevogel, Pastoret 1980; Raue *et al.* 2005; Marlier, Vindevogel 2006; Freick, Müller, Raue 2008), et chez l'adulte naïf ou immunodéprimé (Vindevogel, Pastoret 1980). Des cas de mort sans signes cliniques préalables sont aussi rapportés chez le pigeon (Bernabé *et al.* 1994).

Les premières mises en évidence du virus sont issues d'animaux présentant un tableau clinique semblable à celui de la psittacose (Cornwell, Wright 1970), c'est-à-dire :

- une clinique systémique peu spécifique : hypovigilance, abattement, dysorexie voire anorexie ;
- ceci associé à une atteinte du système respiratoire haut avec des lésions diphtéroïdes dans le pharynx, du jetage, des éternuements, jusqu'à de la dyspnée sévère avec du stertor (Cornwell, Wright 1970; Freick, Müller, Raue 2008). Des signes oculaires, de type chassie ou épiphora, évocateurs de conjonctivites ou de sinusites sont également rapportés. La coloration des caroncules, normalement blanche, peut devenir gris-jaunâtre dans la forme aiguë.

On parle aussi de « **Coryza du pigeon** » (Marlier, Vindevogel 2006). Des surinfections secondaires ne sont pas rares.

D'autres signes cliniques sont rapportés associés à cette clinique peu spécifique, comme par exemple des signes digestifs avec des vomissements/régurgitations, de la diarrhée et de la biliverdinurie (Aini *et al.* 1993; Marlier, Vindevogel 2006; Zhang *et al.* 2015).

Une clinique majoritairement neurologique et souvent fatale est décrite au Moyen-Orient dans les années 1980. L'auteur parle alors d'encéphalomyélite virale herpétique du

pigeon (Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979; Tantawi *et al.* 1981). Cependant, la causalité d'un tel syndrome du à cet agent pathogène est remise en cause (Ritchie 1995).

Les infections à *Chlamydia psittaci*, à *Trichomonas* spp., à *Salmonella* spp., aux avipoxvirus (dans sa forme diphtéroïde), aux adénovirus ou aux paramyxovirus peuvent entraîner une clinique semblable à celle induite par le CoHV-1.

c. Chez le faucon *Falco* spp.

Les signes cliniques présentés chez les faucons du genre *Falco* spp., quelle que soit l'espèce, sont peu spécifiques et d'intensité variable – soit très importante, soit très fruste. Le rapace présente généralement pendant 24 à 72h un abattement et un amaigrissement sévère, de la dysorexie voire de l'anorexie, associés à des signes digestifs peu spécifiques (diarrhée, vomissements, régurgitations, biliverdinurie) (Graham *et al.* 1975; Mozos *et al.* 1994). L'atteinte du système respiratoire directement liée au CoHV-1 n'est pas démontrée chez les faucons, celle-ci est souvent consécutive à du parasitisme ou des surinfections bactériennes ou fongiques (Graham *et al.* 1975; Tarello 2011). A l'issue de cette phase clinique, les faucons meurent quasiment dans 100% des cas, 4 à 6 jours post-infection.

Une forme neuro-invasive, attribuée au CoHV-1, a récemment été décrite (Figure 7).



Figure 7: Jeune femelle Faucon pèlerin (*Falco peregrinus*) présentant un torticollis et une kératite. (Woźniakowski *et al.* 2013)

d. Chez les autres espèces d'oiseaux.

Des cas d'infection par le CoHV-1 (ou StHV-1 ou FaHV-1) ont été mis en évidence chez d'autres espèces d'oiseaux. Des tentatives d'infections expérimentales chez des mammifères ont été tentées pour estimer la spécificité du virus. Une revue des principaux cas disponibles dans la bibliographie sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Revue bibliographique des cas d'infection par le CoHV-1 chez les oiseaux autres que pigeons ou faucons.

Espèce	Décès (en j. post-infection, - : pas de décès, ? : information non disponible)	Signes cliniques (- : absence de signe clinique, ?: information non disponible)	Références bibliographiques
<i>Bubo virginianus</i> Grand-duc d'Amérique	7-10	Anorexie Abattement	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975; Gailbreath, Oaks 2008; Rose <i>et al.</i> 2012)
<i>Otus asio</i> Petit-duc maculé	8	-	(Maré, Graham 1973)
<i>Streptopelia risoria</i> Tourterelle domestique	3-9	Frustes : léger abattement avec ou sans diarrhée	(Maré, Graham 1973; Kunkle, Duhamel 1991)
<i>Accipiter cooperii</i> Épervier de Cooper	?	Abattement Ataxie	(Pinkerton <i>et al.</i> 2008)
<i>Accipiter striatus</i> Épervier brun	?	?	(Maré, Graham 1976)
<i>Buteo swainsoni</i> Buse de Swainson	?	?	
<i>Hieraetus pennatus</i> Aigle botté	?	Abattement	(Ramis <i>et al.</i> 1994)
<i>Buteo buteo</i> Buse variable		Anorexie Amaigrissement	
Dindonneaux de 15j.	-	-	(Maré, Graham 1973; Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979)
DOC			
Souris suisse albinos			
Chien Beagle			
Cochon			
Cobaye			
Lapin			
Canard			
Moineaux			
Inséparables			

2. Tableau lésionnel

Les premières mises en évidence du virus CoHV-1 reposent sur des découvertes d'autopsie (Smadel, Jackson, Harman 1945; Maré, Graham 1973). Une revue de toutes les lésions macroscopiques décrites dans les cas de CoHV-1 est présentée dans le Tableau 7. Les lésions caractéristiques sont révélées en caractères gras. Les infections à *Chlamydia psittaci*, à *Trichomonas* spp., à *Salmonella* spp., aux avipoxvirus (dans sa forme diphtéroïde), aux adénovirus ou aux paramyxovirus peuvent être à l'origine de lésions similaires à celles observées lors d'infection par le CoHV-1 (Ritchie 1995).

Tableau 7 : Revue du tableau lésionnel macroscopique compatible avec une infection par le CoHV-1.

Animal	Organes	Lésions macroscopiques	Références bibliographiques
Pigeon <i>Columba</i> spp	Foie	Hépatomégalie. Lésions multifocales de couleur blanche à jaunâtre, en relief, comprises entre 0.5-10 mm de diamètre environ, réparties aussi bien en surface de l'organe que dans le parenchyme. ⇒ Compatible avec une hépatite nécrosante multifocale. ⇒ Sévérité variable selon les individus	(Smadel, Jackson, Harman 1945; Cornwell, Wright 1970; Vindevogel, Pastoret 1981; Kunkle, Duhamel 1991; Bernabé <i>et al.</i> 1994; Gailbreath, Oaks 2008; Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014; Zhang <i>et al.</i> 2015; Zhao <i>et al.</i> 2015)
	Rate	Splénomégalie. Lésions punctiformes multifocales importantes distribuées sur l'ensemble du parenchyme de couleur brune, jaune, ou grisâtre. ⇒ Compatible avec une splénite nécrosante multifocale	(Gailbreath, Oaks 2008; Zhang <i>et al.</i> 2015)
	Rein	Lésions corticales multifocales d'environ 2 mm de diamètre, couleur crème. ⇒ Compatible avec une nécrose multifocale.	(Cornwell, Wright 1970)
	Voies respiratoires hautes	Pseudo-membrane diphtéroïde en regard du larynx pouvant être partiellement obstructive (en absence de <i>Trichomonas gallinae</i>) Pertes de substance de quelques mm de diamètre en regard des muqueuses pharyngée et laryngée,	(Cornwell, Wright 1970; Vindevogel, Pastoret 1981; Zhang <i>et al.</i> 2015)

		associée à une production de couleur jaune à marron, de consistance caséuse. ⇒ Compatible avec des ulcérations .	
	Pancréas (infection expérimentale IP)	Discrets foyers blanchâtres sur le pancréas, associé à un dépôt fibrineux sur la paroi péritonéale. ⇒ Compatible avec une pancréatite et péritonite (origine iatrogène)	(Cornwell, Wright, McCusker 1970)
Faucon <i>Falco</i> spp.	Foie	Hépatomégalie. Lésions multifocales de couleur blanche, jaunâtre ou brune, en relief, réparties aussi bien en surface de l'organe que dans le parenchyme. ⇒ Compatible avec une hépatite nécrosante multifocale.	(Ward, Fairchild, Vuicich 1971; Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975; Mozos <i>et al.</i> 1994)
	Rate	Splénomégalie. Lésions punctiformes multifocales importantes distribuées sur l'ensemble du parenchyme de couleur brune, jaune, ou grisâtre. ⇒ Compatible avec une splénite nécrosante multifocale	(Ward, Fairchild, Vuicich 1971; Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975)
	Moelle osseuse	Nodules blancs (0.5-1 mm) distribués dans toute la moelle osseuse en nombre important, de consistance relativement plus ferme que le reste du tissu médullaire.	(Ward, Fairchild, Vuicich 1971; Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975)
	Intestin grêle	Congestion. Lésions punctiformes blanchâtres. Striation visible en regard de la séreuse.	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975)
	Ovaires	Nodule blanchâtre	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975)
	Glandes surrénales	Absence de lésion macroscopique.	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975)

Le tableau lésionnel décrit chez les autres espèces de rapaces est semblable à celui présenté par les faucons (Pinkerton *et al.* 2008; Phalen *et al.* 2011; Rose *et al.* 2012). Les illustrations disponibles dans la littérature les plus parlantes sont présentées ci-après (Figure 8).

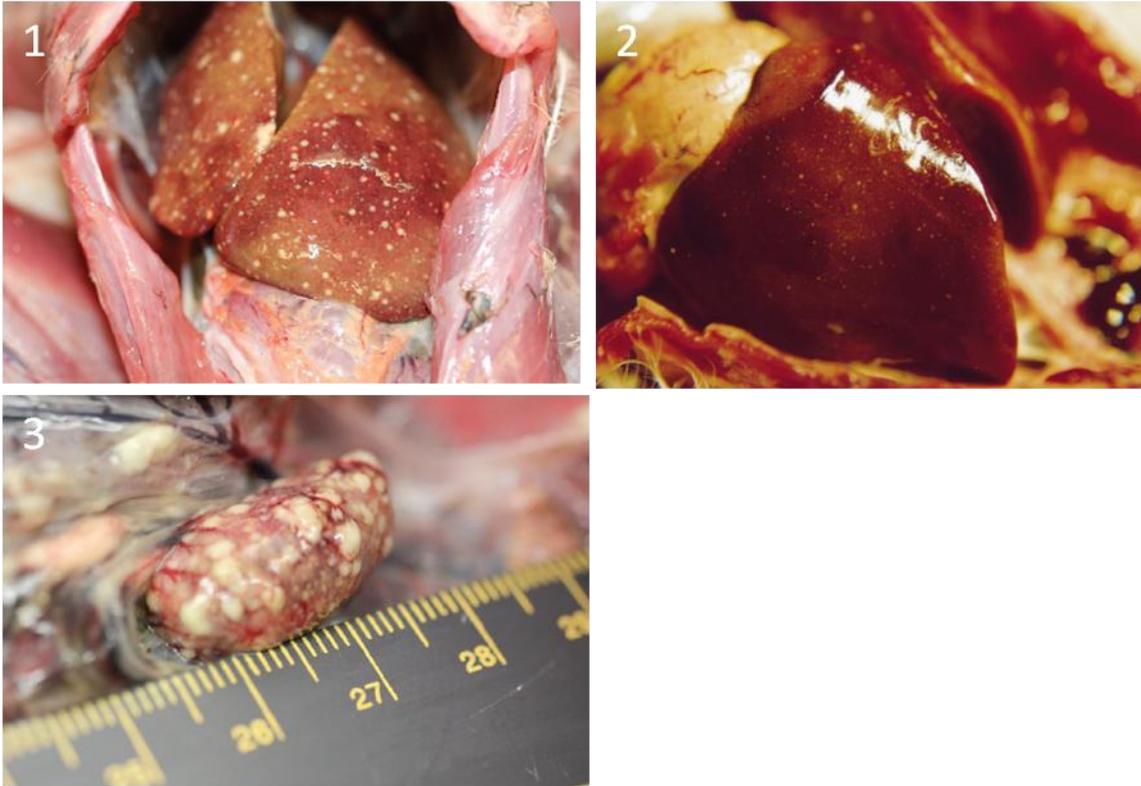


Figure 8 : Lésions caractéristiques d'infection par le CoHV-1 : nécrose hépatique multifocale chez une femelle adulte Grand-Duc américain (1, Rose *et al.* 2012) et chez un faucon gerfaut hybride (2, Wernery, Joseph, Kinne 2001) ; splénite nécrosante chez un mâle juvénile Grand-duc américain (3, Rose *et al.* 2012).

3. Histopathologie

L'analyse microscopique des tissus lésés macroscopiquement ou non permet de caractériser l'affection. Une revue de toutes les lésions microscopiques retrouvées dans les cas de CoHV-1 est présentée dans le Tableau 8. Les lésions caractéristiques sont révélées en caractères gras.

Tableau 8 : Revue des lésions microscopiques compatibles avec une infection par le CoHV-1 chez le pigeon et le faucon.

Animal	Organes	Lésions microscopiques	Références bibliographiques
Pigeon <i>Columba spp.</i>	Foie	<p><u>Capsule hépatique</u> : en général couverte de fibrine riche en hétérophiles et quelques macrophages.</p> <p><u>Abords des lésions</u> : la population cellulaire est majoritairement composée de macrophage mais aussi de leucocytes hétérophiles. Les canaux biliaires contiennent beaucoup de débris cellulaires.</p> <p><u>Périphérie des lésions</u> : CIN dans les hépatocytes, après coloration à l'H&E, ils sont d'une éosinophilie pâle à une basophilie prononcée. Les corps éosinophiliques sont entourés d'un « halo » clair tandis que les corps basophiles occupent la totalité du noyau, sans « halo ».</p> <p>La chromatine est marginée dans le noyau.</p>	(Smadel, Jackson, Harman 1945; Cornwell, Wright 1970; Vindevogel, Pastoret 1981; Bernabé <i>et al.</i> 1994; Marlier, Vindevogel 2006; Gailbreath, Oaks 2008; Zhang <i>et al.</i> 2015; Zhao <i>et al.</i> 2015)
	Rate	<p>Multiplés foyers de nécrose :</p> <p>Idem au foie.</p> <p>CIN en périphérie des lésions de nécrose.</p>	(Zhang <i>et al.</i> 2015; Zhao <i>et al.</i> 2015)
	Rein	<p><u>Lésions</u> : Nécrose tubulaire associée à une hyperhémie, et légère infiltration lymphocytaire et hétérophilique. Quelques uns des foyers de nécrose sont composés de cellules dégénérées du parenchyme rénal, des macrophages et des lymphocytes. Des CIN sont aussi mis en évidence dans les cellules tubulaires en marge des foyers de nécrose.</p>	(Cornwell, Wright 1970; Zhao <i>et al.</i> 2015)
	Voies respiratoires hautes	<p><u>Pharynx + Larynx</u> : destruction de l'épithélium associée une congestion et infiltration par des cellules mononucléées dans le tissu conjonctif sous-jacent.</p> <p><u>Trachée</u> : perte des cellules ciliées associée avec une hyperplasie épithéliale, légère infiltration hétérophilique de l'épithélium et de la lumière trachéale. Les glandes à mucus sont quasiment entièrement détruites.</p> <p>⇒ Inflammation de l'appareil respiratoire haut.</p> <p>⇒ CIN en périphérie des zones de nécrose (infection expérimentale IT)</p>	(Cornwell, Wright 1970; Cornwell, Wright, McCusker 1970; Vindevogel, Pastoret 1981; Marlier, Vindevogel 2006; Zhao <i>et al.</i> 2015)
	Pancréas (infection expérimentale IP)	<p>Infiltration interstitielle diffuse de cellules mononucléées.</p> <p>CIN éosinophilique dans les cellules acineuses en périphérie des zones de nécrose.</p>	(Cornwell, Wright, McCusker 1970)
Faucon <i>Falco spp.</i>	Foie	<p>Multiplés foyers de nécrose :</p> <p>Caryolyse et fragments éosinophiles, et noyaux pycnotiques et fragments basophiles.</p> <p>CIN retrouvés dans les hépatocytes et histiocytes adjacents aux foyers de nécrose. Ils vont de l'inclusion pan-nucléaire basophile à l'inclusion nucléaire éosinophile centrale séparée de la chromatine périphérique par un halo clair ou « hypochromatique ».</p> <p>La chromatine est marginée dans le noyau.</p>	(Ward, Fairchild, Vuicich 1971; Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975; Mozos <i>et al.</i> 1994; Gailbreath, Oaks 2008)

	Rate	Multiples foyers de nécrose : Idem au foie. CIN en moins grand nombre.	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975; Gailbreath, Oaks 2008)
	Moelle osseuse	Foyers nécrotiques avec éléments érythroïdes et myéloïdes. CIN présents mais en nombre limité.	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975; Gailbreath, Oaks 2008)
	Intestin grêle	Foyers de nécrose limité à la lamina propria. CIN dans les cellules épithéliales des glandes de Lieberkuhn, dans les villosités et des cellules mononucléées infiltrantes, En périphérie des zones de nécrose.	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975; Mozos <i>et al.</i> 1994; Gailbreath, Oaks 2008)
	Ovaire	Foyer de nécrose	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975)
	Glandes surrénales	CIN en grand nombre.	(Maré, Graham 1973; Graham <i>et al.</i> 1975)
	Reins	Infiltrat de cellules mononucléées, avec des CIN identiques à ceux retrouvés dans les hépatocytes et intestin. CIN observés dans les cellules épithéliales des tubules rénaux.	(Mozos <i>et al.</i> 1994)

Des foyers nécrotiques entourés de cellules présentant des CIN sont parfois rapportés dans d'autres organes ne présentant pas de lésion macroscopique : cœur, thymus, bourse de Fabricius, parathyroïdes, thyroïde, pancréas, tissu lymphoïde caecal, tissu lymphoïde intestinal (Pinkerton *et al.* 2008; Phalen *et al.* 2011; Rose *et al.* 2012; Gailbreath, Oaks 2008).

4. Physiopathologie *in vivo*

Les espèces hôtes des herpesvirus semblent divisées en 2 catégories : les espèces pouvant être amenées à devenir des porteurs latent du virus (dans notre cas, les pigeons du genre *Columba* spp.), et des hôtes « accidentels » (tourterelles, faucons et autres rapaces). L'infection par le CoHV-1 est à l'origine d'une maladie plus grave chez les hôtes accidentels (Pinkerton *et al.* 2008).

La réplication du virus dans les cellules infectées est intranucléaire (Maré, Graham 1973). L'affinité du virus semble être dirigée vers les cellules du système lymphoréticulé et les hépatocytes.

Lors d'infection expérimentale chez le pigeon, par inoculation d'une souche de CoHV-1 par voie intra-trachéale, les lésions caractéristiques de nécrose multifocale sont présentes dans les voies respiratoires mais aussi dans le parenchyme hépatique. La diffusion

systémique du virus après une première exposition à des éléments contaminés par voie respiratoire est probable (Cornwell, Wright, McCusker 1970).

Les travaux de Vindevogel *et al.* (Vindevogel, Pastoret 1980) ont comparé le pouvoir neutralisant des deux sources supposées d'anticorps d'origine maternelle chez le pigeon et de virus, dans le vitellus et le lait de jabot. La technique sérologique utilisée est celle de la séroneutralisation par réduction de plage de lyse. Le lait de jabot a été mis en suspension (1/1) dans du PBS à un pH de 7,3 après prélèvement, puis inactivé thermiquement à 56°C pendant 30 min. Le vitellus prélevé n'a pas été inactivé. Les conclusions de ces expérimentations sont que le vitellus semble avoir un pouvoir neutralisant (jusqu'à des dilutions par 27 à 48), contrairement au lait de jabot. Tous les jeunes dont les parents sont séropositifs présentent des anticorps à l'éclosion. Aucun virus n'est isolé dans le vitellus des jeunes pigeonceaux. Le titre en anticorps semble diminuer et disparaître vers le 14^{ème} jour. De plus, aucun jeune ne présente de signe clinique lorsqu'il est protégé par les anticorps d'origine parentale. Les signes cliniques semblent apparaître chez le jeune élevé par des parents séronégatifs et non excréteurs, et chez l'adulte immunodéprimé (traitement expérimental immunodépresseur à la Cyclophosphamide). Cependant, un titre sérique en anticorps ne semble pas prévenir l'apparition de signes cliniques (Vindevogel, Pastoret 1981).

Les effets biologiques cellulaires *in vitro* sont traités dans la partie suivante (Partie I, IV., 2. et 3.).

IV. Mise en évidence

1. Lésions macroscopiques

L'autopsie, et la recherche de lésions macroscopiques, est la première étape post-mortem de la mise en évidence d'infection par le CoHV-1. Même si un tableau lésionnel nécrotique chez les pigeons ou les rapaces est fortement évocateur d'infection par un herpesvirus (Marlier, Vindevogel 2006), une mise en évidence de l'agent étiologique par analyse de laboratoire est nécessaire.

2. Culture virale

La mise en culture de l'agent étiologique du « Coryza du pigeon » ou de l'IBDF est une technique de laboratoire relativement ancienne, mais cependant spécifique, qui reste encore la méthode de référence pour l'isolement du CoHV-1. Elle reste aussi une technique permettant la quantification du virus dans les échantillons par les techniques de plages de lyse (Cornwell, Weir 1970).

Les premières techniques de culture sont fondées sur l'inoculation de suspensions de tissus infecté sur les membranes chorio-allantoïdienne (CAM) d'œufs de poule embryonnés de quelques jours d'âge (Smadel, Jackson, Harman 1945; Cornwell, Weir 1970; Cornwell, Wright, McCusker 1970). Cette technique, après plus ou moins de passage sur CAM, permet de caractériser des lésions macroscopiques de type « pocks » nécrotiques en surface des CAM. L'analyse microscopique permet notamment de discriminer les infections par le CoHV-1, l'ILTV et le *Pigeonpox virus* (Tableau 9 (Cornwell, Weir 1970)). Des CIN sont aussi observés sur ces lésions développées *in vitro*.

Tableau 9 : Etude comparative in vitro entre le CoHV-1, l'ILTV et le *Pigeonpox virus* (Cornwell, Weir 1970).

	ILT virus	Pigeon Poxvirus	CoHV-1
Lésions macroscopiques sur CAM	Pocks étendus avec ulcères de couleur grise	Pocks de taille plus réduite, jamais allongés, en relief, couleur crème, sans dépression centrale	Pocks de taille plus réduite, parfois allongés, en relief, couleur crème, avec dépression centrale
Lésions histopathologiques des pocks sur CAM	CIN. Nécrose précoce. Atteinte de l'ectoderme uniquement, limité par du tissu de granulation. Cellules syncytiales.	Foyers d'hyperplasie ectodermique sévère. Tissu de granulation sous-jacent.	CIN. Nécrose précoce. Atteinte de l'ectoderme et mésoderme.
Comparaison autres références bibliographiques	Réponse primaire de l'ectoderme, avec modifications secondaires dans les autres couches cellulaires. Hyperplasie nécrosante, avec remplacement du tissu sain par un tissu inflammatoire œdémateux.	Phénomène prolifératif sévère sur la CAM : épaisseur de l'ectoderme jusqu'à 6 fois la normale. Absence d'anomalie embryonnaire.	Comparaison difficile. Présence de nécrose et de réaction inflammatoire jusqu'au mésoderme. Modifications semblables à celles du virus de la Maladie de Pacheco chez les psittacidés.

Des études sur des cultures monocellulaires (CEF, CEK, CEHC, DEF, PEF, PEHC...) complètent la caractérisation du virus. Ces lignées cellulaires sont prélevées sur des embryons de poussin (« C »), de caneton (« D ») ou de pigeonneau (« P ») (Maré, Graham 1973; Graham *et al.* 1975; Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979; Schwers *et al.* 1980; Vindevogel, Pastoret 1980; Schwers *et al.* 1981; Aini *et al.* 1993; Ehlers *et al.* 1999; Schettler *et al.* 2001; Zsivanovits *et al.* 2004; Cardoso *et al.* 2005; Gailbreath, Oaks 2008; Pinkerton *et al.* 2008; Woźniakowski *et al.* 2013; Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014; Zhang *et al.* 2015; Wernery, Joseph, Kinne 2001). Les effets cytopathiques caractérisés dans les cas de CoHV-1 sont ceux des herpesvirus : les cellules ont tendance à augmenter de taille, à

s'arrondir, puis on observe la formation de cellules syncytiales multi-nucléées associées à des CIN, jusqu'à la lyse totale des cellules. Ils apparaissent quelques jours après inoculation (entre 1 et 4j, jusqu'à 12 jours). Un nombre de passages plus important en culture cellulaire rend l'apparition d'effets cytopathiques plus rapide (Maré, Graham 1973).

L'utilisation des cultures cellulaires permet l'établissement d'une TCID₅₀ et de quantifier le titre viral dans un échantillon donné (Maré, Graham 1973; Graham *et al.* 1975; Aini *et al.* 1993; Wernery, Joseph, Kinne 2001; Zsivanovits *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2015).

3. Histopathologie

L'histopathologie reste encore aujourd'hui une méthode intéressante dans les premières investigations de suspicion d'infection par le CoHV-1 (Bernabé *et al.* 1994), même si elle n'est pas suffisante pour avérer la présence du virus.

La coloration la plus courante est celle à l'hématoxyline et l'éosine (H&E). Elle permet entre autre de mettre en évidence les CIN dans les cellules en périphérie des lésions nécrotiques et de les caractériser (CIN plutôt éosinophiles, avec une chromatine marginée basophile) (Figure 9). Cependant d'autres virus aviaires peuvent être à l'origine de CIN : adénovirus, circovirus, paramyxovirus (Ritchie 1995). On retrouve l'utilisation de cette coloration dans la très grande majorité des publications scientifiques concernant le CoHV-1.

Une autre technique permettant la mise en évidence des CIN est la coloration de Lendrum's (Maré, Graham 1973).

La mise en évidence de l'antigène viral en regard des lésions nécrotiques peut aussi être réalisée par immunohistochimie (Cornwell, Wright, McCusker 1970).

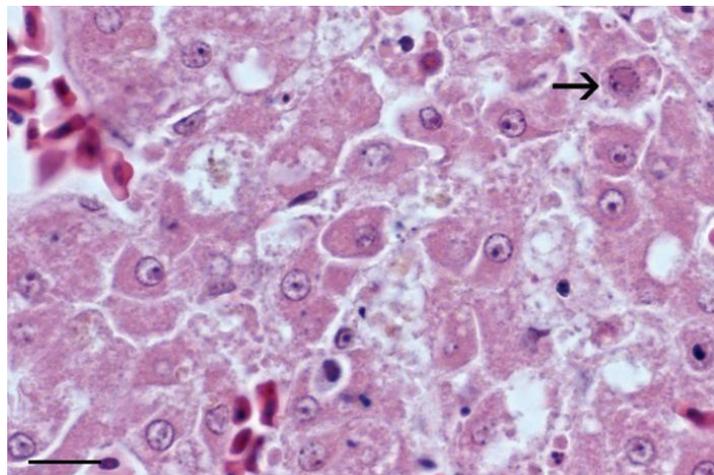


Figure 9 : Nécrose hépatocellulaire avec présence d'un corps d'inclusion nucléaire (flèche) dans un hépatocyte. (H&E) (*60) (Rose *et al.* 2012).

4. Microscopie électronique

Les protocoles destinés à l'observation au microscope électronique des lésions dues au CoHV-1 ont peu évolué en 40 ans. L'observation des particules virales reste encore aujourd'hui particulièrement intéressante d'un point de vue diagnostique.

Le procédé est tout d'abord basé sur une fixation des échantillons, directement prélevés sur les organes ou issus de cultures, utilisant des composés tels que le glutaraldéhyde et le tétr oxyde d'osmium. Le tout est ensuite inclus dans une résine epon-araldite puis sectionné en coupes d'environ 60 nm d'épaisseur, et enfin contrasté avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb (Kunkle, Duhamel 1991; Bernabé *et al.* 1994; Mozos *et al.* 1994; Pinkerton *et al.* 2008; Phalen *et al.* 2011).

Cette technique permet la mise en évidence des différentes structures morphologiques du virus enveloppé, aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des cellules infectées. La microscopie électronique permet de caractériser en partie la composition des CIN (Figure 4).

5. Méthodes biomoléculaires :

Depuis plus de 20 ans, les techniques d'analyse dites biomoléculaires sont devenues incontournables dans l'étude des maladies virales.

a. Méthode sérologique

Tout d'abord, la sérologie est une méthode encore utilisée de nos jours pour étudier le pouvoir neutralisant de potentielles « barrières » biologiques dans la transmission du virus

(Vindevogel, Pastoret 1980), pour obtenir des données épidémiologiques ou phylogénétiques (Kaleta 1990; Zsivanovits *et al.* 2004; Schettler *et al.* 2001), ou encore pour caractériser la réaction immunitaire lors d'un contact avec le CoHV-1 et évaluer l'efficacité de vaccins (Wernery, Joseph, Kinne 2001).

La technique majoritairement utilisée est celle de réduction de plage de lyse à 50%. De part l'évaluation d'un titre viral par TCID₅₀, on peut, selon les conditions de départ et le temps d'apparition d'effets cytopathiques, établir le pouvoir neutralisant d'un sérum. Un protocole résumé est décrit dans le Tableau 10 (Schettler *et al.* 2001).

Tableau 10 : Exemple de protocole d'étude sérologique pour détecter le CoHV-1.

Technique	Test de neutralisation du virus	Isolat de FaHV issu d'un faucon hybride (fourni par C. Grund; Ludwig Maximilian University, Munich, Germany) Isolat de OHV 473/73 (E. F. Kaleta, Justus Liebig University, Giessen, Germany)
Dose d'antigène	100 TCID ₅₀ /100 µL	+ 2X de plasma
Micropuits	Volume total	25 µL
Incubation	37 °C	1h
Inoculation	4x10 ⁵ cellules/mL (50 µL) ajouté aux puits (Inoculation de CEF + DMEM + 2% FBS (+ 10% tryptose) (+ 0.5 % gentamycine))	Observation quotidienne des effets cytopathiques pendant 7 j ⇒ Calcul du titre Positifs pour des titres supérieurs ou égaux à 1 :4

Ces études sérologiques permettent également de définir d'éventuelles réactions immunitaires croisées contre des virus isolés chez d'autres animaux. C'est ainsi qu'une proximité tout du moins antigénique entre PHV, FHV, et OHV a été établie dans les années 1970 (Tableau 11, (Maré, Graham 1973; Kunkle, Duhamel 1991). Une nette distinction avec les herpesvirus des Psittacidés ou d'autres oiseaux (LCVC...) est alors permise (Kunkle, Duhamel 1991). Ces résultats sont appuyés par la suite par les travaux de Tantawi *et al.* (Tantawi, Falluji, Sheikhly 1979).

Tableau 11 : Résultats de caractérisation antigénique de plusieurs herpesvirus aviaires. (+) index de neutralisation de 100 ou plus ; (?) index de neutralisation de 50 ; (-) absence de neutralisation. (Maré, Graham 1973)

Antiserum de...	Antiserum préparé chez	Neutralisation contre les virus homologues	Neutralisation du FHV	Homogénéité antigénique
FHV S-18	Lapin	+	+	Forte, mais incomplète
OHV	Lapin	+	?	
PHV	Lapin	+	+	
ILTV	Lapin	+	-	Faible
MDV	Poulet	+	-	
HAV	Lapin	+	-	

La sérologie a cependant des limites non négligeables. D'un point de vue caractérisation des virus, un même protéophénotype et donc une signature antigénique peut correspondre à des génotypes parfois significativement différents (cf. classification initiale du CoHV-1 parmi les *Betaherpesvirinae*). Pour ce qui est de la sensibilité de la détection d'anticorps anti-CoHV-1, la qualité intrinsèque du test est importante à prendre en compte, mais aussi le statut immunitaire de l'animal prélevé (Vindevogel, Pastoret 1981). Enfin, la sérologie ne permet à ce niveau que de mettre en évidence un contact entre le système immunitaire de l'hôte et le virus, en aucun cas on ne peut conclure directement à la présence du virus dans un élevage donné à un moment donné. A ce jour, aucune étude quant au profil des anticorps synthétisés dans les cas d'infection par le CoHV-1 n'est disponible.

b. Directe

Ces techniques permettent la mise en évidence de l'agent pathogène lui-même ou de ses constituants dans les échantillons.

1- Analyse par digestion d'endonucléases de restriction

Cette technique de caractérisation du matériel génétique viral est la première à étudier celui du CoHV-1 (Aini *et al.* 1993). Elle compare les produits de digestion par plusieurs enzymes bactériennes entre des herpesvirus isolés chez des faucons de prairie, des pigeons *Columba livia* et des souches d'herpesvirus isolés chez des Psittacidés (*Psittacus erithacus* et *Amazona ochrocephala oratrix*) (Tableau 12).

Tableau 12 : Origine des échantillons d'oiseaux dont les herpesvirus isolés ont été analysés après digestion par des endonucléases de restriction (Aini *et al.* 1993).

Animal	Référence de l'échantillon/Contexte épidémioclinique de la mort	Prélèvement	Isolement
<i>Falco mexicanus</i> (captif)	(D8904689) Aigue Nourri avec des pigeons 7j avant.	Suspension à 10% de Foie	4 passages en cultures CEF
<i>Falco mexicanus</i> (sauvage)	(D8904641) Aigue Nourri avec des pigeons	Suspension à 10% de Foie	4 passages en cultures CEF
<i>Columba livia</i>	(D9006983) Aigue Suspicion d'intoxication aux dioxines	Suspension à 10% de foie et rate	1 passage en culture CEF
<i>Columba livia</i>	(D8900906) Clinique peu spécifique : vomissement, biliverdinurie	Suspension à 10% de Foie	2 passages en culture CEF
<i>Psittacus erithacus</i>	(D9100448) Mort subite	-	-
<i>Amazona ochrocephala</i> <i>oratrix</i>	(D9008842) Mort subite	-	-

Après extraction des ADN viraux, ceux-ci sont digérés par 4 enzymes de restriction : (EcoRI, HindIII, PstI et XbaI) et les profils de digestion comparés (le détail des résultats est détaillé en ANNEXE 1).

Les principales conclusions de cette étude sont la répétabilité et la spécificité de cette technique de laboratoire concernant le CoHV-1, ainsi que la proximité génétique des souches d'herpesvirus isolés chez les faucons et les pigeons. Cependant, de légères différences subsistent et participent à la thèse d'une différenciation entre PHV et FHV. Les herpesvirus de Psittacidae sont eux bien différents des PHV et FHV, et même différents entre eux. Par ailleurs, cette technique, dont la spécificité est bonne, est souvent remplacée par d'autres techniques de mise en évidence du matériel génétique développées depuis cette époque.

2- PCR :

Les techniques de « Polymerase chain reaction » ou PCR font partie des procédures parmi les plus répandues pour la mise en évidence d'un agent pathogène viral, ou au moins de son matériel génétique. Le but de cette partie n'est pas d'expliquer les principes de la PCR mais de référencer les principales études utilisant cette méthode et leurs spécificités concernant le CoHV-1.

La principale séquence cible des amorces développées pour mettre en évidence le CoHV-1 est le gène de l'ADN polymérase virale, séquence particulièrement conservée (VanDevanter *et al.* 1996; Ehlers *et al.* 1999). Aucune protéine homologue n'est retrouvée uniquement chez les herpesvirus. La plus spécifique est une sous-unité ATPase de la terminase (rôle dans la compaction de l'ADN dans la capside), retrouvée chez une très grande majorité des herpesvirus et chez le bactériophage « T4-like » (Famille des *Myoviridae*) (Davison *et al.* 2009).

Echantillons analysés

Le type de prélèvement, la qualité de l'échantillon ainsi que la conservation de celui-ci jusqu'au traitement en laboratoire sont autant de facteurs importants à ne pas négliger lors de la mise en place d'un protocole de PCR. Tous ces facteurs peuvent être à l'origine d'une dégradation prématurée du matériel génétique et être à l'origine de faux négatifs.

Dans la grande majorité des études concernant le CoHV-1, les échantillons traités en PCR sont issus directement de prélèvements d'organes post-mortem (fixés ou non) ou d'isolats de cultures cellulaires, riche en ADN viral. Un résumé des types de prélèvements analysés est disponible en Tableau 13. Cependant, dans le but d'étudier les dynamiques d'infection par ce virus, quelques études utilisent des échantillons ante-mortem issus d'écouvillons cloacaux et trachéaux.

Tableau 13 : Types de prélèvements utilisés pour une mise en évidence par PCR du CoHV-1.

Type de prélèvement	Organes	Références bibliographiques
Surnageant de culture virale	Foie, rate, intestin, moelle osseuse, glandes surrénales	(VanDevanter <i>et al.</i> 1996; Ehlers <i>et al.</i> 1999; Raue <i>et al.</i> 2005; Freick, Müller, Raue 2008; Gailbreath, Oaks 2008; Woźniakowski <i>et al.</i> 2013; Zhang <i>et al.</i> 2015; Zhao <i>et al.</i> 2015)
Organes fixés (retrait de la paraffine au préalable)	Foie, rate, moelle osseuse, tissu lymphoïde intestinal...	(Pinkerton <i>et al.</i> 2008; Phalen <i>et al.</i> 2011)
Suspension de tissu frais	Foie, rate, intestin, moelle osseuse	(Gailbreath, Oaks 2008; Stenzel <i>et al.</i> 2012; Woźniakowski <i>et al.</i> 2013; Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014)
Ecouvillons cloacaux	-	(Stenzel <i>et al.</i> 2012)
Ecouvillons pharyngés (cultures cellulaires)	-	(Vindevogel, Debruyne, Pastoret 1985)

Des inhibiteurs de PCR peuvent être présents dans les échantillons et conduire à de faux négatifs. Les principaux cités dans la littérature sont l'acide urique, particulièrement présent dans les urofécès d'oiseaux, les polysaccharides végétaux ou encore les IgG présentes dans le sang (Freick, Müller, Raue 2008). Aucune estimation quantitative du pouvoir «inhibiteur » de ces composants n'est disponible à notre connaissance dans le cas du CoHV-1.

L'extraction de l'ADN est de nos jours réalisée à l'aide de kits d'extraction disponibles dans le commerce (Freick, Müller, Raue 2008; Woźniakowski *et al.* 2013), avec ou non une lyse préalable du tissu si nécessaire (kits également disponibles dans le commerce). Les échantillons, aussi bien avant ou après extraction, sont conservés à -80°C (à défaut, à -20°C).

PCR uniplex

Sous le terme « PCR uniplex », la littérature sous-entend que la PCR amplifie une unique séquence d'un agent pathogène, sous forme conventionnelle (PCR point limite) ou quantitative (PCRq ou Real-Time PCR).

Les PCR point limite ont été développées dans les travaux de VanDevanter *et al.* (VanDevanter *et al.* 1996), de Raue *et al.* (Raue *et al.* 2005) Freick *et al.* (Freick, Müller, Raue 2008), de Phalen *et al.* (Phalen *et al.* 2011) et de Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2015). Les jeux d'amorces utilisés sont décrits dans le Tableau 14. La composition des mix et les conditions d'amplifications sont disponibles dans les articles cités dans ce tableau.

L'étude de Freick *et al.* (Freick, Müller, Raue 2008), dans le but de développer une PCR multiplex, étudie la sensibilité analytique de la PCR uniplex (Raue *et al.* 2005) dans différentes conditions. Le seuil de détection minimal est dans cette étude de 10^3 copies (obtention d'une bande fluorescente clairement visible sous UV, correspondante à la taille de la séquence clonée et amplifiée). La spécificité de cette PCR, compte tenu des résultats obtenus lors de l'étude de spécificité de la PCR multiplex correspondante, peut être légitimement supposée de 100%.

Tableau 14 : Revue des amorces spécifiques ciblant l'ADN polymérase des herpesvirus ou du CoHV-1 décrites dans la littérature utilisée en PCR uniplex. (s : « sens » ; as : « anti-sens »).

Références bibliographiques	PCR	Amorce	Dénomination	Séquence (5'-3')	Taille de l'amplicon final (pb)
PCR Consensus herpesvirus (VanDevanter <i>et al.</i> 1996)	PCR 1	s	DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	215-315
		as	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	
	PCR 2	s	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT	
		as	TGV	TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT	
		as	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	
PCR Consensus herpesvirus (Ehlers <i>et al.</i> 1999)	PCR 1	s	DFA-d	GAYTTYGCIAAGYYTITAYCC	215-315
		as	ILK-d	TCCTGGACAAGCAGCARIYSGCIMTIAA	
	PCR 2	s	KG1-d	GTCTTGCTCACCAGITCIACICCYTT	
		as	TGV-d	TGTAACCTCGGTGTAYGGITTYACIGGIGT	
		as	IYG-d	CACAGAGTCCGTRTCICCRTAIAT	
PCR spécifique CoHV-1 (Raue <i>et al.</i> 2005)	-	s	PiHV-s	GGGACGCTCTGATTAAGGAAT	242
	-	as	PiHV-as	CTTGGTGATCAGCAGCAGCTTG	
PCR spécifique CoHV-1 (Phalen <i>et al.</i> 2011)	PCR sur tissu frais	?	-	CGTCCTGCGACGTGGAAATTAAC	1636
		?	-	AGTAGTCCTCCCCGCCTTC	
	PCR sur tissu fixé	?	-	TCTGCTGGACAAACAGCAG	172
		?	-	CTCGCCACCGCCGGTGTATGTA	
PCR nichée spécifique CoHV-1 (Zhang <i>et al.</i> 2015)	PCR 1	s	ARB1	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNN NNGATAT	?
			ARB6	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNN NNACGCC	
		as	GSPF1	AGACGGTGGTCAGTTTGTGT	
			GSPR1	CCGGCGATGACTACCTACA	
	PCR 2	s	AB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
		as	GSPF2	GGTGGGTTCGGGCAGTT	
GSPR2	CTGAGCATCCTCTGACGG				
PCR nichée spécifique CoHV-1 (Zhang <i>et al.</i> 2015)	PCR 1	s	PiHVn2F	GGGGTTCATAGGAGAATACTGTC	513
		as	PiHVn2R	CTGTCTAAGGTGAGCGTCGTAATA	
	PCR 2	s	PiHVn3F	GGTTCCTGTTGCCCGATAA	240
		as	PiHVn3R	CGTGGAATCCCGTCTCG	

A ce jour, une seule étude décrit une mise en évidence du CoHV-1 par PCR quantitative (PCRq) (Woźniakowski *et al.* 2013). La sensibilité semble similaire à celles des PCR conventionnelles uniplex ou multiplex (Figure 10). La spécificité intrinsèque est également estimée à 100%.

Les amorces utilisées sont décrites ci-après dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Revue des amorces spécifiques ciblant l'ADN polymérase des herpesvirus ou du CoHV-1 décrites dans la littérature utilisée en PCRq uniplex. (s : « sens » ; as : « anti-sens »)

Référence bibliographique	Amorce :	Dénomination	Séquence (5'-3')	Taille de l'amplicon final (pb)
PCRq spécifique CoHV-1 (Woźniakowski <i>et al.</i> 2013)	s	CoHV1	GATGGCGGCTGCTGTTTGT	207
	as	CoHV2	CGCCGTGGACGACTTGCGT	

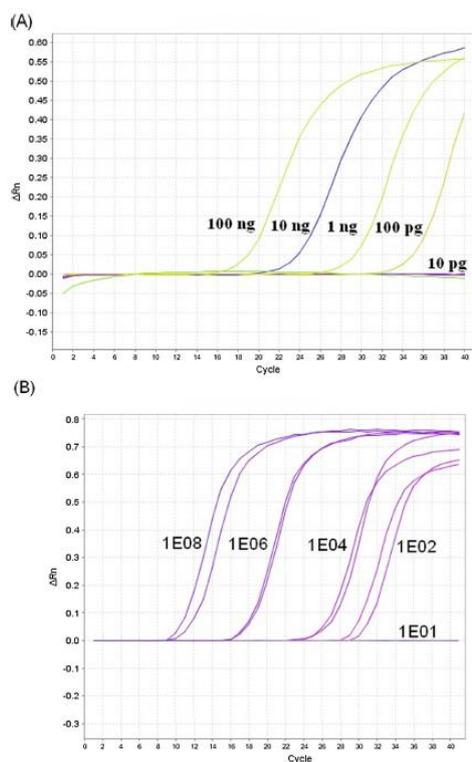


Figure 10: Détermination de la sensibilité de la PCRq selon (Woźniakowski *et al.* 2013). (A) Amplification d'échantillons de concentrations en ADN données contenant des dilutions successives au 10^{ème} de l'isolat standard de CoHV-1. (B) Amplification d'échantillons contenant un nombre donné de copies du plasmide cloné contenant la séquence cible du CoHV-1. ΔRn correspond à un index déterminant les variations de fluorescence au cours des cycles d'amplification.

Cette étude a permis la mise en évidence pour la première fois du CoHV-1 chez un Goéland argenté (*Larus argentatus*), un Héron cendré (*Ardea cinerea*), une Corneille mantelé (*Corvus cornix*) et une Grive musicienne (*Turdus philomelos*) (Woźniakowski *et al.* 2013).

A notre connaissance, aucune étude de suivi quantitatif ou semi-quantitatif d'excrétion du CoHV-1 n'a été réalisée grâce à une PCRq. Une étude effectuée un tel suivi chez des pigeonneaux, mais par titrage sur culture cellulaire (Vindevogel, Debruyne, Pastoret 1985), ce qui demande beaucoup plus de temps de manipulation.

PCR multiplex

Dans la littérature, des protocoles de PCR multiplex sont décrits. En effet, chez les columbiformes, la présence du CoHV-1 est souvent recherchée dans le cadre d'épizooties de syndrome YPDS, en association avec d'autres agents pathogènes (PiCV, FAdV). L'intérêt majeur de ces PCR multiplex réside dans la limitation des biais dus à la manipulation des oiseaux et à la contamination des prélèvements, avec la possibilité d'automatiser le traitement des échantillons.

L'inconvénient majeur de ce type de protocole réside dans l'optimisation restreinte de la sensibilité. Les travaux de Freick *et al.* (Freick, Müller, Raue 2008) montrent qu'une augmentation de la température d'hybridation au-delà de 60,5 °C ou une diminution du nombre de cycles d'amplification – inférieur à 39 – est à l'origine d'une diminution de sensibilité de détection d'au moins un pathogène. Pour le protocole optimal obtenu par Freick *et al.* ceux-ci obtiennent une bonne sensibilité analytique – même meilleure que leur PCR uniplex – de l'ordre de 10 copies de génomes pour ce qui est de la détection du CoHV-1.

L'étude de Freick *et al.* (Freick, Müller, Raue 2008) estime avoir la spécificité analytique d'une telle PCR, en soumettant des échantillons de foie contenant de l'ADN bactérien (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp.), fongique (*Candida* spp.), ou d'autres virus (EHV-1, PBFDV, CAV), mais exempt de CoHV-1. La spécificité était de 100%.

3- LAMP

Les techniques d'amplification isotherme LAMP ou « Loop-mediated isothermal amplification » sont des procédés biomoléculaires récents (début des années 2000) parfois qualifiés de « révolutionnaires » (Notomi *et al.* 2015; Sahoo *et al.* 2016; Mansour *et al.* 2015). Le principe est d'amplifier à l'aide de 3 couples d'amorces complémentaires une séquence spécifique d'ADN, et si associée avec une enzyme Reverse-Transcriptase, d'ARN, dans des

conditions isothermes (Figure 11 et ANNEXE). Cette technique demande ainsi beaucoup moins de matériel spécifique, encombrant et coûteux que la PCR classique et la PCRq (Figure 11). Une étude (Mansour *et al.* 2015) répertorie les principales techniques de LAMP utilisées dans le cadre de recherche d'agents pathogènes à déclaration obligatoire à l'OIE. La validation de ces résultats n'est pour autant pas encore actée par l'Organisation mondiale pour la santé animale. Les principaux avantages et inconvénients de la méthode sont répertoriés en ANNEXE .

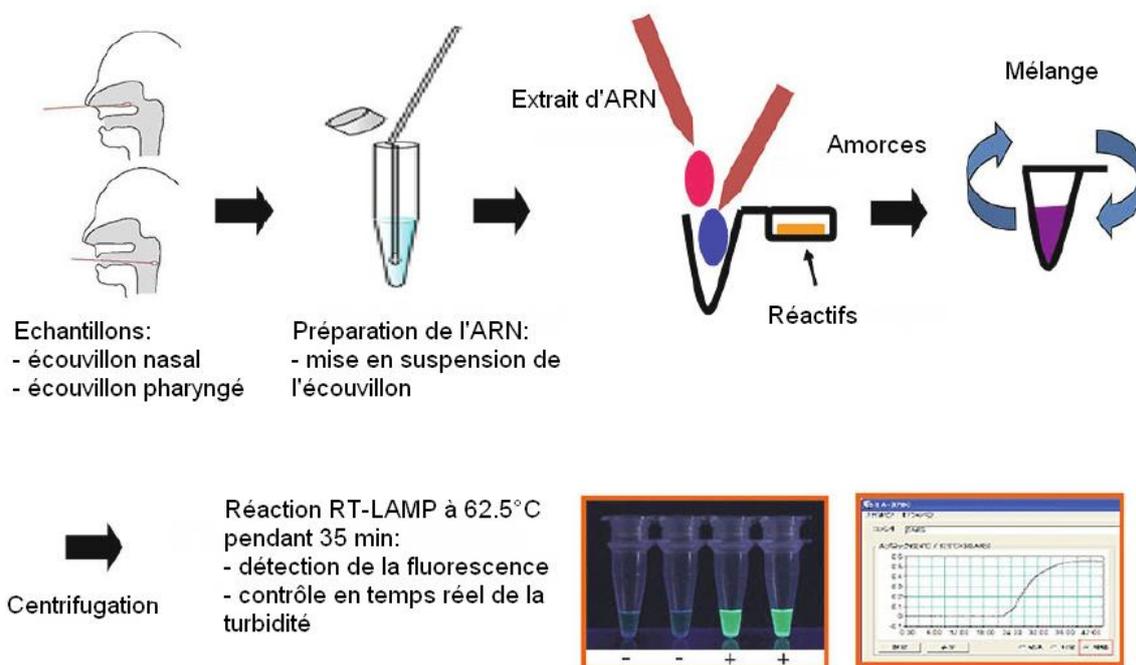


Figure 11 : Schéma du déroulement d'une méthode d'amplification LAMP appliquée à la recherche de virus Influenza chez l'homme : l'écouvillon est trempé dans les réactifs d'extraction puis dans un tube contenant les réactifs d'amplification (Notomi *et al.* 2015).

Appliquée à la mise en évidence du CoHV-1, cette technique LAMP présente des résultats prometteurs. En effet, les travaux de Woźniakowski *et al.* (Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014) présentent une sensibilité analytique nettement supérieure à la PCRq développée quelques années avant (Woźniakowski *et al.* 2013), avec une détection d'une quantité d'ADN de l'ordre de 10 fg, contre 100 pg pour la PCRq. La spécificité intrinsèque de cette méthode est de 100%.

Les échantillons analysés sont des suspensions de foie à 10%, dont l'ADN est extrait grâce à un kit disponible dans le commerce. Le détail des amorces utilisées est disponible en Figure 12. Le mix, plongé 30 min à 60°C, est d'un volume total de 15 µL, composé de 5 µL de Isothermal Mastermix (OptiGene™, Horsham, West Sussex, UK), de 1 µL d'une dilution

au 10^{ème} de « DMSO concentrated SYBR Green I solution 10 000 X » (Invitrogen™), de 1 µL d'eau PCR-grade (EurX, Gdansk, Poland), de 1µL de l'échantillon ADN, de 2µL d'amorces FIP-BIP (0.8 mmol/L), de 0,5 µL d'amorces F3-B3 (0,2 mmol/L) et de 1 µL d'amorces LF-LB (0,4 mmol/L).

Amorce	Séquences 5'-3'	Taille	Localisation dans la séquence du CoHV-1 (GQ478232.1)
F3	AGACGGCCTGATCTTCGG	18	215–232
B3	CCGTGGACGACTTGCGT	17	378–395
BIP	CAGGCTCTCGCGAACG	43	300–318
(B1c+B2)	TGCTTTTC CGGCGATGACTACCTACAG		357–376
FIP	TCCTCCTGACGGACTGGC	42	273–292
(F1c+F2)	TGTTTT GGCTCCCCGGGATTTTGG		233–250
LF	CGCGTATGGCTTTTCGCATA	20	251–270
LB	ACCCTGTACTTTGTGAAAAA	20	319–338

Figure 12 : Détail des amorces, ciblant l'ADN polymérase virale, utilisées dans la LAMP développée pour détecter le CoHV-1. (Woźniakowski, Wencel, Samorek-Salamonowicz 2014)

L'inconvénient majeur est l'impossibilité de séquencer directement les produits d'une telle amplification.

Les résultats obtenus à partir des échantillons de foie de pigeon analysés sont confirmés par culture du virus sur CEF et par PCRq. La fiabilité du procédé de LAMP appliqué au CoHV-1 semble être très satisfaisante.

4- Séquençage

Le séquençage du matériel génétique du CoHV-1 est généralement l'étape suivant l'amplification d'une séquence par PCR, dans le but d'identifier et d'étudier la souche de virus mise en évidence. L'apport des séquences identifiées (Tableau 16) est essentiel au développement des connaissances sur ce virus en termes de phylogénie, de phénotype et de mode d'action.

Les différentes techniques de séquençages utilisées dans le cadre d'analyse du CoHV-1 sont fondées essentiellement sur la méthode de Sanger, précédée d'un retrait des amorces, puis suivie d'une analyse informatisée des résultats, comprenant une correction manuelle des éventuelles erreurs de lecture. Mais le séquençage haut-débit prend de plus en plus d'importance. L'étude de Spatz *et al.* (Spatz, Volkening, Ross 2014) utilise une technique de séquençage haut-débit, complétée par un séquençage par la méthode de Sanger (précédée d'une PCR haute-fidélité et d'un clonage) pour combler les vides.

Disposant du génome complet d'un FaHV-1 (Spatz, Volkening, Ross 2014), à terme, un séquençage du génome complet du CoHV-1 serait une avancée importante dans la compréhension des relations entre les herpesvirus isolés chez les falconiformes et chez les columbiformes.

Tableau 16 : Revue des séquences de CoHV-1 ou FaHV-1 disponibles dans la base de données GenBank.

Référence bibliographique	Numéro d'accension GenBank	Taille de la séquence (pb)	Technique de séquençage
(Ehlers <i>et al.</i> 1999)	AF141890	1791	Méthode de Sanger (Prism™ BigDye® Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems))
(Gailbreath, Oaks 2008)	EF522952- EF522960	180	? (Amplicon Express Pullman, Washington, USA)
(Pinkerton <i>et al.</i> 2008)	EF623994.1	181	Méthode de Sanger (Big-Dye® Terminator kit (Perkin- Elmer, Branchburg, New Jersey, USA))
Yui <i>et al.</i> 2008 (publication non disponible)	AB426112	181	?
(Phalen <i>et al.</i> 2011)	GQ4708229-GQ478232	129-439	? (AGRF, Brisbane, Queensland, Australia)
(Woźniakowski <i>et al.</i> 2013)	JX892992-JX893009	207	Séquençage haut débit (GS FLX/Titanium sequencer (Roche, Branford, Connecticut, USA)
Ratthanophart <i>et al.</i> 2014 (non-publié)	KM010015	242	?
(Spatz, Volkening, Ross 2014)	KJ668231 ou NC_024450	204 054	Séquençage haut-débit (Illumina® MiSeq sequencing) Méthode de Sanger (Mini prep DNA, Qiagen®)
Xing <i>et al.</i> 2014 (non-publié)	KM280875	244	?
Zhang <i>et al.</i> 2014 (non publié)	KC544263	1404	?
(Zhang <i>et al.</i> 2015)	KJ995972	4336	?
(Zhao <i>et al.</i> 2015) Glycoprotéine B (UL27)	KU051711	2988	?

V. Données épidémiologiques

L'étude de la transmission et de la circulation du CoHV-1 est un point central dans la compréhension du mode d'action du virus mais aussi dans l'anticipation et la prévention d'éventuelles contaminations. Dans cette partie, les connaissances disponibles dans la littérature quant à la transmission verticale, horizontale, interspécifique mais aussi de (séro-) prévalence au sein de différentes populations sont présentées.

1. Chez les pigeons *Columba spp.*

Chez le pigeon, peu d'étude sont disponibles sur les modalités précises de transmission du virus.

La transmission du virus des parents aux jeunes par le lait de jabot semble probable, contrairement à la transmission *in ovo*. L'hypothèse d'absence de transmission *in ovo* est confortée par des résultats similaires observés avec d'autres herpesvirus aviaires (ILTV...) (Vindevogel, Pastoret 1980). La transmission *in ovo* reste encore peu probable de par l'absence d'isolement du virus dans les organes génitaux des pigeons infectés. Cependant, une réserve est à noter car on ne peut pas exclure une transmission lors de phase aiguë de la maladie (Vindevogel, Pastoret 1981).

En termes de transmission horizontale, aucune étude disponible ne précise les conditions exactes du passage du CoHV-1 de pigeon à pigeon. Un contact rapproché est semble-t-il nécessaire. De par la clinique exprimée par les pigeons, une contamination par les voies respiratoires et digestives semble privilégiée (Marlier, Vindevogel 2006). Le CoHV-1 semble effectivement être excrété dans les uro-fécès des pigeons (Stenzel *et al.* 2012).

Le CoHV-1 a été, jusqu'à ce jour, mis en évidence chez des pigeons aux USA, Royaume-Uni, Belgique, Espagne, Allemagne, Pologne et Chine (Smadel, Jackson, Harman 1945; Cornwell, Wright 1970; Vindevogel, Pastoret 1980; Bernabé *et al.* 1994; Freick, Müller, Raue 2008; Woźniakowski *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2015).

La séroprévalence du CoHV-1 dans les populations de pigeons d'élevage en Belgique est estimée autour de 60 % (Vindevogel et al cité par Gailbreath, Oaks (2008)). Jusqu'à 30 % environ des pigeons d'élevage sont effectivement porteurs du virus (Raue *et al.* 2005; Stenzel *et al.* 2012; Woźniakowski *et al.* 2013), présentant ou non des signes cliniques. A notre connaissance, une seule étude épidémiologique nous informe quant à la circulation du CoHV-

1 dans les populations sauvages de pigeons. Selon l'étude de Wozniakowsky et al (Woźniakowski *et al.* 2013), 6 des 11 pigeons soumis à la PCRq sont sortis positifs.

2. Chez les faucons *Falco spp.*

L'infection par le CoHV-1 entraîne une mort rapide des faucons (24-72h post-infection). En ce sens, l'hypothèse d'une transmission verticale chez le faucon semble fortement improbable et n'a d'ailleurs jamais été mise en évidence. La transmission horizontale directe entre faucons n'a, à ce jour, jamais été prouvée.

Chez les rapaces, l'hypothèse d'une contamination par l'ingestion de proies porteuses latentes du virus est émise pour la première fois par Maré et Graham (Maré, Graham 1973). D'autres cas de rapaces nourris avec de potentiels porteurs latents sont décrits dans la littérature (Phalen *et al.* 2011). Une hypothèse de contamination par voie oro-urofécale est émise par Mozos *et al.* (Mozos *et al.* 1994). Cette hypothèse est renforcée par l'amplification de séquences du virus par PCR dans les uro-fécès de pigeons (Stenzel *et al.* 2012).

Le CoHV-1 (ou FaHV) a été, jusqu'à ce jour, mis en évidence chez des faucons aux USA, en Espagne, en Australie et au Royaume-Uni (Maré, Graham 1973; Mozos *et al.* 1994; Phalen *et al.* 2011). Des données séro-épidémiologiques en Angleterre semblent indiquer quelques cas d'expositions non-fatales de faucons au CoHV-1 (Zsivanovits *et al.* 2004), cependant certains des échantillons de sang analysés sont rapportés comme hémolysés et à l'origine de potentiels faux positifs. La présence latente du CoHV-1 chez les faucons reste une possibilité. Cependant, à notre connaissance, aucune présence effective du virus n'est décrite chez un animal cliniquement sain présentant une immunité acquise contre le CoHV-1.

3. Chez les autres espèces d'oiseaux.

Peu de publications concernant la prévalence ou séroprévalence du virus sont disponibles chez d'autres espèces.

A notre connaissance, aucune hypothèse expliquant la présence de traces du virus chez un Goéland argenté (*Larus argentatus*), un Héron cendré (*Ardea cinerea*), une Corneille mantelé (*Corvus cornix*) et une Grive musicienne (*Turdus philomelos*) n'est à ce jour clairement avancée (Woźniakowski *et al.* 2013).

La publication de Schettler *et al.* (Schettler *et al.* 2001) met pour la première fois en évidence des anticorps anti-CoHV-1 chez un rapace (Balbuzard pêcheur *Pandion haliaetus*)

ne présentant pas la maladie foudroyante décrite chez les faucons. Cette immunité acquise est aussi décrite chez d'autres rapaces en Angleterre (Zsivanovits *et al.* 2004).

VI. Lutte

1. Traitement

Deux molécules antivirales ont été étudiées dans le traitement du CoHV-1.

Tout d'abord, dans les années 1980, après des débuts prometteurs, l'utilisation du PFA est écartée. En effet, ce composé aux effets cytotoxiques rapportés comme limités, a une activité antivirale par l'inhibition des ADN polymérase de certains virus, démontrée contre plusieurs herpesvirus (BHV-1, SuisHV-1) (Schwers *et al.* 1980, 1981). Cependant, son effet selon la souche d'herpesvirus est considéré comme inconstant et une étude *in vivo* chez le pigeon et des perruches ondulées *Melopsittacus undulatus* se révèle inefficace en traitement thérapeutique ou prophylactique (Vindevogel, Pastoret, Aguilar-Setien 1982).

Ensuite, des tentatives de traitement d'animaux infectés par le CoHV-1 par utilisation de l'acyclovir sont décrites (Thiry *et al.* 1983). Cet inhibiteur sélectif d'ADN polymérase virales se révèle efficace *in vitro*. En effet, l'acyclovir réduit de manière significative la taille moyenne des plages produites par le SuHV-1 et le CoHV-1. En revanche, lors des études *in vivo*, des injections intramusculaires d'acyclovir (100 mg/kg/jour; trois injections quotidiennes) ne préviennent pas l'apparition de la maladie chez des pigeons infectés et ne diminuent pas le niveau d'excrétion virale. Le même traitement appliqué, comme pour les pigeons, avant l'infection, protège les perruches contre le développement de la maladie aussi longtemps qu'elles sont traitées, mais la plupart des animaux meurent peu après l'arrêt du traitement. Le virus peut être de nouveau isolé du foie des animaux morts.

A ce stade, aucune autre tentative de traitement n'a été tentée depuis plus de 20 ans.

2. Vaccination

La vaccination est une piste qui a été envisagée dans la lutte contre le CoHV-1 aussi bien chez le pigeon que chez le faucon.

La première étude disponible concerne des essais *in vivo* chez le pigeon *Columba livia* (Vindevogel, Pastoret, Leroy 1982). Vindevogel *et al.* décrivent la production d'un vaccin atténué et d'un vaccin inactivé. Dans les deux cas, la vaccination a tendance à réduire significativement l'excrétion virale (suivi de l'excrétion par écouvillonnage pharyngé) et l'expression des signes cliniques après infection (exposition pharyngée à la souche virulente de CoHV-1). Cependant, ces vaccins ne semblent pas prévenir l'infection, ni l'apparition de

porteurs latents, une immunodépression induite par injection de cyclophosphamide entraînant une réexcrétion du virus. Cependant, il n'est pas précisé dans l'étude lequel de ces virus (virulent ou atténué) était majoritairement excrété, et si celui-ci était contaminant.

La deuxième étude est un essai clinique d'un vaccin atténué contre le FaHV chez des faucons hybrides (Gerfaut x Sacre, Lannier) (Wernery, Joseph, Kinne 2001). Elle fait suite à une première étude pilote en 1999 où Wernery *et al.* semblaient montrer l'efficacité d'un vaccin atténué contre l'hépatite herpétique chez des faucons crécerelles européens *Falco tinunculus* (article non disponible). Cette étude est menée sur 4 faucons, tous vaccinés contre la maladie de Newcastle (Nobilis ND Hitchner vaccine, Intervet, vaccin vivant atténué). Le protocole de primo-vaccination appliqué à 3 des 4 faucons consiste en 2 injections du vaccin atténué DuFaHe (1 mL SC, $10^{5,25}$ TCID₅₀/mL) à 14 jours d'intervalle. Le 4^{ème} faucon ne reçoit aucune injection. L'épreuve d'infection a lieu 32 jours après la première injection. Elle consiste en l'exposition IN et IOcc de 0,5 mL ($10^{4,75}$ TCID₅₀/mL) d'un isolat d'herpesvirus issu d'un faucon américain. Les 4 faucons sont logés au bloc dans la même volière. Le faucon contrôle est le seul à décéder 10 jours après l'épreuve, présentant toutes les caractéristiques pathologiques d'une infection au FaHV, sans développer d'immunité spécifique, et sans excréter le virus (culture CEF à partir d'écouvillon cloacal, absence d'étude de sensibilité de la méthode). Les faucons vaccinés ont eux survécu 13 jours après infection, et semblent avoir développé une immunité spécifique contre le FaHV 14 jours après la première injection de primo-vaccination. Une souche lentogénique (index de pathogénicité intracérébrale de 0,23) du virus de la maladie de Newcastle est isolée chez les 3 faucons vaccinés.

Les résultats de cette dernière étude semblent prometteurs mais les conclusions que l'on peut en tirer sont tout de même limitées. En effet, aucune donnée n'étudie l'évolution de l'immunité induite par cette vaccination sur le long terme, on ne sait pas quand faire de rappel de ce vaccin. De plus, l'épreuve d'infection de l'étude est certes efficace, puisque le faucon contrôle décède consécutivement à cette infection, mais l'exposition par consommation de proie infectée englobe d'autres mécanismes d'infection et de réaction du système immunitaire. Enfin, le nombre de faucons étudiés est très faible, et conclure à une efficacité et une innocuité du vaccin avec une population si faible n'est pas possible.

A ce jour, aucune recommandation concernant la vaccination des pigeons ou des faucons n'est donnée. La vaccination des faucons avec le DuFaHe est citée dans certains ouvrages, sans pour autant le recommander, ni en précisant les modalités sur le long terme de cette vaccination.

PARTIE II : ETUDE DE CAS AUTOUR DE L'ELEVAGE DE FAUCONS DE CHASSE DE L'ECWP D'OUMJNIBA.

I. Contexte

1. Généralités

a. La région

Les infrastructures de l'ECWP concernées par notre étude sont situées au cœur du Moyen-Atlas, dans la province de Fès-Boulemane. Situés sur les haut-plateaux calcaires entre Boulemane et Missour, les 3 sites d'élevage de l'ECWP se trouvent à Missour, Enjil et Oum Jniba (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Il s'agit d'une zone de moyenne à haute montagne (1500-2000 m d'altitude). Le climat est d'influence continentale autour de Boulemane à désertique vers Missour.



Figure 13 : Plan de la région (le nord est situé vers le haut de l'image) (Image : Google® Maps).

Aujourd'hui encore, l'économie locale repose essentiellement sur l'élevage extensif des ovins, bien que les déplacements des troupeaux soient rendus de plus en plus difficiles par le développement de l'agriculture.

b. L'organisation

L'Emirates Center for Wildlife Propagation (**Erreur! Source du renvoi introuvable.**) est un ensemble de centres d'élevage émirati fondé en 1995 par feu sa Majesté le Cheikh Zayed Bin Sultan Al Nahyan, alors Président des Emirats Arabes Unis. La gestion de ce centre est confiée à la société RENECO for Wildlife Preservation (Figure 14).



Figure 14 : Logos de l'ECWP (gauche) et de RENECO for Wildlife preservation (droite).

L'origine du projet réside dans la volonté des autorités émiraties d'entretenir la tradition ancestrale de la fauconnerie. Pour cela, et prenant conscience de l'impact de cette chasse sur les populations d'outardes sauvages (Outarde houbara en Afrique, *Chlamydotis undulata* ; Outarde de Macqueen en Asie, *Chlamydotis macqueenii*), un plan de protection et de renforcement des populations sauvages a été développé depuis plus de 20 ans. Actuellement, sur les sites de l'ECWP, des travaux de renforcement des populations de gangas cata (*Pterocles alchata caudacutus*), gangas couronnés (*Pterocles coronatus*), ainsi que d'œdicnèmes criards (*Burhinus oedicephalus*) sont également en cours.

c. L'élevage

Le centre ECWP d'Oum Jniba fait partie intégrante d'un projet de reproduction de faucons gerfaut *Falco rusticolus* purs de phase blanche et de phase noir. Initialement situé sur la zone d'Enjil, l'élevage de faucons a déménagé en 2008 à Oum Jniba. Il se trouve à une altitude de 1939 m. Ceci permet d'obtenir des conditions plus sèches et plus douces qu'à faible altitude, nécessaires à une reproduction efficace de cette espèce. En effet, les faucons gerfauts, dont l'habitat naturel se situe dans des zones tempérées à polaires, sont particulièrement sensibles au climat désertique avec des températures élevées.



Figure 15 : Principales structures de l'élevage d'Oum Jniba. Le nord est situé vers le haut de l'image. (Image : Google® Maps)

1- Origine des faucons

Les oiseaux sont originaires d'élevages anglais, allemands, nord-américains, émiratis ou du centre même. Les faucons sont généralement entraînés et utilisés à la chasse dans un centre dédié à la fauconnerie dans leur première année de vie, avant d'arriver au centre ECWP. Ils sont alors placés dans un module de quarantaine jusqu'à leur maturité sexuelle (entre 3 et 4 ans).

2- Modules d'élevage

Les modules d'élevage concernent 3 bâtiments + 1 bâtiment de quarantaine (Figure 15). Chaque module est constitué de plusieurs volières d'une surface d'environ 20m² et dont le substrat au sol est du gravier. Un espace de nidification est aménagé en hauteur, recouvert de plastique servant de pelouse artificielle, de même que les quelques perchoirs.

Les faucons reproducteurs sont placés en couple dans les volières des modules d'élevage. Les volières sont toutes équipées d'un système de vidéosurveillance (Figure 16) dans le but de suivre en temps réel toute modification du comportement qu'elle soit physiologique pendant la période de reproduction, ou bien pathologique. Les contacts avec l'être humain sont limités au maximum. Le seul contact permanent avec l'extérieur correspond à une zone grillagée au niveau du toit de chaque volière d'environ 10m².

Un bilan sanitaire des faucons est effectué deux fois par an (Octobre-Décembre et Juin-Aout). Les oiseaux sont alors capturés et anesthésiés (fixe : Médétomidine + Kétamine en IM), un bilan clinique est réalisé, ainsi qu'un rappel de vaccination (1 fois par an, contre la maladie de Newcastle, Imopest®, Merial, France) à raison de 0,5 mL/faucon, un traitement préventif anticoccidien (diclazuril) et antiparasitaire externe (dichlorméthane).



Figure 16 : Système de vidéosurveillance des modules d'élevage. (Photo: F. LORENTÉ)

3- Biosécurité

Des mesures de biosécurité ont été renforcées depuis 2 ans : désinfection (Virkon®) systématique des véhicules entrant dans l'enceinte de l'élevage, obligation pour toute personne autorisée à entrer dans la partie élevage de passer par un sas de désinfection avec nettoyage et désinfection des mains, des chaussures, et changement de combinaison de travail (vêtements et chaussures) à l'entrée et la sortie de l'élevage. Il est à noter que des travaux ont lieu dans la partie élevage et que des employés peuvent parfois accéder à la zone d'élevage sans passer par ce sas. Des cas d'intrusions de voleurs ont parfois eu lieu dans le centre.

Lors des bilans sanitaires, un nettoyage et une désinfection des volières sont effectués. Le gravier superficiel souillé est enlevé, la totalité de la volière est nettoyée avec de l'eau à haute pression, puis désinfectée au Virkon®. Un gravier neuf, nettoyé et désinfecté est placé. Puis une dernière personne effectue une dernière désinfection et laisse le tout sécher pendant 24h. Tous les bacs à eau et les tiroirs à alimentation sont également nettoyés et désinfectés.

4- Alimentation

L'alimentation fournie aux faucons est composée de proies entières congelées (cailles, pigeons et DOC) provenant d'un fournisseur espagnol. L'origine précise des proies n'est pas connue. La fréquence d'alimentation des faucons est variable selon la période de l'année, de 4 fois par jour en période de reproduction à 1-2 fois par jour en été. Les proies sont conservées au maximum 3 mois à -18°C, puis les stocks sont renouvelés. Les proies sont décongelées puis données immédiatement aux faucons en volière, en limitant au maximum le contact avec l'être humain par l'intermédiaire de tiroirs.

2. Données épidémiologique

Les principales maladies rencontrées chez les faucons reproducteurs d'Oum Jniba sont en très grande majorité d'origine métabolique (amyloïdose, athérosclérose...). Des cas de podagres sont décrits. Les cas de maladies infectieuses demeurent très rares depuis l'ouverture du centre (notamment un cas de salmonellose).

Les cas d'herpesvirose décrits dans ce travail sont les premiers cas de maladie infectieuse rapportés dans le centre entraînant la mort de plusieurs individus sur une courte période.

3. Risques éventuels d'infection par le CoHV-1

Malgré toute la bonne volonté et la rigueur d'application des mesures de biosécurité mises en place dans l'élevage de faucons, des risques d'infection par le CoHV-1 existent.

Tout d'abord, avant même d'arriver au Centre ECWP, certains animaux peuvent être exposés au CoHV-1 lors de leur entraînement. Une contamination par consommation de proies infectées et un éventuel portage asymptomatique du CoHV-1 peuvent être supposés à ce moment là.

Ensuite, le centre n'est pas totalement hermétique, et une proximité entre des populations d'oiseaux sauvages, dont des pigeons *Columba livia*, et les faucons n'est pas à négliger. En effet, une exposition à de la matière infectante est possible à travers les filets présents au-dessus des volières, ou par manquement aux mesures de biosécurité (personnel manipulant des pigeons à l'extérieur du centre pour le nourrissage de leurs propres faucons). Une contamination oro-urofécale ne peut donc être écartée.

Enfin, le statut CoHV-1 des pigeons congelés nous est totalement inconnu, ainsi que l'origine et les conditions de conservation des carcasses par le fournisseur. Une contamination par la consommation de pigeons infectés, malgré la congélation, ne peut pas être ignorée.

II. Cas cliniques et investigations

1. Cas cliniques

a. Clinique

L'étude de cas concerne 3 faucons gerfaut *Falco rusticolus* femelles immatures, provenant d'une collection privée dédiée à la pratique de la fauconnerie dans les environs de Zaida au Maroc. Les oiseaux sont originaires d'Angleterre (Identification : F13M00184) et d'Allemagne (F13M00187 et F13M00191). Ils sont nés en 2013 et ont participé à la saison d'entraînement et de chasse à l'automne 2013. Les faucons ont ensuite été transférés au centre ECWP d'Oum Jniba, à environ 65 km, le 16 février 2014, dans le module de quarantaine, qu'ils quitteront uniquement lors des bilans sanitaires.

Les trois faucons sont retrouvés morts dans leur volière à moins d'une semaine d'intervalle (Tableau 17). Le premier faucon F13M00184 est retrouvé mort le 06 juin 2015 au matin. En quelques minutes, la carcasse est en partie consommée par les 2 autres oiseaux (Figure 17). Une semaine plus tard, le faucon F13M00187 a présenté de la biliverdinurie, et est décédé en quelques heures, avant même que l'équipe vétérinaire puisse le transférer à la clinique. Le 3^{ème} faucon F13M00191 est retrouvé mort 24h après, après n'avoir présenté qu'un léger abattement.

Les signes cliniques rapportés sont un affaiblissement (2/3), associé à de la biliverdinurie (2/3). La mort est survenue subitement dans les 3 cas.



Figure 17 : Carcasse consommée du faucon F13M00184 (gauche) ; Traces de biliverdinurie péri-cloacale chez le faucon F13M00184 (droite). (Photo : Dr Rachida OUHMAMA, DMV, ECWP, Division Faucon).

b. Autopsie et Histopathologie

Les autopsies et analyses lésionnelles macroscopiques ont été effectuées par le Dr Rachida OUHMAMA (DVM, ECWP, Division Faucon, Centre d'Oum Jniba), dans les heures suivant la mort des oiseaux. Des empreintes de foie sur carte FTA[®] ont été réalisés. L'observation microscopique des organes a été confiée au laboratoire NOIVBD (Nederlands Onderzoek Instituut Voor Vogels en Bijzondere Dieren, Pays-Bas) et les photographies des lames histologiques ont été aimablement réalisées par le service d'Anatomie Pathologique de l'ENVT. Le détail est disponible dans le Tableau 17.

Le premier faucon décédé a développé les lésions macroscopiques caractéristiques d'herpesvirose. Les 2 oiseaux suivants ne présentaient qu'une congestion diffuse des viscères, sans foyer nécrotique macroscopiquement visible.

Tableau 17 : Tableau lésionnel des 3 faucons décédés au centre ECWP d'Oum Jniba.

Organes analysés	Lésions macroscopiques d'intérêt	Lésions microscopiques d'intérêt (H&E)	Conclusion
F13M00184 06/06/2015 femelle			
Foie	Multiples foyers nécrotiques. <u>Figure 18</u>	Nécrose multifocale, associée à des réactions lymphoïdes périportales. De nombreux CIN sont notés. <u>Figure 19</u>	Hépatosplénite nécrotique associée à des CIN.
Rate	Quasi-entièrement nécrotique. <u>Figure 18</u>	Nécrose très importante. Nombreux CIN. <u>Figure 19</u>	
Rein	Hyperémie (surtout dans la medulla).	Hyperémie.	
Glandes surrénales	Hypertrophie.	Hypertrophie corticale.	
F13M00187 13/06/2015 femelle			
Foie	Congestion.	Congestion hépatique. CIN en périphérie de zones de nécroses. Infiltrat périportale modéré.	Hépatosplénite nécrotique associée à des CIN.
Rate	Congestion.	Nécrose, hémorragie, infiltration hétérophilique, CIN fréquents.	
Reins	Congestion.	Noyaux des cellules des tubules parfois élargis avec une margination du nucléole. CIN ?	
F13M00191 14/06/2015 femelle			
Foie	Congestion	Nécrose importante. CIN fréquents.	Hépatosplénite nécrotique associée à des CIN.
Rate	Congestion.	Dépôt protéique (amyloïde ?) autour des artéioles et sinusoides. Nécrose avec infiltration hétérophilique en regard des follicules. CIN éosinophiliques nombreux.	
Reins	Congestion légère.	-	
Moelle osseuse	-	Faible activité de la moelle blanche.	
Duodénum	-	Nombreuses cellules caliciformes dans la muqueuse. Nombreux bacilles dans la lumière.	
Cerveau	Hyperhémie méningée.	-	



Figure 18 : Aspect macroscopique des lobes hépatiques (gauche) et de la rate en coupe (droite) du faucon F13M00184 (Photo : Dr Rachida OUHMAMA, DVM, ECWP, Division Faucon).

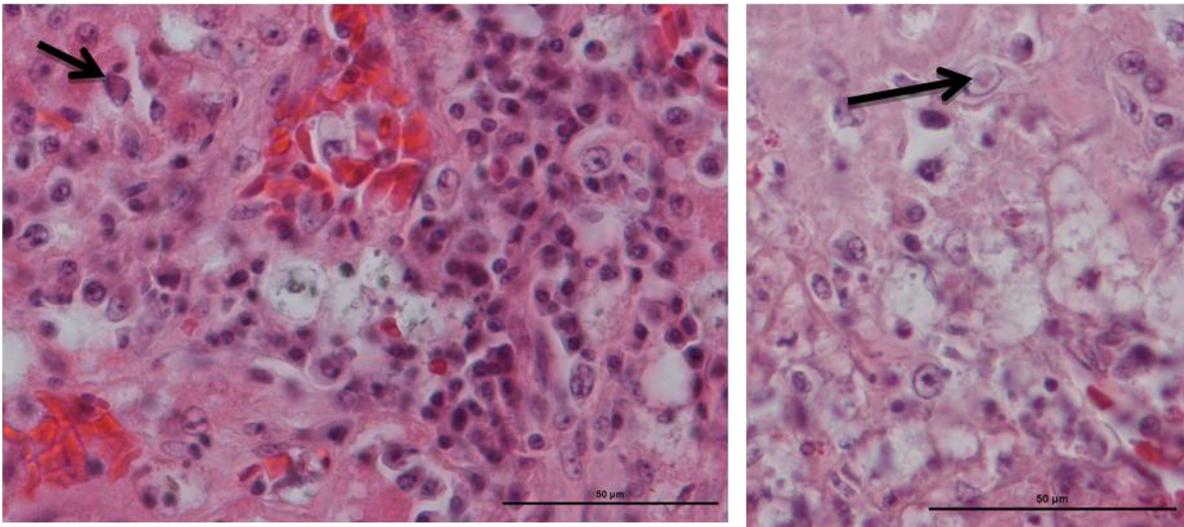


Figure 19 : Observation d'un CIN dans le foie (gauche) et la rate (droite) du premier faucon décédé (H&E, barre d'échelle = 50 µm) (Service d'Anatomie Pathologique, ENVF, France).

c. Examen de laboratoire

1- PCR : Matériels et méthodes

Extraction de l'ADN viral

Le détail des échantillons étudiés de faucon est décrit dans le Tableau 18. Un morceau carré de carte FTA[®] de 5 mm x 5 mm est découpé à la lame de scalpel stérile, puis déposé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Un volume de 300 µL d'eau distillée est ajouté. Le tout est mis pendant 24h à 4-6°C sur oscillateur (40 oscillations/min). L'extraction est réalisée ensuite à l'aide d'un kit NucleoSpin[®] RNA Virus (MACHEREY-NAGEL, Allemagne), qui permet l'extraction d'ARN et d'ADN viral. Le produit d'élution est conservé à -20°C.

Tableau 18 : Identification et nature des prélèvements de faucons étudiés dans un premier temps.

Identification du laboratoire	Nature	Identification originale	Date du prélèvement	Type de prélèvement	Média de transport	Organe prélevé
F3	Faucon	F13M00187	13/06/2015	Tissu	FTA [®]	Foie
F4	Faucon	F13M00184	06/06/2015	Tissu	FTA [®]	Foie
F9	Faucon	F13M00191	14/06/2015	Tissu	FTA [®]	Foie
FHV 1869/96	Témoin positif aimablement fourni par le Pr. Michael Lierz					

PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus »

Tout d'abord, le but des manipulations en laboratoire a été de confirmer par l'utilisation d'outils biomoléculaires la présence d'un herpesvirus chez ces 3 faucons. Pour cela, nous nous sommes appuyés dans un premier temps sur les travaux de VanDevanter *et al.* (VanDevanter *et al.* 1996).

Le protocole de PCR nichée utilisé cherche à amplifier une séquence cible entre 215 et 315 pb du gène de l'ADN polymérase des herpesvirus. Le détail des amorces utilisées est rapporté dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Amorces utilisés dans le cadre de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».

Sens de lecture	Nom de l'amorce	Détail de la séquence de l'amorce (5'-3')	Référence bibliographique
Sens	DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	(VanDevanter <i>et al.</i> 1996)
Sens	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA	
Sens	TGV	TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT	
Anti-sens	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT	
Anti-sens	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	

Le mix de la PCR 1, utilisant le kit KAPA2G Robust (Kapa Biosystems, USA), pour chaque puits est présenté dans le Tableau 20 :

Tableau 20 : Composition du mix pour la PCR 1 de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».

Réactifs	Volume (µL)
5X KAPA2G Buffer A	5
dNTP 10 mM	0,5
DFA 10 µM	2,5
ILK 10 µM	2,5
KG1 10 µM	2,5
Eau distillée	8,9
KAPA2G Robust DNA Polymerase	0,1
ADN échantillon	3

Le volume total est de 25 µL.

Les conditions d'amplification de la PCR 1 sont les suivantes (Tableau 21) :

Tableau 21 : Conditions d'amplifications de la PCR 1 de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».

Température	Temps	Nombre de cycles
95 °C	3 min	1
95 °C	30 s	45
46 °C	60 s	
72 °C	60 s	
72 °C	1 min	1

Le mix de la PCR 2, utilisant le kit KAPA2G Robust (Kapa Biosystems, USA), pour chaque puits est donné dans le Tableau 22:

Tableau 22 : Composition du mix pour la PCR 2 de la PCR consensus ADN polymérase « Pan-herpesvirus ».

Réactifs	Volume (µL)
5X KAPA2G Buffer A	5
dNTP 10 mM	0,5
TGV 10 µM	2,5
IYG 10 µM	2,5
Eau	12,4
KAPA2G Robust DNA Polymerase	0,1
ADN échantillon (produit de PCR 1)	2

Le volume total est de 25 µL.

Les produits de cette PCR 2 sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1-1,2% (poudre d'agarose + TBE + agent intercalant SYBR[®] Safe X20 000 (Invitrogen[™], USA)) et mis à migrer en cuve à électrophorèse (90V, 1h).

PCR ADN polymérase spécifique « CoHV-1 »

Afin de préciser les résultats de la PCR consensus « Pan-herpesvirus », nous avons réalisé une PCR spécifique au CoHV-1 fondée sur le protocole décrit dans l'étude de Raue *et al.* (Raue *et al.* 2005). La séquence cible est d'une taille de 242 pb, spécifique du gène de l'ADN polymérase du CoHV-1. Le détail des amorces est précisé dans le tableau ci-dessous (Tableau 23).

Tableau 23 : Amorces utilisées dans le cadre de la PCR ADN polymérase spécifique «CoHV-1».

Sens de lecture	Nom de l'amorce	Détail de la séquence de l'amorce (5'-3')	Référence bibliographique
Sens	PiHV-s	GGGACGCTCTGATTAAGGAAT	(Raue <i>et al.</i> 2005; Freick, Müller, Raue 2008; Stenzel <i>et al.</i> 2012)
Anti-Sens	PiHV-as	CTTGGTGATCAGCAGCAGCTTG	

Le mix de la PCR, utilisant le kit KAPA2G Robust (Kapa Biosystems, USA), pour chaque puits est présenté dans le Tableau 24:

Tableau 24 : Composition du mix pour la PCR ADN polymérase spécifique «CoHV-1».

Réactifs	Volume (µL)
5X KAPA2G Buffer A	5
dNTP 10 mM	0,5
PiHV-s 10 µM	1,25
PiHV-as 10 µM	1,25
Eau distillée	13,9
KAPA2G Robust DNA Polymerase	0,1
ADN échantillon	3

Le volume total est de 25 µL.

Les conditions d'amplification de la PCR sont les suivantes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) :

Tableau 25: Conditions d'amplifications de la PCR ADN polymérase spécifique «CoHV-1».

Température	Temps	Nombre de cycles
95 °C	3 min	1
95 °C	20 s	40
60 °C	20 s	
72 °C	20 s	

Les produits de cette PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1 % pour migration.

Séquençage

Les produits de la PCR ADN polymérase spécifique « CoHV-1 » ont été séquencés par méthode Sanger.

2- Résultats

Les 3 échantillons issus des faucons autopsiés révèlent une bande fluorescente comprise entre 200 et 300 pb après la PCR nichée et la PCR spécifique « CoHV-1 » (Figure 20). Ainsi, du matériel génétique du CoHV-1 est présent dans les foies des 3 faucons.

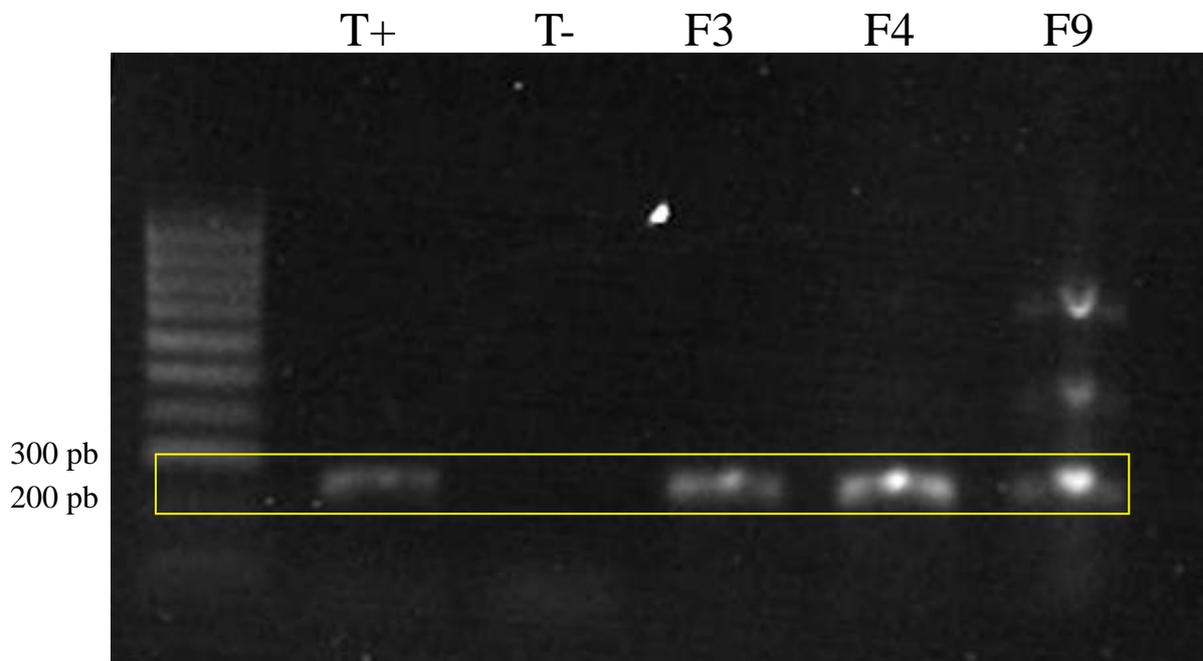


Figure 20 : Migration des produits de PCR ADN polymérase spécifique « CoHV-1 » des 3 faucons. Encadrés en jaune, les produits d’amplifications de taille comprise entre 200 et 300 pb, correspondant à la séquence spécifique du CoHV-1.

Les détails de la séquence « Consensus 1 PiHV » obtenue par PCR spécifique CoHV-1 à partir des échantillons des 3 faucons sont précisés dans le [Tableau 26](#), ainsi que les résultats obtenus par analyse du logiciel BLAST®.

Tableau 26 : Séquence « Consensus 1 PiHV » et résultats de l'analyse BLAST. (en rouge souligné : substitutions silencieuses ; en vert souligné : substitution faux-sens)

Nom de la séquence		Séquence				
Consensus 1 PiHV	-	TCGAAGGTTTTCTCGCACTCTAGTTTGATCGGCGGCAGGAA <u>T</u> AGCT CGCTCGAGATGCGCTTCCCCATGACGTGCGCCGG <u>C</u> GGATACCAGGGC CGCGGT <u>A</u> TCCACGCCGGTGATCTTGACAAACACGGAATCCGTGTCC CCGTAGATAACCGACACGGAGTAGTCCTCCCCCGCCTTCGCGTGCC CGTCCAGCTGCGGGA				
BLAST®		Identité (%)	Taille de l'alignement (pb)	Différences	E-value	Bit score
-	KJ668231.1	100	199	0	2.41E-98	368
	KJ995972.1	98.492	199	3	2.43E-93	351
	KM280875.1	98.492	199	3	2.43E-93	351
	KM010015.1	98.492	199	3	2.43E-93	351
	AF141890.1	100	55	0	2.70E-18	102
	EF623994.1	100	53	0	3.49E-17	99
	EF522960.1	100	53	0	3.49E-17	99
	EF522959.1	100	53	0	3.49E-17	99
	EF522952.1	100	53	0	3.49E-17	99

3- Discussion

Si l'on considère les données épidémiocliniques, histopathologiques et le résultat de nos travaux de laboratoire, le diagnostic formel de trois cas d'herpesvirose à CoHV-1 chez ces 3 faucons gerfauts semble raisonnable.

L'hypothèse d'une infection du premier faucon suivi de la contamination de ses congénères par prédation nous paraît très probable. Il s'agirait de la première description d'un cas de transmission du CoHV-1 entre faucons. L'analyse de la séquence amplifiée est effectuée dans une partie ultérieure (Partie II, II., 2., c., 3- Discussion).

La recherche d'autres pathogènes potentiellement présents ayant pu favoriser l'infection par le CoHV-1, ou ayant été intercurrents à cette infection, aurait été intéressante.

2. Etude de prévalence dans les différentes populations d'oiseaux

a. Echantillons

Dans le but d'évaluer les risques d'infections par le CoHV-1 dans l'élevage de faucons d'Oum Jniba, il nous a paru intéressant d'évaluer la prévalence de ce virus dans les différentes populations aviaires à risque présentes autour du centre. La nature des prélèvements est précisée dans la partie suivante.

Pour cela, en novembre 2015, 101 des 195 faucons alors présents dans le centre ont été prélevés au hasard, quels que soient leur condition clinique, leur âge ou leur sexe.

De plus, 90 pigeons captifs parmi une population que nous considérerons « infinie » (arrivées fréquentes par milliers, mélange des populations) originaires des Pays-Bas, élevés sur le site d'entraînement pour la fauconnerie aux alentours de Zaida, et dont les faucons ont été nourris durant leur première année de vie, ont été prélevés.

Ensuite, 30 empreintes de foies de pigeons congelés (origine : Espagne) couramment utilisés pour le nourrissage des faucons d'Oum Jniba ont été analysées.

Enfin, 160 pigeons sauvages, provenant de 5 captures différentes entre les 17 et 20 novembre 2016 dans la région entre Oum Jniba et Missouri ont été écouvillonnés. Ces captures se sont déroulées de nuit, à l'entrée de puits à l'intérieur desquels les pigeons nichent.

Quelques gangas sauvages, gibier potentiellement chassé dans cette région, ont également été prélevés.

Le récapitulatif des différentes populations est présenté ci-dessous (Tableau 27).

Tableau 27 : Identification des différentes populations d'oiseaux prélevées.

Population	Identification	Date de prélèvement	Zone géographique d'origine
Faucons reproducteurs	FLF01-FLF101	Novembre 2015	Oum Jniba
Pigeons captifs	FLP201-FLP290	Novembre 2015	Zaida
Gangas sauvages	FLG301-FLG308	Novembre 2015	Enjil
Pigeons congelés	FLPc401-FLPc431	2016	Espagne
Pigeons sauvages	FLPw501-FLPw536	Novembre 2016	5 points de prélèvement entre Oum Jniba et Missouri
	FLPw537-FLPw569		
	FLPw570-FLPw584		
	FLPw585-FLPw630		
	FLPw631-FLPw660		

b. Prélèvements

La recherche du CoHV-1 est réalisée à partir de l'étalement sur carte FTA® d'écouvillons cloacaux, aussi bien pour les pigeons vivants que pour les faucons. Un seul prélèvement est réalisé par oiseau. Concernant les pigeons congelés, le prélèvement consiste en une empreinte du foie, une fois décongelé, de l'animal sur carte FTA®.

Pour chaque prélèvement, un morceau carré de carte FTA® imprégné de matière de 5 mm x 5 mm est découpé à la lame de scalpel stérile, puis déposé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Un volume de 300 µL d'eau distillée est ajouté. Le tout est mis pendant 24h à 4-6°C sur oscillateur (40 oscillations/min). Un volume de 200 µL de suspension de chaque échantillon est prélevé puis déposé sur une plaque de 96 puits. L'extraction est réalisée selon les recommandations du fabricant (Kit cador® Pathogen 96 QIAcube® HT) à l'aide d'un robot d'extraction QIAcube® HT (QIAGEN®, Pays-Bas), aimablement mis à notre disposition par le laboratoire VibioSphen (Labège, France). Les produits d'élution sont conservés à -80°C.

L'ADN de 10 échantillons de faucons (FLF91-FLF101) et de 30 pigeons congelés (FLPc401-FLPc431) est extrait selon la méthode décrite précédemment (Partie II, II., 1., d., 1- ,Extraction de l'ADN viral). Les produits d'élution sont également conservés à -80°C.

c. Examens de laboratoire

1- PCR quantitative : Matériels et méthodes

PCR « Phusion High-fidelity » spécifique « CoHV-1 »

Dans le but de cloner la séquence spécifique au CoHV-1 (242 pb, (Raue *et al.* 2005)), et par la suite d'estimer le nombre de copies de cette séquence dans les échantillons analysés, il nous a été nécessaire d'amplifier cette séquence à l'aide d'une PCR utilisant une autre enzyme qu'initialement décrit, une enzyme « Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase » (Thermo Fisher Scientific™, USA). Les échantillons analysés sont ceux des faucons F3 et F4. Les amorces utilisées sont celles utilisées précédemment (Tableau 23). Le détail du mix (Tableau 28) et des conditions d'amplification (Tableau 29) sont décrites ci-après.

Tableau 28: Composition du mix pour la PCR «Phusion High-fidelity» spécifique «CoHV-1».

Réactifs	Volume (µL)
5X Phusion HF Buffer	10
dNTP 10 mM	1
PiHV-s 10 µM	2.5
PiHV-as 10 µM	2.5
Eau distillée	28.5
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	0,5
ADN échantillon	5

Le volume total déposé dans un puits est de 50 µL.

Tableau 29 : Conditions d'amplifications de la PCR «Phusion High-fidelity» spécifique «CoHV-1».

Température	Temps	Nombre de cycles
98 °C	30 s	1
98 °C	10 s	35
63 °C	20 s	
72 °C	15 s	
72 °C	10 min	1

Les produits de cette PCR ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 1%. La migration en cuve à électrophorèse a duré 1h30 environ (90V). Le résultat de la migration était satisfaisant (Figure 21).

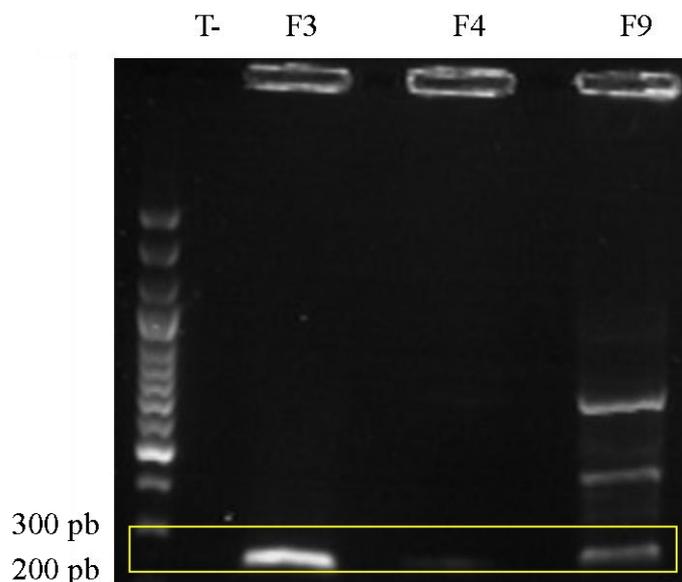


Figure 21 : Migration des produits de PCR « Phusion High-fidelity » spécifique « CoHV-1 » des 3 faucons. Encadrés en jaune, les produits d'amplifications de taille comprise entre 200 et 300 pb, correspondant à la séquence spécifique du CoHV-1.

Les produits d'amplification, identifiés par exposition à la lumière UV, ont ensuite été découpés et extraits du gel d'agarose à l'aide d'un kit de purification d'acides nucléiques, « NucleoSpin Gel & PCR Clean-up » (« Protocole 5.2, DNA extraction from agarose gel »-Macherey-Nagel (Allemagne)). Le volume d'élution était de 30 μ L, le tout conservé à 4°C pendant 24h, puis à -20°C par la suite.

Séquençage

Les produits d'amplification des échantillons F3, F4 et F9 par la PCR « Phusion High-fidelity » spécifique au CoHV-1 (respectivement F3pp, F4pp et F9pp), ont été séquencés par la méthode de Sanger. La réaction de séquençage a été réalisée au laboratoire de l'UMR 1225.

Après étude des résultats bruts lus sur le logiciel « Bio Edit Sequence Alignment Editor », une séquence « Consensus 1 PiHV » est extraite et soumise à comparaison grâce au logiciel BLAST.

Elaboration d'une gamme référence

L'établissement de la gamme référence permettant l'estimation du nombre de copies de la séquence spécifique au CoHV-1 dans un échantillon est fondé sur le clonage de cette séquence dans un plasmide bactérien. Ce clonage a été réalisé à l'aide du kit « StrataClone Blunt PCR Cloning Kit » (Agilent, USA) selon les instructions du fabricant. Les séquences clonées sont les séquences amplifiées des faucons F3 (F3pp pour F3 « produit de PCR Phusion HF») et F4 (F4pp). Les colonies identifiées comme ayant inséré la séquence d'intérêt sont colorées en blanc. Cinq colonies de chaque boîte ensemencée avec 5 µL de mix de clonage (de F3pp et F4pp) sont tout d'abord testées par PCR pour vérifier l'insertion de la séquence d'intérêt dans le plasmide bactérien (Figure 22), puis déposées en milieu de culture L Agar (+ Ampicilline) pour cultiver ces clones qui contiennent la séquence d'intérêt.

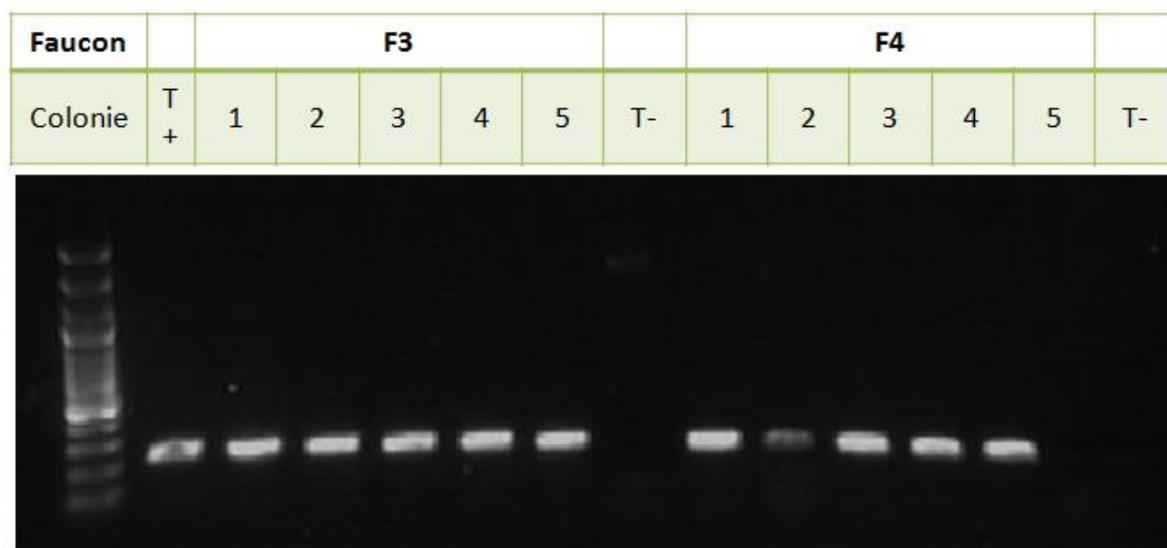


Figure 22: Résultats de la migration sur gel d'agarose des produits de PCR « Phusion HF » spécifique « CoHV-1 » pour la vérification de l'insertion de la séquence d'intérêt dans les clones utilisés pour l'élaboration de la gamme.

Après environ 24h d'incubation à 37°C avec agitation, les plasmides sont extraits des bactéries à l'aide d'un Kit « NucleoSpin Plasmid Easypure » (Macherey-Nagel, Allemagne). Le produit d'élution est de 50 µL, conservé à 4°C.

La quantité d'acides nucléiques a été estimée par fluorométrie grâce à un Qubit™ Fluorometer (Thermo Fisher Scientific™, USA). La concentration en ADN correspondante à la colonie 1 du faucon F3 est estimée à 186 ng/µL. Connaissant la taille initiale du plasmide (4272 pb) et de l'insert (242 pb), une conversion de « grammes » à « nombre de copies » a été possible (Tableau 30). De là, nous avons réalisé les dilutions nécessaires pour obtenir des concentrations voulues pour l'établissement de la gamme de référence.

Tableau 30 : Conversion « g/μL » en « copies/μL »

Conversion g -> copie			
Taille plasmide (pb)	Taille insert (pb)	Concentration (g/μL)	Concentration (copie/μL)
4272	242	1.86E-07	3.82E+10

PCR quantitative spécifique CoHV-1

La PCRq spécifique « CoHV-1 » a été réalisée sur 2 machines, avec différents kits de PCRq dont le détail est précisé dans le [Tableau 31](#).

Tableau 31 : Détail des instruments et kit utilisés pour l'étude par PCRq des échantillons de pigeons, faucons et gangas.

Instrument	Light Cycler ® 480	Light Cycler ® 96
Kit PCRq	iTaq™ Universal SYBR® Green supermix (Bio Rad, USA)	LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche Molecular Systems, Suisse)
Echantillons étudiés	FLF01-FLF101 FLP201-FLP290 FLG301-FLG308	FLPw501-FLPw536 FLPw537-FLPw569 FLPw570-FLPw584 FLPw585-FLPw630 FLPw631-FLPw660
Période de traitement des échantillons	03-06/2016	11-12/2016

La composition des mix de chaque réaction de PCRq est développée ci-après ([Tableau 32](#) à [Tableau 35](#)).

Tableau 32: Light Cycler ® 480 : Composition du mix pour la PCRq spécifique CoHV-1.

Réactifs	Volume (μL)
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	5
PiHV-s 10 μM	0,2
PiHV-as 10 μM	0,2
Eau distillée	2,6
ADN échantillon	2

Le volume total déposé dans un puits est de 10 μL.

Tableau 33 : Light Cycler ® 480 : Conditions d'amplifications de la PCRq spécifique CoHV-1.

Température	Temps	Nombre de cycles
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	45
60 °C	60 s	
95°C	5 s	1
65°C	60 s	
97°C	Continue (0.11°C/s) Acquisition tous les 5°C	
40°C	30 s	1

Tableau 34: Light Cycler ® 96 : Composition du mix pour la PCRq spécifique CoHV-1.

Réactifs	Volume (µL)
LightCycler® 480 SYBR® Green I Master	5
PiHV-s 10 µM	0,2
PiHV-as 10 µM	0,2
Eau distillée	2,6
ADN échantillon	2

Le volume total déposé dans un puits est de 10 µL.

Tableau 35 : Light Cycler ® 96 : Conditions d'amplifications de la PCRq spécifique CoHV-1.

Température	Temps	Nombre de cycles
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	45
60 °C	60 s	
72 °C	10 s	
95 °C	5 s	1
65 °C	60 s	
97 °C	Continue (0.11°C/s) Acquisition tous les 5°C	
40 °C	30 s	1

Des plaques de 96 puits sont chargées de 8 µL de mix puis 2 µL d'échantillon sont déposés. Deux échantillons correspondant à un même animal sont déposés dans 2 puits distincts sur la même plaque. Des points de gamme de 10¹ à 10⁶ copies sont également

déposés en deux fois sur chaque plaque de 96 puits. Des témoins négatifs (Eau distillée, 2 ou 4 puits selon les plaques) sont également présents sur chaque plaque.

Pour chaque Light Cycler®, une plaque de 96 puits où sont déposés des points de gamme de 10^0 à 10^9 (8 exemplaires de chaque), ainsi que 8 ou 16 contrôles négatifs est réalisée. Ces plaques sont désignées comme « plaques référence » de chaque LC.

Vérification et séquençage

Après analyse des résultats obtenus par PCRq, nous avons tenté, pour les échantillons qualifiés de « positifs » ou « douteux », d'amplifier par PCR une séquence spécifique de l'ADN polymérase du CoHV-1 et par PCR consensus une séquence de l'ADN polymérase conservée parmi tous les herpesvirus (PCR « Pan-herpesvirus ») ; ceci dans le but de séquencer les produits de PCR et d'étudier une éventuelle variabilité des différents virus mis en évidence.

2- Résultats

Critères de positivité de la PCRq

Les paramètres auxquels nous nous sommes intéressés sont tout d'abord le T_m « maximum » (T_m max, [Figure 23](#), [Figure 25](#)) puis le Ct. Un résultat considéré comme positif correspond à un échantillon dont le T_m max est « concordant avec le T_m max d'un échantillon positif » (défini ci-après), et un Ct significativement inférieur au Ct imputable à un « bruit de fond » ([Figure 24](#), [Figure 26](#)).

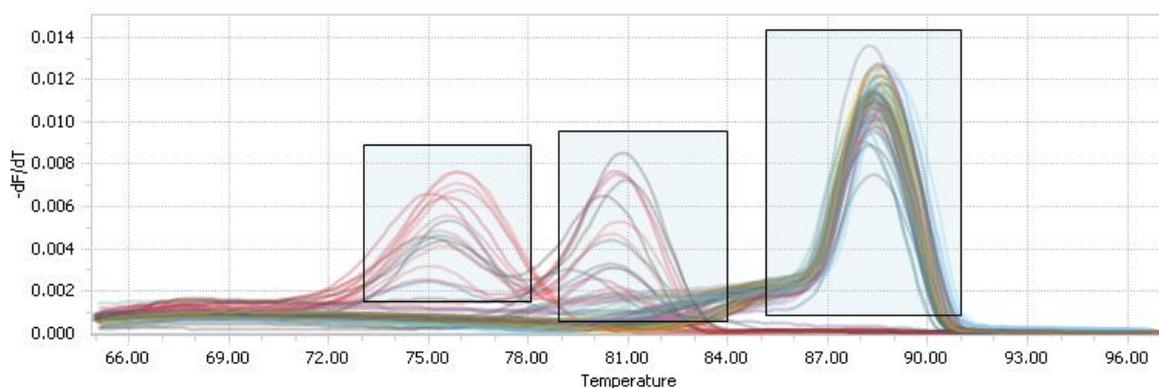


Figure 23 : Représentation graphique des pics de fusion et détermination des T_m de la plaque référence du LC96. Les 2 premiers cadres en partant de la gauche correspondent à des produits d'amplification non-spécifiques ou des dimères d'amorces. Le cadre englobant les pics de fusion à droite du graphe correspondent aux produits d'amplification spécifique recherchés, permettant l'identification des $T_{m_{max}}$.

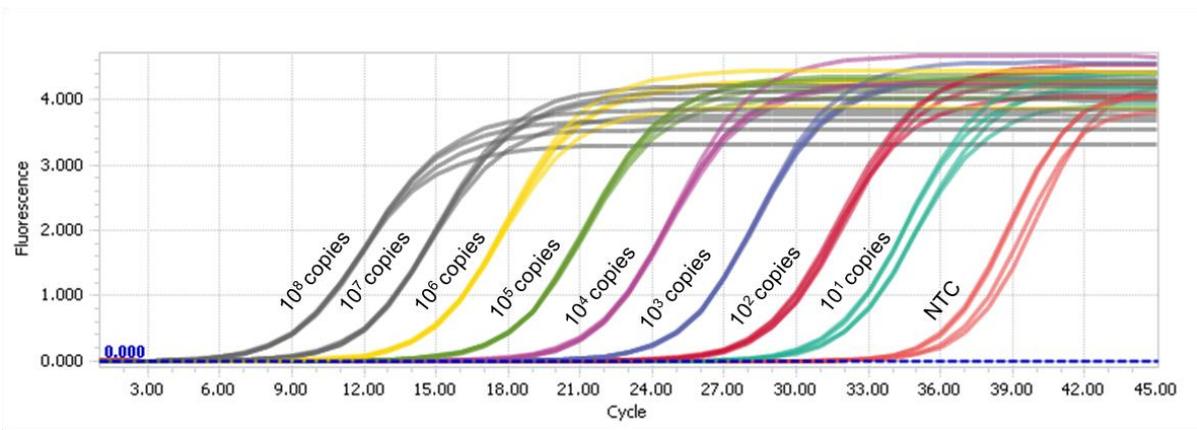


Figure 24 : Représentation graphique de la fluorescence en fonction du cycle d'amplification de 4 échantillons de chaque point de gamme entre 10¹ et 10⁸ copies, et 4 contrôles négatifs (issus de la plaque référence du LC96).

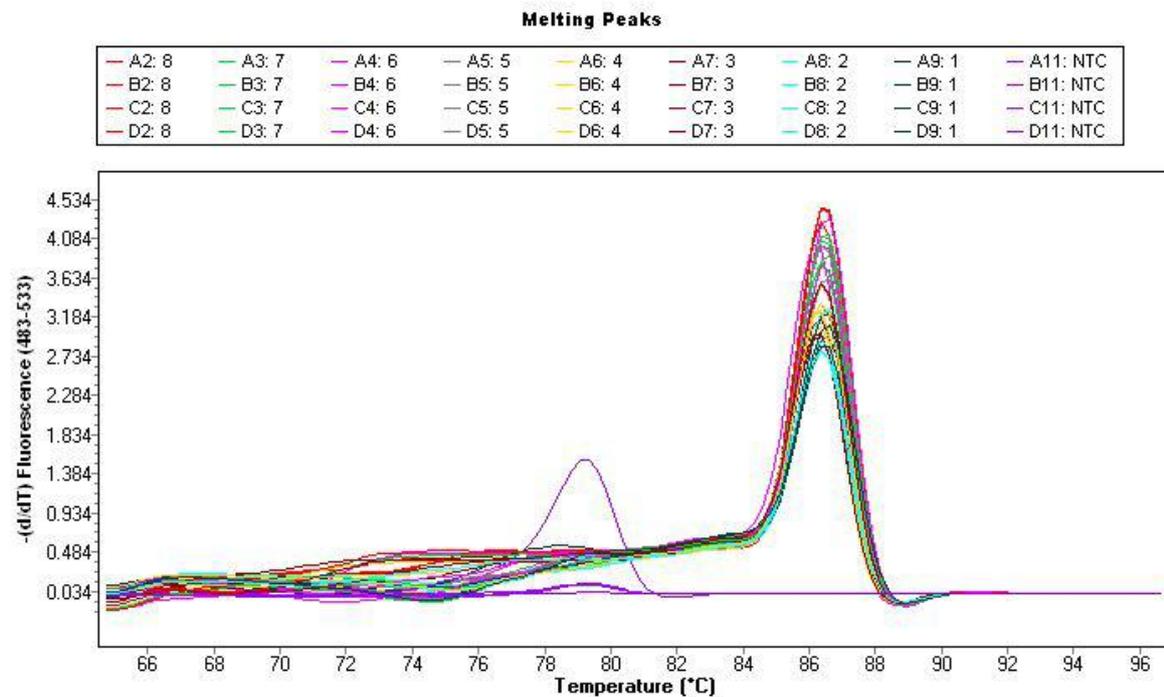


Figure 25 : Représentation graphique des pics de fusion (« Melting peaks ») et détermination des T_m de la plaque référence du LC480 (4 échantillons de chaque point de gamme entre 10¹ et 10⁸ copies donnent un pic aux alentours de 86°C, et 4 contrôles négatifs donnent un pic vers 79°C).

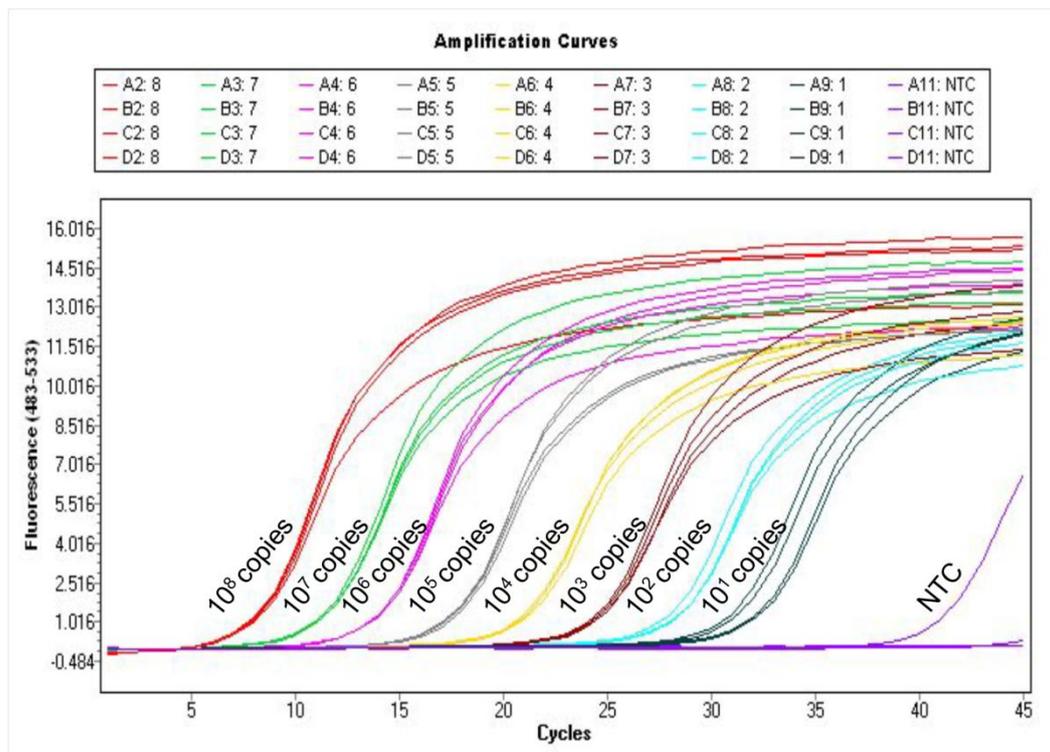


Figure 26 : Représentation graphique de la fluorescence en fonction du cycle d'amplification (« Amplification curves ») de 4 échantillons de chaque point de gamme entre 10^1 et 10^8 copies (en rouge, à gauche), et 4 contrôles négatifs (en violet, à droite) issus de la plaque référence du LC480).

L'étude du $T_{m_{max}}$ de chaque échantillon a été réalisée séparément pour chaque « LC ou kit PCRq » (Figure 27 : $T_{m_{max}}$ moyen de l'ordre de 86°C pour le Light Cycler® 480 et le kit iTaq™ Universal SYBR® Green supermix (Bio Rad, USA), de 88°C pour le Light Cycler® 96 et le kit LightCycler® 480 SYBR® Green I Master (Roche Molecular Systems, Suisse)). Ainsi, l'intervalle de référence des $T_{m_{max}}$ « positifs » est établi sur la base d'un intervalle moyen comprenant 99% des valeurs de $T_{m_{max}}$ des points de gamme allant de 10^1 à 10^9 copies ($T_{m_{max}}$ moyen + ou - 2.6 SD), défini à partir des valeurs issues de la plaque référence de chaque LC. Considérant la faible variabilité des génomes des herpesvirus, la limite supérieure de cet intervalle n'est pas prise en compte dans le critère de positivité car elle exclurait par la suite des échantillons que l'on sait positifs (F3, F4 et F9).

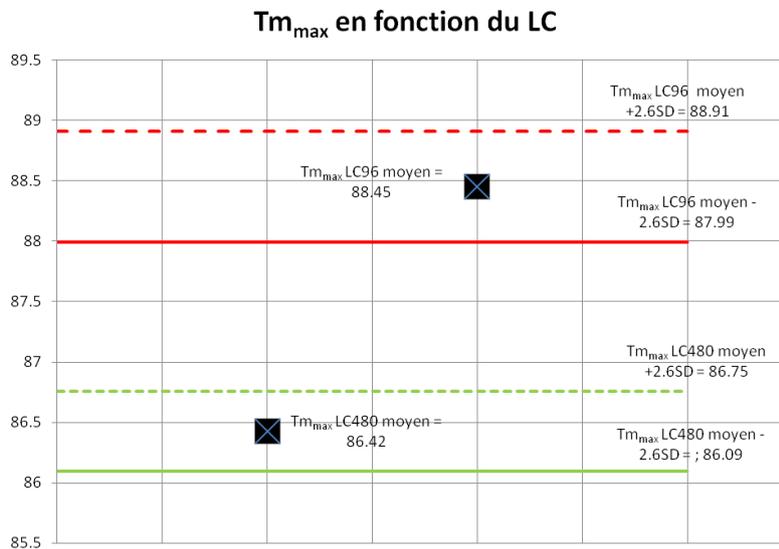


Figure 27 : Représentation graphique des Tm_{max} moyen (+ ou 2.6 SD, en °C) des points de gamme de 10¹ à 10⁹ copies des plaques références de chaque LC.

Tableau 36 : Critères de positivité en termes de Tm_{max}.

Light Cycler®	Critère de positivité du Tm _{max}
LC 480	≥ 86,09 °C
LC 96	≥ 87,99 °C

Le critère pour considérer le Tm_{max} d'un échantillon comme positif est d'être supérieur ou égal à la limite inférieure de cet intervalle de référence (supérieur au Tm_{max} moyen – 2.6SD), respectivement au LC utilisé (**Tableau 36**)

Concernant le Ct, un facteur « LC + kit PCRq » ne suffit pas, il nous a fallu prendre en compte un facteur « Plaque ». Ainsi, le seuil de positivité est déterminé plaque par plaque. Les Ct des points de gammes à 10¹ copies (points de gamme les plus faibles) sont dans chaque cas significativement inférieurs aux Ct des contrôles négatifs.

Le critère pour considérer le Ct d'un échantillon significativement inférieur à celui d'un « bruit de fond » est d'être inférieur ou égal à la limite supérieure de l'intervalle comprenant 95% des Ct des points de gamme à 10¹ copies (Ct_{moyen 10copies} + ou – 2SD) de la plaque respective.

Dans les calculs des intervalles de référence (par LC pour les Tm, par plaque pour les Ct) :

- concernant la plaque référence LC96, un échantillon a été exclu : un témoin d'extraction qui ne donnait aucun résultat en terme de Tm.

- concernant la plaque référence LC480, deux échantillons correspondant à des contrôles négatifs ont donné des résultats concordant avec une contamination accidentelle lors du dépôt (l'un avec un $T_{m_{max}}$ positif et un Ct suffisamment faible, le deuxième présentant un Ct très faible sans donner de valeur de T_m).

Par soucis d'accroître notre sensibilité, nous avons considéré comme « **douteux** » les échantillons dont le $T_{m_{max}}$ correspondait au même critère qu'un échantillon considéré comme positif (Tableau 36) et dont le Ct était inférieur ou égal à la limite inférieure de l'intervalle comprenant 95% des Ct des contrôles négatif de la plaque respective.

Résultats de PCR quantitative spécifique « CoHV-1 »

Deux échantillons par individu ont donc été analysés par PCRq. Un récapitulatif des résultats positifs et douteux sont présentés dans le Tableau 37, ci-dessous.

Tableau 37 : Tableau récapitulatif des échantillons positifs ou douteux. (FLP : pigeon captif de Zaida ; FLPw : pigeon sauvage ; FLPc : pigeon congelé).

Identification de l'animal	Nombre d'échantillon positif	Nombre d'échantillon douteux	Remarques
FLP 217	1	1	
FLP 241	1	1	
FLP 245	0	2	
FLP 252	2	0	
FLP 259	0	2	
FLP 266	0	1	
FLP 268	0	1	T_m concordant et Ct = 21,44 cycles (équivalent à une concentration extrapolée à 6.48×10^3 copies)
FLP 273	2	0	
FLP 279	0	2	
FLPw 612	0	1	
FLPw 618	0	1	
FLPc 403	2	0	Efficacité faible de la PCRq
FLPc 409	2	0	
FLPc 417	2	0	
FLPc 426	1	0	
FLPc 428	1	0	

Vérification et séquençage

Concernant les échantillons « positifs » ou « douteux » de pigeons, nous n'avons réussi à séquencer la séquence cible de la PCR ADN polymérase spécifique « CoHV-1 » que chez trois pigeons captifs.

Tableau 38 : Séquences obtenues chez les pigeons prélevés. (en rouge souligné : mutation silencieuse ; en vert souligné : mutation faux-sens)

Pigeon	Séquence
FLP 241	TCGAAGGTTTTCTCGCACTCTAGTTTGATCGGCGGCAGGAA <u>T</u> AGCTCGCTCGAGATGCGCTTCCCCATGACGTCGCCGG <u>G</u> CGGA TACCAGGGCCGCGGT <u>A</u> TCCACGCCGGTGATCTTGACAAACA CGGAATCCGTGTCCCCGTAGATAACCGACACGGAGTAGTCC TCCCCCGC _{ctt} CGCGTGCCCCGTCCAGCTGCGGGA
FLP 252	TCGAAGGTTTTCTCGCACTCTAGTTTGATCGGCGGCAGGAA <u>C</u> AGCTCGCTCGAGATGCGCTTCCCCATGACGTCGCCGG <u>T</u> GGA TACCAGGGCCGCGGT <u>G</u> TCCACGCCGGTGATCTTGACAAACA CGGAATCCGTGTCCCCGTAGATAACCGACACGGAGTAGTCC TCCCCCGCCTTTCGCGTGCCCCGTCCAGCTGCGGGA
FLP 279	TGATCGGCGGCAGGAA <u>C</u> AGCTCGCTCGAGATGCGCTTCCCC ATGACGTCGCCGG <u>T</u> GGATAACAGGGCCGCGGT <u>G</u> TCCACGCC GGTGATCTTGACAAACACGGAATCCGTGTCCCCGTAGAT

La séquence amplifiée chez le pigeon FLP 241 est identique à celle présentée dans le Tableau 26 (199 pb d'alignement, 100% d'identité avec la séquence du FaHV-1 S18).

La séquence amplifiée chez le pigeon FLP 252 présente, pour des alignements compris entre 30 et 199 pb, 100% d'identité avec les séquences de CoHV-1 (KJ995972.1, KM280875.1, KM010015.1, AF141890.1, EF623994.1, EF522960.1, EF522959.1, EF522952.1, GQ478232.1). Trois substitutions (2 silencieuses, un faux-sens), sont à noter par rapport à la séquence du FaHV-1 S18 (KJ668231.1) pour un alignement de 199 pb (98% d'identité).

La séquence amplifiée chez le pigeon FLP 279 présente, pour un alignement de 121 pb, 100% d'identité avec les séquences de CoHV-1 (KJ995972.1, KM280875.1, KM010015.1), et 97.5 % d'identité avec la séquence du FaHV-1 (3 substitutions, identiques à celles du pigeon FLP 252, ci-avant).

Les autres résultats de séquençage présentent un bruit de fond trop important pour identifier clairement une séquence, ou correspondent au résultat d'une amplification non spécifique.

A ce jour, nous n'avons pas réussi à obtenir de séquences d'ADN à partir de la PCR « Pan-herpesvirus » pour les échantillons des pigeons « positifs » ou « douteux ».

3- Discussion

Tout d'abord, à l'aide de la PCR spécifique « CoHV-1 » et du séquençage des produits d'amplification des échantillons issus des 3 faucons décédés au centre ECWP, le diagnostic d'infection par le CoHV-1 de ces trois faucons gerfaut est clairement établi. En effet, une identité de 100% est établie, sur une séquence de 199 nucléotides alignés, avec le FaHV-1 S18 (Spatz, Volkening, Ross 2014), et sur des séquences de 53 à 55 nucléotides, avec le CoHV-1. Trois substitutions dans la séquence nucléotidique sont à noter avec des séquences de souches asiatiques du CoHV-1 (Tableau 26). Celles-ci ne semblent pas entraîner de modification du cadre de lecture, et ne substituent dans la séquence traduite qu'une valine par une alanine, sans conséquence connue sur la fonctionnalité de la protéine codée.

La séquence amplifiée chez un pigeon captif de Zaida (FLP 241) est identiques à celle des 3 faucons morts au centre. Les séquences identifiées chez les pigeons captifs FLP 252 et FLP 279 sont identiques à celles des souches asiatiques disponibles dans la base de données GenBank. Il est ainsi possible que 2 souches de CoHV-1 circulent dans les populations captives de pigeons à Zaida. Il ne nous a pas été possible à ce jour d'identifier la séquence de CoHV-1 mise en évidence par PCRq chez les pigeons congelés (faible efficacité de la PCRq). Des modifications dans les conditions d'amplification de la PCR, un clonage des produits de PCR suivi d'un criblage, un séquençage à haut débit ou encore la détermination du profil de restriction spécifique de la séquence d'intérêt pourraient éventuellement nous permettre d'extraire cette séquence des échantillons riches en matériel génétique, et sujet à l'amplification de produit non spécifiques, et de l'identifier.

La sensibilité analytique de la technique de PCRq développée dans ce travail est de 10 copies de la séquence d'intérêt par échantillon,

En ce qui concerne la spécificité analytique de la méthode, elle peut être raisonnablement estimée à 100% (Raue *et al.* 2005).

L'extrapolation des résultats de cette étude est à faire avec précaution. En effet, la détection et amplification de la séquence d'intérêt peut être synonyme de la présence effective

du virus (infectant ou non), mais aussi de « débris » du virus et ne signer qu'un passage transitoire du virus sans pour autant avoir infecté l'animal. Cependant, compte tenu du mode de prélèvement (écouvillon cloacal) et des données séro-épidémiologiques et physiopathologiques connues à ce jour sur le CoHV-1 chez le pigeon, il nous paraît raisonnable de supposer que la présence d'une quantité absolue supérieure à 10 copies par échantillon est synonyme d'excrétion active, de réplication du virus et donc d'une réelle infection par le CoHV-1 chez l'animal prélevé (qu'il soit symptomatique ou pas, non défini dans notre étude). Il nous est cependant impossible de déterminer la corrélation entre excrétion et statut immunitaire de l'animal, une étude sérologique nous aurait permis d'étudier l'exposition relative des pigeons et faucons au CoHV-1.

Les avantages de la technique de PCRq développée dans notre étude, outre sa sensibilité et sa spécificité, résident dans le traitement systématique et répétable d'un grand nombre d'échantillons associé à une estimation quantitative de la présence du CoHV-1. Même si l'extrapolation absolue de cette donnée quantitative serait absurde, cette technique permet d'évaluer un ordre de grandeur de l'excrétion du virus, utilisant un matériel de prélèvement simple d'utilisation (écouvillon, cartes FTA®) au coût restreint.

d. Interprétation épidémiologique

La PCRq spécifique « CoHV-1 » nous donne accès à deux couples de données en termes de T_m et de C_t , et augmente la sensibilité, tout en estimant la répétabilité de la procédure. A partir de ces résultats bruts, nous pouvons raisonnablement déterminer les critères pour lesquels un oiseau est effectivement considéré comme excréteur du CoHV-1. Nous avons fait le choix de considérer comme positif tout oiseau présentant en PCRq deux résultats positifs, un seul résultat positif et un douteux, un seul résultat positif (efficacité élevée), ou deux résultats douteux. Sont considérés comme douteux les oiseaux ne présentant qu'un seul résultat positif (efficacité faible de la PCRq) ou douteux. Les résultats sont présentés dans le Tableau 39.

Tableau 39 : Résultats et estimation de la prévalence apparente du CoHV-1 dans les différentes populations étudiées (calculs réalisés grâce à l’outil disponible sur le site <http://epitools.ausvet.com.au>).

	Nombre de positif	Taille de l'échantillon	Estimation de la prévalence apparente (intervalle de confiance Wilson)	Limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95%	Limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95%
FLP	7	90	7,8 %	3,8 %	15,2 %
FLF	0	101	0 %	0 %	3,7 %
FLG	0	8	0 %	0 %	32,4 %
FLPc	3	31	9,7 %	3,3 %	24,9 %
FLPw	0	160	0 %	0 %	2,3 %

Tout d’abord, aucun ganga ni faucon ne semble excréter du CoHV-1. Nous n’avons donc pas mis en évidence du CoHV-1 chez les gangas. De plus, aucun faucon ne semble excréter du CoHV-1, ce qui semble concorder avec la très faible possibilité d’un portage asymptomatique chez les *Falconidae*. Nous ne pouvons pas conclure à une possible exposition non-fatale au CoHV-1 dans l’élevage de faucons. L’excrétion urofécale du CoHV-1 par les faucons semble en tout cas très peu probable.

En ce qui concerne les populations de pigeons captifs d’origine européenne (FLP et FLPc), la prévalence du CoHV-1 est d’environ 10%, malgré une différence de nature de l’échantillon de départ. De par la relative richesse en matériel génétique d’une empreinte de foie (prélèvements FLPc), et la relative pauvreté d’un écouvillon cloacal (prélèvements FLP), nous pouvons supposer que la prévalence d’excrétion du CoHV-1 (FLP) est légèrement sous-estimée par rapport au portage théorique (FLPc).

Notons ensuite qu’aucun pigeon sauvage n’est clairement positif avec la PCRq, malgré le grand nombre d’animaux prélevés. Ceci peut s’expliquer par un biais de sélection des animaux échantillonnés. En effet, lors de la capture, seuls les animaux dont l’état clinique permet l’envol rapide sont potentiellement capturés. Ainsi, les jeunes souffrant de YPDS ou les adultes en phase clinique d’herpesvirose peuvent être moins sujet à la capture. De plus, il est possible que la pression d’infection dans la population sauvage soit beaucoup plus faible qu’en élevage confiné : en effet, dans la nature, l’animal clinique s’isolera et les contacts avec ses congénères seront limités. Ajoutons à cela le stress chronique et l’immunodépression potentielle engendrés par les conditions de grande densité de population, qui peuvent permettre « une surexpression, une sur-excrétion et une sur-réceptivité » relative du CoHV-1, augmentant le risque de transmission horizontale dans les populations de pigeons captifs.

L'hypothèse de l'absence de circulation (ou très faible circulation) du CoHV-1 dans les populations de pigeons sauvages dans la région étudiée est également à envisager. D'après les dires de fauconniers chassant régulièrement du pigeon dans la région depuis une dizaine d'année, aucun faucon n'est décédé d'herpesvirose. Le risque d'introduction du CoHV-1 dans les populations de pigeons sauvages à partir des pigeons importés est à envisager. Une étude sérologique aurait été très intéressante.

e. Analyse du risque : discussion

D'après l'analyse des résultats obtenus, deux sources principales de contamination du faucon F13M00184 sont avancées :

- Une contamination par ingestion de proie infectée et contenant du virus infectant à la dose suffisante, à cause des pigeons congelés fournis régulièrement au centre ECWP ; cependant, aucun autre cas d'hépatite herpétique n'est à déploré depuis plus de 10 ans;
- Une contamination préalable au centre d'entraînement de fauconnerie de Zaida, et la mise en place d'un portage asymptomatique et développement foudroyant de la maladie pour une raison inconnue.

Une contamination par voie oro-urofécale par l'intermédiaire de la faune sauvage ne peut être exclue, mais semble cependant moins probable.

Une infection de ce faucon par toute autre contamination accidentelle impliquant le personnel technique ne nous semble pas pertinente dans notre cas.

Ainsi, bien qu'intéressante d'un point de vue nutritionnel et financier, l'utilisation de pigeons dans le régime alimentaire des faucons aussi bien de reproduction que de fauconnerie doit être à tout prix évité en l'absence de connaissance du statut infectieux concernant le CoHV-1. De plus, les pigeons peuvent être porteurs de nombreux autres pathogènes transmissibles aux faucons (PMV-1, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas* spp. ...).

CONCLUSION

Le CoHV-1 est un virus retrouvé fréquemment dans les populations de pigeons domestiques. Il peut causer chez les falconiformes une hépatosplénite fatale. La contamination des faucons par ingestion de pigeons infectés est la voie privilégiée de transmission du CoHV-1 entre ces oiseaux.

Trois cas d'infection par le CoHV-1 ont été mis en évidence chez 3 faucons gerfaut femelles dans le Centre ECWP d'Oum Jniba en juin 2015. Pour la première fois, une contamination entre faucon est fortement suspectée, deux des faucons ayant consommé en partie le premier de leur congénère décédé quelques heures auparavant. La confirmation de ces cas d'herpesvirose au CoHV-1 par les techniques biomoléculaires a été possible.

Des techniques de PCR nichée consensus, de PCR spécifique au CoHV-1 et l'élaboration d'un protocole de PCR quantitative ont été mises en œuvre et ont permis de réaliser une étude de prévalence du CoHV-1 dans l'élevage de faucons reproducteurs, mais aussi dans différentes populations de pigeons de la région, aussi bien captifs que sauvages. La sensibilité analytique de la PCRq est de 10 copies de génome par échantillon, tandis que sa spécificité est estimée à 100%.

Aucune trace de CoHV-1 n'a été mise en évidence dans les populations de faucons, gangas ou pigeons sauvages. La prévalence du CoHV-1 dans les populations de pigeons vivants captifs ou congelés importés d'Europe est d'environ 10%. Les séquences de CoHV-1 mises en évidence chez les 3 faucons sont identiques à un des pigeons captifs, tandis que chez 2 autres pigeons captifs, une séquence identique aux à celle des souches asiatiques de CoHV-1 a été mise en évidence.

Une contamination du premier faucon décédé par la consommation d'une proie infectée est l'hypothèse principale. Un portage asymptomatique du CoHV-1 ou une contamination oro-urofécale ne peuvent pas être exclus.

Même si le risque d'infection reste faible compte tenu des mesures de biosécurité et de l'alimentation des faucons, une alternative au pigeon comme proie est très fortement conseillée.

BIBLIOGRAPHIE

- AINI, I., SHIH, L. M., CASTRO, A. E. et ZEE, Y. C., 1993. Comparison of herpesvirus isolates from falcons, pigeons and psittacines by restriction endonuclease analysis. *Journal of Wildlife Diseases*. 1993. Vol. 29, n° 2, pp. 196-202.
- BERNABÉ, A., GÓMEZ, M. A., NAVARRO, J. A., GÓMEZ, S. et SÁNCHEZ, J., 1994. Herpesvirus hepatitis in pigeon in Spain. *An. Vet.(Murcia)*. 1994. Vol. 9, pp. 57-60.
- CARDOSO, Maria, HYATT, Alex, SELLECK, Paul, LOWTHER, Sue, PRAKASH, Vibhu, PAIN, Deborah, CUNNINGHAM, Andrew A. et BOYLE, David, 2005. Phylogenetic analysis of the DNA polymerase gene of a novel alphaherpesvirus isolated from an Indian Gyps vulture. *Virus Genes*. 2005. Vol. 30, n° 3, pp. 371-381.
- CORNWELL, H. J. C. et WEIR, Anne R., 1970. Herpesvirus infection of pigeons: III. Use of embryonated eggs for the growth and characterization of the virus. *Journal of comparative pathology*. 1970. Vol. 80, n° 4, pp. 509-515.
- CORNWELL, H. J. C., WRIGHT, N. G. et MCCUSKER, H. B., 1970. Herpesvirus infection of pigeons: II. Experimental infection of pigeons and chicks. *Journal of comparative pathology*. 1970. Vol. 80, pp. 229-232.
- CORNWELL, H. J. C. et WRIGHT, N. G., 1970. Herpesvirus infection of pigeons: I. Pathology and virus isolation. *Journal of comparative pathology*. 1970. Vol. 80, n° 2, pp. 221-227.
- DAVISON, Andrew J., EBERLE, Richard, EHLERS, Bernhard, HAYWARD, Gary S., MCGEOCH, Duncan J., MINSON, Anthony C., PELLETT, Philip E., ROIZMAN, Bernard, STUDDERT, Michael J. et THIRY, Etienne, 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology*. 2009. Vol. 154, n° 1, pp. 171-177.
- DAVISON, Andrew J, PELLETT, Phil et STEWART, James, 2015. *Rename species in the family Herpesviridae to incorporate a subfamily designation*. 2015. ICTV. Disponible à l'adresse : <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>
- DAVISON, Andrew J, 2005. *Taxonomic proposals from the Herpesviridae study group*. 2005. ICTV.
- DAVISON, Andrew J., 2010. Herpesvirus systematics. *Veterinary microbiology*. 2010. Vol. 143, n° 1, pp. 52-69.
- EHLERS, Bernhard, BORCHERS, Kerstin, GRUND, Christian, FROLLICH, Kai, LUDWIG, Hanns et BUHK, Hans-JoLrg, 1999. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus genes*. 1999. Vol. 18, n° 3, pp. 211-220.
- FREICK, Markus, MÜLLER, Hermann et RAUE, Rüdiger, 2008. Rapid detection of pigeon herpesvirus, fowl adenovirus and pigeon circovirus in young racing pigeons by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*. 2008. Vol. 148, n° 1-2, pp. 226-231.
- GAILBREATH, Katherine L. et OAKS, J. Lindsay, 2008. Herpesviral inclusion body disease in owls and falcons is caused by the pigeon herpesvirus (columbid herpesvirus 1). *Journal of wildlife diseases*. 2008. Vol. 44, n° 2, pp. 427-433.

- GRAHAM, D. L., MARE, C. J., WARD, F. P. et PECKHAM, M. C., 1975. Inclusion body disease (herpesvirus infection) of falcons (IBDF). *Journal of Wildlife Diseases*. 1975. Vol. 11, pp. 83-91.
- KALETA, E.F., 1990. Herpesviruses of birds - a review. *Avian Pathology*. 1990. Vol. 19, n° 2, pp. 193-211.
- KUNKLE, Robert A. et DUHAMEL, Gerald E., 1991. An outbreak of herpesvirus infection in a flock of ringed turtle doves (*Streptopelia risoria*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1991. Vol. 3, n° 1, pp. 93-95.
- MANSOUR, Shimaa M. G., ALI, Haytham, CHASE, Christopher C. L. et CEPICA, Arnost, 2015. Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of 18 World Organization for Animal Health (OIE) notifiable viral diseases of ruminants, swine and poultry. *Animal Health Research Reviews*. 2015. Vol. 16, n° 2, pp. 89-106.
- MARÉ, C. J. et GRAHAM, D. L., 1973. Falcon herpesvirus, the etiologic agent of inclusion body disease of falcons. *Infection and immunity*. 1973. Vol. 8, n° 1, pp. 118-126.
- MARÉ, C. J. et GRAHAM, David L., 1976. Pathogenicity and Host Range of the Falcon Herpesvirus. In : *Wildlife Diseases*. Springer US. pp. 471-482.
- MARLIER, D. et VINDEVOGEL, H., 2006. Viral infections in pigeons. *The Veterinary Journal*. 2006. Vol. 172, n° 1, pp. 40-51.
- MOZOS, E., HERVAS, J., MOYANO, T., DIAZ, J. et GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C., 1994. Inclusion body disease in a peregrine falcon (*Falco peregrinus*): histological and ultrastructural study. *Avian Pathology*. 1994. Vol. 23, n° 1, pp. 175-181.
- NOTOMI, Tsugunori, MORI, Yasuyoshi, TOMITA, Norihiro et KANDA, Hidetoshi, 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. 2015. Vol. 53, n° 1, pp. 1-5.
- PHALEN, Dn, HOLZ, P, RASMUSSEN, L et BAYLEY, C, 2011. Fatal columbid herpesvirus-1 infections in three species of Australian birds of prey. *Australian Veterinary Journal*. 2011. Vol. 89, n° 5, pp. 193-196.
- PINKERTON, Marie E., WELLEHAN JR, James FX, JOHNSON, April J., CHILDRESS, April J., FITZGERALD, Scott D. et KINSEL, Michael J., 2008. *Columbid herpesvirus-1* in two Cooper's hawks (*Accipiter cooperii*) with fatal inclusion body disease. *Journal of wildlife diseases*. 2008. Vol. 44, n° 3, pp. 622-628.
- POTGIETER, L. N. D., KOCAN, A. A. et KOCAN, K. M., 1979. Isolation of a herpesvirus from an American kestrel with inclusion body disease. *Journal of Wildlife Diseases*. 1979. Vol. 15, n° 1, pp. 143-149.
- RAMIS, A., MAJÓ, N., PUMAROLA, M., FONDEVILA, D., FERRER, L. et MAJO, N., 1994. Herpesvirus Hepatitis in Two Eagles in Spain. *Avian Diseases*. 1994. Vol. 38, n° 1, pp. 197.
- RAUE, Rüdiger, SCHMIDT, Volker, FREICK, Markus, REINHARDT, Brinja, JOHNE, Reimar, KAMPHAUSEN, Ludger, KALETA, Erhard F., MÜLLER, Hermann et KRAUTWALD-JUNGHANNS, Maria-Elisabeth, 2005. A disease complex associated with

pigeon circovirus infection, young pigeon disease syndrome. *Avian Pathology*. 2005. Vol. 34, n° 5, pp. 418-425.

RITCHIE, B. W., 1995. Herpesviridae. In : *Avian viruses: Function and Control*. Wingers Publishing.

ROSE, Nicole, WARREN, Amy L., WHITESIDE, Douglas, BIDULKA, Julie, ROBINSON, John H., ILLANES, Oscar et BROOKFIELD, Caroline, 2012. Case Report: Columbidae herpesvirus-1 mortality in great horned owls (*Bubo virginianus*) from Calgary, Alberta. *Can Vet J*. 2012. Vol. 53, pp. 265–268.

SAHOO, Pravas Ranjan, SETHY, Kamadev, MOHAPATRA, Swagat et PANDA, Debasis, 2016. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Veterinary World*. 2016. Vol. 9, n° 5, pp. 465-469.

SCHETTLER, Elvira, LANGGEMACH, Torsten, SÖMMER, Paul, STREICH, Jürgen et FRÖLICH, Kai, 2001. Seroepizootiology of selected infectious disease agents in free-living birds of prey in Germany. *Journal of Wildlife Diseases*. 2001. Vol. 37, n° 1, pp. 145–152.

SCHWERS, Anne, PASTORET, P.P., VINDEVOGEL, H., LEROY, P., AGUILAR-SETIEN, A. et GODART, M., 1980. Comparison of the effect of trisodique phosphonoformate on the mean plaque size of pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Journal of comparative pathology*. 1980. Vol. 90, pp. 625-633.

SCHWERS, Anne, VINDEVOGEL, H., LEROY, P. et PASTORET, P.P., 1981. Susceptibility of different strains of pigeon herpesvirus to trisodium phosphonoformate. *Avian Pathology*. 1981. Vol. 10, n° 1, pp. 23-29.

SMADEL, Joseph E., JACKSON, E. B. et HARMAN, J. W., 1945. A new virus disease of pigeons. I. Recovery of the virus. . 1945. Vol. 81, n° 4, pp. 385-398.

SPATZ, Stephen J., VOLKENING, Jeremy D. et ROSS, Teresa A., 2014. Molecular characterization of the complete genome of falconid herpesvirus strain S-18. *Virus Research*. 2014. Vol. 188, pp. 109-121.

STENZEL, T.A., PESTKA, D., TYKAŁOWSKI, B., ŚMIAŁEK, M. et KONCICKI, A., 2012. Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland. *Veterinary Record*. 2012. Vol. 171, n° 22, pp. 562-562.

TANTAWI, H. H., AL-ABDULLA, J. M., ABDUL-MOHAIMEN, N. et YONAN, M. S., 1981. Viral Encephalomyelitis of Pigeons. VI. Some Physico-Chemical Properties of the Virus and Extracted Viral DNA. *Avian Diseases*. 1981. Vol. 25, n° 2, pp. 272.

TANTAWI, H. H., FALLUJI, M. M. Al et SHEIKHLY, F. Al, 1979. Viral Encephalomyelitis of Pigeons: Identification and Characterization of the Virus. *Avian Diseases*. 1979. Vol. 23, n° 4, pp. 785.

TARELLO, W., 2011. Etiologic Agents and Diseases Found Associated with Clinical Aspergillosis in Falcons. *International Journal of Microbiology*. 2011. pp. 1-6.

THIRY, Etienne, VINDEVOGEL, Henri, LEROY, Pascal, PASTORET, Paul-Pierre, SCHWERS, Anne, BROCHIER, B., ANCIAUX, Y. et HOYOIS, P., 1983. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies virus, infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Veterinary Research*. 1983. Vol. 14, n° 3, pp. 239–245.

VANDEVANTER, Donald R., WARRENER, Paul, BENNETT, Lindsey, SCHULTZ, Emily R., COULTER, Silvija, GARBER, Richard L. et ROSE, Timothy M., 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1996. Vol. 34, n° 7, pp. 1666–1671.

VINDEVOGEL, H., DEBRUYNE, Hélène et PASTORET, P. P., 1985. Observation of pigeon herpesvirus 1 re-excretion during the reproduction period in conventionally reared homing pigeons. *Journal of comparative pathology*. 1985. Vol. 95, n° 1, pp. 105–112.

VINDEVOGEL, H., PASTORET, P. P., BURTONBOY, G., GOUFFAUX, M. et DUCHATEL, J. P., 1975. Isolement d'un virus herpès dans un élevage de pigeons de chair. In : *Annales de Recherches vétérinaires*. 1975. pp. 431–436.

VINDEVOGEL, H., PASTORET, P. P. et LEROY, P., 1982. Vaccination trials against pigeon herpesvirus infection (Pigeon herpesvirus 1). *Journal of comparative pathology*. 1982. Vol. 92, n° 4, pp. 483–494.

VINDEVOGEL, H. et PASTORET, P. P., 1981. Pathogenesis of pigeon herpesvirus infection. *Journal of comparative pathology*. 1981. Vol. 91, n° 3, pp. 415–426.

VINDEVOGEL, H., PASTORET, P.P. et AGUILAR-SETIEN, A., 1982. Assessment of phosphonoformate-treatment of pigeon herpesvirus infection in pigeons and budgerigars, and Aujeszky's disease in rabbits. *Journal of comparative pathology*. 1982. Vol. 92, pp. 177-180.

VINDEVOGEL, H. et PASTORET, P.P., 1980. Pigeon herpes infection: Natural transmission of the disease. *Journal of comparative pathology*. 1980. Vol. 90, pp. 409-413.

WARD, F. Prescott, FAIRCHILD, David G. et VUICICH, Jeanne V., 1971. Inclusion body hepatitis in a prairie falcon. *Journal of Wildlife Diseases*. 1971. Vol. 7, n° 2, pp. 120-124.

WERNERY, U., JOSEPH, S. et KINNE, J., 2001. An attenuated herpes vaccine may protect Gyr hybrids from fatal inclusion body hepatitis. A preliminary report. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 2001. Vol. 48, n° 10, pp. 727–732.

WOŹNIAKOWSKI, G., WENCEL, P. et SAMOREK-SALAMONOWICZ, E., 2014. Detection of CoHV-1 by loop-mediated amplification (LAMP). Application of LAMP for CoHV-1 incidence monitoring in domestic pigeons. *Letters in Applied Microbiology*. 2014. Vol. 59, n° 6, pp. 610-614.

WOŹNIAKOWSKI, Grzegorz J., SAMOREK-SALAMONOWICZ, Elżbieta, SZYMAŃSKI, Piotr, WENCEL, Piotr et HOUSZKA, Marek, 2013. Phylogenetic analysis of *Columbid herpesvirus-1* in rock pigeons, birds of prey and non-raptorial birds in Poland. *BMC veterinary research*. 2013. Vol. 9, n° 1, pp. 1.

ZHANG, Lijiao, LI, Zhanhong, LI, Shuang, HU, Xueying, SUN, Haigang, LI, Meixia, YANG, Xiuhuan, BAI, Runian et SU, Jingliang, 2015. Characterization of the first *Columbid herpesvirus-1* isolate from a hybrid meat-type pigeon flock in China. *Archives of Virology*. 2015. Vol. 160, n° 2, pp. 459-464.

ZHAO, Panpan, MA, Jian, GUO, Ying, TIAN, Li, GUO, Guangyang, ZHANG, Kexin et XING, Mingwei, 2015. Isolation and characterization of a herpesvirus from feral pigeons in China. *The Veterinary Journal*. 2015. Vol. 206, n° 3, pp. 417-419.

ZSIVANOVITS, Petra, FORBES, Niel A., ZVONAR, Laura Twedt, WILLIAMS, Michael R., LIERZ, Michael, PRUSAS, Christine et HAFEZ, Mohamed M., 2004. Investigation into the seroprevalence of falcon herpesvirus antibodies in raptors in the UK using virus neutralization tests and different herpesvirus isolates. *Avian Pathology*. 2004. Vol. 33, n° 6, pp. 599-604.

ANNEXES

ANNEXE 1

Figures issues de (Aini *et al.* 1993).

1	Echelle (ADN de bactériophage lambda par HindIII)
2	Pacheco's Herpesvirus de référence
3	<i>Amazona ochrocephala oratrix</i>
4	<i>Psittacus erithacus</i>
5	Pigeon herpesvirus de référence
6	<i>Columba livia</i> (D9006983)
7	<i>Columba livia</i> (D8900906)
8	<i>Falco mexicanus</i> (captif) (D8904689)
9	<i>Falco mexicanus</i> (sauvage) (D8904641)
10	Echelle (ADN de bactériophage lambda par HindIII)

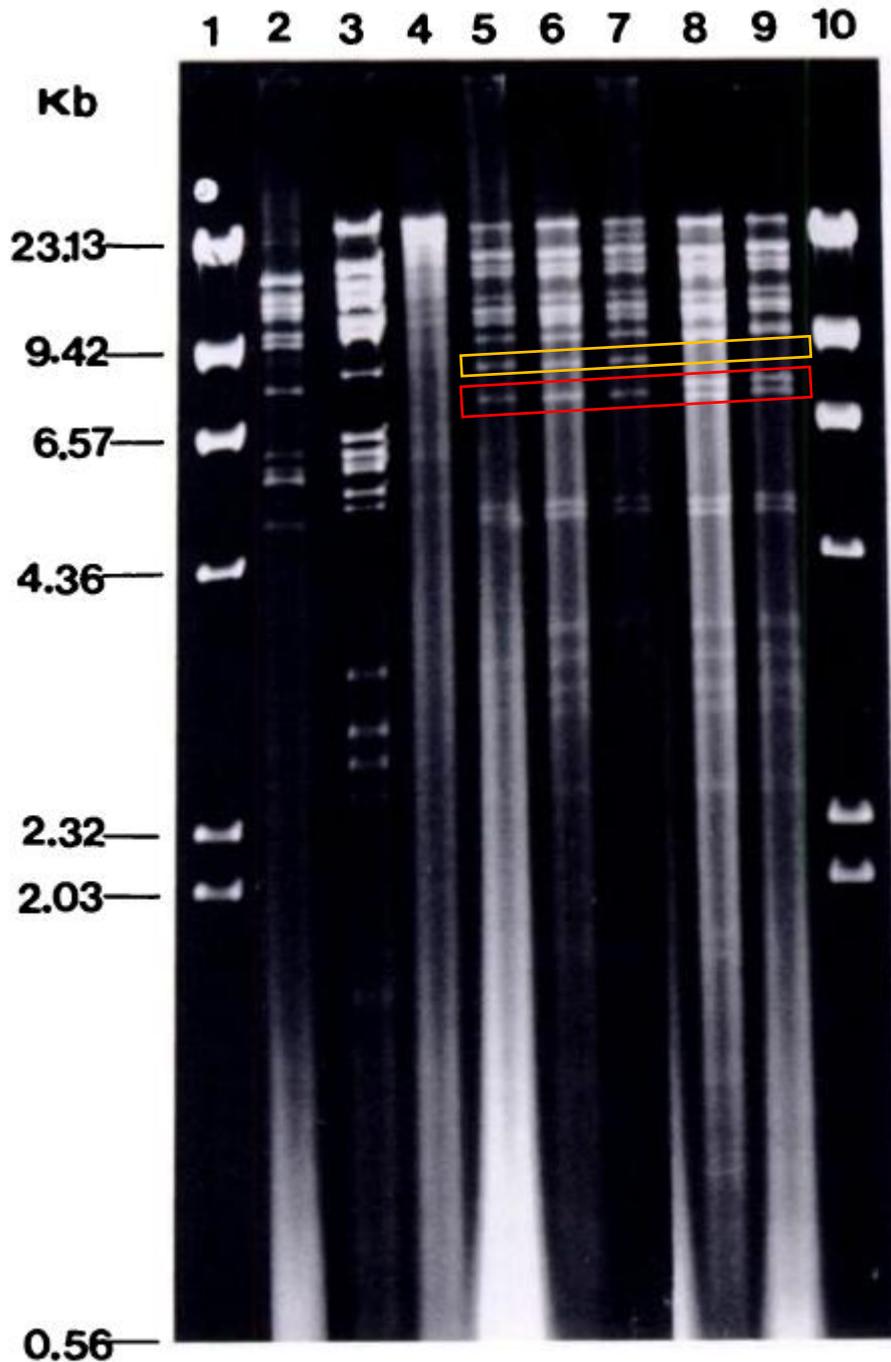


Figure 28: Résultat de la digestion des différents ADN par EcoRI. Les encadrés de couleur mettent en avant les fragments qui diffèrent entre les souches les virus de pigeons et de faucons. Encadré jaune : fragment d'environ 8.5 kb présent chez les herpesvirus de pigeons (référence + isolats) et non chez les faucons. Encadré rouge : fragment d'environ 8 kb présent chez les herpesvirus des faucons et non chez les pigeons (référence + isolats) (Aini *et al.* 1993).

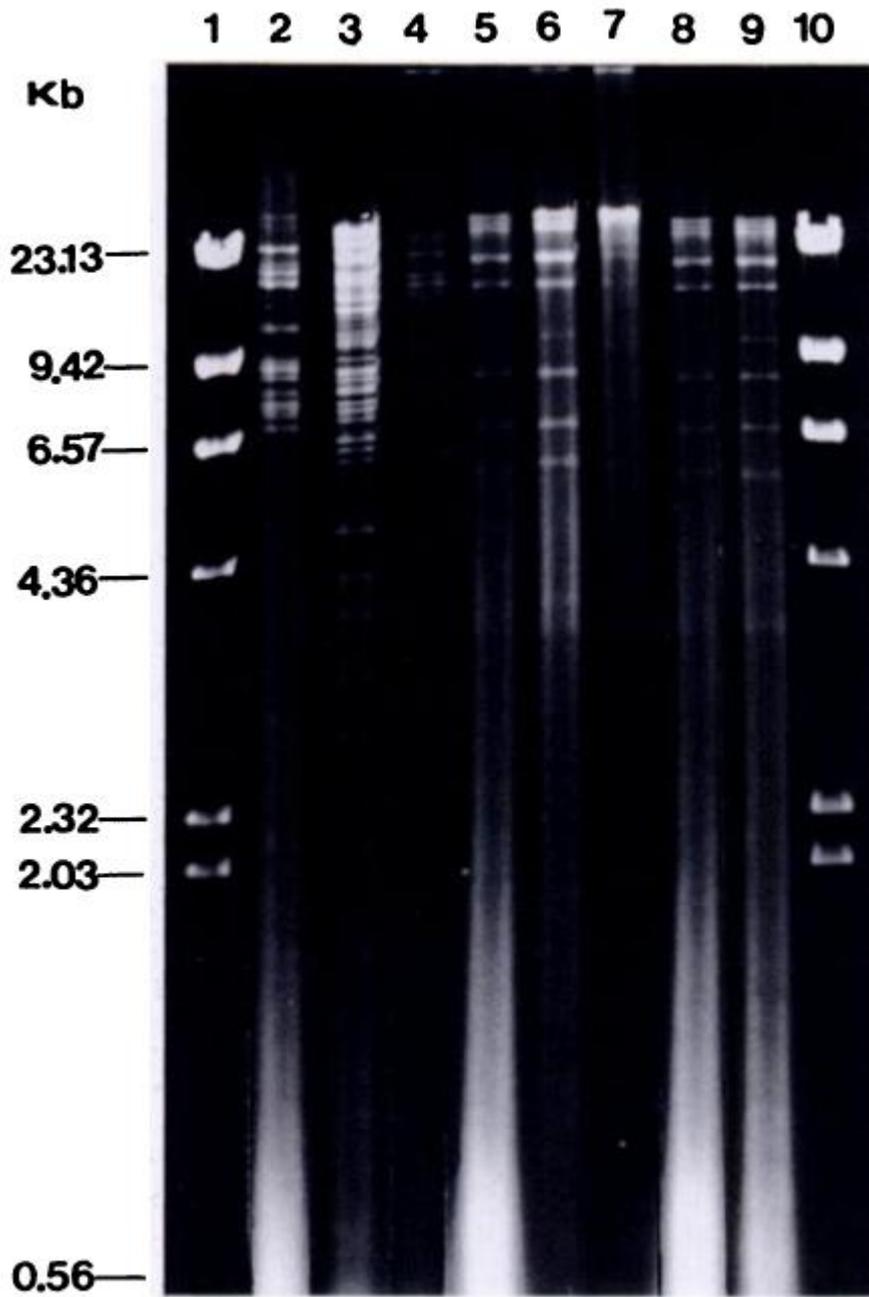


Figure 29 : Résultat de la digestion des différents ADN par HindIII. Les motifs des herpes de pigeons et faucons sont identiques, et bien différents des herpes de psittacidés (Aini *et al.* 1993).

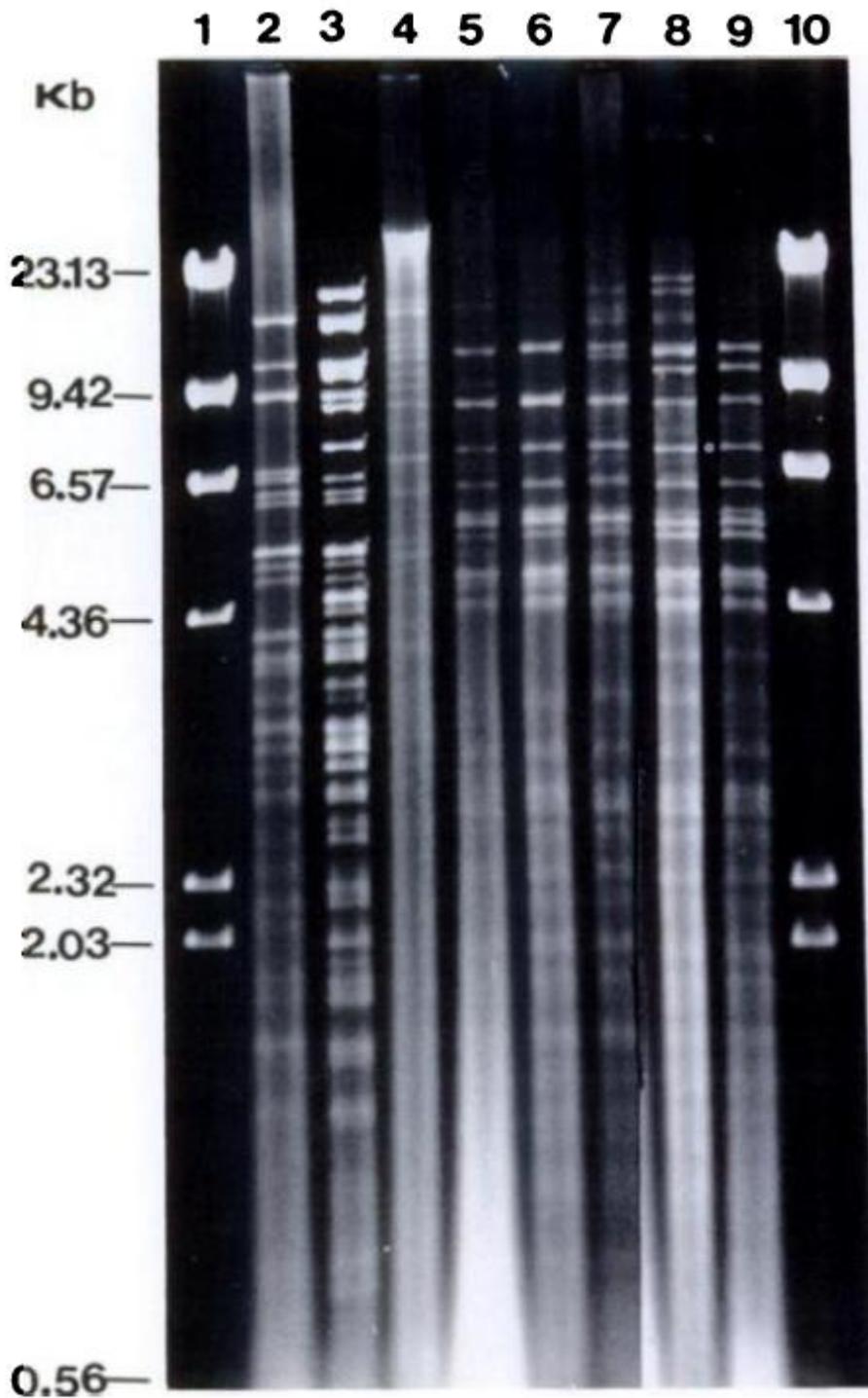


Figure 30 : Résultat de la digestion des différents ADN par PstI. Les motifs des herpes de pigeons et faucons sont identiques, et bien différents des herpes de psittacidés. De plus, les herpes de psittacidés semblent bien différer entre eux (Aini *et al.* 1993).

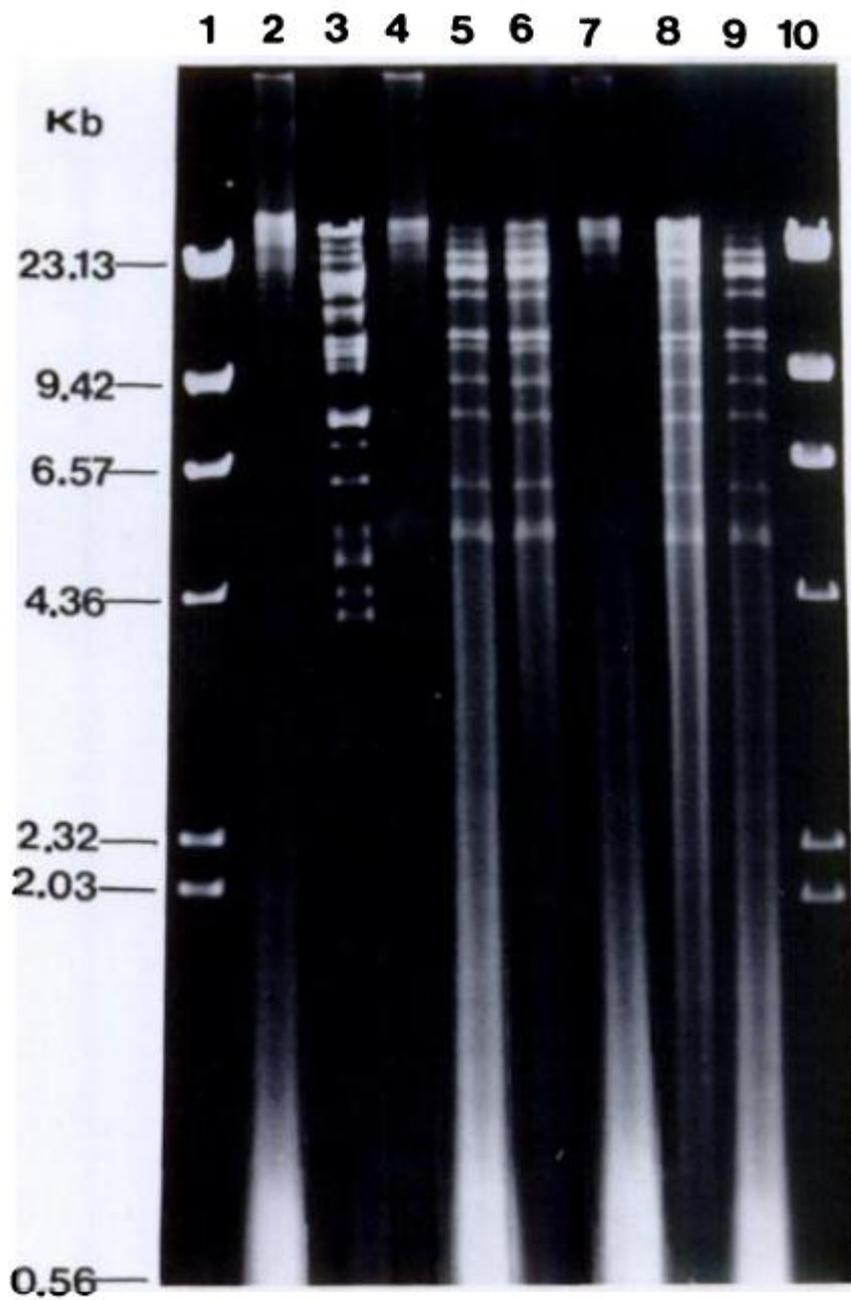
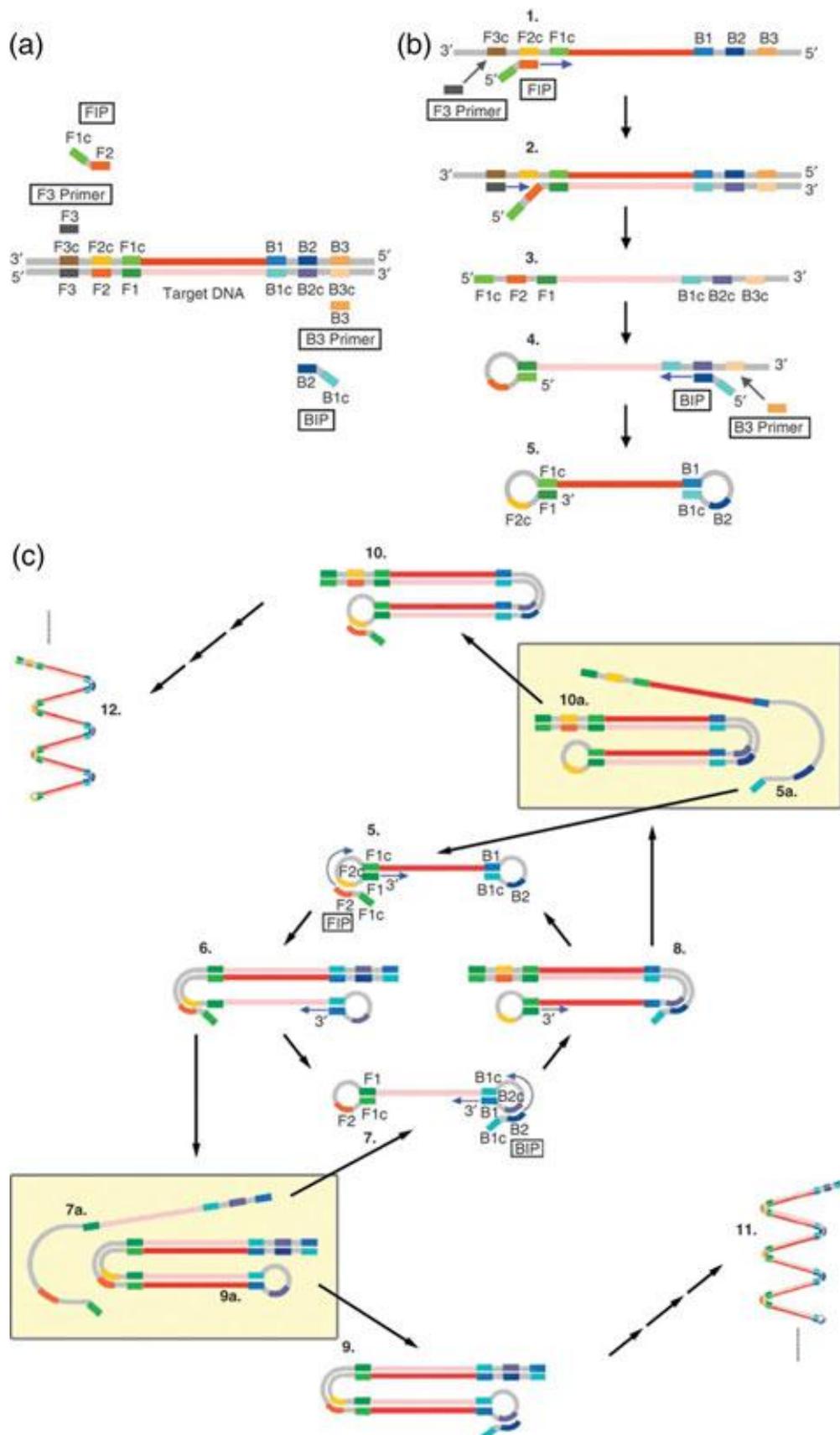


Figure 31 : Résultat de la digestion des différents ADN par XbaI. Les motifs des herpes de pigeons et faucons sont identiques, et bien différents des herpes de psittacids (*Aini et al.* 1993).

ANNEXE 2

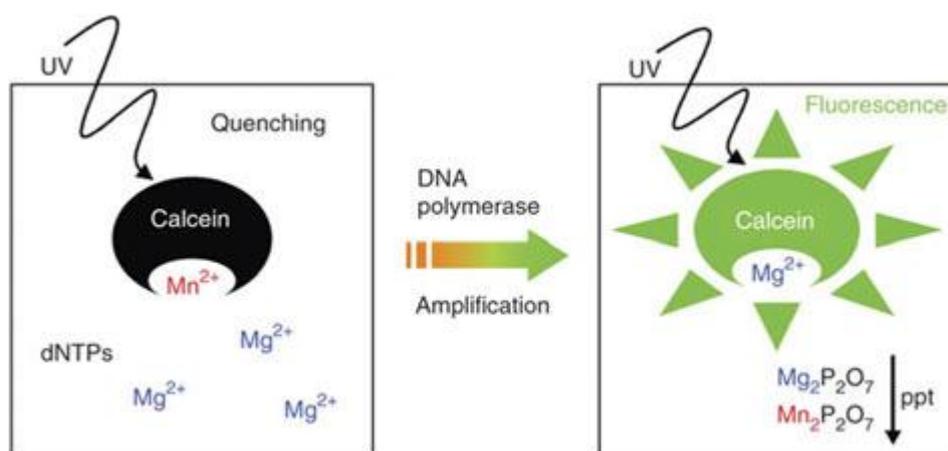
Extraits traduits de (Mansour *et al.* 2015)

Principe schématisé de la méthode LAMP (d'après (Mansour *et al.* 2015)).



(a) Amorces et séquences cibles. Les séquences cibles de l'extrémité 5' vers 3' sont notées F3, F2, F1, B1c, B2c et B3. Le -c signifie qu'il s'agit d'une séquence complémentaire (ex : F1c est complémentaire de F1). (b) Etape du démarrage de la méthode LAMP. La région F2 s'hybride à la région F2c du brin d'ADN ciblé pour initier l'élongation. L'amplification de l'ADN se déroule de la même manière avec le brin complémentaire et l'amorce BIP. Dans un second temps, l'amorce F3 s'hybride à la région F3c de l'ADN ciblé pour entamer une synthèse d'ADN avec déplacement du brin complémentaire déjà initialement synthétisé lors de la première étape. Le brin synthétisé à l'aide de FIP est alors remplacé et libéré. Ce brin libéré forme à son extrémité 3' une boucle (structure 3). Une synthèse d'ADN complémentaire de l'ADN monobrin de la même manière qu'expliqué précédemment permet la formation de la structure 5, qui possède une boucle à chaque extrémité (« dumbbell-like structure »=...). (c) Etape d'amplification cyclique.

Les techniques de révélation sont multiples : migration sur gel d'agarose (+Bromide d'ethidium), résultats immédiats (fluorescence verte aux UV, 302 nm) avec suivi quantitatif en temps réel (SYBR Green I...), ou encore à l'aide de Calceine acetoxyethyl ester (Fluorexon).



Description schématique de la méthode de détection par coloration de la calcéine des produits de LAMP (Mansour *et al.* 2015). La polymérisation lors de LAMP conduit à la formation de pyrophosphates qui se lient aux ions manganèses de la calcéine et aux ions magnésium du tampon pour combiner 2 méthodes de détection : une émission de fluorescence (« quenching » = extinction) de la calcéine, et/ou la production de phosphate de manganèse qui précipite. La présence d'ions magnésium dans la solution tampon permet une accentuation de la fluorescence.

Avantages	Inconvénients
Simple : aucun matériel couteux (bain-marie)	Accès aux réactifs limité

thermostaté) n'est nécessaire pour réussir à obtenir des quantités importantes d'une même copie (109-1010 copies en 15-30 min).	
Spécifique : la réaction d'amplification ne peut avoir lieu que si les 6 régions ciblées par les amorces sont présentes sur l'ADN présent dans l'échantillon.	Analyses multiplex limitées voire impossible
Sensibilité : comparable à la PCR. Elle semble cependant moins sujette aux interférences en présence d'un ADN non-ciblé ou de molécules inhibitrices.	Détermination/fabrication des amorces : logiciels spécifiques
Extraction optionnelle, efficace avec cartes FTA	Pas de contrôle interne d'une potentielle inhibition de la réaction
	Impossible de cloner les produits d'amplification

:

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LORENTE Fabien** intitulée « **Identification et étude de prévalence du *Columbid alphaherpesvirus-1* dans un élevage de faucons de chasse et dans des populations locales de pigeons au Maroc.**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 4 janvier 2017
Professeur Stéphane BERTAGNOLI
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



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

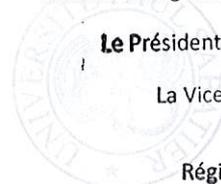



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



M. LORENTE Fabien
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 08/09/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL



Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRE-OBRECHT

LORENTÉ Fabien

IDENTIFICATION AND PREVALENCE OF *COLUMBID ALPHAHERPESVIRUS-1* IN CAPTIVE HUNTING FALCONS AND LOCAL PIGEON POPULATIONS IN MOROCCO.

Columbid alphaherpesvirus-1 (CoHV-1) whose domestic and wild pigeons are reservoirs presents a potential threat for falcons. CoHV-1 causes fatal hepatitis, so called inclusion body disease among falcons. In June 2015, 3 gyrfalcons from the Emirates Center for Wildlife Propagation captive flocks in Morocco were found dead. Postmortem and histopathological examinations indicated herpetic infection. This was confirmed by PCR tests and by analysis of obtained sequences. Those falcons were regularly fed with pigeons. An epidemiological study was thus performed to estimate prevalence of CoHV-1 in captive falcons as well as in captive pigeons used for falcons' feeding and wild pigeons living around the breeding station. To this end, cloacal swabs in living birds, and liver prints in dead frozen pigeons used to feed the falcons were tested by qPCR. All sampled falcons (n=101) and wild birds (pigeons: n=160; gangas: n=8) were negative whereas 7.8% domestic pigeons (7/90) and 9.7% of liver samples from frozen pigeons (3/31) were positive. The sequence of a positive sample was identical to the sequences of the 3 dead falcons and the FaHV-1 S18 (KJ668231.1). The sequence of two positive samples was identical to the sequences of Asian strain of CoHV-1. To our knowledge, this is the first report of CoHV-1 in both falcon and pigeon in Northern Africa.

Key words: Falcon, pigeon, PCR, qPCR, herpesvirus, Morocco, wild, captive, breeding.

IDENTIFICATION ET ETUDE DE PREVALENCE DU *COLUMBID ALPHAHERPESVIRUS-1* DANS UN ELEVAGE DE FAUCONS DE CHASSE ET DANS DES POPULATIONS LOCALES DE PIGEONS AU MAROC.

Le *Columbid alphaherpesvirus-1* (CoHV-1), présent dans les populations de pigeons, est un danger potentiel pour les faucons. Le CoHV-1 provoque une hépatosplérite foudroyante, aussi appelée maladie des corps d'inclusion, chez les falconiformes. En Juin 2015, trois faucons Gerfaut issus de l'élevage de l'Emirates Center for Wildlife Propagation au Maroc sont retrouvés morts. L'autopsie et l'examen histopathologique sont en faveur d'une infection par un herpesvirus. Cette hypothèse a été confirmée par tests PCR et séquençage des amplicons. Ces trois faucons étaient régulièrement nourris avec des pigeons. Le premier faucon a été en partie consommé par ses deux congénères peu après sa mort. Une étude de prévalence du CoHV-1 a été réalisée sur les faucons du Centre ECWP et dans plusieurs populations captives et sauvages de pigeons en lien épidémiologique avec les rapaces. Pour cela, des écouvillons cloacaux pour les oiseaux vivants, et des empreintes de foie pour les pigeons congelés ont été testés par PCRq. Aucun des faucons (n=101) et oiseaux sauvages (pigeons : n=160, gangas : n=8) prélevés n'était positif, contrairement à 7.8% (7/90) des pigeons captifs utilisés pour l'entraînement, et 9.8% (3/31) des foies de pigeons congelés. La séquence d'un échantillon positif était identique à la séquence identifiée chez les trois faucons décédés et au FaHV-1 S18 (KJ668231.1). La séquence de deux échantillons positifs était identique à la séquence de souches asiatiques de CoHV-1. A notre connaissance, il s'agit de la première mise en évidence simultanée du CoHV-1 chez des pigeons et des faucons en Afrique du Nord.

Mots-clés : Faucon, pigeon, PCR, PCRq, virus, herpesvirus, Maroc, captif, sauvage, élevage.