



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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25412

To cite this version:

Barategui, Claudine . *Étude épidémiologique du virus de l'influenza aviaire et du virus de la maladie de Newcastle chez l'avifaune sauvage aux Émirats Arabes Unis*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 104 p.

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

ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DU VIRUS DE L'INFLUENZA AVIAIRE ET DU VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE CHEZ L'AVIFAUNE SAUVAGE AUX EMIRATS ARABES UNIS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

BARATEGUI Claudine
Née, le 14 mai 1992 à PERPIGNAN (66)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Stéphane BERTAGNOLI

M. Guillaume LE LOC'H

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

M. Julien HIRSCHINGER

Doctorant en thèse universitaire à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

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 **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- 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. **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*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

- Mme **BORDE DORE Laura**, *Médecine interne des équidés*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités de Toulouse, Praticien Hospitalier au CHU de Toulouse

Service de Virologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie infectieuse

Qui m'a fait l'honneur d'encadrer et de diriger ce travail,

Pour ses conseils et sa disponibilité, toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur Guillaume LE LOC'H

Maitre de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Médecine zoologique et santé de la faune sauvage

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse,

Mes remerciements les plus sincères et respectueux.

A Monsieur Julien HIRSCHINGER

Doctorant en thèse universitaire à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Service Interactions Hôtes – Agents Pathogènes

Qui a permis la réalisation de ce travail,

Pour son aide et sa patience, mes remerciements les plus sincères.

Table des matières

Liste des figures	9
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
Partie 1: Etude bibliographique	15
I. Le virus de l'Influenza aviaire	15
1. Propriétés du virus	15
2. Signes cliniques chez les oiseaux	17
3. Moyens diagnostiques	19
4. Portage du virus de l'Influenza aviaire par l'avifaune sauvage	21
II. Le virus de la maladie de Newcastle	23
1. Propriétés du virus	23
2. Signes cliniques chez les oiseaux	23
3. Moyens diagnostiques	24
4. Portage du virus de la maladie de Newcastle par l'avifaune sauvage	26
III. Contexte épidémiologique au Moyen Orient face au virus Influenza aviaire et au virus de la maladie de Newcastle	27
1. Importance de la réalisation d'études épidémiologiques au Moyen Orient	27
2. Situation épidémiologique du Moyen Orient	31
IV. Données biologiques et épidémiologiques des espèces d'oiseaux incluses dans l'étude expérimentale	35
1. Connaissances sur la transmission du virus de l'Influenza aviaire et du virus de la maladie de Newcastle par l'avifaune sauvage	35
2. Oiseaux de la famille des Passéridés	37
3. Oiseaux de la famille des Colombidés	41
4. Francolin gris (<i>Francolinus pondicerianus</i>)	47
Partie 2: Etude expérimentale	51
I. But de l'étude	51

II. Présentation des échantillons.....	51
1. Prélèvements	51
2. Stockage et expédition	54
III. Matériels et méthodes	55
1. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	55
2. RT-PCR quantitative et RT-PCR conventionnelle (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	56
3. Analyses statistiques	63
IV. Résultats.....	64
1. Résultat des tests ELISA	64
2. Résultats des tests PCR	66
V. Discussion	73
Conclusion.....	77
Bibliographie.....	79
Annexes.....	91
Annexe 1 : protocole du kit ID Screen® Influenza A AntibodyCompetition Multi- species	92
Annexe 2 : protocole du kit ID Screen® Newcastle Disease Competition.....	94
Annexe 3 : extrait du tableau référençant pour chaque oiseau son espèce, son âge, le site de prélèvement et les résultats des tests sérologiques	96
Annexe 4 : extrait du tableau référençant tous les oiseaux prélevés pour l'étude moléculaire et la composition de chaque pool	97
Annexe 5 : protocole d'extraction d'ARN à partir du kit cador® Pathogen 96 QIAcube® HT.....	98
Annexe 6 : extrait du tableau référençant les oiseaux prélevés plusieurs fois avec les résultats des tests sérologiques	102
Annexe 7 : Protocole d'extraction de l'ADN à partir d'un gel grâce au kit QIAquick® Gel Extraction	103

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Virus de l’Influenza aviaire : schéma et micrographie électronique (Whitworth et al., 2010).....	16
Figure 2 : Le virus de l’Influenza aviaire au Moyen Orient (Al-Azemi et al., 2008 ; Lu et al., 2010 ; Nagy et al., 2017 ; Williams, Peterson, 2009)	32
Figure 3 : Le virus de la maladie de Newcastle au Moyen Orient en 2017 (OIE).....	34
Figure 4 : Distribution du Moineau domestique dans le monde (del Hoyo et al., 2009)	37
Figure 5: Moineau domestique mâle (Ravi, 2011).....	38
Figure 6 : Distribution du Bulbul à oreillons blancs dans le monde (del Hoyo et al., 2005)...	39
Figure 7: Bulbul à oreillons blanc (Goyal, 2014).....	40
Figure 8 : Distribution de la Tourterelle turque dans le monde (del Hoyo et al., 1997)	42
Figure 9 : Tourterelle turque (Rønning, 2010).....	42
Figure 10: Distribution de la tourterelle maillée dans le monde(del Hoyo et al., 1997).....	43
Figure 11 : Tourterelle maillée (Dupont, 2015)	44
Figure 12: Distribution du pigeon biset dans le monde (Lepage, 2018)	45
Figure 13: Pigeon biset (Hulbert, 2017).....	46
Figure 14: Distribution du Francolin gris dans le monde (del Hoyo et al., 1994)	48
Figure 15: Francolin gris (Kasambe, 2017)	48
Figure 16: Analyse moléculaire phylogénétique des séquences génétiques de PMV-1.	71
Figure 17 : séquences en acides aminés issues des séquences du gène de fusion F de PMV-1 isolées à partir des souches identifiées dans l’étude.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : nombre de prises de sang réalisées par espèce et nombre d'individus prélevés par espèce	53
Tableau 2 : nombre d'écouvillonnages et d'autopsies réalisés par espèce.....	53
Tableau 3 : composition du mix pour un puits.....	57
Tableau 4 : conditions de la RT-PCRq.....	58
Tableau 5 : composition du mix amorces + sonde	58
Tableau 6 : composition du mix pour un puits.....	59
Tableau 7 : conditions de la RT-PCRq.....	59
Tableau 8 : <i>composition du mix pour un puits</i>	60
Tableau 9 : <i>conditions de la RT-PCR conventionnelle</i>	60
Tableau 10 : composition du mix pour un puits.....	62
Tableau 11 : conditions de la RT-PCR conventionnelle	62
Tableau 12: résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus Influenza aviaire	64
Tableau 13 : résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus de l'Influenza aviaire par site de prélèvement.....	64
Tableau 14 : résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle	65
Tableau 15 : résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle par site de prélèvement.....	66
Tableau 16 : prévalences réelles des pools à partir de la RT-PCR quantitative.....	67
Tableau 17 : Cycles seuils (Ct) moyens des témoins positifs et des échantillons obtenus par RT-PCR quantitative pour le virus de l'Influenza aviaire et pour le virus de la maladie de Newcastle	67
Tableau 18 : Charge virale moyenne des échantillons calculée à partir des valeurs des cycles seuils moyens.	69

LISTE DES ABREVIATIONS

EAU : Emirats Arabes Unis

IFHC : International Fund for Houbara Conservation

NARC : National Avian Research Center

SKHBC-AD : Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center – Abu Dhabi

IHA : inhibition à l'hémagglutination

PASDOM : *Passer domesticus*

PYCTIS : *Pycnonotus leucotis*

STRDEC : *Streptopelia decaocto*

STRSEN : *Spilopelia senegalensis*

COLLIV : *Columba livia*

FRAPON : *Francolinus pondicerianus*

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

OR : Odd Ratio

Introduction

Les deux dernières décennies ont vu apparaître de nombreuses maladies infectieuses (Daszak, 2000 ; Jones et al., 2008 ; Loh et al., 2015). Ces maladies infectieuses émergentes affectent les populations animales domestiques et sauvages mais aussi l'homme, les deux-tiers de ces maladies étant des zoonoses (Jones et al., 2008 ; Loh et al., 2015). Elles ont donc un impact majeur d'un point de vue économique et sanitaire.

Le virus de l'Influenza aviaire et le virus de la maladie de Newcastle sont connus et étudiés depuis longtemps. Les volailles, population domestique sensible à ces virus et en contact direct avec l'homme, ont fait l'objet de nombreuses études portant sur le portage et l'excrétion de ces virus (Mohran et al., 2011 ; Leventhal et al., 2013 ; Shekaili et al., 2015a ; Nagy et al., 2017). Le rôle de l'avifaune sauvage, fortement suspecté dans la transmission de virus aviaires aux populations domestiques, est maintenant le sujet principal des dernières études. En effet, l'avifaune sauvage jouerait un rôle clé en représentant un bassin zoonotique (Daszak, 2000) et une surveillance s'avère donc nécessaire afin de comprendre son implication exacte et de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle adaptées (Loh et al., 2015).

Depuis quelques années, de nombreuses études se sont penchées sur l'interaction entre les populations sauvages et domestiques et la transmission de virus aviaires (Tian et al., 2015 ; Keawcharoen et al., 2011 ; Abolnik, 2014 ; Cappelle et al., 2015 ; Devlin et al., 2016). Les oiseaux d'eau appartenant à l'ordre des Ansériformes et des Charadriiformes sont considérés comme espèces réservoirs du virus de l'Influenza aviaire et du virus de la maladie de Newcastle (Alexander, 2000 ; Causey, Edwards, 2008 ; Caron et al., 2014 ; Cappelle et al., 2015) et leur rôle dans la transmission des virus aux oiseaux d'élevage est fortement suspecté. Cependant, les élevages de volailles sont rarement proches de l'habitat de ces oiseaux migrateurs, mettant à mal cette hypothèse.

La sensibilité aux virus de l'Influenza aviaire et de la maladie de Newcastle ainsi que leur excrétion ont été démontrées chez l'avifaune sauvage autre que oiseaux d'eau à de nombreuses reprises, en laboratoire et sur le terrain (Cross, 1995 ; Silva et al., 2006 ; Boon et al., 2007 ; Brown et al., 2009 ; Forrest et al., 2010 ; Thinh et al., 2012 ; Assam et al., 2014). Les sites d'élevage abritent de nombreuses espèces d'oiseaux résidentes, qui y trouvent nourriture et refuge. C'est ainsi qu'est apparue la notion d'espèces relais désignant des espèces sensibles au virus en contact à la fois avec les oiseaux domestiques et les oiseaux

d'eau réservoirs (Caron et al., 2014). Elles pourraient ainsi représenter le chaînon manquant dans la transmission de virus.

Notre étude a été réalisée aux Emirats Arabes Unis (EAU), au sein d'élevages conservatoires d'outardes houbara (*Chlamydotis macqueenii*). Ces élevages ont été mis en place par l'International Fund for Houbara Conservation (IFHC) à partir de 1977. Il s'agit d'un programme commun à plusieurs pays du Moyen Orient, d'Afrique du nord et d'Asie centrale dont le but est de soutenir les populations sauvages d'outardes houbara par des relâchés conservatoires. En effet, l'Outarde houbara est une espèce sur la liste rouge des espèces en voie de disparition et présente en Annexe 1 de la convention sur le commerce international des espèces menacées d'extinction (CITES). Deux sites ont fait partie de l'étude : le National Avian Research Center (NARC) et le Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center – Abu Dhabi (SKHBC-AD).

L'étude porte sur six espèces résidentes, retrouvées abondamment autour d'élevages conservatoires d'outardes houbara (*Chlamydotis macqueenii*): le Moineau domestique (*Passer domesticus*), le Bulbul à oreillons blancs (*Pycnonotus leucotis*), la Tourterelle turque (*Streptopelia decaocto*), la Tourterelle maillée (*Spilopelia senegalensis*), le Pigeon biset (*Columba livia*) et le Francolin gris (*Francolinus pondicerianus*). Ces espèces font parties de familles reconnues comme espèces relais (Caron et al., 2014).

Le but est de connaître les prévalences du virus de l'Influenza aviaire et du virus de la maladie de Newcastle chez ces espèces. Il s'inscrit dans un projet de plus grande ampleur dont le but est de comprendre la transmission de virus aviaires des oiseaux sauvages aux élevages afin de mettre en place des mesures adaptées pour éviter cette transmission.

Partie 1: Etude bibliographique

I. Le virus de l'Influenza aviaire

1. Propriétés du virus

a) Classification

Le virus de l'Influenza aviaire est un *Influenza virus A* de la famille des *Orthomyxoviridae* (Whitworth et al., 2010 ; ANON., 2002). L'Influenza aviaire fait partie de la liste des maladies réglementées en France. Les sous-types H5 et H7 ainsi que tout virus Influenza A hautement pathogène (indice de pathogénie supérieur à 1,2) sont considérés comme danger sanitaire de première catégorie (OIE, The Center for Food Security and Public Health, 2016) et soumis à déclaration obligatoire.

b) Morphologie

Il s'agit d'un virus enveloppé de 80 à 120 nm de diamètre. Il comprend huit segments d'ARN monobrans négatifs codant pour dix protéines virales : deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine et la neuraminidase, deux protéines de matrice M1 et M2, une nucléoprotéine NP, un complexe polymérase constitué de trois protéines PA, PB1, PB2, une protéine non structurale NS1 et une protéine de transport NS2 (Rutvisuttinunt et al., 2013). Le génome a une taille totale de 13.6 kilobases (Rutvisuttinunt et al., 2013). La surface externe est recouverte de glycoprotéines virales ayant une activité hémagglutinante et de fusion, noté HA, ou une activité neuraminidase, notée N (Figure 1). La glycoprotéine HA, et dans une moindre mesure la glycoprotéine N, sont les cibles de la réponse immunitaire. Les différents sous-types du virus se caractérisent par la combinaison d'une hémagglutinine et d'une neuraminidase. Il existe au sein de l'espèce *Influenza A* dix-huit hémagglutinines et onze neuraminidases différentes (Liu et al., 2018). Il y a généralement peu ou pas de protection croisée entre les sous-types. Chaque sous-type comprend plusieurs souches qui diffèrent par mutation, recombinaison ou réarrangement de gènes (Whitworth et al., 2010).

Pour nommer une souche du virus de l'Influenza aviaire, on utilise la nomenclature officielle qui comprend : l'espèce virale de l'Influenza, l'espèce hôte à partir de laquelle la souche a été isolée, l'origine géographique, le numéro de référence désigné par le laboratoire, l'année d'isolement et le sous-type du virus. Par exemple, la souche H9N2 détectée dans une étude aux Emirats Arabes Unis entre 2000 et 2003 était très proche de la souche A/Quail/Hong Kong/G1/97 (H9N2): c'est-à-dire un virus Influenza A de sous-type H9N2 isolé chez la caille à Hong Kong en 1997 (Aamir et al., 2007).

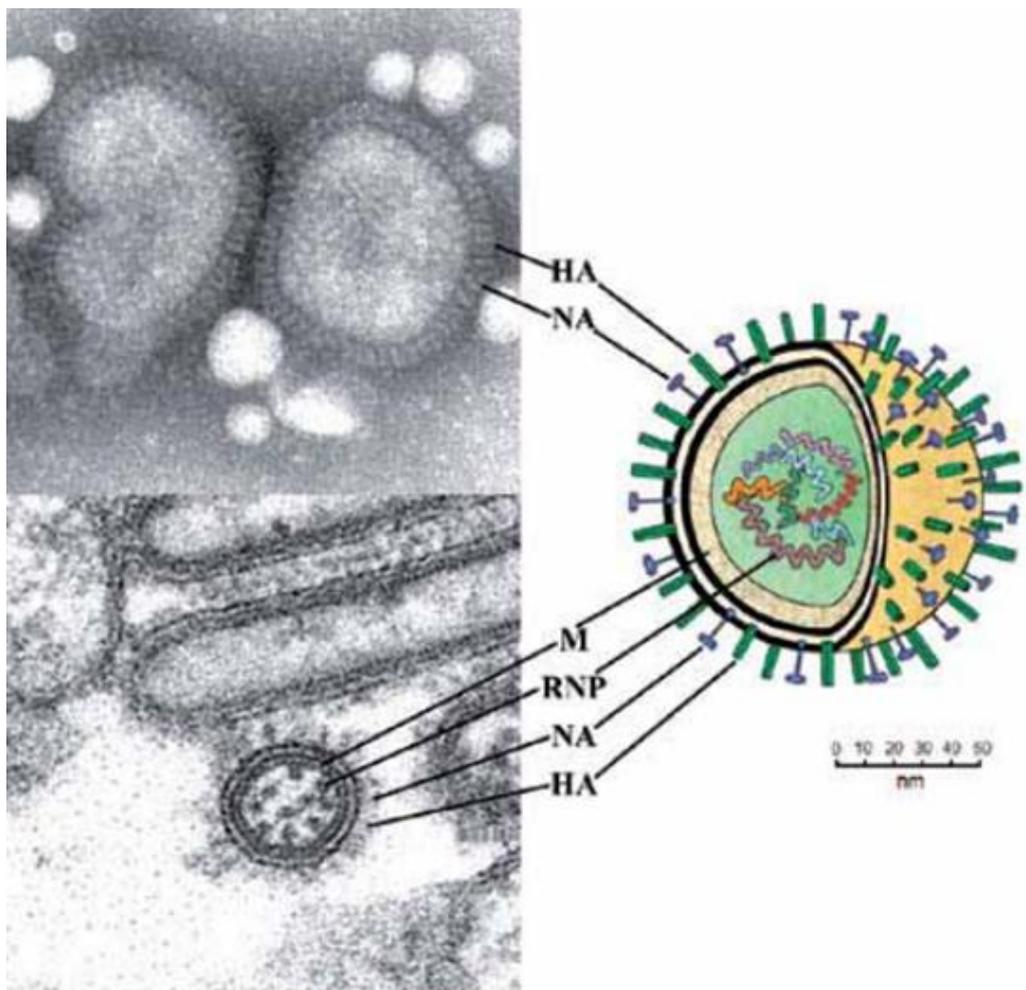


Figure 1 : Virus de l'Influenza aviaire : schéma et micrographie électronique (Whitworth et al., 2010)
HA : glycoprotéine à activité hémagglutinante ; NA : glycoprotéine à activité neuraminidase ; M : matrice ;
RNP : ribonucléoprotéine

c) Propriétés biologiques

La transmission du virus a lieu par contact direct avec un individu infecté ou par contact indirect via les sécrétions respiratoires ou une contamination fécale (Whitworth et al., 2010). La survie du virus dans l'environnement dépend de l'humidité, de la température et de la salinité. Il peut survivre plusieurs mois dans un habitat frais et humide, environnement souvent fréquenté par les oiseaux d'eau, principaux hôtes du virus de l'Influenza aviaire. Dans des fèces, le virus peut survivre jusqu'à 105 jours (OIE, 2012).

2. Signes cliniques chez les oiseaux

a) Signes cliniques chez les volailles

La virulence de la souche dépend de l'hémagglutinine, selon les acides aminés présents au niveau du site de clivage. Jusqu'à présent, seuls deux sous types ont généré par mutation dans la région du site de clivage des souches hautement pathogènes pour les volailles: H5 et H7. On peut aussi définir une souche hautement pathogène par son indice de pathogénie après inoculation intraveineuse du virus qui sera supérieur à 1.2 (OIE, 2015).

Lorsqu'une volaille domestique est infectée par un virus Influenza aviaire faiblement pathogène, elle peut répondre de différentes façons. Soit la réponse immunitaire de l'hôte répond efficacement à l'infection et permet l'élimination du virus, soit il y a un échappement à la réponse immunitaire et une adaptation à l'hôte par réassortiment lors de co-infections ou par glissement antigénique. Dans le cas des virus H5 et H7, les mutations successives peuvent entraîner l'apparition de souches hautement pathogènes (OIE, The Center for Food Security and Public Health, 2016).

- Souches faiblement pathogènes

On observe une infection sub-clinique à modérée. Les poulets présentent des signes respiratoires, entériques et reproductifs bénins (OIE, The Center for Food Security and Public Health, 2016). On note une réduction de l'activité, de l'appétit et de la consommation d'eau, une diminution de la production et de la qualité des œufs. Les signes respiratoires se manifestent par de la toux, des éternuements et du jetage. Ils peuvent aussi avoir de la diarrhée et des signes neurologiques (tremblements). Les gibiers (faisans, cailles) peuvent

présenter les mêmes symptômes ou une forme asymptomatique de la maladie. De la même façon, les canards présentent des formes le plus souvent sub-cliniques, avec parfois une sinusite.

- Souches hautement pathogènes

L'infection provoque une maladie sévère chez le poulet et la dinde. On observe une atteinte importante de l'état général avec un œdème de la tête, une cyanose de la crête, des barbillons et de l'extrémité des pattes, des troubles respiratoires, digestifs et parfois nerveux. Les oiseaux meurent en un à deux jours avec une mortalité supérieure à 75%. Il n'y a aucun signe pathognomonique.

L'infection peut être asymptomatique, modérée ou sévère chez les autres oiseaux. Chez les gibiers, on observe de l'anorexie, une léthargie, des signes neurologiques et une mort rapide. Les gibiers d'eau domestiques présentent une infection modérée, mais on peut observer des signes respiratoires, de la diarrhée et une augmentation de la mortalité.

b) Signes cliniques chez l'avifaune sauvage

L'infection a été confirmée chez au moins 105 espèces (Śmietanka et al., 2012). Elle est particulièrement commune chez les oiseaux de l'ordre des Anseriformes (canards, oies, cygnes), des Charadriiformes et dans une moindre mesure des Passeriformes (OIE, The Center for Food Security and Public Health, 2016 ; Caron et al., 2014 ; Alexander, 2000 ; Causey, Edwards, 2008).

- Souches faiblement pathogènes

La majorité des oiseaux sauvages ne présentent pas de signes cliniques suite à l'infection (Śmietanka et al., 2012). Il a parfois été observé une diminution des capacités de recherche de nourriture et de migration.

- Souches hautement pathogènes

Les oiseaux sauvages peuvent être affectés par le virus mais la sensibilité à l'infection et l'apparition de signes cliniques dépend de l'espèce hôte. Les signes cliniques causés par le virus H5N1 de la lignée asiatique peuvent aller de signes non spécifiques isolés à de la diarrhée, de la détresse respiratoire, des signes neurologiques et/ou une mortalité élevée (Tian et al., 2015 ; Al-Azemi et al., 2008)

3. Moyens diagnostiques

Les signes cliniques dus à une infection par le virus de l'Influenza aviaire ne sont pas pathognomoniques. C'est pourquoi, le diagnostic passe nécessairement par la détection du virus en laboratoire. Plusieurs moyens diagnostiques sont à disposition, notamment l'isolement viral et la RT-PCR en temps réel (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) (OIE, 2015).

a) Choix des échantillons

Sur les oiseaux vivants, les prélèvements de choix sont les écouvillons cloacaux et oropharyngés. Lorsque les prélèvements par écouvillons sont difficiles à réaliser, il est possible de récupérer des fientes fraîches. Sur les oiseaux morts, on peut aussi réaliser des écouvillons sur différents organes (trachée, poumons, sacs aériens, intestins, rate, reins, cerveau, foie, cœur). L'analyse des échantillons peut ensuite se faire en pools ou séparément (OIE, 2015).

b) Isolement du virus

Il s'agit du gold standard en terme de test diagnostique, bien que la méthode soit chronophage. On inocule le produit à tester dans le sac allantoïque de trois à cinq œufs de poules embryonnés de trois à onze jours. On réalise ensuite une incubation à 37°C pendant deux à sept jours. Le fluide allantoïque est ensuite récupéré et testé pour l'activité d'héماغglutination. Cette activité peut être due à un virus Influenza A mais aussi à un Paramyxovirus, c'est pourquoi on utilise souvent la RT-PCR afin de confirmer l'infection par le virus de l'Influenza aviaire, et de déterminer le sous-type. On peut aussi identifier le sous-type avec des tests d'inhibition de l'héماغglutination (OIE, 2015).

L'OIE définit le pouvoir pathogénique d'un virus Influenza aviaire selon trois moyens diagnostiques :

- Une suspension de fluide allantoïque infectée et diluée au dixième est inoculée par voie intraveineuse chez huit poulets de 4 à 8 semaines. Le virus est considéré comme hautement pathogène s'il est létal pour six à huit poulets, au bout de dix jours d'incubation.
- Un virus est hautement pathogène si l'index de pathogénie est supérieur à 1.2. Pour le calculer, une suspension de fluide allantoïque infectée et diluée au dixième est inoculée par voie intraveineuse à dix poulets âgés de six semaines. Les poulets sont examinés toutes les 24 heures pendant dix jours et à chaque observation ils sont scorés entre 0 et 3 (0 : absence de signe clinique ; 1 : signes cliniques modérés ; 2 : signes cliniques sévères ; 3 : mort). L'index est la moyenne des scores par oiseau et par observation sur les dix jours.
- Tous les virus H5 et H7 peuvent être considérés comme hautement pathogènes si la séquence en acides aminés de l'hémagglutinine est similaire à celle des virus connus comme étant hautement pathogènes. La détermination de la séquence du site de clivage est devenue la méthode de choix pour connaître le pouvoir pathogénique d'un virus Influenza A. Les virus hautement pathogènes présentent de multiples acides aminés basiques au niveau du site de clivage alors que les virus faiblement pathogènes n'en présentent qu'un en première position et un en troisième ou quatrième position (Li et al., 2017).

c) Méthodes moléculaires

La RT-PCR en temps réel permet d'identifier rapidement l'ARN viral. C'est une méthode très sensible mais il faut faire attention aux risques de contaminations croisées entre les échantillons à tester. La sensibilité et la spécificité de la RT-PCR en temps réel sont similaires à celles de l'isolement viral, à partir des écouvillons trachéaux et oropharyngés. Par contre, la sensibilité est plus faible lorsque les échantillons sont des écouvillons cloacaux, des fèces ou des organes du fait de la présence d'inhibiteurs de la PCR, induisant des faux négatifs.

Il est possible d'identifier le sous-type viral par PCR en utilisant des amorces spécifiques, en séquençant les produits d'amplification (OIE, 2015).

d) Tests sérologiques

Il s'agit de tests ELISA ou de test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).

Le test ELISA permet de détecter les anticorps dirigés contre la protéine de nucléocapside, l'hémagglutinine, ou la neuraminidase. Il existe différents kits commerciaux, certains sont spécifiques de sous-types du virus, comme H5, H7 et N1.

Le test d'IHA est considéré comme le gold standard parmi les tests sérologiques. Cependant, comme il s'agit d'une méthode assez laborieuse, les tests ELISA sont couramment utilisés.

Une étude a déterminé la sensibilité et la spécificité de tests ELISA, en les comparant au test d'IHA dont la sensibilité est de 98.8% et la spécificité de 99.5% (Comin et al., 2013). Il a ainsi été démontré que des tests ELISA de blocage (blocking ELISA) ont une sensibilité et une spécificité qui ne sont pas différentes significativement de celles du test d'IHA. La sensibilité est plus faible pour le test ELISA par compétition et dépend de l'espèce étudiée.

4. Portage du virus de l'Influenza aviaire par l'avifaune sauvage

Les oiseaux d'eau de l'ordre des Anseriformes (canards, oies, cygnes en particulier) et de l'ordre des Charadriiformes (mouette et sternes en particulier) sont considérés comme réservoir naturel du virus de l'Influenza aviaire (Tian et al., 2015 ; Aamir et al., 2007 ; Chen et al., 2006 ; Munster et al., 2007). Le premier isolement chez une espèce sauvage a eu lieu en 1961 sur une Sterne commune (Wobeser, 1997) ; depuis le virus a été isolé chez plus de 90 espèces de 13 ordres différents (Stallknecht, Brown, 2007).

II. Le virus de la maladie de Newcastle

1. Propriétés du virus

a) Classification

Le virus de la maladie de Newcastle, dénommé *Avian avulavirus 1*, est classé dans la famille des *Paramyxoviridae*, et le genre des *Avulavirus* (OIE, 2013). Il s'agit d'une maladie réglementée soumise à déclaration obligatoire auprès de l'OIE. C'est un danger sanitaire de première catégorie et une zoonose mineure.

b) Morphologie

Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN simple brin négatif, non segmenté. Il est constitué d'un génome viral d'environ 15kb, comprenant six gènes qui codent pour six protéines de structure : protéine de fusion F, nucléoprotéine NP, protéine de matrice M, phosphoprotéine P, polymérase L et hémagglutinine-neuraminidase HN (Cattoli et al., 2011). Il existe différentes souches du virus, réparties en deux clades, le clade I comprenant un génotype et le clade II comprenant dix-huit génotypes (Diel et al., 2012 ; Dimitrov et al., 2016).

c) Propriétés biologiques

La transmission du virus a lieu par contact direct avec un oiseau infecté ou par contact indirect, via les aérosols ou la contamination fécale de la nourriture, de l'eau et de l'environnement (Bailey et al., 1998 ; OIE, 2013). Le virus peut survivre pendant de longues périodes à température ambiante, notamment dans les fientes.

2. Signes cliniques chez les oiseaux

Les signes cliniques et la sévérité de l'infection dépendent de la souche ; on parle alors de souche faiblement pathogène ou hautement pathogène. On décrira ici les signes cliniques selon la virulence de la souche, mais elle n'est pas la seule à rentrer en compte dans la sévérité

des signes cliniques. Il faut aussi prendre en compte l'âge et le statut immunitaire de l'espèce, la voie de contamination, le stress environnemental, et les co-infections (Cattoli et al., 2011).

a) Les signes cliniques chez le poulet

On pourra observer des symptômes respiratoires (toux, halètement, éternuements, râles), des symptômes nerveux (tremblements, paralysie, torticolis), des symptômes digestifs (diarrhée) ou une diminution de la production d'œufs avec des œufs malformés. Le taux de létalité est variable et peut atteindre les 100% (OIE, 2013 ; Cattoli et al., 2011).

b) Signes cliniques chez l'avifaune sauvage

Les oiseaux d'eau présentent souvent une infection sub-clinique. Les passereaux ont une sensibilité qui diffère selon l'espèce : certains n'auront qu'une infection sub-clinique alors que d'autres développent des signes cliniques sévères. Des cas de mortalité ont été rapportés chez des corbeaux (OIE, 2013) et des colombidés (Isidoro-Ayza et al., 2017).

3. Moyens diagnostiques

Tout comme une infection par le virus de l'Influenza aviaire, une infection par le virus de la maladie de Newcastle n'entraîne pas de signes pathognomoniques. Un diagnostic en laboratoire est donc nécessaire (OIE, 2012). Les prélèvements à effectuer sont les mêmes que ceux décrits pour le virus de l'Influenza aviaire.

a) Isolement viral

L'isolement peut être effectué par inoculation dans la cavité allantoïque d'œufs de poule, comme cela a été décrit pour le virus de l'Influenza aviaire.

Il est aussi possible de réaliser un isolement par culture cellulaire (OIE, 2012). Les souches virales peuvent se répliquer dans de nombreux types cellulaires d'origine aviaire ou non aviaire. Les plus utilisés sont les hépatocytes, les cellules rénales ou les fibroblastes d'embryons de poule, les cellules rénales de Grivet, ou encore les cellules myogéniques

aviaires. La multiplication virale est souvent accompagnée d'effets cytopathiques, avec une rupture de la monocouche et la formation de syncytia.

L'identification du virus est ensuite réalisée par recherche de l'activité d'hémagglutination. Cependant, un test d'hémagglutination positif ne confirme pas l'isolement du virus de la maladie de Newcastle. En effet, l'activité hémagglutinante est commune aux virus Influenza et de la maladie de Newcastle. On peut confirmer une infection par le virus de la maladie de Newcastle par un test d'inhibition de l'hémagglutination mais il existe tout de même des réactions croisées avec d'autres *Avulavirus*. Les techniques de RT-PCR sont donc devenues les techniques de choix pour la détection et le typage du virus de la maladie de Newcastle (OIE, 2012).

L'évaluation du pouvoir pathogène d'une souche est fondée sur la mesure de l'index de pathogénicité intracérébral. Cela consiste à inoculer par voie intracérébrale du fluide allantoïque infecté à dix poussins de 24 à 40 heures d'âges. Ils sont ensuite examinés toutes les 24 heures pendant huit jours et scorés de 0 à 2 (0 : absence de signe clinique, 1 : présence de signes cliniques ; 2 : mort). L'index est la moyenne des scores par poussin et par observation sur les huit jours. Les souches virulentes auront un index proche de 2 et les souches faiblement pathogènes un score proche de 0. Cependant, les méthodes moléculaires, plus rapides et moins fastidieuses, permettent maintenant de connaître la virulence d'une souche en déterminant la séquence en acides aminés de la protéine F au site de clivage. La présence de deux paires d'acides aminés basiques en position 112, 113 et 115, 116 suivis par la phénylalanine en position 117 définit une souche virulente. La présence d'acides aminés uniques en position 113 et 116 suivis de la leucine en position 117 amène à une souche faiblement pathogène (Nanthakumar et al., 2000 ; Collins et al., 1996).

On mesure l'index de pathogénicité intracérébral lors d'un épisode épizootique mais pas lors d'une surveillance de routine sur des oiseaux en bonne santé.

b) Techniques moléculaires

La RT-PCR est une méthode sensible et rapide. On réalise souvent une amplification d'une partie du gène de fusion qui contient le site de clivage et permet ainsi de déterminer la virulence de la souche. L'inconvénient est qu'il est impossible d'utiliser les mêmes amorces pour détecter les virus de classe I et de classe II car les souches sont trop distinctes. Par ailleurs, au sein d'une même classe, le gène de matrice n'est pas hautement conservé et il peut

y avoir des faux négatifs (OIE, 2012).

c) Tests sérologiques

Il s'agit de tests ELISA ou de test d'inhibition de l'hémagglutination. Les tests ELISA ont une haute sensibilité et spécificité.

4. Portage du virus de la maladie de Newcastle par l'avifaune sauvage

L'infection par le virus de la maladie de Newcastle a été rapportée chez au moins 250 espèces dans le monde et plus de la moitié des 50 ordres (Xiang et al., 2017 ; Munir et al., 2015). Les espèces sauvages, et notamment les oiseaux d'eau, sont considérés comme réservoir naturel. Les souches faiblement pathogènes semblent circuler couramment chez les populations sauvages, comme nous l'indique la diversité phylogénétique des virus circulant chez les oiseaux d'eau et les espèces des littoraux (Cappelle et al., 2015). Des souches virulentes sont couramment isolées chez les pigeons et les cormorans (Ganar et al., 2014 ; Cappelle et al., 2015).

Entre 2013 et 2015, sur 2024 échantillons récoltés sur des oiseaux sauvages dans la province de Guangdong en Chine, 0,93% étaient positifs. La majorité des souches étaient faiblement pathogènes mais des souches virulentes ont été isolées chez trois oiseaux dont deux oiseaux résidents, une tourterelle tigrine et une poule d'eau (Xiang et al., 2017). Au Pakistan, après une épidémie causant la mort de 190 paons dans un parc, le virus a été isolé chez quatre des espèces les plus communes du pays, le pigeon biset, le moineau domestique, le corbeau familial et le martin triste (Munir et al., 2015).

III. Contexte épidémiologique au Moyen Orient face au virus Influenza aviaire et au virus de la maladie de Newcastle

1. Importance de la réalisation d'études épidémiologiques au Moyen Orient

a) Position actuelle du Moyen Orient dans l'industrie aviaire

Le Moyen-Orient est constitué de l'ensemble des pays à la jonction entre l'Afrique du Nord et l'Asie, et comprend : la Syrie, l'Iraq, l'Israël, les territoires palestiniens, l'Arabie saoudite, les Emirats Arabes Unis, le Yémen, l'Oman, le Liban, la Jordanie, l'Iran, le Koweït, le Qatar, le Bahreïn et Chypre (Insee, 2016). Néanmoins d'autres pays sont parfois inclus à cet ensemble comme la Turquie, l'Egypte, l'Afghanistan, et le Pakistan (Aamir et al., 2007). C'est donc une région à l'interface entre l'Afrique, l'Asie et l'Europe.

Le Moyen-Orient et l'Afrique du Nord représentent à eux deux 10.4% de la production mondiale de volaille, avec 2.4 milliards d'oiseaux élevés en 2017 (Nagy et al., 2017). Cette production est en constante augmentation. En 2017, l'Iran était placé au 5^{ème} rang mondial de la production de poulets ; l'Egypte, l'Arabie Saoudite et la Jordanie étaient aux 1^{er}, 3^{ème} et 9^{ème} rangs respectivement dans la production de pigeons. L'industrie de la volaille est un secteur en plein essor dans cette région, avec des échanges importants avec les Etats-Unis, la Chine, le Brésil et l'Europe. Au vue de l'importance locale de la production de volailles, il semble donc nécessaire de connaître la situation épidémiologique de cette région face à des virus aviaires majeurs comme les virus de l'Influenza aviaire et de la maladie de Newcastle.

b) Particularité de l'industrie aviaire au Moyen Orient

Il y a encore beaucoup de marchés de volailles vivantes au Moyen Orient. Les volailles de différents élevages sont en contacts et parfois mélangées. Cela favorise la transmission des virus et leur transit vers de nouveaux élevages, les mesures de biosécurité étant souvent absentes. Par ailleurs, il n'y pas seulement de gros systèmes d'élevage en bâtiment mais encore énormément de production en basse-cours. Les espèces de basses-cours sont les premières touchées par des virus comme l'Influenza aviaire et le virus de la maladie de Newcastle (Shekaili et al., 2015a ; Lu et al., 2010 ; Alkhalaf, 2010). Cela s'explique par des

mesures de biosécurité qui ne sont pas appliquées, un défaut de vaccination et des volailles en liberté, facilitant le contact avec les espèces sauvages. Une étude réalisée sur 243 basse-cours en Oman a montré une séroprévalence de 37.5% pour le virus Influenza aviaire et de 42.1% pour le virus de la maladie de Newcastle (Shekaili et al., 2015) avec respectivement 84% et 90% des élevages touchés par ces virus. Cette prévalence varie selon la région, et se trouve être plus importante dans des zones avec une densité d'oiseaux importante, avec la présence de marchés d'oiseaux vivants à proximité ou la présence d'espèces sauvages (notamment dans les lieux de nidification d'espèces migratrices). Les oiseaux de basse-cours sont donc fortement touchés par les virus aviaires et peuvent les transmettre aux autres élevages lors des marchés par exemple.

c) Importance des programmes de surveillance face aux épidémies

La mise en place de programmes de surveillance au Moyen-Orient comme partout dans le monde est nécessaire afin d'appliquer des mesures adéquates pour limiter la propagation des virus. En effet, ces derniers causent de gros dégâts à l'échelle de l'homme comme à l'échelle de l'animal.

Chez l'homme, 860 infections par le virus de l'Influenza aviaire hautement pathogène H5N1 de génotype Z ont été confirmées entre 2003 et 2018, avec 454 décès (WHO, 2018 ; Puthavathana, 2005). Des virus faiblement pathogènes comme H9N2 causent dans la majorité des cas des maladies respiratoires mais les personnes immunodéprimées peuvent présenter des défaillances multiples d'organes entraînant la mort (Nagy et al., 2017). Il est donc nécessaire de limiter au mieux la propagation de tels virus.

Chez les oiseaux, les signes cliniques sont différents selon le virus, la souche du virus, l'espèce d'oiseau et les infections concomitantes. Les volailles sont des espèces sensibles aux virus de la maladie de Newcastle et au virus de l'Influenza. Selon la souche, on peut avoir une forte baisse de la production, avec des chutes de ponte, des animaux affaiblis, ou alors une mortalité importante. Cela engendre de gros dégâts financiers.

Des virus faiblement pathogènes chez l'oiseau peuvent entraîner des cas graves chez l'homme comme le virus H7N9 qui a provoqué 39 décès en Chine en mars 2013 suite à une infection confirmée chez la volaille. La propagation silencieuse du virus dans les élevages a provoqué un important problème de santé publique (Tenzin et al., 2015).

La Jordanie, l'Israël et la Palestine ont créé en 2003 le partenariat MECIDS (Middle East Consortium on Infectious Disease Surveillance) afin de mettre en place des programmes de surveillance des maladies infectieuses. D'abord dédié aux partages d'informations concernant les épidémies de maladies liées à l'alimentation, ils s'intéressent maintenant aussi aux maladies vectorielles et à l'Influenza aviaire (Leventhal et al., 2013). L'épizootie survenue au Moyen Orient en 2005 due au virus H5N1 s'est propagée de la Turquie à la Jordanie. Les moyens mis en œuvre par le MECIDS avec la création de zones de protection et l'abattage des élevages infectés a permis de limiter la propagation du virus.

Plus la détection des épizooties est précoce, plus vite des mesures peuvent être adoptées pour endiguer la propagation. L'épizootie de H5N1 qui a eu lieu entre 2007 et 2008 en Arabie Saoudite en est un bel exemple (Lu et al., 2010). De novembre 2007 à janvier 2008, 19 élevages ont été touchés par le virus H5N1, avec une première détection du virus dans des élevages de basse cours. La détection du virus par le laboratoire central de diagnostic vétérinaire a été rapide et des mesures de contrôle ont pu être mises en place dans la foulée. Celles-ci comprenaient l'établissement de zones de quarantaine, avec trois zones distinctes. La première zone était considérée comme infectée, l'ensemble des espèces était abattues, un vide sanitaire de 21 jours était effectué et des oiseaux sentinelles étaient remplacés avec prélèvements trachéaux et cloacaux. Dans la deuxième zone (zone de protection) il y avait des restrictions de vente et de déplacement et dans la troisième zone (zone de surveillance) tous les élevages étaient testés. Ces mesures ont permis de contrôler l'épizootie en un an.

d) Mise en danger d'espèces protégées

L'infection par des virus aviaires ne menace pas seulement les élevages, mais aussi des espèces sauvages dont certaines sont protégées. C'est le cas de l'Outarde houbara (*Chlamydotis macqueenii*), une espèce appartenant à l'ordre des Otidiformes et vivant en Afrique du nord et en Asie, proie traditionnelle de la chasse au faucon. Depuis 2004, elle est sur la liste rouge des espèces en voie de disparition et elle est classée comme vulnérable par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. Elle est par ailleurs mentionnée en Annexe 1 de la convention sur le commerce internationale des espèces de la faune et de la flore sauvages menacées d'extinction (CITES) (Khan† et al., 2009). Le déclin de la

population d'outardes houbara est dû à une chasse intensive, au braconnage et à la dégradation de leur habitat.

Depuis plus de 20 ans, des programmes de conservation ont été mis en place en Afrique du nord, au Moyen Orient et en Asie centrale. Il a été créé des élevages d'outardes en captivité, dans le but de soutenir les populations sauvages par des relâchés conservatoires. Les élevages créés au Moyen Orient sont situés dans des régions désertiques ou semi-désertiques où des installations ont été mises en place pour assurer une certaine autonomie, comme des cultures pour nourrir les outardes. Ces oasis artificiels attirent la faune sauvage, augmentant le risque de contact avec les outardes (Le Loc'h et al., 2014 ; Bock et al., 2008).

Une étude réalisée sur des outardes houbara introduites en Arabie Saoudite pour l'entraînement des faucons a permis de montrer qu'elles étaient sensibles au virus de l'Influenza aviaire (Khan et al., 2009). Deux jours après leur introduction, les outardes ont commencé à présenter des signes cliniques ; 93% sont décédées par la suite, de même que 62% des faucons qui sont rentrés en contact avec des outardes ou qui ont été nourris avec des carcasses infectées. Le virus aviaire H5N1 a été isolé sur chacun des prélèvements effectués, à la fois sur les outardes et sur les faucons. Les outardes sont donc fortement touchées par le virus H5N1 hautement pathogène, qui peut décimer un élevage entier. Il est donc important de connaître la situation épidémiologique de la région afin d'éviter au mieux l'infection. Cependant, l'origine de l'infection des outardes reste inconnue. Le transport des outardes d'Asie centrale vers des fauconneries du Moyen Orient est souvent illégal, et se réalise dans de mauvaises conditions avec un mélange d'espèces. Dans une étude réalisée en 2013 (Wernery et al., 2013), des prélèvements ont été effectués sur des oiseaux transportés dans des fauconneries aux Emirats Arabes Unis : des cailles communes, des faisans vénérés et des outardes sénégalaises. Ces oiseaux présentaient des signes respiratoires. Le virus H9N2 a été isolé chez ces trois espèces. Ainsi, le transport illégal d'espèces infectées est un bon vecteur de propagation de virus.

2. Situation épidémiologique du Moyen Orient

a) Epizootie de H5N1, virus hautement pathogène

Le Moyen Orient n'a pas échappé à l'épizootie de H5N1, qui a débuté en Chine. Le virus a d'abord été isolé de façon sporadique sur des oiseaux sauvages trouvés morts dans la région de Hong Kong, puis en avril 2005 sur des oies sauvages dans la réserve naturelle du lac de Qinghai (Al-Azemi et al., 2008). Le virus s'est rapidement propagé avec une détection chez des espèces sauvages puis chez des espèces d'élevage en Asie centrale, au Moyen Orient, en Europe et en Afrique. La grande majorité des pays du Moyen Orient a connu une épizootie due au virus H5N1 entre 2006 et 2007 (Figure 2). La majorité des analyses réalisées au Moyen Orient a été effectuée dans des élevages, hormis en Oman où une étude a aussi concerné des oiseaux sauvages. Il aurait été intéressant d'étudier l'infection chez les espèces sauvages, sachant que 6000 oiseaux de huit espèces différentes de gibiers d'eau ont été retrouvés morts au lac de Qinghai, dont six espèces migratrices, reconnues comme infectées par le virus H5N1 (Williams, Peterson, 2009). Leur rôle dans la propagation du virus est donc fortement suspecté.

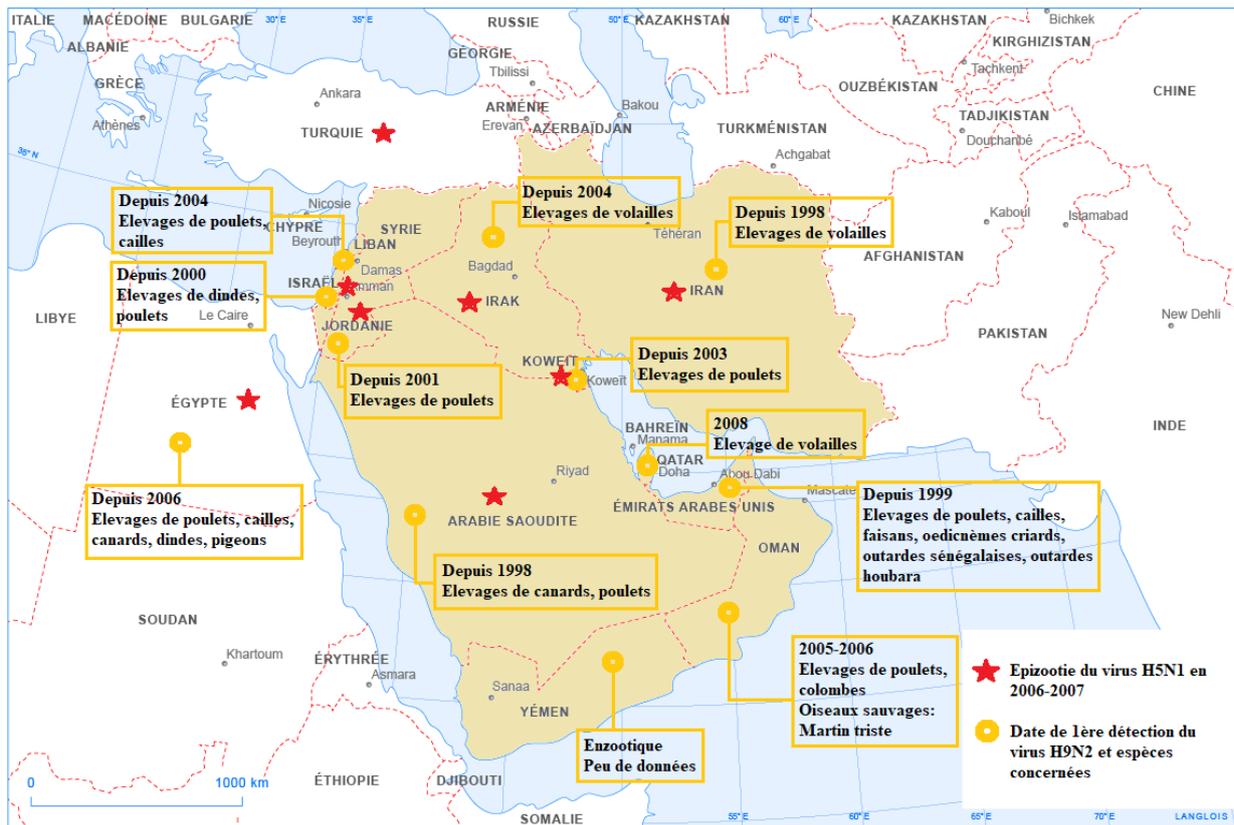


Figure 2 : Le virus de l'Influenza aviaire au Moyen Orient (Al-Azemi et al., 2008 ; Lu et al., 2010 ; Nagy et al., 2017 ; Williams, Peterson, 2009)

b) Virus H9N2, faiblement pathogène

Le virus H9N2 est enzootique en Asie depuis les années 90 (Aamir et al., 2007). Son infection entraîne souvent une diminution de la production d'œufs, et des signes cliniques modérés. Cependant, lors de co-infections avec un autre agent, la morbidité et la mortalité peuvent être élevées.

Avant 1992, le virus n'avait été isolé qu'en Asie, sur des canards. Le virus s'est ensuite propagé dans le sud de l'Asie puis au Moyen Orient, avec une première détection en Arabie Saoudite et en Iran en 1998 (Nagy et al., 2017). Il a depuis été détecté dans tous les pays du Moyen Orient, sur des volailles domestiques.

Aux Emirats Arabes Unis, la première détection a eu lieu en 1999 dans des élevages de poulets (Nagy et al., 2017). Le virus a ensuite été isolé entre 2000 et 2003 dans des élevages de cailles et de poulets, où les oiseaux présentaient des signes cliniques (Aamir et al., 2007). Les souches isolées étaient proches de celles détectées en Iran et au Pakistan. Les échanges commerciaux importants entre les Emirats Arabes Unis et le Pakistan pourraient jouer un rôle

dans la circulation du virus H9N2. Le virus a par la suite encore été isolé de 2005 à 2015 sur de nombreuses espèces d'élevage différentes.

Là encore, très peu d'études se sont penchées sur le cas des oiseaux sauvages au Moyen Orient.

c) Virus de la maladie de Newcastle

Le virus de la maladie de Newcastle est largement répandu dans le monde (Figure 3). La première panzootie mise en évidence a débuté en 1926 (Alexander et al., 2004). Elle a touché les poulets, et s'est propagée de l'Asie du sud à l'Europe de l'Est dans un premier temps puis à toute l'Europe, à l'Amérique et à l'Afrique. La deuxième panzootie a commencé en 1960 au Moyen Orient avant de se propager rapidement à l'ensemble des continents. Une troisième est à noter, qui a touché en premier lieu les pigeons dédiés à la course en Iraq en 1977. Du fait de l'importation des pigeons pour la participation aux courses en Belgique, le virus s'est largement et rapidement propagé.

De nos jours, les souches faiblement pathogènes sont largement répandues dans le monde. Les souches virulentes sont endémiques en Amérique centrale, en Amérique du sud, en Asie, au Moyen Orient, en Afrique et chez les cormorans sauvages en Amérique du Nord.

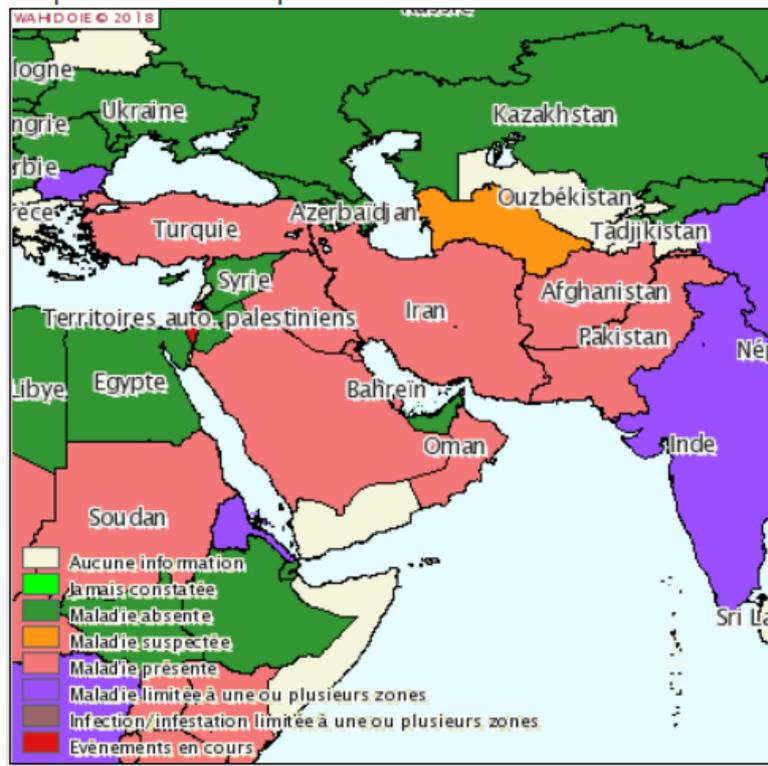


Figure 3 : Le virus de la maladie de Newcastle au Moyen Orient en 2017 (OIE)

IV. Données biologiques et épidémiologiques des espèces d'oiseaux incluses dans l'étude expérimentale

Nous avons réalisé notre étude aux Emirats Arabes Unis, sur deux sites d'élevages conservatoires d'outardes houbara : le National Avian Research Center (NARC) et le Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center – Abu Dhabi (SKHBC-AD). Nous avons voulu savoir si les espèces d'oiseaux sauvages les plus abondantes autour des sites étaient infectées par le virus de l'Influenza aviaire et le virus de la maladie de Newcastle. Une étude préalable nous a permis de choisir les espèces résidentes les plus représentées au sein des deux sites : le Moineau domestique (*Passer domesticus*, *PASDOM*), le Bulbul à oreillons blancs (*Pycnonotus leucotis*, *PYCTIS*), la Tourterelle turque (*Streptopelia decaocto*, *STRDEC*), la Tourterelle maillée (*Spilopelia senegalensis*, *STRSEN*), le Pigeon biset (*Columba livia*, *COLLIV*) et le Francolin gris (*Francolinus pondicerianus*, *FRAPON*).

1. Connaissances sur la transmission du virus de l'Influenza aviaire et du virus de la maladie de Newcastle par l'avifaune sauvage

a) Virus de l'Influenza aviaire

Depuis la découverte en 2005 d'oiseaux migrateurs morts au lac de Qinghai en Chine infectés par le virus H5N1, le rôle des oiseaux sauvages dans la propagation du virus est envisagé. Des études expérimentales sur des canards, des oies et des cygnes ont montré qu'ils étaient capables de diffuser le virus H5N1 pendant quelques jours sans montrer de signes cliniques de la maladie (Tian et al., 2015). Une étude de suivi satellitaire a montré que des canards ont survécu à l'infection par le virus H5N1 et ont été capables de migrer sur une distance minimale de 655 kilomètres (Tian et al., 2015). Des espèces sauvages seraient donc capables de propager sur de longues distances non seulement des virus faiblement pathogènes mais aussi des souches plus virulentes. Certaines espèces sont d'ailleurs partiellement immunisées contre le virus H5N1 après avoir été exposées à des virus faiblement pathogènes comme H9N2 (Tian et al., 2015).

Une étude s'est attachée à objectiver la transmission du virus hautement pathogène H5N1 des oiseaux sauvages aux oiseaux domestiques (Keawcharoen et al., 2011). Plus de 24000

échantillons d'espèces sauvages (migratrices et résidentes) ont été collectés entre janvier 2004 et décembre 2007 en Thaïlande. Parmi les résultats obtenus, il a été démontré que la capacité d'un élevage à infecter d'autres élevages est 1.7 fois supérieure les mois où on retrouve des oiseaux sauvages infectés.

Le rôle des espèces résidentes commence aussi à être étudié. En effet, les oiseaux d'eau sont rarement au contact des oiseaux domestiques du fait de leurs niches écologiques respectives. De ce fait, des « espèces relais » ont été recherchées parmi les oiseaux terrestres (Caron et al., 2014). Une espèce est définie comme telle lorsqu'elle a la capacité à être infectée et à excréter le virus ; elle doit aussi être en contact avec les oiseaux d'eau et la population domestique. C'est souvent le cas de nombreuses espèces résidentes qui partagent l'habitat des oiseaux d'eau et visitent les élevages en quête de nourriture. Une étude réalisée pendant deux ans sur des espèces relais a ainsi montré que le contact indirect entre les espèces réservoirs et les espèces domestiques à travers ces relais est vingt fois plus fréquent que le potentiel contact direct entre les deux populations (Caron et al., 2014). Dans cette étude, ils ont aussi remarqué des espèces relais dominantes appartenant à trois familles : la famille des Passéridés, des Colombidés et des Ciconiidés. Le rôle des pigeons et des tourterelles est d'ailleurs souvent suspecté ; en 2014 une souche faiblement pathogène H7N9 touchant les volailles avait été détectée chez des pigeons en bonne santé (Abolnik, 2014) ; cette souche avait causée 139 cas humains en 2013, dont 47 décès en Chine.

b) Virus de la maladie de Newcastle

De nombreuses souches faiblement pathogènes isolées chez les volailles sont reliées par phylogénie aux souches isolées chez les oiseaux sauvages, suggérant une transmission du virus entre les deux populations (Cappelle et al., 2015).

La transmission du virus de la maladie de Newcastle ne se fait pas uniquement des espèces sauvages vers les espèces domestiques. La situation inverse a aussi été remarquée, notamment avec le transfert de souches vaccinales (Devlin et al., 2016 ; Rohaim et al., 2017). Les éleveurs utilisent souvent des vaccins vivants atténués afin de protéger les volailles contre la maladie. L'excrétion de virus proches de souches vaccinales a été mise en évidence chez 17 espèces appartenant à dix ordres différents ; en majorité des Colombiformes et des Ansériformes (Ayala et al., 2016). La distance génétique entre les souches isolées et les

souches vaccinales est minimale et ne va pas au-delà de 0.093%.

2. Oiseaux de la famille des Passéridés

a) Moineau domestique (*Passer domesticus*)

- Taxonomie et distribution

Le Moineau domestique est un petit passereau de la famille des Passéridés et de l'ordre des Passériformes.

On retrouve le moineau en Europe, dans le sud de l'Asie, au nord-ouest de l'Afrique (du Maroc à la Libye) et au Moyen Orient (Figure 4). Il a été introduit dans de nombreuses régions habitées du monde, dont l'Amérique et l'Australie (del Hoyo et al., 2009).

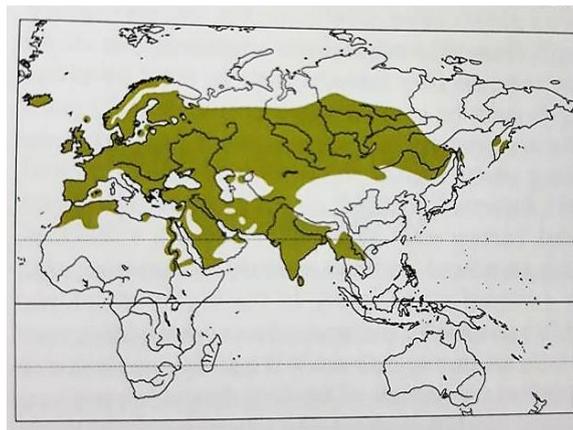


Figure 4 : Distribution du Moineau domestique dans le monde (del Hoyo et al., 2009)

- Description et biologie

Les mâles présentent une tête caractéristique : une calotte grise, une bande noire allant de la base du bec aux yeux, une bordure marron derrière les yeux, une tâche blanche au-dessus de l'œil qui est parfois absente, et des joues blanchâtres (Figure 5) (del Hoyo et al., 2009). Ils présentent un manteau brun-roux strié de noir, une couleur brun-grise du dos à la queue et une bavette noire du bec à la poitrine. L'iris est marron foncé, le bec noir et les pattes marrons (Géroutet, 1957).

Les femelles sont plus ternes avec la tête, le dos et le croupion gris et un ventre blanchâtre. Les juvéniles ressemblent aux femelles.



Figure 5: Moineau domestique mâle (Ravi, 2011)

Le Moineau domestique vit autour des bâtiments et des fermes dans les zones urbanisées. Dans la péninsule arabique, on le retrouve en petites colonies, éloignées de l'homme, des plaines aux montagnes.

Ce sont des oiseaux opportunistes, qui se nourrissent de graines, de baies, de bourgeons, d'insectes et de petits mollusques.

La période de reproduction a lieu de février à septembre mais peut être interrompue par les hautes températures ou les pluies de mousson. Le moineau fabrique son nid dans les falaises, les arbres ou sur les bâtiments. Le nid est fait de tiges et de feuilles, tapissés de plumes et de duvet. Il y a trois à quatre couvées par an, avec deux à cinq œufs couvés par le mâle et la femelle pendant 11 à 14 jours (del Hoyo et al., 2009 ; Chantelat, 2001).

Le moineau est un oiseau commun, dont la taille de l'habitat a augmenté avec son introduction dans certaines régions. Cependant, depuis 1980 son déclin est observé dans les pays d'Europe de l'ouest et d'Amérique du nord, dans les zones urbanisées et les fermes. Il a de ce fait été mis sur liste rouge au Royaume-Uni en 2002, et listé comme « quasi-menacé » en Allemagne (del Hoyo et al., 2009). Son habitat s'étend cependant dans d'autres pays comme le Kazakhstan, la Sibérie, la Thaïlande, le Soudan et l'ouest de l'Afrique.

b) Bulbul à oreillons blancs (Pycnonotus leucotis)

- Taxonomie et distribution

Le Bulbul à oreillons blancs appartient à la famille des Pycnonotidés et à l'ordre des Passériformes. On le retrouve au Moyen Orient (Iraq, Iran, Koweït, Arabie Saoudite, Emirats Arabes Unis, Qatar, Oman) et au sud-ouest de l'Asie (Afghanistan, Pakistan, Inde) (Figure 6).

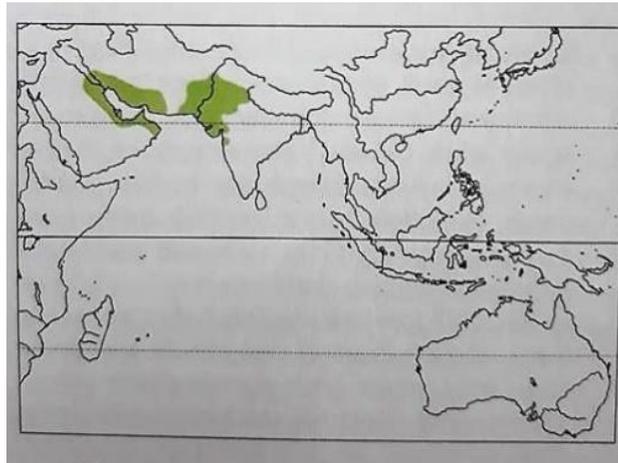


Figure 6: Distribution du Bulbul à oreillons blancs dans le monde (del Hoyo et al., 2005)

- Description et biologie

Le Bulbul à oreillons blancs a une tête et une gorge noires, et de larges taches blanches de chaque côté de la tête. La partie supérieure des ailes est gris clair, le poitrail gris pâle et le dessous de la queue jaune orangé (Figure 7). L'iris est brun, le bec noir et les pattes grises à noires. Le mâle et la femelle sont similaires. Les juvéniles sont bruns sur la tête, avec un corps et une queue plus pâles et un jaune plus pâle sous la queue (del Hoyo et al., 2005).



Figure 7: Bulbul à oreillons blanc (Goyal, 2014)

Le bulbul habite les régions boisées sèches et semi-désertiques, les jardins, les vergers, et les zones cultivées. Il se nourrit de fruits, de bourgeons, de graines, d'invertébrés et d'insectes. On le rencontre par paire ou en petits groupes, parfois en bande de 20 à 30 individus.

La période de reproduction est de février à septembre, souvent d'avril à juillet en Iraq et de juillet à septembre en Inde. Le nid est fait de brindilles, de racines, et il est placé proche du sol dans les buissons ou les arbustes. La femelle couve pendant 10 à 14 jours deux à quatre œufs.

Il s'agit d'une espèce commune et visible dans de nombreuses régions, notamment au nord de l'Inde, au Pakistan et au sud de l'Iraq. Elle n'est pas menacée.

c) *Epidémiologie face aux virus Influenza et Newcastle*

- Virus de l'Influenza aviaire

Depuis quelques années, les passereaux sont de plus en plus étudiés, leur rôle dans la propagation de virus étant suspecté. Le virus de l'Influenza aviaire a été détecté chez de nombreux oiseaux de la famille des Passéridés. Une étude réalisée en 2007 au Vietnam a mis en évidence la présence d'anticorps dirigés contre les sous-types H5 et H9 chez deux oiseaux du genre *Pycnonotus* : le Bulbul à tête noire (*Pycnonotus melanicterus*) et le Bulbul orphée (*Pycnonotus jocosus*), respectivement (Thin et al., 2012). Ces deux espèces ne présentaient pas de signes cliniques.

La sensibilité du Moineau domestique au virus Influenza a été étudiée par inoculation intranasale de virus. Face à une infection par le virus H5N1, plus de 50% des oiseaux meurent, le taux de létalité dépendant de la dose inoculée (Boon et al., 2007). La mort

survient 5 à 8 jours post-infection. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques et comprennent de la léthargie et des signes neurologiques (Brown et al., 2009). Les moineaux excrètent de hautes charges virales détectées par écouvillons oropharyngés et dans une moindre mesure par écouvillons cloacaux (Forrest et al., 2010).

Face à une infection par le virus H9N2, les moineaux présentent des signes cliniques variés (faiblesse, troubles respiratoires, jetage). Ils excrètent le virus entre deux et huit jours post-infection. Lorsque des moineaux domestiques naïfs sont mis en contact avec des poulets infectés, tous les moineaux sont infectés au bout de quatre jours. Dans le cas inverse, les poulets sont aussi rapidement infectés, avec une excrétion du virus six à huit jours après la mise en contact avec les moineaux (Iqbal et al., 2013).

- Virus de la maladie de Newcastle

Les passereaux sont considérés comme espèces réservoirs du virus de la maladie de Newcastle. Au Brésil, parmi des moineaux domestiques capturés autour d'un élevage de poulets, 3.8% présentaient une sérologie positive (Silva et al., 2006). Peu d'études concernent les oiseaux du genre *Pycnonotus*.

3. Oiseaux de la famille des Colombidés

a) Tourterelle turque (Streptopelia decaocto)

- Taxonomie et distribution

La Tourterelle turque appartient à la famille des Colombidés et à l'ordre des Colombiformes. On la retrouve de l'Europe à l'Asie mineure, au sud de l'Asie et au Moyen Orient (Iraq, Iran, territoires palestiniens) (Figure 8). Elle a été introduite aux Etats Unis (del Hoyo et al., 1997).

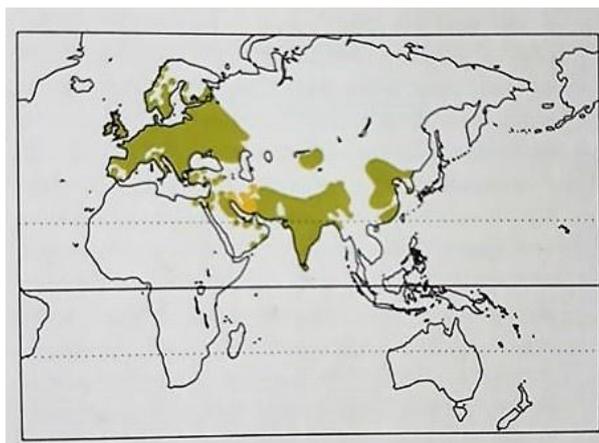


Figure 8: Distribution de la Tourterelle turque dans le monde (del Hoyo et al., 1997)

- Description et biologie

La Tourterelle turque a une tête gris clair avec une nuque chamois rosée, un manteau brun sablonneux et un demi-collier noir bordé de blanc à l'arrière du cou (Géroudet, 1962). Le ventre et les flancs sont gris pâles, et le poitrail gris-rosé (Figure 9) (del Hoyo et al., 1997). L'iris est rouge, le bec noir et les pattes rougeâtres. Les deux sexes sont similaires. En revanche, les juvéniles ne présentent pas de collier noir et sont de couleur sable.



Figure 9 : Tourterelle turque (Rønning, 2010)

En Asie, la Tourterelle turque est présente dans les régions semi-désertiques et arides, et évitent les villes. Ailleurs, on la retrouve dans les centres villes, les parcs, les jardins et les vergers. En Iraq, on retrouve les nids à moins d'un kilomètre des habitations (del Hoyo et al., 1997).

Elle se nourrit de graines, de racines, de fruits et d'insectes.

La période de reproduction s'étend de mars à octobre, mais peut durer toute l'année dans les régions du sud. Les nids sont bâtis dans les buissons, les arbres, les grandes haies et les bâtiments. Il y a généralement trois à cinq couvées par an, avec deux œufs couvés pendant 14 à 16 jours (Chantelat, 2001).

La tourterelle est un oiseau commun, abondant en Inde, au Pakistan, et qui se propage rapidement aux Etats Unis et en Europe depuis son introduction.

b) Tourterelle maillée (*Spilopelia senegalensis*)

- Taxonomie et distribution

La Tourterelle maillée appartient à la famille des Columbidae et à l'ordre des Columbiformes. On la retrouve en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie), en Afrique sub-saharienne, au Moyen Orient (Arabie Saoudite, Yémen, Iran), au sud-ouest de l'Asie, et au nord-ouest de la Chine (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Elle a été introduite en Australie et probablement en Israël, en Syrie, au Liban, en Turquie et à Malte (del Hoyo et al., 1997).

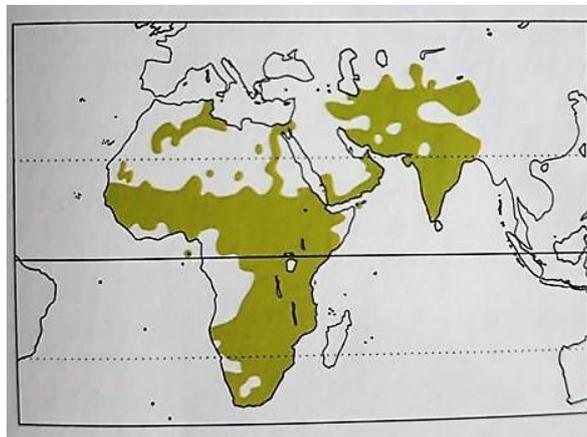


Figure 10: Distribution de la tourterelle maillée dans le monde (del Hoyo et al., 1997)

- Description et biologie

La Tourterelle maillée présente une tête, un cou et un poitrail rosés, un ventre blanc, manteau rouge-brun et une couverture des ailes bleu-grise (Figure 11). Elle possède une large bande de plumes noires avec des pointes cuivrées autour du cou. Le dessous de sa queue est blanc, sa croupe noire, son iris et son bec noirs et ses pattes violettes. La femelle est similaire au mâle

mais avec des teintes plus ternes (Svensson et al., 2012).



Figure 11: Tourterelle maillée (Dupont, 2015)

En Afrique, la Tourterelle maillée occupe des régions sèches, mais toujours dans un rayon de dix kilomètres d'un point d'eau. On la retrouve dans les savanes boisées, les villages, les jardins, mais surtout dans les forêts d'acacias.

Elle se nourrit de graines, de fruits et d'insectes.

La période de reproduction est de février à juin au nord de l'Afrique, de février à octobre en Égypte, toute l'année dans le sud de l'Afrique, et après les pluies en Afrique de l'est. Le nid est constitué de racines, de brindilles et se situe souvent dans les buissons et les arbres.

L'incubation des œufs dure de 12 à 13 jours.

Il s'agit d'une espèce abondante.

c) Pigeon biset (*Columba livia*)

- Taxonomie et distribution

Le Pigeon biset appartient à la famille des Colombidés et à l'ordre des Colombiformes. Sur les sites étudiés, on retrouve surtout le pigeon biset domestique ; il est le descendant des pigeons bisets issus de pigeonniers, retournés à l'état sauvage (Svensson et al., 2012). Ils sont encore utilisés comme pigeons de course. D'abord présents en Europe, en Afrique du sud et de l'est et en Asie du Sud, ils ont été introduits partout dans le monde depuis (Figure 12).

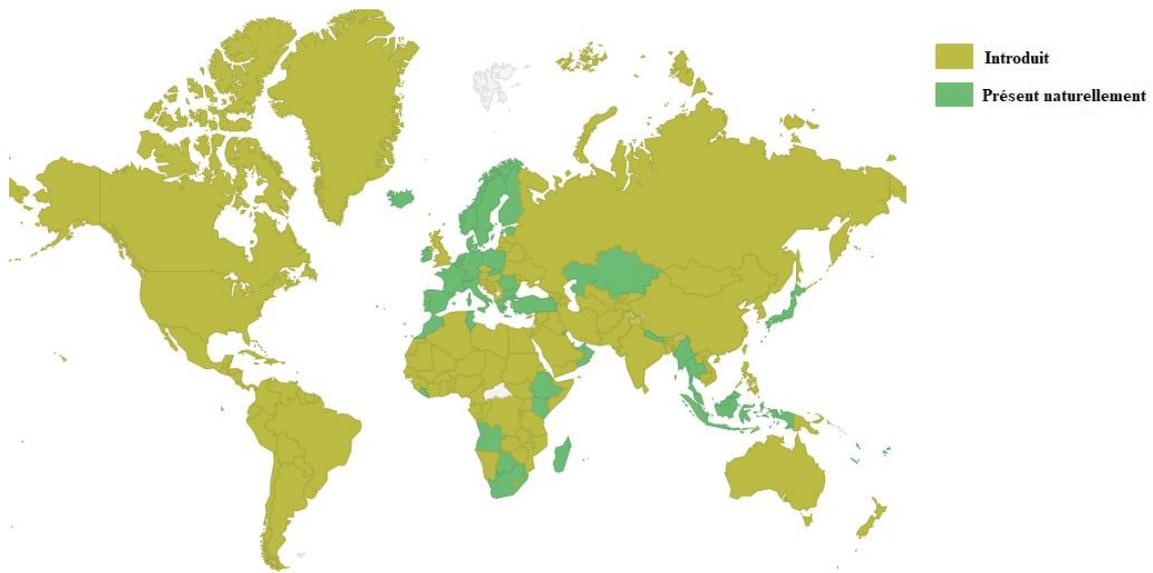


Figure 12: Distribution du pigeon biset dans le monde (Lepage, 2018)

- Description et biologie

Le Pigeon biset féral peut présenter diverses robes. Parfois, il est semblable au Pigeon biset sauvage (*Columba livia livia*). Celui-ci est de couleur gris bleuâtre, avec une tête plus foncée, et le dessus des ailes plus clair. Deux bandes noires sont remarquables sur les ailes lorsqu'elles sont repliées ainsi qu'une bande noire à l'extrémité de la queue, la queue étant gris sombre. Le cou est iridescent, violet et vert (Géroudet, 1962 ; Chantelat, 2001). Il existe des variantes chez le Pigeon biset féral : un manteau gris et blanc ou chamois rosé, un croupion blanc ou encore quelques rémiges blanches (Figure 13) (Svensson et al., 2012).



Figure 13: Pigeon biset (Hulbert, 2017)

Le Pigeon biset féral vit surtout dans les villes. Il se nourrit de graines et d'invertébrés qu'il trouve dans les cultures proches des villes, dans les ports et les chemins de fer, ou au cœur de la ville (Rose, Nagel, et al., 2006). Ils adoptent souvent un nombre restreint de lieux qu'ils visitent régulièrement (Rose, Haag-Wackernagel, et al., 2006).

La période de reproduction varie selon la région, généralement de mars à juillet. Le nid est constitué de tiges, de feuilles, de racines, et de plumes, souvent dans des bâtiments abandonnés. Ils font jusqu'à cinq couvées par an, avec deux œufs couvés par les deux sexes (del Hoyo et al., 1997 ; Chantelat, 2001).

d) Epidémiologie face aux virus

- Virus Influenza aviaire

Les pigeons et les tourterelles sont peu sensibles à l'infection par le virus de l'Influenza aviaire. Plusieurs études s'appuient sur des infections expérimentales par inoculation du virus au pigeon biset.

Lors d'infection par des virus hautement pathogènes comme H5N1, les signes cliniques dépendent de la dose inoculée. A forte dose (titre de 10^6 EID₅₀), on observe une mortalité de 40%, de la faiblesse, des signes neurologiques, ou une absence de symptômes. Les pigeons excrètent le virus mais sur une courte durée et en faible quantité. A des doses moins élevées

(inférieures à 10^4 EID₅₀), les pigeons sont asymptomatiques et n'excrètent pas le virus (Brown et al., 2009).

- Virus de la maladie de Newcastle

Les pigeons et les tourterelles sont sensibles au virus de la maladie de Newcastle. L'infection a été mise en évidence chez les pigeons dédiés à la course à partir de 1977. Ils présentaient des signes neurologiques (torticolis, paralysie, perte d'acuité visuelle) et une diarrhée persistante mais les signes respiratoires étaient rares (Cross, 1995). Le virus a été nommé PPMV-1 (*Pigeon Avulavirus 1*). Les pigeons de courses étant à l'époque ignorés par les autorités de contrôle, ils ont été à l'origine de nombreuses épizooties, tout comme la Tourterelle maillée. Une étude au Nigeria a permis de détecter des anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle chez la Tourterelle maillée (Assam et al., 2014).

Des souches virulentes ont été détectées ces dernières années dans de nombreux pays d'Europe chez les oiseaux sauvages de la famille des colombidés, surtout chez la Tourterelle des bois et la Tourterelle turque (Napp et al., 2017).

4. Francolin gris (*Francolinus pondicerianus*)

a) Taxonomie et distribution

Le Francolin gris est un gibier à plume de la famille des Phasianidés, et de l'ordre des Galliformes. On le retrouve surtout dans les régions arides et sèches de l'Asie ; au Pakistan, en Inde, au Bangladesh, au Sri Lanka et en Iran (Figure 14) (Khalil et Anwar, 2016). Il est aussi présent dans les zones cultivées.

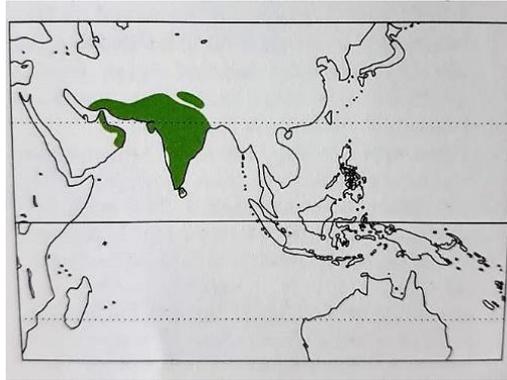


Figure 14: Distribution du Francolin gris dans le monde (del Hoyo et al., 1994)

b) Description et biologie

Le Francolin gris mesure entre 33 et 35 centimètres. Il présente une gorge de couleur jaune bordée de noir, une calotte marron, un bec noir et des pattes rougeâtres (Figure 15). Les rectrices externes sont de couleur marron (del Hoyo et al., 1994). La femelle est semblable au mâle mais ne présente pas d'éperons. Les juvéniles sont plus ternes.



Figure 15: Francolin gris (Kasambe, 2017)

Le Francolin gris vit dans les prairies, les plaines sèches et les plateaux, et notamment dans les zones proches des cultures.

Ils se nourrissent de graines, de céréales, de pousses de cultures, de baies et d'insectes.

Les francolins se reproduisent l'année suivant leur éclosion. Ils construisent leur nid au printemps et pondent aux mois de mars et d'avril ou parfois aux mois de septembre et d'octobre, après les moissons (Khalil et al., 2016). Le nid est un trou rempli d'herbes et de feuilles, souvent à couvert mais parfois exposé dans les champs. Ils pondent six à neuf œufs incubés par la femelle pendant 18 à 19 jours (del Hoyo et al., 1994).

La population est en déclin, et le francolin gris fait partie de la liste rouge de l'IUCN (International Union for Conservation of Nature). Le déclin de cette espèce s'explique par la chasse illégale, la destruction de son habitat, l'intensification de l'agriculture et un manque de nourriture disponible.

c) Prévalence face aux virus

Peu d'études ont été réalisées sur le statut des oiseaux du genre *Francolinus* vis-à-vis du virus Influenza et au virus de la maladie de Newcastle. Une analyse réalisée sur des oiseaux de la famille des Phasianidés à Hong-Kong a permis d'isoler une souche virulente du virus de la maladie de Newcastle chez le Francolin perlé (*Francolinus pintadeanus*) qui ne présentait pas de signes cliniques (Shortridge et al., 1978). Au Nigéria, des anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle ont été mis en évidence chez le Francolin à double éperons (*Francolinus bicalcaratus*) (Assam et al., 2014).

Partie 2: Etude expérimentale

I. But de l'étude

Nous avons cherché à savoir si les oiseaux sauvages proches d'élevages conservatoires d'outardes houbara étaient porteurs de virus aviaires tels que le virus de l'Influenza aviaire et le virus de la maladie de Newcastle. Cette étude s'insère dans un projet plus important visant à évaluer le risque que représentent les oiseaux sauvages dans la transmission d'agents infectieux aviaires aux oiseaux d'élevages.

L'étude a été réalisée sur deux sites des Emirats Arabes Unis présentant des élevages conservatoires d'outardes houbara mis en place par l'IFHC : NARC créé en 1989 et SKHBC-AD créé en 2012.

II. Présentation des échantillons

1. Prélèvements

L'étude a concerné six espèces d'oiseaux sauvages : le Moineau domestique (*Passer domesticus*), le Bulbul à oreillons blancs (*Pycnonotus leucotis*), la Tourterelle turque (*Streptopelia decaocto*), la Tourterelle maillée (*Spilopelia senegalensis*), le Pigeon biset (*Columba livia*) et le Francolin gris (*Francolinus pondicerianus*). Ces espèces ont été sélectionnées selon deux critères : ce sont des espèces résidentes, et ce sont les espèces les plus représentées dans les zones étudiées.

Les oiseaux ont été capturés sur les deux sites afin d'effectuer des prélèvements en vue de tests sérologiques et virologiques. Lors de leur première capture, les oiseaux ont été bagués. Leur sexe et leur âge ont été identifiés selon des critères morphologiques. Pour les espèces dont les deux sexes ont des morphologies identiques, leur distinction s'est faite lors de la période de reproduction, avec la présence d'une plaque incubatrice chez les femelles et d'une plaque copulatoire chez les mâles.

Des prises de sang ont été réalisées, permettant de récolter 4005 séra ; 2832 en 2016 et 1173 en 2017 (Tableau 1), issus de 3740 individus différents.

Pour la recherche des virus, 4696 écouvillons, à la fois cloacaux et trachéaux, issus de 4384 individus ont été réalisés entre 2016 et 2017 (Tableau 2). Sur les oiseaux retrouvés morts ou morts lors de la capture, des autopsies ont été effectuées afin de prélever leurs organes entre 2015 et 2017; cela correspond à 1893 organes (trachée, poumons, foie, rate, pancréas, intestins, reins) issus de 349 individus.

Tableau 1 : nombre de prises de sang réalisées par espèce et nombre d'individus prélevés par espèce.

PASDOM : *Passer domesticus*, PYCTIS : *Pycnonotus leucotis*, STRDEC : *Streptopelia decaocto*, STRSEN : *Spilopelia senegalensis*, COLLIV : *Columba livia*, FRAPON : *Fracolinus pondicerianus*, PS : prise de sang

Espèce	PASDOM		PYCTIS		STRDEC		STRSEN		COLLIV		FRAPON	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Année de prélèvement												
Nb total de PS	783	200	666	384	427	177	684	262	235	103	37	47
Nb d'individus prélevés	964		966		561		888		286		60	

Tableau 2 : nombre d'écouvillonnages et d'autopsies réalisés par espèce

	Année de prélèvement	Nombre d'individus prélevés (écouvillons)	Nombre d'individus autopsiés
PASDOM	2015		24
	2016	984	34
	2017	218	0
PYCTIS	2015		63
	2016	903	25
	2017	447	16
STRDEC	2015		2015 : 104 2016 : 24 2017 : 12
	2016	452	
	2017	174	
STRSEN	2015		
	2016	771	
	2017	262	
COLLIV	2015		16
	2016	244	16
	2017	107	4
FRAPON	2015		2
	2016	44	2
	2017	44	3

2. Stockage et expédition

Les séra ont été stockés sur place à -20°C jusqu'à leur envoi en France dans des containers réfrigérés à l'aide de glace carbonique.

Le transport d'écouvillons ou d'organes depuis les EAU étant impossible, les écouvillons et les organes ont été déposés sur des cartes FTA (Fast Technology analysis) (le transport des prélèvements eux-mêmes étant interdit). Lors du dépôt d'un échantillon sur la carte, il y a une lyse des cellules, une dénaturation des protéines, et les acides nucléiques sont stabilisés (Liang et al., 2014). Cela permet de les protéger des nucléases, de l'oxydation, des ultra-violets et du développement microbien. Ils peuvent ainsi être transportés sans chaîne de froid et sans risque de dissémination d'agents infectieux. Les écouvillons et les organes sont conservés sur place à -80°C.

A leur arrivée, l'ensemble des séra et des cartes FTA a été stocké dans des congélateurs à -20°C en attendant leur exploitation.

III. Matériels et méthodes

1. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Il s'agit ici d'un test sérologique par compétition. Au fond des puits sont fixés des antigènes. Le sérum à tester est déposé dans le puits, et les anticorps dirigés contre le virus étudié, s'ils sont présents, se fixent aux antigènes. Un premier lavage est effectué, permettant d'éliminer tout élément non fixé. Un anticorps dirigé contre l'antigène et couplé à une enzyme, la peroxydase, est déposé dans le puits et se fixe aux antigènes libres. Un nouveau lavage est effectué pour éliminer les anticorps non fixés. On ajoute un substrat, qui lorsque la peroxydase est présente, entraîne une coloration bleue. L'intensité de la coloration dépend de la concentration en enzyme.

Lorsque le sérum contient l'anticorps recherché, peu voire aucun anticorps couplé à la peroxydase ne peut se fixer, et la solution reste incolore. Si le sérum ne contient pas l'anticorps recherché, la solution devient bleue. La mesure de l'intensité de la coloration se fait au spectrophotomètre par mesure de la densité optique à 450 nanomètres.

Les tests ELISA ont été réalisés avec les kits ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species et ID Screen® Newcastle Disease Competition (ID Vet, France) pour la recherche d'anticorps dirigés contre la nucléoprotéine du virus Influenza A et la recherche d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle respectivement (Annexe 1 et Annexe 2).

Dans des plaques de 96 puits, 10 µL de sérum a été déposé dans chaque puits hormis dans les puits A1, B1, C1 et D1 destinés aux témoins positifs et négatifs. Si la quantité de sérum était trop faible pour réaliser les tests sérologiques afin de détecter les deux virus, il a tout d'abord été décidé d'effectuer les analyses Influenza A en priorité. Par la suite, nous avons décidé de diluer les sérums au demi afin de réaliser les deux tests ; cela correspond à 53 séra. Au total, 4012 séra ont été analysés pour le virus de l'Influenza aviaire et 3767 séra pour le virus de la maladie de Newcastle (Annexe 3). Nous avons suivi les protocoles fournis avec les kits (Annexe 1 et Annexe 2). Les densités optiques ont ensuite été mesurées avec le lecteur Clariostar® (BMG Labtech).

2. RT-PCR quantitative et RT-PCR conventionnelle (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Extraction des acides nucléiques

Sur chaque carte FTA ont été déposés cinq empreintes de cinq individus différents ou cinq empreintes d'organes d'un même individu.

Les cartes FTA ont été découpées à l'emporte-pièce (Harris Uni-Core™, 6mm de diamètre) afin que tous les échantillons prélevés soient de même taille. La découpe a été réalisée sur la zone contenant le plus de matériel biologique. Chaque échantillon a été déposé dans un Eppendorf de 1,5mL, avec ajout de 300µL de buffer TE (PanReac Applichem TE buffer (1x) pH 8.0), puis mis sous agitation pendant quatre heures dans une pièce à 4°C.

Au vu du nombre important d'échantillons, il a été décidé de réaliser des pools de cinq échantillons (Annexe 4). Des plaques de 96 puits ont été utilisées afin de réaliser l'extraction. Dans chaque puits, nous avons déposé 40µL de cinq échantillons, soit un total de 200µL. Deux puits étaient destinés aux témoins positif et négatif d'extraction. L'extraction a ensuite été réalisée avec l'automate QIAcube® HT à l'aide du kit QIAcube® Pathogen 96 QIAcube® HT (Qiagen, Allemagne) (Annexe 5). La réussite de l'extraction est vérifiée grâce aux témoins positif et négatif. Les produits d'extraction sont ensuite stockés dans un congélateur à -80°C jusqu'à la réalisation de la RT-PCR quantitative.

A partir des pools reconnus comme positifs par RT-PCR quantitative, nous avons par la suite réalisé une extraction individuelle de chaque échantillon, en suivant le même protocole.

RT- PCR quantitatives en temps réel

Afin de détecter les virus étudiés, nous avons réalisé des RT-PCR quantitatives en temps réel avec l'automate ViiA™ 7 Real-Time PCR System. Elles permettent d'amplifier le génome viral en suivant le processus au cours du temps par fluorescence. Au plus l'échantillon aura une charge virale élevée, au moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent sera significativement supérieur au bruit de fond ; il s'agit du cycle seuil (Cyclethreshold, Ct), début de la phase exponentielle d'amplification.

Des plaques de 96 puits chacune, contenant les échantillons à étudier, sont placées dans l'automate, ainsi que le mix permettant de réaliser la RT-PCR quantitative. A chaque RT-PCR un témoin positif et un témoin négatif ont été ajoutés. Les résultats ont été analysés à partir du

logiciel QuantStudio™ Real-Time PCR Software V1.3.

- RT-PCRq pour l'amplification et la détection du virus de l'Influenza aviaire

La PCR quantitative a été réalisée à partir du kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step (Bio-Rad). Le fluorophore utilisé s'incorpore à la double hélice d'ADN et émet une fluorescence une fois lié à l'ADN. La spécificité dépend ici de la spécificité des amorces. On analysera la courbe de fusion dont le pic est atteint à une température spécifique (ANON., 2018).

Les amorces M52C 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3' et M253R 5'-AGGGCATTGACAAAG/TCGTCTA-3' (Fouchier et al., 2000) sont utilisées afin d'amplifier une région conservée du gène M (codant pour la protéine de matrice) de 244bp. La composition du mélange permettant la réaction et les caractéristiques de la PCR sont détaillées dans les tableaux ci-dessous (tableaux 3 et 4).

Tableau 3 : composition du mix pour un puits

Composant	Quantité (µL)
RNase-free water	2.275
Itaq 2x	5
i Script RT	0.125
Amorce M52C 10µM	0.3
Amorce M253R 10µM	0.3
ARN	2

Tableau 4 : conditions de la RT-PCRq

Etape	Température (°C)	Temps	Cycles
Reverse transcription	50	10min	1
Activation de la polymérase	95	1min	1
Dénaturation	95	15s	40
Hybridation/Extension	60	30s	
Courbe de fusion	95	10s	1
	65	1min	
	97	1s	
Refroidissement	37	30s	1

- RT-PCRq pour l'amplification et la détection du virus de la maladie de Newcastle

La RT-PCRq a été réalisée à partir du kit QuantiNovaTM Probe RT-PCR (Qiagen, Allemagne). Elle utilise une sonde Taqman ; la dégradation de cette sonde au cours de chaque passage de la Taq polymérase est accompagnée d'une augmentation de la fluorescence (ANON., 2001). Les amorces M+4100 5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3' et M-4220 5'-CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3' et la sonde M+4169 5'-[FAM]TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC[TAMRA]-3' (Kim et al., 2008) sont utilisées afin de rechercher une région conservée du gène M (codant pour la protéine de matrice) de 121bp des Paramyxovirus de classe II. La composition du mélange permettant la réaction et les caractéristiques de la PCR sont détaillées dans les tableaux ci-dessous (tableaux 5, 6 et 7).

Tableau 5 : composition du mix amorces + sonde

Composant	Quantité (µL)
Eau	64
Amorce M+4100 100µM	16
Amorce M-4220 100µM	16
Sonde M+4169 100µM	4

Tableau 6 : composition du mix pour un puits

Composant	Quantité (µL)
Mix amorces + sonde	1
2x QuantiNova Probe RTPCR Master Mix	10
QN Probe RT Mix	0.2
Eau	6.8
ARN	2

Tableau 7 : conditions de la RT-PCRq

Etapas	Température (°C)	Temps	Cycles
Reverse transcription	45	10min	1
Activation initiale de la PCR	95	5min	1
Dénaturation	95	5s	45
Hybridation/extension	60	30s	

Ces PCR quantitatives sont réalisées de la même façon sur les échantillons issus des pools positifs.

RT-PCR conventionnelle et séquençage

A partir des pools reconnus comme positifs, nous avons réalisé une RT-PCR conventionnelle avec l'automate thermocycleur peqSTAR® 2X (Peqlab, Allemagne) et le kit Qiagen OneStep RT-PCR Kit, suivie d'une électrophorèse, afin de réaliser par la suite du séquençage. Des témoins positif et négatif ont été ajoutés à la RT-PCR conventionnelle. Le but du séquençage est à la fois de confirmer nos résultats et de connaître la diversité des souches mises en évidence.

Nous n'avons pas utilisé les mêmes amorces que pour la RT-PCR quantitative. En effet, pour le virus Influenza A, les amorces M52C et M253R ne permettent pas d'identifier les sous-types du virus car elles amplifient une région conservée du gène M.

Pour l'*Avian avulavirus 1*, les amorces M+4100 et M-4220 entraînent l'amplification d'une région trop courte, qui ne permet pas un séquençage correct.

- Virus de l'Influenza aviaire

Nous avons tout d'abord utilisé les amorces HA-1134F 5'-GGAATGATHGAYGGNTGGTATGG-3' et Bm-NS-890R 5'-ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGG-3' qui permettent de rechercher une région conservée du gène HA2 et de déterminer les quinze sous-types HA (Phipps et al., 2004). La taille du fragment est de 640 paires de bases. La composition du mélange et les caractéristiques de la RT-PCR sont détaillées dans les tableaux ci-dessous (Tableau 8 et Tableau 9).

Tableau 8 : composition du mix pour un puits

Composant	Quantité (µL)
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5x	5
dNTP 10 mM	1
HA-1134F 10µM	1.5
Bm-NS-890R 10µM	1.5
RNaseOUT (5-10 unités/réaction)	0.2
RNase-free water	11.8
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1
ARN	3

Tableau 9 : conditions de la RT-PCR conventionnelle

Etapes	Température (°C)	Temps	Cycles
Reverse transcription	50	30min	1
Activation initiale de la PCR	95	15min	1
Dénaturation	94	30s	45
Hybridation	50	30s	
Extension	72	1min	
Extension finale	72	10min	1

Nous avons recherché par la suite les deux sous-types d'Influenza aviaire hautement pathogène, H5 et H7, ainsi que le sous-type H9, déjà mis en évidence aux EAU.

Pour la recherche des sous-types H9, les amorces H9F 5'-

GGAAGAATTAATTATTATTGGTCGGTAC-3' et H9R 5'-

GCCACCTTTTTCAGTCTGACATT-3' ont été utilisées permettant d'amplifier une région conservée du gène HA9 de 182bp (Ben Shabat et al., 2010).

Pour la recherche des sous-types H5, les amorces H5-kha1 5'-

CCTCCAGARTATGCMTAYAAAATTGTC-3' et H5-kha3 5'-

TACCAACCGTCTACCATKCCYTG-3' ont été utilisées permettant d'amplifier une région conservée de 300pb (Pérez et al., 2012).

Pour la recherche des sous-types H7, les amorces GK7.3 5'-

ATGTCCGAGATATGTTAAGCA-3' et GK7.4 5'-TTTGTAATCTGCAGCAGTTC-3' ont été utilisées permettant d'amplifier une région conservée de 201pb (Slomka et al., 2009).

La composition du mélange et les conditions de RT-PCR sont identiques à la RT-PCR HA hormis pour la température d'hybridation qui est de 60°C, 58°C et 54°C pour H9, H5 et H7 respectivement.

- Virus de la maladie de Newcastle

Nous avons utilisé les amorces SealF 5'-CCTTGGTGAITCTATCCGIAG-3' et SealR 5'-CTGCCACTGCTAGTTGIGATAATCC-3' qui permettent de rechercher des séquences de 254bp du gène F (Seal et al., 1995). Nous avons effectué la RT-PCR uniquement sur les pools positifs comprenant les écouvillons et non les organes. Le protocole de la PCR est présenté dans les tableaux ci-dessous (Tableau 10 et Tableau 11).

Tableau 10 : composition du mix pour un puits

Composant	Quantité (µL)
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5x	5
dNTP 10 mM	1
SealF 10µM	1.5
SealR 10µM	1.5
RNaseOUT	0.2
RNase-free water (5-10 unités/réaction)	11.8
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1
ARN	3

Tableau 11 : conditions de la RT-PCR conventionnelle

Étapes	Température (°C)	Temps	Cycles
Reverse transcription	50	30min	1
Activation initiale de la PCR	95	15min	1
Dénaturation	94	30s	40
Hybridation	50	30s	
Extension	72	1min	
Extension finale	72	10min	1

- Electrophorèse

Une électrophorèse des produits de RT-PCR a été effectuée, en utilisant un gel d'agarose 1,5 % et un marqueur de poids moléculaire comme repère. La migration des produits de PCR est visualisée sous UV (en présence de SYBR® Safe DNA Gel Stain utilisé à 20000X) après une migration d'environ une heure et trente minutes à 100 volts.

- Séquençage

Après l'électrophorèse, les bandes ayant migré jusqu'à la position correspondant à la taille du fragment recherché sont découpées et placées dans des Eppendorf de 1,5mL. L'ADN est purifié grâce au kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) (Annexe 7) puis préparé pour le séquençage par le laboratoire GATC Biotech. Les séquences obtenues sont corrigées grâce au

logiciel BioEdit et les fragments sont comparés aux séquences présentes dans la banque de données du National Center for Biotechnology Information grâce à l'outil BLAST.

3. Analyses statistiques

Pour les techniques ELISA, les prévalences réelles ont été calculées à partir du site <http://epitools.ausvet.com.au>, d'après le calcul décrit par Rogan et Gladen (Rogan et Gladen, 1978). Nous avons choisi des intervalles de confiance de 95%, calculés avec la méthode de Baker (Reiczigel et al., 2010).

La spécificité et la sensibilité du test sont estimées à 99% et 90% respectivement. Une étude réalisée avec le kit utilisé pour la détection sérologique du virus de l'Influenza aviaire a montré que la sensibilité et la spécificité du test dépendaient de l'espèce. Elles sont supérieures à 98% pour les poulets mais égales à 89% pour les canards (Terregino). Le test ELISA par compétition du virus de la maladie de Newcastle a une spécificité supérieure à 98% et une sensibilité supérieure à 95% (Rasamoelina Andriamanivo et al., 2012)

Nous avons considéré les résultats douteux comme positifs pour le calcul de la prévalence. Lorsqu'un oiseau a été analysé plusieurs fois, nous n'avons gardé que le résultat le plus récent. Nous avons comparé les résultats selon le site de prélèvement, l'espèce et l'âge de l'individu par régression logistique à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2018).

A partir des résultats par pools des RT-PCR quantitatives, nous avons calculé des prévalences réelles par optimisation du maximum de vraisemblance (Williams, Moffitt, 2001 ; 2010 ; Lyles et al., 2012). La vraisemblance quantifie la probabilité que les observations (être positif ou négatif au virus) proviennent d'un échantillon donné (et donc d'une espèce parmi les six représentées) ; en d'autres termes, que l'hypothèse à partir de laquelle telle espèce est positive ou négative est la plus vraisemblable (Chesneau, 2018). En effet, les pools contiennent plusieurs individus différents, potentiellement issus de plusieurs espèces différentes et il s'agit de savoir quel individu, et donc quelle espèce, est effectivement positif au sein du pool. Afin de réaliser ces tests statistiques, nous avons dû considérer les tests de RT-PCR comme parfaits.

IV. Résultats

1. Résultat des tests ELISA

a) Virus de l'Influenza aviaire

Les prévalences sont faibles pour chacune des espèces, avec une prévalence réelle de 0% comprise dans l'intervalle de confiance (Tableau 12). Il n'a pas été possible d'effectuer de régression logistique sur ces résultats du fait du faible nombre d'oiseaux positifs. Pour chaque espèce et sur chaque site, il y a donc très peu d'individus présentant des anticorps dirigés contre le virus de l'Influenza aviaire (Tableau 12 et Tableau 13).

Tableau 12: résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus de l'Influenza aviaire

Espèce	Effectif	Positifs	Douteux	Prévalence réelle – IC 95%
PASDOM	964	13	1	0.5% [0-1,6]
PYCTIS	966	4	1	0% [0-0,2]
STRSEN	888	0	1	0% [0-0]
STRDEC	561	0	4	0% [0-0,9]
COLLIV	286	0	0	0% [0-0,4]
FRAPON	60	0	0	0% [0-5,6]
Total	3725	19	7	0% [0-0]

Tableau 13 : résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus de l'Influenza aviaire par site de prélèvement

Espèce	Site NARC		Site SKHBC-AD	
	Nombre de positifs	Prévalence réelle IC 95%	Nombre de positifs	Prévalence réelle IC 95%
PASDOM	7/636	0,1% [0-1,4]	7/328	1,3% [0,1-3,8]
PYCTIS	2/354	0% [0-1,2]	3/612	0% [0-0,5]
STRSEN	1/339	0% [0-0,7]	0/549	0% [0-0]
STRDEC	1/187	0% [0-2,2]	3/373	0% [0-1,5]
COLLIV	0/264	0% [0-0,5]	0/19	0% [0-17,8]
FRAPON	0/22	0% [0-15,6]	0/38	0% [0-9,2]
Total	11/1802	0% [0-0,1]	14/1919	0% [0-0,2]

Durant les prélèvements, des prises de sang ont été effectuées chez d'autres espèces. Un goéland brun (*Larus fuscus*) a été retrouvé positif. Les outardes houbara présentes sur les sites n'ont pas été prélevées car elles sont vaccinées et les résultats pourraient donc être faussement positifs.

b) Virus de la maladie de Newcastle

On observe une prévalence importante pour le virus de la maladie de Newcastle, notamment chez les pigeons, les tourterelles et le Francolin gris (Tableau 14).

A partir de la régression logistique, lorsqu'on compare l'espèce la plus représentée, le Bulbul à oreillons blancs avec 927 oiseaux prélevés, aux autres espèces, elles ont toutes significativement plus de chance de présenter des anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle, hormis le Moineau domestique. Ce dernier est d'ailleurs l'oiseau qui a la probabilité la plus faible d'avoir une sérologie positive, avec une prévalence de 2.0%. Le Francolin gris est l'espèce qui a significativement la probabilité la plus élevée d'avoir rencontré le virus et développé des anticorps avec une prévalence de 73.2%, mais il faut rester vigilant sur ce résultat du fait du faible nombre de francolins prélevés par rapport aux autres oiseaux.

Tableau 14 : résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle

Espèce	Effectif	Positifs	Douteux	Prévalence réelle – IC 95%
PASDOM	877	15	9	2,0% [1,0-3,4]
PYCTIS	927	61	24	9,2% [7,3-11,5]
STRSEN	831	218	7	29,3% [26,0-32,8]
STRDEC	537	227	19	50,8% [46,1-55,5]
COLLIV	270	32	8	15,5% [11,3-20,8]
FRAPON	59	36	3	73,2% [58,9-85,2]
Total	3501	589	70	20,1% [18,7-21,6]

Il y a significativement plus d'adultes (oiseaux de plus d'un an) que de juvéniles qui présentent des anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle (OR = 1.35 [1.13-1.62], $p < 0.001$). Cela pourrait s'expliquer par un système immunitaire naïf chez les juvéniles au contraire des adultes qui ont une probabilité plus grande d'avoir rencontré le virus auparavant et d'avoir créé des anticorps. Il a plusieurs fois été décrit des signes cliniques et

une mortalité plus importants chez les juvéniles que chez les adultes expliqués par leur système immunitaire immature (Hoque et al., 2012).

Les oiseaux présentant des sérologies positives sont plus présents sur le site SKHBC-AD que sur le site NARC mais ce n'est pas significatif (OR = 1.65 [1.4-1.94], p = 0.021) (Tableau 15).

Tableau 15 : résultats des tests sérologiques dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle par site de prélèvement

Espèce	Site NARC		Site SKHBC-AD	
	Nombre de positifs	Prévalence réelle IC 95%	Nombre de positifs	Prévalence réelle IC 95%
PASDOM	13/572	1,4% [0,4-3,2]	11/305	2,9% [1,2-6,0]
PYCTIS	27/338	7,9% [5,1-11,7]	58/589	9,9% [7,5-12,9]
STRSEN	90/308	31,8% [26,4-37,8]	135/523	27,8% [23,8-32,2]
STRDEC	69/180	42,3% [34,7-50,5]	177/356	55,1% [49,3-60,9]
COLLIV	38/249	15,9% [11,5-21,5]	2/19	10,7% [2,2-34,2]
FRAPON	12/22	60,2% [37,8-81,0]	27/37	80,9% [63,0-93,9]
Total	249/1669	15,8% [14-17,9]	410/1830	24,1% [22,0-26,3]

2. Résultats des tests PCR

a) RT-PCR quantitative

L'étude a été réalisée sur 1318 pools. Le virus de l'Influenza aviaire a été détecté dans 36 pools, 9 pools contenant des écouvillons et 27 pools contenant des organes; et le virus de la maladie de Newcastle dans 46 pools, 28 pools contenant des écouvillons et 17 pools contenant des organes. Lors de l'étude individuelle des échantillons, nous n'avons pas eu pour chaque pool positif au moins un échantillon positif, nous n'avons donc pas pu évaluer le nombre d'échantillons positifs.

Nous avons constitué les pools écouvillons au fur et mesure de la réception des cartes FTA. Les pools ne sont pas forcément monospécifiques et peuvent contenir de une à quatre espèces différentes. C'est pourquoi nous avons utilisé l'optimisation du maximum de vraisemblance afin de calculer les prévalences, à partir des résultats des pools écouvillons.

Nous avons des prévalences qui sont relativement faibles, à la fois pour le virus de l'Influenza aviaire et le virus de la maladie de Newcastle (Tableau 16). Pour ce dernier, cela dénote avec

les résultats des tests sérologiques, pour lesquels les prévalences sont nettement supérieures. D'autres espèces ont été prélevées, dont les outardes sentinelles. Aucun de ces oiseaux n'a été retrouvé positif pour aucun des deux virus.

Tableau 16 : prévalences réelles des pools à partir de la RT-PCR quantitative

Espèce	Virus de l'Influenza aviaire	Virus de la maladie de Newcastle
	Prévalence réelle IC 95%	Prévalence réelle IC 95%
PASDOM	0.3% [0-0.8]	0.2% [0-0.8]
PYCTIS	0.2% [0-0.5]	0.4% [0.1-1.0]
STRSEN	0.1% [0-0.4]	1.0% [0.4-1.9]
STRDEC	0.8% [0.2-1.7]	1.4% [0.4-2.7]
COLLIV	0.5% [0-1.6]	1.0% [0.2-2.4]
FRAPON	1.2% [0-4.2]	3.1% [0.2-8.3]
Total	0.3% [0-0.9]	0.6% [0.2-1.3]

A chaque RT-PCR quantitative réalisée, nous avons utilisé trois témoins positifs avec des charges virales différentes : 10^1 , 10^2 , et 10^3 copies de génomes par $2\mu\text{L}$. A partir des cycles seuils des témoins positifs et de nos échantillons (Tableau 17), nous avons essayé de déterminer quelle était la charge virale moyenne de nos échantillons positifs.

Tableau 17 : Cycles seuils (Ct) moyens des témoins positifs et des échantillons obtenus par RT-PCR quantitative pour le virus de l'Influenza aviaire et pour le virus de la maladie de Newcastle

Virus étudié	Echantillons	10^3	10^2	10^1	Ecouvillons	Organes
Virus de l'Influenza aviaire	Moyenne Ct	21,591	26,164	32,659	30,679	34,154
	Ct maximal				32,591	36,33
	Ct minimal				26,34	29,674
Virus de la maladie de Newcastle	Moyenne Ct	16,767	21,074	22,391	31,877	25,546
	Ct maximal				39,362	27,801
	Ct minimal				20,223	20,406

A partir des résultats des témoins positifs, nous avons effectué une courbe de la charge virale en fonction du cycle seuil ou inversement (Figure 16 et Figure 17). Une courbe de tendance y a été insérée nous donnant l'équation $f(\text{cycle seuil}) = \text{charge virale}$ la plus probable (avec un coefficient de corrélation proche de 1). A partir de cette équation, la charge virale moyenne de nos échantillons est évaluée.

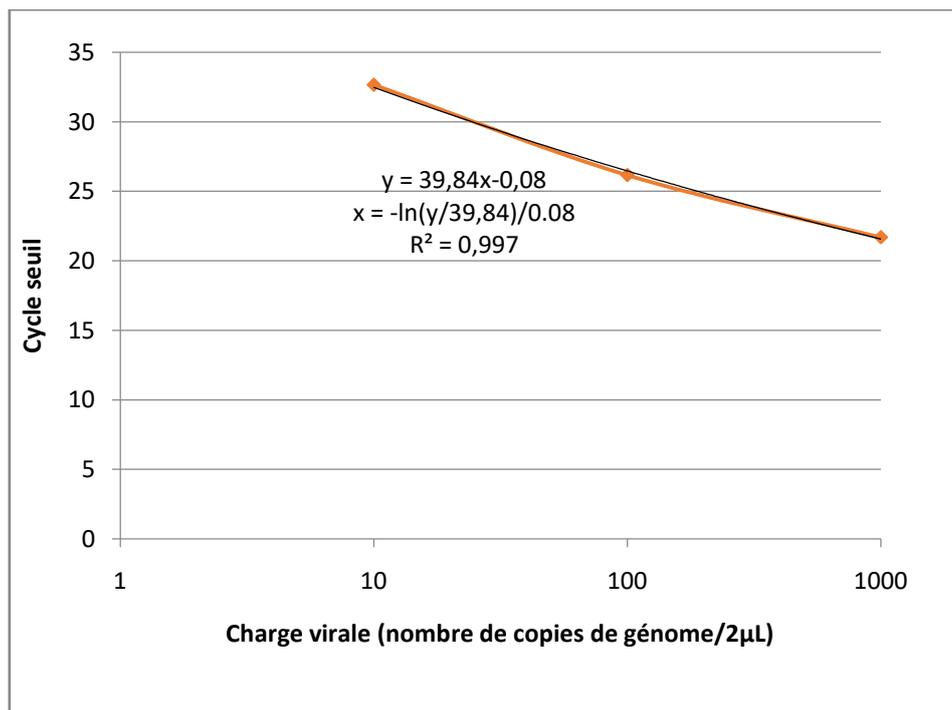


Figure 16 : Cycle seuil moyen obtenu par RT-PCR quantitative en fonction de la charge virale des témoins positifs du virus de l'Influenza aviaire (courbe orange) et courbe de tendance (courbe noire)

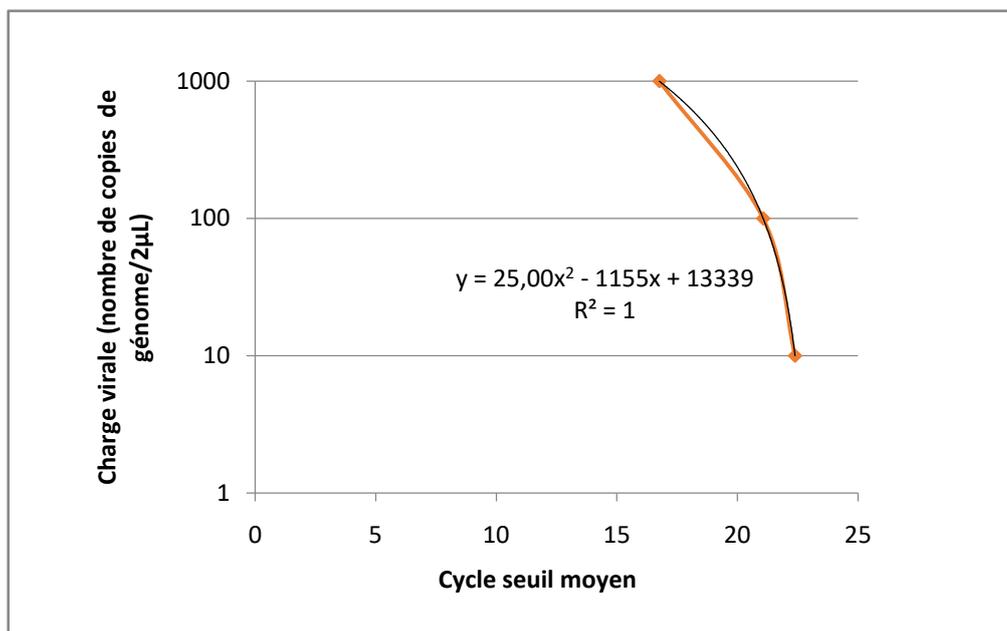


Figure 17 : Charge virale des témoins positifs de RT-PCRq concernant le virus de la maladie de Newcastle en fonction du cycle seuil moyen obtenu (courbe orange) et courbe de tendance (courbe noire).

Nous avons ainsi pu déterminer à partir de l'équation la charge virale moyenne des échantillons lorsque le cycle seuil correspondant était compris dans l'intervalle des cycles seuils des témoins positifs (et donc lorsque le cycle seuil appartenait à la courbe) (Tableau 18). Il faut cependant rester vigilant sur les résultats trouvés. En effet, l'écart théorique devrait être de trois cycles seuils par puissance de 10 ce qui n'est pas le cas avec notre gamme de témoins positifs. Pour le virus de l'Influenza aviaire, l'écart est plus élevé et pour le virus de la maladie de Newcastle nous aurions dû trouver un cycle seuil entre 19 et 20 pour le témoin positif de charge virale $10^2/2\mu\text{L}$.

Tableau 18 : Charge virale moyenne (en copies de génomes/ $2\mu\text{L}$) des échantillons calculée à partir des valeurs des cycles seuils moyens.

		Ecouvillons	Organes
Virus de l'Influenza aviaire	Cycle seuil	30,679 [26,34-32,59]	34,154 [29,67-36,33]
	Charge virale	26,2 [12,3-176]	Maximum 39,74
Virus de la maladie de Newcastle	Cycle seuil	31,877 [20,22-39,36]	25,546 [20,40-27,80]
	Charge virale	Maximum 205,7	Maximum 180,2

Pour le virus de l'Influenza aviaire la charge virale moyenne à partir des écouvillons est de 13 copies de génome par microlitre. Nous n'avons pu obtenir pour les organes qu'une valeur de charge virale maximale de 19 copies de génome par microlitre, ce qui est relativement faible. Pour le virus de la maladie de Newcastle, seules les charges virales maximales ont pu être calculées. Cependant, les cycles seuils moyens ayant une valeur supérieure à celui du témoin positif 10^1 , nous pouvons conclure que les charges virales moyennes sont inférieures à dix copies de génome, à la fois pour les écouvillons et les organes. Les échantillons positifs pour le virus de l'Influenza aviaire et pour le virus de la maladie de Newcastle ont donc des charges virales faibles en moyenne.

b) PCR conventionnelle et séquençage

Nous n'avons obtenu aucune séquence à partir de la RT-PCR conventionnelle ciblant le virus de l'Influenza aviaire.

Concernant l'*Avian avulavirus 1*, nous avons obtenu huit séquences provenant des pools écouvillons. Toutes ces séquences sont différentes du contrôle positif. Elles sont présentées dans l'arbre phylogénétique ci-dessous (séquences surlignées en rouge) (Figure 18).

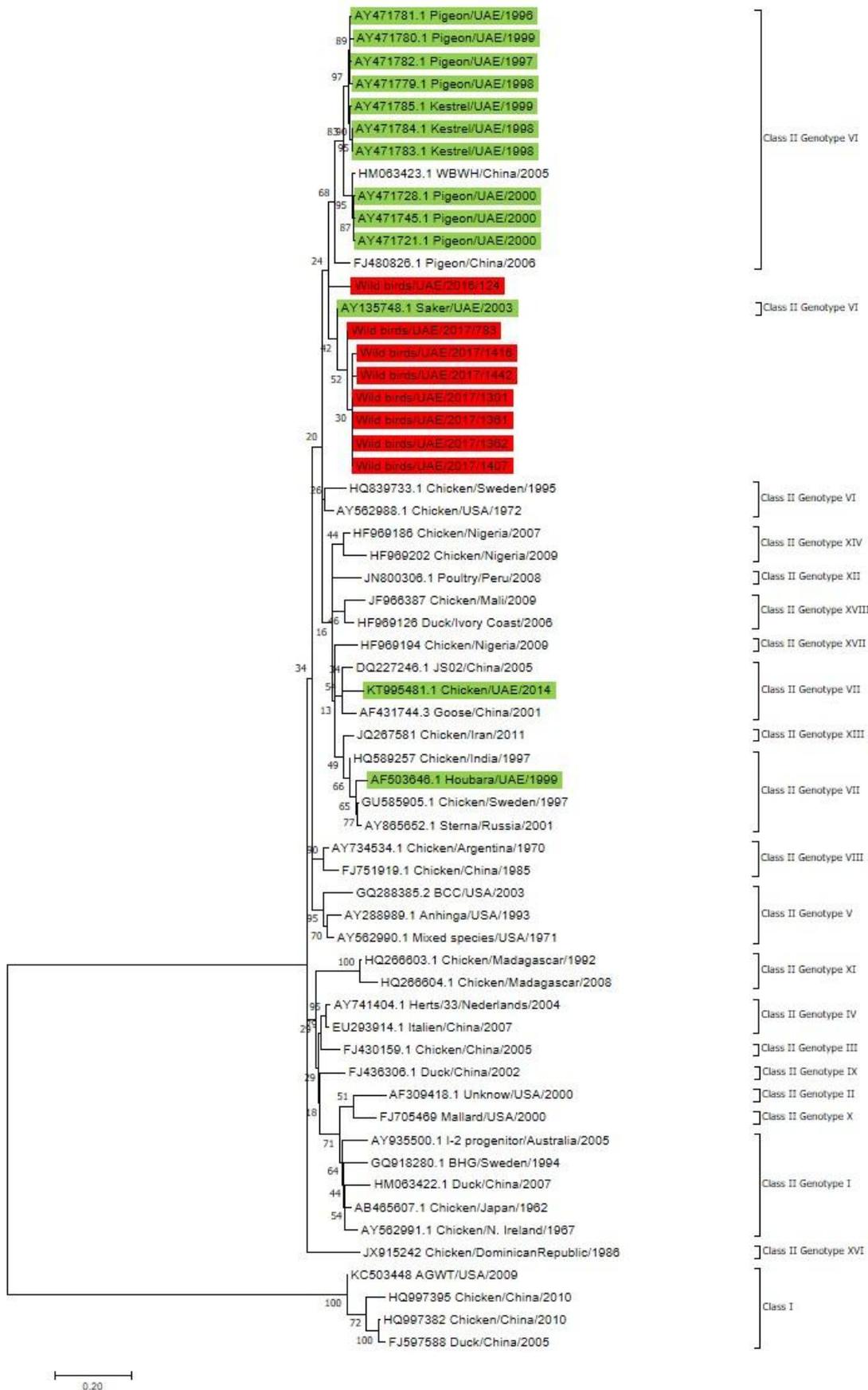


Figure 18: Analyse moléculaire phylogénétique des séquences génétiques de PMV-1. Les séquences retrouvées dans notre étude sont surlignées en rouge. Les séquences surlignées en vert sont celles retrouvées aux EAU.

On observe deux types de séquences, appartenant au génotype VI. La première concerne une seule séquence (pool 124) proche des souches décrites en Europe de l'ouest chez des pigeons. La deuxième concerne les sept autres séquences (pools 783, 1301, 1361, 1362, 1407, 1416 et 1442) et est proche des souches décrites en Asie du sud-est chez des pigeons.

Deux pools présentent des échantillons d'une seule espèce uniquement : le pool 783, qui est constitué d'échantillons provenant de pigeons biset, et le pool 1442 qui est constitué d'échantillons provenant de bulbuls à oreillons blancs.

Dans chacune des séquences, nous avons identifié de multiples acides aminés basiques entre les positions 113 et 116 et une phénylalanine en position 117 (Figure 19). Les *Avian avulavirus 1* présentant ces caractéristiques sont considérés comme virus de la maladie de Newcastle (OIE, 2012 ; Nanthakumar et al., 2000 ; Collins et al., 1996).

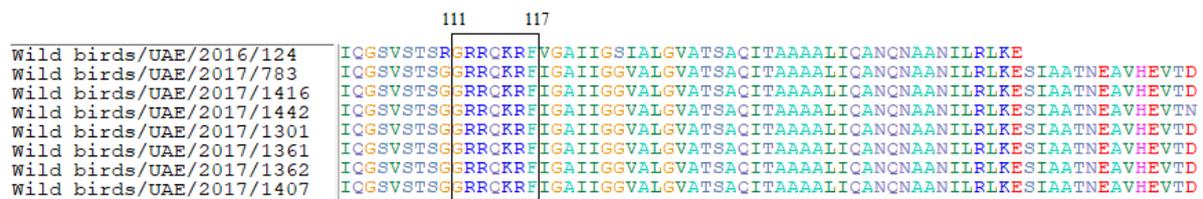


Figure 19 : séquences en acides aminés issues des séquences du gène de fusion F de PMV-1 isolées à partir des souches identifiées dans l'étude. Dans le rectangle noir on peut observer les multiples acides aminés basiques entre les positions 113 et 116 suivis de la phénylalanine en position 117, caractéristique des souches hautement pathogènes de PMV-1.

Les séquences identifiées ne sont pas exactement similaires aux séquences précédemment retrouvées et décrites aux EAU (séquences surlignées en vert dans l'arbre phylogénétique). Ces huit séquences sont donc considérées comme nouvellement décrites aux EAU.

V. Discussion

Plusieurs études expérimentales existent sur la sensibilité des passereaux aux virus de l'Influenza aviaire et de la maladie de Newcastle. Par contre, il y en a peu sur la recherche du virus au sein des populations sauvages. Une étude réalisée au Vietnam en 2006 sur des moineaux domestiques proches de fermes de poulets a montré que 3.80% excrétaient le virus de la maladie de Newcastle, contre 0.2% dans notre étude (Silva et al., 2006). Il n'existe pas de publications sur le Bulbul à oreillons blancs.

On retrouve plus de publications chez les pigeons et les tourterelles, notamment avec la caractérisation du PPMV-1 (Pigeon avulavirus 1). La recherche d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle montre souvent des prévalences élevées. Une étude réalisée en Slovénie en 2000 a montré une prévalence sérologique de 84.2% chez le Pigeon biset (Dovč et al., 2004), alors qu'une autre réalisée au Brésil en 2010 a montré une prévalence de 5.5% (de Sousa et al., 2010). On retrouve des prévalences élevées dans notre étude avec 15,5%, 29.3% et 50.8% pour le Pigeon biset, la Tourterelle maillée et la Tourterelle turque respectivement.

Une étude rétrospective sur le portage du virus Influenza aviaire chez les pigeons et les tourterelles a rassemblé 32 recherches réalisées dans 24 pays différents de 1985 à 2013 (Abolnik, 2014). Il s'agissait surtout de régions où des épizooties étaient en cours. Au total la séroprévalence était de 8.01% avec une séroprévalence pour les virus hautement pathogènes de 0.37%. Le virus a été isolé chez 1.1% des oiseaux. Dans notre étude, les séroprévalences sont quasi nulles et le virus n'est isolé que chez 0.1 à 0.8% des oiseaux. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait qu'il n'y avait pas d'épizootie connue en cours dans la région étudiée.

Plusieurs études ont été réalisées sur le virus de l'Influenza aviaire et sur le virus de la maladie de Newcastle au Moyen Orient.

Des recherches récentes ont montré des séroprévalences élevées concernant le virus de la maladie de Newcastle. En 2012, une étude réalisée en Iran sur des volailles de basse-cours a montré une séroprévalence de 40.13% (Saadat et al., 2014). De même, une étude réalisée en 2016 en Oman a montré une séroprévalence de 33.8% (Alsahami et al., 2018). Dans notre étude, la séroprévalence totale est elle aussi élevée (20.1%).

On retrouve aussi des séroprévalences importantes pour le virus Influenza aviaire chez les volailles domestiques : 34.28% et 21.28% chez des canards et des poulets respectivement en

Arabie Saoudite en 2010 (Alkhalaf, 2010), 39% en Iran en 2012 (Saadat et al., 2014), et 37.5% en Oman en 2015 (Shekaili et al., 2015). Il s'agissait à chaque fois de souche H9. Dans notre étude, qui porte sur des oiseaux sauvages, la séroprévalence est nulle.

Nous pouvons observer dans notre étude des prévalences sérologique et virologique très faibles pour le virus de l'Influenza aviaire. La circulation et l'excrétion du virus sont donc limitées et les oiseaux semblent infectés de manière sporadique. Les espèces étudiées, qui sont les oiseaux résidents les plus présents dans la zone d'étude, ne semblent donc pas représenter un risque majeur dans la transmission du virus aux outardes et ne joueraient qu'un rôle secondaire. Cependant, même si on ne peut pas les considérer comme espèce réservoir elles sont capables d'être des espèces relais.

Concernant le virus de la maladie de Newcastle, nous pouvons observer une différence importante entre les résultats des tests sérologiques et virologiques. La séroprévalence est élevée pour deux ordres : les Colombiformes représentés par le Pigeon biset, la Tourterelle maillée et la Tourterelle turque et les Galliformes représentés par le Francolin gris. On retrouve ces résultats dans une moindre mesure pour les prévalences virologiques. Il en est de même dans la littérature. En effet, les Galliformes sont infectés par tous les génotypes de l'*Avian avulavirus 1* et on retrouve souvent des séroprévalences élevées (Alsahami et al., 2018 ; Dimitrov et al., 2016 ; Saadat et al., 2014). Les Colombiformes sont surtout infectés par les souches du génotypes VI que l'on nomme souvent Pigeon avulavirus 1 (Dimitrov et al., 2016).

On peut donc supposer que les Colombiformes et les Galliformes joueraient un rôle important dans le maintien du virus de la maladie de Newcastle avec une circulation du virus entre les oiseaux. Les oiseaux sont ainsi régulièrement infectés et peuvent transmettre le virus lors de la période d'excrétion.

Nous avons rencontré plusieurs limites dans notre étude.

Nous avons observé des prévalences différentes pour le virus de la maladie de Newcastle, avec des prévalences élevées pour les tests ELISA mais faibles pour les RT-PCR. Cela a déjà été rapporté dans des études concernant le virus de l'Influenza aviaire. Une première étude réalisée en octobre 2007 en Egypte sur 200 oiseaux de basse-cours a montré une séroprévalence de 4.9% mais aucun écouvillon positif par RT-PCR (El-Zoghby et al., 2011).

Une autre étude réalisée en Egypte entre 2010 et 2013 sur 135 oiseaux sauvages avait montré une séroprévalence allant de 44.8% pour les pigeons à 87.9% pour les aigrettes mais seulement deux oiseaux positifs en RT-PCR (Fadel, Afifi, 2017). Ces études émettaient l'hypothèse d'une infection ancienne par le virus, avec des oiseaux qui n'excrètent donc plus le virus mais qui présentent encore des anticorps. Dans notre étude, certains oiseaux ont été capturés plusieurs fois et lors de chaque capture des prises de sang ont été effectuées (Annexe 6). Nous avons constaté que 47 oiseaux positifs au premier test ELISA l'étaient aussi au deuxième, le prélèvement ayant eu lieu de 2 à 18 mois plus tard ; cette hypothèse est donc valide.

De plus, nous n'avons étudié que les *Avian avulavirus 1* de clade II. Les *Avian avulavirus* de clade I pourraient être recherchés bien qu'ils aient surtout été identifiés chez des oiseaux d'eau.

Nous n'avons pas pu déterminer le sous-type du virus Influenza détecté à la fois par ELISA et RT-PCR. Nous voulions effectuer des tests ELISA spécifiques des sous-types H5 et H7 mais nous n'avions pas assez de sérum. Les prises de sang sont difficiles à réaliser sur les oiseaux et on ne peut d'ailleurs pas prélever plus d'un pourcent de leur poids corporel sans atteinte de l'état général, ce qui limite les quantités prélevées (Doneley, 2011).

Nous avons eu des problèmes de détection par RT-PCR quantitative lors de l'étude des échantillons analysés individuellement. En effet, parmi les pools reconnus comme positifs nous aurions dû avoir au moins un échantillon par pool concerné positif avec le même protocole. Nous avons émis plusieurs hypothèses face à ces problèmes de détection.

La première est un manque de matière sur les cartes FTA. Sur chaque carte, une découpe a déjà été effectuée une première fois lors de l'étude des pools. Ainsi, lors de la deuxième découpe, le morceau prélevé ne présentait pas forcément des dépôts de matière organique sur toute sa surface. Les charges virales pouvant être faibles, cela réduit encore plus la concentration en virus, qui peut ne pas être détecté pas la suite. De plus, l'empreinte sur carte FTA diminue la quantité de matériel biologique et l'envoi des Emirats Arabes Unis en France entraîne un risque de rupture de la chaîne du froid.

Des études sur les problèmes de détection par PCR ont été réalisées montrant que plusieurs facteurs pouvaient rentrer en compte. Tout d'abord le dépôt sur écouvillon, qui est la méthode de choix pour effectuer les prélèvements : d'après des recherches il y aurait une perte de charge virale dans la matrice de l'écouvillon même si les conditions de stockage sont respectées (Fereidouni et al., 2012). Le deuxième facteur est la présence d'inhibiteurs de la

PCR dans les matières fécales (sels biliaires, complexes de polysaccharides) diminuant l'efficacité de la PCR (Fereidouni et al., 2012 ; Rådström et al., 2004). La mise en pool des échantillons a diminué la concentration de ces inhibiteurs et a pu augmenter de ce fait la sensibilité de la PCR.

Nous avons pu constater à partir de nos résultats que les charges retrouvées sont faibles. Ainsi, les problèmes de détection peuvent aussi être dus à des charges virales trop faibles.

Nous avons eu des problèmes de gestion des échantillons et de constitution des pools, ce qui a rendu difficile le calcul des prévalences par espèce. Nous avons pris en compte cette erreur afin de ne pas la reproduire par la suite.

Nous avons pu obtenir des séquences de l'*Avian avulavirus 1* à partir de huit pools. Les souches mises en évidence appartiennent au génotype VI. Ce génotype, faisant parti de la clade II, est considéré comme panzootique et on le réfère parfois au Pigeon avulavirus 1 (Dimitrov et al., 2016). Il s'agit d'un génotype très diversifié génétiquement avec neuf sous-types (VIa à VIi), qui est hautement pathogène chez les volailles. La majorité des sous-types est rencontrée chez les oiseaux de la famille des Colombidés mais les autres sont souvent rencontrés chez la volaille. Ce génotype est répandu là où il y a des courses de pigeons et dans les régions où on retrouve des pigeons et des tourterelles.

CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer que pour six espèces d'oiseaux sauvages résidentes présentes aux Emirats Arabes Unis, la prévalence d'infection par le virus de l'Influenza aviaire est faible. Le risque de transmission aux élevages conservatoires présents sur les zones étudiées est donc mineur. Nous avons par contre remarqué une séroprévalence élevée pour le virus de la maladie de Newcastle bien qu'il y ait peu d'oiseaux qui excrètent le virus. Ces espèces, et notamment celles appartenant à l'ordre des Colombiformes et des Galliformes, jouent donc un rôle important dans le maintien du virus et peuvent être considérés comme espèce réservoir. Il est donc important de continuer la surveillance des oiseaux sauvages, qui peuvent être porteurs du virus de la maladie de Newcastle et du virus de l'Influenza aviaire.

Par ailleurs, un oiseau migrateur de la famille des Laridés, le Goéland brun, a présenté une sérologie positive pour le virus de l'Influenza aviaire. Cela remet en lumière la notion d'espèces relais, avec des oiseaux résidents proches à la fois de l'habitat d'oiseaux migrateurs et des élevages et étant sensibles aux virus aviaires. Il serait donc intéressant d'étudier aussi les oiseaux d'eau afin de comprendre l'ensemble de l'écologie des deux virus.

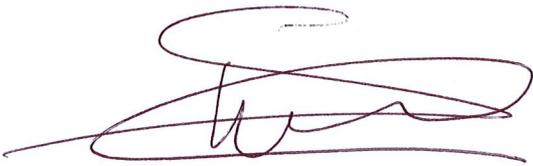
Nous n'avons pas pu exploiter les résultats découlant de l'étude des organes prélevés sur les oiseaux morts. De nouvelles expériences vont être effectuées en étudiant chaque oiseau de manière individuelle. Les résultats des RT-PCR concernant les organes pourront ainsi compléter les résultats obtenus à partir des écouvillons.

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 **Claudine BARATEGUI** intitulée « **Etude épidémiologique du virus de l'influenza aviaire et du virus de la maladie de Newcastle chez l'avifaune sauvage aux Emirats arabes Unis** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

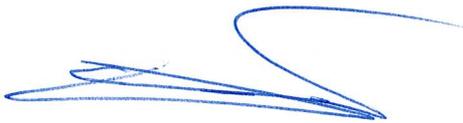
Fait à Toulouse, le 21 novembre 2018
Professeur Stéphane BERTAGNOLI
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



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



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



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 CEVU

Régine ANDRE-OBRECHT

Mlle Claudine BARATEGUI
a été admis(e) sur concours en : 2013
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017
a validé son année d'approfondissement le : 06/09/2018
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

- AAMIR, U.B., WERNERY, Ulrich, ILYUSHINA, N. et WEBSTER, R.G., 2007. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. In : *Virology*. avril 2007. Vol. 361, n° 1, p. 45-55. DOI 10.1016/j.virol.2006.10.037.
- ABOLNIK, Celia, 2014. A current review of avian influenza in pigeons and doves (Columbidae). In : *Veterinary Microbiology*. juin 2014. Vol. 170, n° 3-4, p. 181-196. DOI 10.1016/j.vetmic.2014.02.042.
- AL-AZEMI, Ahmad, BAHL, Justin, AL-ZENKI, Sameer, AL-SHAYJI, Yousif, AL-AMAD, Sami, CHEN, Honglin, GUAN, Yi, PEIRIS, J. S. Malik et SMITH, Gavin J. D., 2008. Avian influenza A virus (H5N1) outbreaks, Kuwait, 2007. In : *Emerging Infectious Diseases*. juin 2008. Vol. 14, n° 6, p. 958-961. DOI 10.3201/eid1406.080056.
- ALEXANDER, Dennis J, 2000. A review of avian influenza in different bird species. In : *Veterinary Microbiology*. mai 2000. Vol. 74, n° 1-2, p. 3-13. DOI 10.1016/S0378-1135(00)00160-7.
- ALEXANDER, Dennis J., BELL, Jonathan G. et ALDERS, R. G., 2004. *A technology review: Newcastle disease, with special emphasis on its effect on village chickens*. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO animal production and health paper, 161. ISBN 978-92-5-105080-4. SF995.6.N4 A34 2004
- ALKHALAF, Abdullah N., 2010. Field investigation on the prevalence of avian influenza virus infection in some localities in Saudi Arabia. In : *Pakistan Veterinary Journal*. juillet 2010. Vol. 30, n° 3.
- ALSAHAMI, Ali, IDERIS, Aini, OMAR, Abdulrahman, RAMANOON, Siti Zubaidah et SADIQ, Mohammed Babatunde, 2018. Seroprevalence of Newcastle disease virus in backyard chickens and herd-level risk factors of Newcastle disease in poultry farms in Oman. In : *International Journal of Veterinary Science and Medicine* [en ligne]. juillet 2018. [Consulté le 28 octobre 2018]. DOI 10.1016/j.ijvsm.2018.06.004.
- ANON., 2001. *La PCR quantitative en temps réel ou la « Taqman »*. 2001. S.l. : INRA.
- ANON., 2002. *Rapport du groupe de travail sur le risque de transmission à l'homme des virus influenza aviaires*. S.l. : Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- ANON., [sans date]. *Principes théoriques de la PCRq*. S.l. : Institut Cochin.
- ASSAM, A., ABDU, P.A., OWOADE, A., EZEALOR, A. et SA'IDU, L., 2014. Avian influenza, newcastle disease antibodies and antigens in apparently healthy wild birds in Kaduna State, Nigeria. In : *International Journal of Infectious Diseases*. avril 2014. Vol. 21, p. 181. DOI 10.1016/j.ijid.2014.03.799.
- AYALA, Andrea J., DIMITROV, Kiril M., BECKER, Cassidy R., GORAICHUK, Iryna V., ARNS, Clarice W., BOLOTIN, Vitaly I., FERREIRA, Helena L., GERILOVYCH, Anton P., GOUGOULOVA, Gabriela V., MARTINI, Matheus C., MUZYKA, Denys V., ORSI, Maria A., SCAGION, Guilherme P., SILVA, Renata K., SOLODIANKIN, Olexii S., STEGNIY, Boris T., MILLER, Patti J. et AFONSO, Claudio L., 2016. Presence of Vaccine-Derived

- Newcastle Disease Viruses in Wild Birds. In : WALDENSTRÖM, Jonas (éd.), *PLOS ONE*. 14 septembre 2016. Vol. 11, n° 9, p. e0162484. DOI 10.1371/journal.pone.0162484.
- BAILEY, T. A., WERNERY, U., SAMOUR, J. H. et NALDO, J. L., 1998. Antibody response of kori bustards (*Ardeotis kori*) and houbara bustards (*Chlamydotis undulata*) to live and inactivated Newcastle disease vaccines. In : *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. décembre 1998. Vol. 29, n° 4, p. 441 -450.
- BEN SHABAT, M., MEIR, R., HADDAS, R., LAPIN, E., SHKODA, I., RAIBSTEIN, I., PERK, S. et DAVIDSON, I., 2010. Development of a real-time TaqMan RT-PCR assay for the detection of H9N2 avian influenza viruses. In : *Journal of Virological Methods*. septembre 2010. Vol. 168, n° 1 -2, p. 72 -77. DOI 10.1016/j.jviromet.2010.04.019.
- BOCK, Carl E., JONES, Zach F. et BOCK, Jane H., 2008. THE OASIS EFFECT: RESPONSE OF BIRDS TO EXURBAN DEVELOPMENT IN A SOUTHWESTERN SAVANNA. In : *Ecological Applications*. juillet 2008. Vol. 18, n° 5, p. 1093 - 1106. DOI 10.1890/07-1689.1.
- BOON, Adrianus C.M., SANDBULTE, Matthew R., SEILER, Patrick, WEBBY, Richard J., SONGSERM, Thaweesak, GUAN, Yi et WEBSTER, Robert G., 2007. Role of Terrestrial Wild Birds in Ecology of Influenza A Virus (H5N1). In : *Emerging Infectious Diseases*. novembre 2007. Vol. 13, n° 11, p. 1720 -1724. DOI 10.3201/eid1311.070114.
- BROWN, Justin D., STALLKNECHT, David E., BERGHAUS, Roy D. et SWAYNE, David E., 2009. Infectious and Lethal Doses of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for House Sparrows (*Passer Domesticus*) and Rock Pigeons (*Columbia Livia*). In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. juillet 2009. Vol. 21, n° 4, p. 437 -445. DOI 10.1177/104063870902100404.
- CAPPELLE, J., CARON, A., SERVAN DE ALMEIDA, R., GIL, P., PEDRONO, M., MUNDAVA, J., FOFANA, B., BALANÇA, G., DAKOUO, M., OULD EL MAMY, A. B., ABOLNIK, C., MAMINIAINA, O. F., CUMMING, G. S., DE VISSCHER, M.-N., ALBINA, E., CHEVALIER, V. et GAIDET, N., 2015. Empirical analysis suggests continuous and homogeneous circulation of Newcastle disease virus in a wide range of wild bird species in Africa. In : *Epidemiology and Infection*. avril 2015. Vol. 143, n° 06, p. 1292 - 1303. DOI 10.1017/S095026881400185X.
- CARON, A., GROSBOIS, V., ETTER, E., GAIDET, N. et DE GARINE-WICHATITSKY, M., 2014. Bridge hosts for avian influenza viruses at the wildlife/domestic interface: An eco-epidemiological framework implemented in southern Africa. In : *Preventive Veterinary Medicine*. décembre 2014. Vol. 117, n° 3 -4, p. 590 -600. DOI 10.1016/j.prevetmed.2014.09.014.
- CATTOLI, Giovanni, SUSTA, Leonardo, TERREGINO, Calogero et BROWN, Corrie, 2011. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. juillet 2011. Vol. 23, n° 4, p. 637 -656. DOI 10.1177/1040638711407887.

- CAUSEY, Douglas et EDWARDS, Scott V., 2008. Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. In : *The Journal of Infectious Diseases*. 15 février 2008. Vol. 197, n° s1, p. S29 - S33. DOI 10.1086/524991.
- CHANTELAT, Jean-Claude, 2001. *Les oiseaux de France, 7ème édition*. S.l. : s.n.
- CHEN, H.-X., SHEN, H.-G., LI, X.-L., ZHOU, J.-Y., HOU, Y.-Q., GUO, J.-Q. et HU, J.-Q., 2006. Seroprevalance and Identification of Influenza A Virus Infection from Migratory Wild Waterfowl in China (2004-2005). In : *Journal of Veterinary Medicine Series B*. mai 2006. Vol. 53, n° 4, p. 166 - 170. DOI 10.1111/j.1439-0450.2006.00940.x.
- CHESNEAU, Christophe, 2018. Sur l'Estimateur du Maximum de Vraisemblance (emv). In : [en ligne]. octobre 2018. Disponible à l'adresse : <https://chesneau.users.lmno.cnrs.fr>.
- COLLINS, M. S., STRONG, I. et ALEXANDER, D. J., 1996. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses" based on the nucleotide sequence of the fusion protein gene. In : *Archives of Virology*. mars 1996. Vol. 141, n° 3-4, p. 635 - 647. DOI 10.1007/BF01718322.
- COMIN, Arianna, TOFT, Nils, STEGEMAN, Arjan, KLINKENBERG, Don et MARANGON, Stefano, 2013. Serological diagnosis of avian influenza in poultry: is the haemagglutination inhibition test really the 'gold standard'? : Evaluation of serological tests for avian influenza. In : *Influenza and Other Respiratory Viruses*. mai 2013. Vol. 7, n° 3, p. 257 - 264. DOI 10.1111/j.1750-2659.2012.00391.x.
- CROSS, Garry, 1995. Paramyxovirus-1 infection (Newcastle disease) of pigeons. In : *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. avril 1995. Vol. 4, n° 2, p. 92 - 95. DOI 10.1016/S1055-937X(05)80044-1.
- DASZAK, P., 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. In : *Science*. 21 janvier 2000. Vol. 287, n° 5452, p. 443 - 449. DOI 10.1126/science.287.5452.443.
- DE SOUSA, Eliane, JÚNIOR, Angelo Berchieri, PINTO, Aramis Augusto, MACHADO, Rosangela Zacarias, CARRASCO, Adriano de Oliveira Torres, MARCIANO, José Antonio et WERTHER, Karin, 2010. Prevalence of Salmonella spp. Antibodies to Toxoplasma gondii, and Newcastle Disease Virus in Feral Pigeons (Columba livia) in the City of Jaboticabal, Brazil. In : *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. décembre 2010. Vol. 41, n° 4, p. 603 - 607. DOI 10.1638/2008-0166.1.
- DEL HOYO, Joseph, ELLIOTT, Andrew et CHRISTIE, David, 2005. *Handbook of the birds of the world. Cuckoo-shrikes to Thrushes*. S.l. : s.n.
- DEL HOYO, Joseph, ELLIOTT, Andrew et CHRISTIE, David, 2009. *Handbook of the birds of the world. Bush-shrikes to Old World Sparrows*. S.l. : s.n.
- DEL HOYO, Joseph, ELLIOTT, Andrew et SARGATAL, Jordi, 1994. *Handbook of the birds of the world. New World Vultures to Guinea-fowl*. S.l. : s.n.
- DEL HOYO, Joseph, ELLIOTT, Andrew et SARGATAL, Jordi, 1997. *Handbook of the birds of the world. Sandgrouse to Cuckoos*. S.l. : s.n.

DEVLIN, Joanne M, VAZ, Paola K, COPPO, Mauricio JC et BROWNING, Glenn F, 2016. Impacts of poultry vaccination on viruses of wild bird. In : *Current Opinion in Virology*. août 2016. Vol. 19, p. 23-29. DOI 10.1016/j.coviro.2016.06.007.

DIEL, Diego G., DA SILVA, Luciana H.A., LIU, Hualei, WANG, Zhiliang, MILLER, Patti J. et AFONSO, Claudio L., 2012. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. In : *Infection, Genetics and Evolution*. décembre 2012. Vol. 12, n° 8, p. 1770-1779. DOI 10.1016/j.meegid.2012.07.012.

DIMITROV, Kiril M., RAMEY, Andrew M., QIU, Xueting, BAHN, Justin et AFONSO, Claudio L., 2016. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). In : *Infection, Genetics and Evolution*. avril 2016. Vol. 39, p. 22-34. DOI 10.1016/j.meegid.2016.01.008.

DONELEY, B., 2011. *Avian medicine and surgery in practice. Companion and aviary birds*. S.l. : s.n.

DOVČ, Alenka, ZORMAN-ROJS, Olga, VERGLES RATAJ, Aleksandra, BOLE-HRIBOVŠEK, Vojka, KRAPEŽ, U. et DOBEIC, M., 2004. Health status of free-living pigeons (*Columba livia domestica*) in the city of Ljubljana. In : *Acta Veterinaria Hungarica*. avril 2004. Vol. 52, n° 2, p. 219-226. DOI 10.1556/AVet.52.2004.2.10.

DUPONT, Bernard, 2015. *Laughing Dove (Streptopelia senegalensis)* [en ligne]. janvier 2015. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Laughing_Dove_\(Streptopelia_senegalensis\)_\(17326371156\).jpg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Laughing_Dove_(Streptopelia_senegalensis)_(17326371156).jpg?uselang=fr).

EL-ZOGHBY, E. F., ABDELWHAB, E. M., ARAFA, A., SELIM, A. A., KHOLOUSY, S. G., KILANY, W. H., HASSAN, M. K., EL-KANAWATI, Z., ALY, M. M. et HAFEZ, H. M., 2011. Active surveillance of avian influenza virus in backyard birds in Egypt. In : *The Journal of Applied Poultry Research*. 1 décembre 2011. Vol. 20, n° 4, p. 584-588. DOI 10.3382/japr.2011-00343.

FADEL, Hanaa Mohamed et AFIFI, Rabab, 2017. Investigation of avian influenza infection in wild birds in Ismailia and Damietta cities, Egypt. In : *Veterinary World*. juin 2017. Vol. 10, n° 6, p. 695-701. DOI 10.14202/vetworld.2017.695-701.

FEREIDOUNI, Sasan R., HARDER, Timm C., GAIDET, Nicolas, ZILLER, Mario, HOFFMANN, Bernd, HAMMOUMI, Saliha, GLOBIG, Anja et STARICK, Elke, 2012. Saving resources: Avian influenza surveillance using pooled swab samples and reduced reaction volumes in real-time RT-PCR. In : *Journal of Virological Methods*. décembre 2012. Vol. 186, n° 1-2, p. 119-125. DOI 10.1016/j.jviromet.2012.08.002.

FORREST, H. L., KIM, J.-K. et WEBSTER, R. G., 2010. Virus Shedding and Potential for Interspecies Waterborne Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Sparrows and Chickens. In : *Journal of Virology*. 1 avril 2010. Vol. 84, n° 7, p. 3718-3720. DOI 10.1128/JVI.02017-09.

FOUCHIER, R. A., BESTEBROER, T. M., HERFST, S., VAN DER KEMP, L., RIMMELZWAAN, G. F. et OSTERHAUS, A. D., 2000. Detection of influenza A viruses

from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. In : *Journal of Clinical Microbiology*. novembre 2000. Vol. 38, n° 11, p. 4096-4101.

GANAR, Ketan, DAS, Moushume, SINHA, Sugandha et KUMAR, Sachin, 2014. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. In : *Virus Research*. mai 2014. Vol. 184, p. 71 -81. DOI 10.1016/j.virusres.2014.02.016.

GÉROUDET, Paul, 1957. *Les passereaux, III: des pouillots aux moineaux*. S.l. : s.n.

GÉROUDET, Paul, 1962. *Guide des oiseaux d'Europe, troisième édition*. S.l. : s.n.

GOYAL, Ajay, 2014. *Pycnonotus leucotis* [en ligne]. décembre 2014. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse :

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pycnonotus_leucotis_by_Ajay_Goyal_\(cropped\).jpg?uselang=fr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pycnonotus_leucotis_by_Ajay_Goyal_(cropped).jpg?uselang=fr).

HOQUE, M.A., BURGESS, G.W., KARO-KARO, D., CHEAM, A.L. et SKERRATT, L.F., 2012. Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in north Queensland, Australia. In : *Preventive Veterinary Medicine*. janvier 2012. Vol. 103, n° 1, p. 49 -62.

DOI 10.1016/j.prevetmed.2011.08.013.

HULBERT, Lewis, 2017. *Feral pigeon (Columba livia domestica)* [en ligne]. mai 2017. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse :

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Feral_pigeon_\(Columba_livia_domestica\),_2017-05-27.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Feral_pigeon_(Columba_livia_domestica),_2017-05-27.jpg).

INSEE, 2016. Pays du Moyen-Orient. In : [en ligne]. 13 octobre 2016. Disponible à l'adresse : <https://www.insee.fr/fr/metadonnees/definition/c1202>.

IQBAL, Munir, YAQUB, Tahir, MUKHTAR, Nadia, SHABBIR, Muhammad Z et MCCAULEY, John W, 2013. Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds. In : *Veterinary Research*. 2013. Vol. 44, n° 1, p. 100. DOI 10.1186/1297-9716-44-100.

ISIDORO-AYZA, M., AFONSO, C. L., STANTON, J. B., KNOWLES, S., IP, H. S., WHITE, C. L., FENTON, H., RUDER, M. G., DOLINSKI, A. C. et LANKTON, J., 2017. Natural Infections With Pigeon Paramyxovirus Serotype 1: Pathologic Changes in Eurasian Collared-Doves (*Streptopelia decaocto*) and Rock Pigeons (*Columba livia*) in the United States. In : *Veterinary Pathology*. juillet 2017. Vol. 54, n° 4, p. 695 -703. DOI 10.1177/0300985817695782.

JONES, Kate E., PATEL, Nikkita G., LEVY, Marc A., STOREYGARD, Adam, BALK, Deborah, GITTLEMAN, John L. et DASZAK, Peter, 2008. Global trends in emerging infectious diseases. In : *Nature*. février 2008. Vol. 451, n° 7181, p. 990-993. DOI 10.1038/nature06536.

KASAMBE, Raju, 2017. *Grey Francolin Francolinus pondicerianus* [en ligne]. mars 2017. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse :

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Grey_Francolin_Francolinus_pondicerianus_by_Dr._Raju_Kasambe_DSCN6251_\(4\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Grey_Francolin_Francolinus_pondicerianus_by_Dr._Raju_Kasambe_DSCN6251_(4).jpg).

KEAWCHAROEN, Juthatip, VAN DEN BROEK, Jan, BOUMA, Annemarie, TIENSIN, Thanawat, OSTERHAUS, Albert D.M.E et HEESTERBEEK, Hans, 2011. Wild Birds and Increased Transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) among Poultry, Thailand. In : *Emerging Infectious Diseases*. juin 2011. Vol. 17, n° 6, p. 1016- 1022. DOI 10.3201/eid1706.100880.

KHALIL, S. et ANWAR, M., 2016. Habitat preference of Grey Francolin (*Francolinus pondicerianus*) in salt range, Punjab. In : *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 2016. Vol. 26, n° 3, p. 842- 849.

KHALIL, Sangam, ANWAR, Maqsood et HUSSAIN, Iftikhar, 2016. Breeding biology of grey francolin (*francolinus pondicerianus*) in salt range, Pakistan. In : *Pakistan Journal of Zoology*. 1 janvier 2016. Vol. 48, p. 115- 123.

KHAN†, Owais Ahmed, SHUAIB, Mohammad Adam, ABDEL RHMAN, Salah Shaban, ISMAIL, Mahmoud Moussa, HAMMAD, Yousef Al, ABDEL BAKY, Mansour Hashim, FUSARO, Alice, SALVIATO, Annalisa et CATTOLI, Giovanni, 2009. Isolation and identification of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus from Houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) and contact falcons. In : *Avian Pathology*. février 2009. Vol. 38, n° 1, p. 35- 39. DOI 10.1080/03079450802609815.

KIM, L. Mia, SUAREZ, David L. et AFONSO, Claudio L., 2008. Detection of a Broad Range of Class I and II Newcastle Disease Viruses Using a Multiplex Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. juillet 2008. Vol. 20, n° 4, p. 414- 425. DOI 10.1177/104063870802000402.

LE LOC'H, Guillaume, DUCATEZ, Mariette F, CAMUS-BOUCLAINVILLE, Christelle, GUÉRIN, Jean-Luc et BERTAGNOLI, Stéphane, 2014. Diversity of avipoxviruses in captive-bred Houbara bustard. In : *Veterinary Research* [en ligne]. décembre 2014. Vol. 45, n° 1. [Consulté le 11 juin 2018]. DOI 10.1186/s13567-014-0098-3. Disponible à l'adresse : <http://www.veterinaryresearch.org/content/45/1/98>.

LEPAGE, Denis, 2018. *The world bird database* [en ligne]. 2018. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : <https://avibase.bsc-eoc.org>.

LEVENTHAL, Alex, RAMLAWI, Assad, BELBIESI, Adel, SHEIKH, Sami, HADDADIN, Akhtam, HUSSEINI, Sari, ABDEEN, Ziad et COHEN, Dani, 2013. Enhanced Surveillance for Detection and Management of Infectious Diseases: Regional Collaboration in the Middle East. In : *Emerging Health Threats Journal*. janvier 2013. Vol. 6, n° 1, p. 19955. DOI 10.3402/ehth.v6i0.19955.

LI, Kuang-Po, CHANG, Poa-Chun, CHENG, Ming-Chu, TAN, Duen-Huey, CHEN, Li-Hsuan, LIU, Yu-Pin, LIN, Yu-Ju, TSAI, Hsiang-Jung et SHIEN, Jui-Hung, 2017. Sequence diversity and associated pathogenicity of the hemagglutinin cleavage site of H5N2 avian influenza viruses isolated from chickens in Taiwan during 2013–2015. In : *Journal of Veterinary Medical Science*. 2017. Vol. 79, n° 1, p. 108- 114. DOI 10.1292/jvms.16-0356.

LIANG, Xiao, CHIGERWE, Munashe, HIETALA, Sharon K. et CROSSLEY, Beate M., 2014. Evaluation of Fast Technology Analysis (FTA) Cards as an improved method for specimen collection and shipment targeting viruses associated with Bovine Respiratory

Disease Complex. In : *Journal of Virological Methods*. juin 2014. Vol. 202, p. 69-72. DOI 10.1016/j.jviromet.2014.02.022.

LIU, Junli, YAO, Lu, ZHAI, Feifei, CHEN, Yuqing, LEI, Jing, BI, Zhenwei, HU, Jianhua, XIAO, Qian, SONG, Suquan, YAN, Liping et ZHOU, Jiyong, 2018. Development and application of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of avian influenza virus subtype H5, H7 and H9. In : *Journal of Virological Methods*. février 2018. Vol. 252, p. 49-56. DOI 10.1016/j.jviromet.2017.11.005.

LOH, Elizabeth H., ZAMBRANA-TORRELIO, Carlos, OLIVAL, Kevin J., BOGICH, Tiffany L., JOHNSON, Christine K., MAZET, Jonna A. K., KARESH, William et DASZAK, Peter, 2015. Targeting Transmission Pathways for Emerging Zoonotic Disease Surveillance and Control. In : *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. juillet 2015. Vol. 15, n° 7, p. 432-437. DOI 10.1089/vbz.2013.1563.

LU, Huaguang, ISMAIL, Mahmoud Moussa, KHAN, Owais Ahmed, AL HAMMAD, Yousef, RHMAN, Salah Shaban Abdel et AL-BLOWI, Mohamed Hamad, 2010. Epidemic Outbreaks, Diagnostics, and Control Measures of the H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in the Kingdom of Saudi Arabia, 2007–08. In : *Avian Diseases*. mars 2010. Vol. 54, n° s1, p. 350-356. DOI 10.1637/8807-040109-ResNote.1.

LYLES, Robert H., TANG, Li, LIN, Ji, ZHANG, Zhiwei et MUKHERJEE, Bhramar, 2012. Likelihood-based methods for regression analysis with binary exposure status assessed by pooling. In : *Statistics in Medicine*. 28 septembre 2012. Vol. 31, n° 22, p. 2485-2497. DOI 10.1002/sim.4426.

MOHRAN, K.A., HAROUN, M. et HASSAN, M., 2011. Molecular Detection, Virus Isolation and Pathotyping of a Newcastle Disease Virus Field Strain from Backyard Chickens in Qatar. In : *Research Journal of Poultry Sciences*. 1 mars 2011. Vol. 4, n° 3, p. 28-32. DOI 10.3923/rjpscience.2011.28.32.

MUNIR, T., ASLAM, A., AHMED, I., IMRAN, M.S. et IJAZ, M., 2015. Potential of commonly resident wild birds towards Newcastle disease virus transmission. In : *Pakistan Veterinary Journal*. janvier 2015. Vol. 35, n° 1, p. 106-107.

MUNSTER, Vincent J., BAAS, Chantal, LEXMOND, Pascal, WALDENSTRÖM, Jonas, WALLENSTEN, Anders, FRANSSON, Thord, RIMMELZWAAN, Guus F., BEYER, Walter E. P., SCHUTTEN, Martin, OLSEN, Björn, OSTERHAUS, Albert D. M. E. et FOUCHIER, Ron A. M., 2007. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. In : *PLoS Pathogens*. 2007. Vol. 3, n° 5, p. e61. DOI 10.1371/journal.ppat.0030061.

NAGY, A., METTENLEITER, T. C. et ABDELWHAB, E. M., 2017. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. In : *Epidemiology and Infection*. décembre 2017. Vol. 145, n° 16, p. 3320-3333. DOI 10.1017/S0950268817002576.

NANTHAKUMAR, T., TIWARI, A.K., KATARIA, R.S., BUTCHAIHAH, G., KATARIA, J.M. et GOSWAMI, P.P., 2000. Sequence analysis of the cleavage site-encoding region of the fusion protein gene of Newcastle disease viruses from India and Nepal. In : *Avian Pathology*. décembre 2000. Vol. 29, n° 6, p. 603-607. DOI 10.1080/713651205.

NAPP, Sebastian, ALBA, Anna, ROCHA, Ana Isabel, SÁNCHEZ, Azucena, RIVAS, Raquel, MAJÓ, Natalia, PERARNAU, Mireia, MASSOT, Cristina, MIGUEL, Elena San, SOLER, Mercé et BUSQUETS, Núria, 2017. Six-year surveillance of Newcastle disease virus in wild birds in north-eastern Spain (Catalonia). In : *Avian Pathology*. 2 janvier 2017. Vol. 46, n° 1, p. 59-67. DOI 10.1080/03079457.2016.1206177.

OIE, 2012. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). In : *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)* [en ligne]. S.l. : s.n. p. 555-574. Disponible à l'adresse : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf.

OIE, 2013. *Newcastle disease. Aetiology, Epidemiology, Diagnosis, Prevention, and Control References* [en ligne]. avril 2013. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/NEWCASTLE_DISEASE.pdf.

OIE, 2015. Avian Influenza (infection with avian influenza viruses). In : *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)* [en ligne]. S.l. : s.n. p. 1-21. Disponible à l'adresse : http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.

OIE et THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH, 2016. *Avian Influenza*. février 2016. S.l. : s.n.

PÉREZ, Lester J., DÍAZ DE ARCE, H., CILLONI, F., SALVIATO, A., MARCIANO, S., PERERA, C.L., SALOMONI, A., BEATO, M.S., ROMERO, A., CAPUA, I. et CATTOLI, G., 2012. An SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for the detection of H5 hemagglutinin subtype avian influenza virus. In : *Molecular and Cellular Probes*. juin 2012. Vol. 26, n° 3, p. 137-145. DOI 10.1016/j.mcp.2012.02.001.

PHIPPS, L.P., ESSEN, S.C. et BROWN, I.H., 2004. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. In : *Journal of Virological Methods*. décembre 2004. Vol. 122, n° 1, p. 119-122. DOI 10.1016/j.jviromet.2004.08.008.

PUTHAVATHANA, P., 2005. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. In : *Journal of General Virology*. 1 février 2005. Vol. 86, n° 2, p. 423-433. DOI 10.1099/vir.0.80368-0.

R CORE TEAM, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. In : [en ligne]. 2018. Disponible à l'adresse : <https://www.R-project.org/>.

RÅDSTRÖM, Peter, KNUTSSON, Rickard, WOLFFS, Petra, LÖVENKLEV, Maria et LÖFSTRÖM, Charlotta, 2004. Pre-PCR Processing : Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. In : *Molecular Biotechnology*. 2004. Vol. 26, n° 2, p. 133-146. DOI 10.1385/MB:26:2:133.

RASAMOELINA ANDRIAMANIVO, H., LANCELOT, R., MAMINIAINA, O.F., RAKOTONDRAFARA, T.F., JOURDAN, M., RENARD, J.F., GIL, P., SERVAN DE ALMEIDA, R., ALBINA, E., MARTINEZ, D., TILLARD, E., RAKOTONDRAVAO, R. et

CHEVALIER, V., 2012. Risk factors for avian influenza and Newcastle disease in smallholder farming systems, Madagascar highlands. In : *Preventive Veterinary Medicine*. avril 2012. Vol. 104, n° 1-2, p. 114-124. DOI 10.1016/j.prevetmed.2011.10.008.

RAVI, Joe, 2011. *A male House Sparrow (Passer domesticus) in Palatine, Illinois, USA* [en ligne]. avril 2011. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:House_Sparrow_Male_\(Passer_Domesticus\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:House_Sparrow_Male_(Passer_Domesticus).jpg).

REICZIGEL, J., FÖLDI, J. et ÓZSVÁRI, L., 2010. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. In : *Epidemiology and Infection*. novembre 2010. Vol. 138, n° 11, p. 1674-1678. DOI 10.1017/S0950268810000385.

ROGAN, W. J. et GLADEN, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. In : *American Journal of Epidemiology*. janvier 1978. Vol. 107, n° 1, p. 71-76.

ROHAIM, M.A., EL NAGGAR, R.F., HELAL, A.M., HUSSEIN, H.A. et MUNIR, Muhammad, 2017. Reverse spillover of avian viral vaccine strains from domesticated poultry to wild birds. In : *Vaccine*. juin 2017. Vol. 35, n° 28, p. 3523-3527. DOI 10.1016/j.vaccine.2017.05.033.

RØNNING, Arnstein, 2010. *Eurasian Collared Dove Streptopelia decaocto* [en ligne]. avril 2010. S.l. : s.n. Disponible à l'adresse : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptopelia_decaocto_.jpg.

ROSE, Eva, HAAG-WACKERNAGEL, Daniel et NAGEL, Peter, 2006. Practical use of GPS-localization of Feral Pigeons *Columba livia* in the urban environment: GPS-localization of Feral Pigeons. In : *Ibis*. 18 janvier 2006. Vol. 148, n° 2, p. 231-239. DOI 10.1111/j.1474-919X.2006.00499.x.

ROSE, Eva, NAGEL, Peter et HAAG-WACKERNAGEL, Daniel, 2006. Spatio-temporal use of the urban habitat by feral pigeons (*Columba livia*). In : *Behavioral Ecology and Sociobiology*. juin 2006. Vol. 60, n° 2, p. 242-254. DOI 10.1007/s00265-006-0162-8.

RUTVISUTTINUNT, Wiriya, CHINNAWIROTPISAN, Piyawan, SIMASATHIEN, Sriluck, SHRESTHA, Sanjaya K., YOON, In-Kyu, KLUNGTHONG, Chonticha et FERNANDEZ, Stefan, 2013. Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. In : *Journal of Virological Methods*. novembre 2013. Vol. 193, n° 2, p. 394-404. DOI 10.1016/j.jviromet.2013.07.001.

SAADAT, Yousef, GHAFOURI, Seyed Ali, TEHRANI, Farshad et LANGEROUDI, Arash Ghalyanchi, 2014. An active serological survey of antibodies to newcastle disease and avian influenza (H9N2) viruses in the unvaccinated backyard poultry in Bushehr province, Iran, 2012-2013. In : *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. mai 2014. Vol. 4, p. S213-S216. DOI 10.12980/APJTB.4.2014C1293.

SEAL, B. S., KING, D. J. et BENNETT, J. D., 1995. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. In : *Journal of Clinical Microbiology*. octobre 1995. Vol. 33, n° 10, p. 2624-2630.

SHEKAILI, Thunai Al, CLOUGH, Helen, GANAPATHY, Kannan et BAYLIS, Matthew, 2015a. Sero-surveillance and risk factors for avian influenza and Newcastle disease virus in

backyard poultry in Oman. In : *Preventive Veterinary Medicine*. novembre 2015. Vol. 122, n° 1-2, p. 145 - 153. DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.09.011.

SHEKAILI, Thunai Al, CLOUGH, Helen, GANAPATHY, Kannan et BAYLIS, Matthew, 2015b. Sero-surveillance and risk factors for avian influenza and Newcastle disease virus in backyard poultry in Oman. In : *Preventive Veterinary Medicine*. novembre 2015. Vol. 122, n° 1-2, p. 145 - 153. DOI 10.1016/j.prevetmed.2015.09.011.

SHORTRIDGE, K.F., ALEXANDER, D.J., HU, L.Y. et KAM, S.L., 1978. Isolation of Newcastle disease virus from phasianidae birds in Hong Kong. In : *Journal of Comparative Pathology*. octobre 1978. Vol. 88, n° 4, p. 633 - 636. DOI 10.1016/0021-9975(78)90017-8.

SILVA, Jsa, MOTA, Ra, VILELA, Smo, DORETTO JÚNIOR, L, PINHEIRO JÚNIOR, Jw et SILVA, Lbg, 2006. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the State of Pernambuco. In : *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. juin 2006. Vol. 8, n° 2, p. 125 - 129. DOI 10.1590/S1516-635X2006000200009.

SLOMKA, Marek J., PAVLIDIS, Theo, COWARD, Vivien J., VOERMANS, John, KOCH, Guus, HANNA, Amanda, BANKS, Jill et BROWN, Ian H., 2009. Validated RealTime reverse transcriptase PCR methods for the diagnosis and pathotyping of Eurasian H7 avian influenza viruses. In : *Influenza and Other Respiratory Viruses*. juillet 2009. Vol. 3, n° 4, p. 151 - 164. DOI 10.1111/j.1750-2659.2009.00083.x.

ŚMIETANKA, K., MINTA, Z., WŁODARCZYK, R., WYROSTEK, K., JÓŹWIAK, M., OLSZEWSKA, M., MINIAS, P., KACZMAREK, K., JANISZEWSKI, T. et KLESZCZ, A., 2012. Avian influenza viruses in wild birds at the Jeziorsko reservoir in Poland in 2008-2010. In : *Polish Journal of Veterinary Sciences* [en ligne]. 1 janvier 2012. Vol. 15, n° 2. [Consulté le 7 octobre 2018]. DOI 10.2478/v10181-011-0150-4. Disponible à l'adresse : <http://content.sciendo.com/view/journals/pjvs/15/2/article-p323.xml>.

STALLKNECHT, David E. et BROWN, Justin D., 2007. Wild birds and the epidemiology of avian influenza. In : *Journal of Wildlife Diseases*. juillet 2007. Vol. 43, n° 3.

SVENSSON, Lars, MULLARNEY, Killian, ZETTERSTRÖM, Dan, GRANT, Peter James, LESAFFRE, Guilhem et PAEPEGAEY, Benoît, 2012. *Les oiseaux d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient: le grand guide ornitho*. Lonay (Suisse) : Delachaux et Niestlé. ISBN 978-2-603-01883-5.

TENZIN, T., TENZIN, S., TSHERING, D., LHAMO, K., RAI, P. B., DAHAL, N. et DUKPA, K., 2015. Emergency surveillance for novel influenza A(H7N9) virus in domestic poultry, feral pigeons and other wild birds in Bhutan. In : *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*. décembre 2015. Vol. 34, n° 3, p. 829 - 836.

TERREGINO, Calogero, [sans date]. Evaluation of sensitivity and specificity of a commercial competitive avian influenza type A antibody ELISA kit (IDVET® Screen Influenza A), OIE-FAO and National Reference Laboratory for Newcastle Disease and Avian Influenza. In : .

THINH, Tien Vu, GILBERT, Martin, BUNPAPONG, Napawan, AMONSIN, Alongkorn, NGUYEN, Dung T., DOHERTY, Paul F. et HUYVAERT, Kathryn P., 2012. Avian Influenza

Viruses in Wild Land Birds in Northern Vietnam. In : *Journal of Wildlife Diseases*. janvier 2012. Vol. 48, n° 1, p. 195 - 200. DOI 10.7589/0090-3558-48.1.195.

TIAN, Huaiyu, ZHOU, Sen, DONG, Lu, VAN BOECKEL, Thomas P., PEI, Yao, WU, Qizhong, YUAN, Wenping, GUO, Yan, HUANG, Shanqian, CHEN, Wenhuan, LU, Xueliang, LIU, Zhen, BAI, Yuqi, YUE, Tianxiang, GRENFELL, Bryan et XU, Bing, 2015. Climate change suggests a shift of H5N1 risk in migratory birds. In : *Ecological Modelling*. juin 2015. Vol. 306, p. 6 - 15. DOI 10.1016/j.ecolmodel.2014.08.005.

WERNERY, Ulrich, SHANMUGANATHAM, Karthik K., KRYLOV, Petr S., JOSEPH, Sunitha, FRIEDMAN, Kimberly, KRAUSS, Scott et WEBSTER, Robert G., 2013. H9N2 influenza viruses from birds used in falconry. In : *Influenza and Other Respiratory Viruses*. novembre 2013. Vol. 7, n° 6, p. 1241 - 1245. DOI 10.1111/irv.12143.

WHITWORTH, Darrell, NEWMAN, Scott, MUNDKUR, Taej et HARRIS, Phil, 2010. *Oiseaux Sauvages Et Influenza Aviaire Une Introduction a La Recherche Appliquee Sur Le Terrain Et Les Techniques D'echantillonnage Epidemiologique*. S.l. : Food & Agriculture Org. ISBN 978-92-5-205908-0.

WHO, 2018. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2018. In : . 21 septembre 2018.

WILLIAMS, Christopher J. et MOFFITT, Christine M., 2001. A Critique of Methods of Sampling and Reporting Pathogens in Populations of Fish. In : *Journal of Aquatic Animal Health*. décembre 2001. Vol. 13, n° 4, p. 300 - 309. DOI 10.1577/1548-8667(2001)013<0300:ACOMOS>2.0.CO;2.

WILLIAMS, Christopher J. et MOFFITT, Christine M., 2010. Estimation of fish and wildlife disease prevalence from imperfect diagnostic tests on pooled samples with varying pool sizes. In : *Ecological Informatics*. juillet 2010. Vol. 5, n° 4, p. 273 - 280. DOI 10.1016/j.ecoinf.2010.04.003.

WILLIAMS, Richard AJ et PETERSON, A Townsend, 2009. Ecology and geography of avian influenza (HPAI H5N1) transmission in the Middle East and northeastern Africa. In : *International Journal of Health Geographics*. 2009. Vol. 8, n° 1, p. 47. DOI 10.1186/1476-072X-8-47.

WOBESER, Gary A., 1997. *Avian Influenza, Newcastle Disease, and Other Paramyxovirus. Second Edition*. S.l. : s.n.

XIANG, Bin, HAN, Lujie, GAO, Pei, YOU, Renrong, WANG, Fumin, XIAO, Jiajie, LIAO, Ming, KANG, Yinfeng et REN, Tao, 2017. Spillover of Newcastle disease viruses from poultry to wild birds in Guangdong province, southern China. In : *Infection, Genetics and Evolution*. novembre 2017. Vol. 55, p. 199 - 204. DOI 10.1016/j.meegid.2017.09.020.

ANNEXES

Annexe 1 : protocole du kit kits ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species

2. Distribuer **50 µl** de Conjugué 1X dans chaque puits.
3. Couvrir la plaque et incuber **30 min ± 3 min à 21°C (± 5°C)**.

4. Lavage

Vider les puits. Laver 3 fois chaque puits avec environ 300 µl de **Solution de lavage**. Eviter le dessèchement des puits entre les lavages.

5. Révélation

1. Distribuer **50 µl** de **Solution de révélation** dans chaque puits.
2. Couvrir la plaque et incuber **10 min ± 1 min à 21°C (± 5°C)** à l'obscurité.
3. Distribuer **50 µl** de **Solution d'arrêt** dans chaque puits pour arrêter la réaction.
4. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Validation

Le test est validé si:

- ✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Négatifs (DO_{CN}) est supérieure à 0.700.

$$DO_{CN} > 0.700$$

- ✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Positifs (DO_{CP}) est inférieure à 30% des (DO_{CN}).

$$DO_{CP} / DO_{CN} < 0.3$$

Interprétation

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage de compétition (S/N%):

$$S/N \% = DO_{\text{échantillon}} / DO_{CN} \times 100$$

Les échantillons présentant S/N%:

- supérieur ou égal à 50% sont considérés comme négatifs.
- entre 45% et 50% sont considérés comme douteux.
- inférieure ou égal à 45% sont considérés comme positifs.

Résultat	Statut
S/N % ≤ 45%	POSITIF
45% < S/N % < 50%	DOUTEUX
S/N % ≥ 50%	NEGATIF

Note: Le logiciel de traitement de données ID Soft™ est disponible gratuitement. Pour plus d'informations, veuillez contacter support.software@id-vet.com

Ce logiciel permet de calculer les différents paramètres du kit (critères de validation, valeurs S/P, titres, détermination de l'âge de la vaccination, groupes) et propose une synthèse graphique des profils sérologiques des animaux testés.

ID.vet
Innovative Diagnostics

Système de
management
certifié



ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species



ELISA de compétition pour la détection des anticorps dirigés contre la nucléoprotéine du virus Influenza A dans les sérums ou plasma aviaires, porcins ou équins ou fluides oraux porcins.

Usage *in vitro*

» Décembre 2016: Ajout d'une nouvelle application pour fluide oral porcins

FLUACA ver 1216 FR

Information Générale

Ce kit de diagnostic est destiné à la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la nucléoprotéine du virus Influenza A.

Il peut être utilisé sur sérum ou plasma porcin, équin ou aviaire ou sur fluide oral porcin.

Description et Principe

Les puits sont sensibilisés avec la nucléoprotéine (NP).

Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les puits. Les anticorps anti-NP, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps qui masque les épitopes de la NP.

Un conjugué anti-NP marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les puits. Il se fixe sur les épitopes NP qui restent libres, formant un complexe antigène-conjugué-HRP.

Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB).

La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester :

- en l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après avoir ajouté de la solution d'arrêt.
- en présence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration

La lecture est réalisée à 450 nm.

Composants du kit

Réactifs*
Microplaques sensibilisées avec la NP
Conjugué Concentré (10X)
Contrôle Positif
Contrôle Négatif
Tampon de dilution 3
Tampon de dilution 2
Solution de lavage concentrée (20X)
Solution de révélation
Solution d'arrêt (0,5 M)

* La composition du kit est indiquée sur l'étiquette de dessus de kit.

1. Le conjugué, les contrôles, les plaques et la solution de révélation doivent être stockés à 5°C (± 3°C).
2. Les autres réactifs peuvent être stockés entre +2°C et +26°C.
3. Les solutions de lavage concentré, de révélation et d'arrêt peuvent être utilisées dans l'ensemble de la gamme IDvet. Les tampons de dilution portant les mêmes numéros de lot sont interchangeables.

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Pipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl, 200 µl.
2. Embouts de pipette à usage unique.
3. Lecteur de microplaques à 96 puits.
4. Eau distillée ou désionisée.
5. Système de lavage manuel ou automatique.

Remarques et précautions d'emploi

1. Ne pas pipeter à la bouche.
2. La solution de révélation peut être irritante pour la peau.
3. La solution d'arrêt (0,5 M) peut être nocive en cas d'ingestion et peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau (R22-43). Eviter le contact avec la peau (S24-37).
4. Ne pas exposer la solution de révélation à une lumière vive ni à des agents oxydants.
5. Tous les réactifs doivent être décontaminés avant élimination. Eliminer les produits conformément à la réglementation en vigueur.

Préparation des échantillons

Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle, puis de les transférer dans la plaque ELISA avec une pipette multicanaux.

Préparation de la solution de lavage

Si nécessaire, ramener la Solution de lavage concentrée (20X) à température ambiante (21°C ± 5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux. Préparer la Solution de lavage (1X) par dilution au 1/20^{ème} de la Solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée/désionisée.

La qualité de l'étape de lavage peut impacter les résultats. S'assurer que les puits soient complètement vides entre les lavages. En cas d'utilisation d'un laveur automatique, il est crucial de paramétrer correctement l'appareil (mode, type et hauteur d'aspiration). Pour plus d'information, veuillez consulter le "Guide de Lavage IDvet", disponible sur demande à info@id-vet.com

Mode opératoire

NOTE 1: IDvet propose des protocoles pour des échantillons de poules, dindes, pintades, oies, autruches, canards, chevaux, et cochons. Contacter IDvet pour l'utilisation du kit sur d'autres espèces.

NOTE 2: Si le test est utilisé pour screening, et si les échantillons positifs sont confirmés par une autre technique, il est possible d'augmenter la détectabilité par une incubation de nuit entre 16h et 20h à 5°C (±3°C), toutes les autres étapes restant identiques au protocole court.

Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C ± 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

1. Incubation des échantillons

1. Dilution des échantillons

Pour les échantillons de poule, dinde, pintade et cheval (sérum ou plasma), ajouter:

- 90 µl du Tampon de dilution 2 dans chaque puits.
- 10 µl du Contrôle Positif dans les puits A1 et B1.
- 10 µl du Contrôle Négatif dans les puits C1 et D1.
- 10µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.

Pour les échantillons de canard, oie, autruche (sérum ou plasma), ajouter:

- 90 µl du Tampon de dilution 2 et 10 µl du Contrôle Positif dans les puits A1 et B1.
- 90 µl du Tampon de dilution 2 et 10 µl du Contrôle Négatif dans les puits C1 et D1.
- 190 µl du Tampon de dilution 2 et 10 µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.

Pour les échantillons de porc (sérum ou plasma), ajouter:

- 90 µl du Tampon de dilution 2 et 10 µl du Contrôle Positif dans les puits A1 et B1.
- 90 µl du Tampon de dilution 2 et 10 µl du Contrôle Négatif dans les puits C1 et D1.
- 200 µl du Tampon de dilution 2 et 5 µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.

» Pour les échantillons de porc (fluide oral), ajouter:

- 90 µl du Tampon de dilution 2 et 10 µl du Contrôle Positif dans les puits A1 et B1.
- 90 µl du Tampon de dilution 2 et 10 µl du Contrôle Négatif dans les puits C1 et D1.
- 50 µl du Tampon de dilution 2 et 50 µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.

2. Couvrir la plaque et incuber 60min ± 6 min à 37°C (± 2°C).

2. Lavage

Vider les puits. Laver 5 fois chaque puits avec environ 300 µl de Solution de lavage. Eviter le dessèchement des puits entre les lavages.

3. Incubation du conjugué

1. Préparer le Conjugué 1X en diluant le Conjugué 10X au 1/10^{ème} en Tampon de dilution 3.

Annexe 2 : protocole du kit ID Screen® Newcastle Disease Competition

Validation

Le test est validé si:

- ✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Négatifs (DO_{CN}) est supérieure à 0.6.

$$DO_{CN} > 0.6$$

- ✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Positifs (DO_{CP}) a un pourcentage d'inhibition (PI) supérieur à 40.

$$PI_{CP} > 40 \%$$

*Equivalent à:

$$DO_{CP} / DO_{CN} < 0.6$$

Interprétation

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage d'inhibition (PI%):

$$PI \% = \frac{DO_{CN} - DO_{\text{échantillon}}}{DO_{CN}} \times 100$$

Les échantillons présentant un PI %:

- supérieur à 40 % sont considérés comme positifs.
- entre 30 et 40 % sont considérés comme douteux.
- inférieur à 30 % sont considérés comme négatifs.

Résultat	Statut
PI % > 40 %	POSITIF
30 % ≤ PI % ≤ 40%	DOUTEUX
PI % < 30 %	NEGATIF

Nota : Les échantillons présentant un PI entre 30% et 40% sont considérés comme douteux et devraient être re-testés. Si les résultats sont toujours douteux après le nouveau test, l'élevage devrait être échantillonné et re-testé à nouveau dans les 10 à 14 jours.



**ID Screen®
Newcastle Disease Competition**



Kit pour la détection des anticorps anti-NDV par ELISA de compétition dans les sérums et jaunes d'oeufs aviaires.

Usage *in vitro*

» **Septembre 2013: Nouveau protocole**

NDVC ver 0913 FR

Information Générale

Ce kit de diagnostic est destiné à la mise en évidence d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Newcastle (NDV).

Il peut être utilisé sur sérum ou jaune d'œuf aviaires.

Description et Principe

Les cupules sont sensibilisées avec l'antigène NDV purifié.

Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les cupules. Les anticorps anti-NDV, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps qui masque les épitopes de NDV.

Un conjugué anti-NDV marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les cupules. Il se fixe sur les épitopes du virus, restés libres, formant un complexe antigène-conjugué-HRP.

Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB).

La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester :

- en l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage.
- en présence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.

La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

Composants du kit

Réactifs*
Microplaques sensibilisées avec l'antigène NDV purifié
Contrôle Positif
Contrôle Négatif
➤ Tampon de dilution 14
Conjugué concentré (10X)
➤ Tampon de dilution 3
Solution de lavage concentrée (20X)
Solution de révélation
Solution d'arrêt (0,5 M)

* La composition du kit est indiquée sur l'étiquette de dessus de kit.

1. Le conjugué, les contrôles, et la solution de révélation doivent être stockés à 5°C (± 3°C)
2. Les autres réactifs peuvent être stockés entre +2°C et +28°C.
3. Les composants portant la même dénomination (solution de lavage, diluants) peuvent être utilisés dans l'ensemble de la gamme IDvet.

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Pipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl, 200 µl.
2. Embouts de pipette à usage unique.
3. Lecteur de microplaques à 96 puits.
4. Eau distillée ou désionisée.
5. Système de lavage manuel ou automatique.

Remarques et précautions d'emploi

1. Ne pas pipeter à la bouche.
2. La solution de révélation peut être irritante pour la peau.
3. La solution d'arrêt (0,5M) peut être nocive en cas d'ingestion et peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau (R22-43). Eviter le contact avec la peau (S24-37).
4. Ne pas exposer la solution de révélation à une lumière vive ni à des agents oxydants.
5. Décontaminer tous les réactifs avant élimination.

Préparation des échantillons

Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle, puis de les transférer dans la plaque ELISA avec une pipette multicanaux.

Préparation de la Solution de lavage

Si nécessaire, ramener la Solution de lavage concentrée (20X) à température ambiante (21°C ± 5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.

Préparer la Solution de lavage (1X) par dilution de la Solution de lavage (20X) dans de l'eau distillée/désionisée.

Mode opératoire

Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C ± 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

1. Ajouter:
 - 100 µl du Contrôle Positif dans les cupules A1 et B1.
 - 100 µl du Contrôle Négatif dans les cupules C1 et D1.

2. Ajouter dans les puits restants:

Sérum :

- - 40 µl de Tampon de dilution 14
- 10 µl de sérum non dilué dans chacun des puits et bien mélanger.

Jaune d'œuf :

- 80 µl de Solution de lavage 1X.
- 20 µl de jaune d'œuf.

3. Couvrir la plaque et incuber 30 minutes (± 3 min) à température ambiante (21°C ± 5°C).
4. Préparer le Conjugué 1X en diluant le Conjugué concentré 10X au 1/10^{ème} en Tampon de dilution 3.
5. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de Solution de lavage 1X. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
6. Distribuer 100 µl de Conjugué 1X dans chaque cupule.
7. Couvrir la plaque et incuber 30 minutes (± 3 min) à température ambiante (21°C ± 5°C).
8. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de Solution de lavage 1X. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
9. Distribuer 100 µl de Solution de révélation dans chaque cupule. Incuber 15 min (± 2 min) à température ambiante (21°C ± 5°C) à l'obscurité.
10. Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction. Ajouter la solution d'arrêt dans le même ordre qu'en étape #9.
11. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Annexe 3 : extrait du tableau référençant pour chaque oiseau son espèce, son âge, le site de prélèvement et les résultats des tests sérologique

M : mâle, F : femelle, U : sexe inconnu, PUL : poussin, N : négatif, P : positif

Date du prélèvement	Ring	PIT Tag	Espèce	Site	Sexe	Age	Plaque	Ligne	Colonne	Résultats IA	Résultats ND
28/01/2016	C0801	0007691361	PASDOM	NARC	F	+1A	1	A	2	N	N
03/02/2016	C0803	000769158B	PYCTIS	SKHBC	U	+1A	1	A	3	N	N
03/02/2016	H0454	000769355F	STRSEN	NARC	U	+1A	1	A	4	N	N
03/02/2016	H0455	00077011DC	STRSEN	NARC	U	+1A	1	A	5	N	N
03/02/2016	H0456	000770BF61	STRSEN	NARC	U	+1A	1	A	6	N	P
03/02/2016	C0805	00076908A0	PYCTIS	NARC	U	+1A	1	A	7	N	
03/02/2016	C0810	000770CCB7	PYCTIS	NARC	U	+1A	1	A	8	N	P
03/02/2016	L1054	0007691A26	COLLIV	NARC	U	+2A	1	A	9	N	N
07/02/2016	L1056	00074D9754	COLLIV	NARC	U	PUL	1	A	10	N	
08/02/2016	C0812	0007700D81	PASDOM	NARC	M	+1A	1	A	11	N	N
08/02/2016	C0815	000770BE91	PYCTIS	NARC	U	+1A	1	A	12	N	N
08/02/2016	C0817	0007691A0C	PYCTIS	NARC	U	+1A	1	B	2	N	
08/02/2016	C0818	0007693BF8	PYCTIS	NARC	U	+1A	1	B	3	N	N
08/02/2016	C0819	0007691428	PYCTIS	NARC	U	+1A	1	B	4	N	N
08/02/2016	C0820	0007691635	PYCTIS	NARC	U	+1A	1	B	5	N	N
08/02/2016	C0821	00074F24F7	PASDOM	NARC	M	+1A	1	B	6	N	N
08/02/2016	C0823	0007700CB3	PASDOM	NARC	M	+1A	1	B	7	N	N
08/02/2016	C0825	000769141D	PASDOM	NARC	M	+1A	1	B	8	N	N
08/02/2016	C0827	000770C2B3	PASDOM	NARC	M	+1A	1	B	9	N	
08/02/2016	C0829	00074F1429	PASDOM	NARC	F	+2A	1	B	10	N	N
08/02/2016	C0831	00074ED530	PASDOM	NARC	F	2A	1	B	11	N	N
08/02/2016	C0833	00074F2DD9	PASDOM	NARC	M	+2A	1	B	12	N	
08/02/2016	C0834	000770BFEC	PASDOM	NARC	F	+1A	1	C	2	N	N
08/02/2016	C0836	000769092F	PASDOM	NARC	F	+1A	1	C	3	N	N
08/02/2016	C0837	00074F1089	PASDOM	NARC	M	+2A	1	C	4	N	N

Annexe 4 : extrait du tableau référençant tous les oiseaux prélevés pour l'étude moléculaire et la composition de chaque pool

Date	Ring	PIT Tag	Species	Tube	Pool
05/04/2016	XG00410	00074EF27D	STRDEC	835	1
05/04/2016	C0702	00074FAEA8	PASDOM	836	1
05/04/2016	XG00411	0007500697	STRDEC	837	1
05/04/2016	XG00412	00074FBE7F	STRDEC	838	1
05/04/2016	C0703	00074F1B0F	PASDOM	839	1
05/04/2016	C0704	00074FD4A1	PASDOM	840	2
05/04/2016	XG00413	00074DD80C	STRDEC	841	2
05/04/2016	C0705	00074FBC05	PASDOM	842	2
05/04/2016	C0706	00074ED3C0	PASDOM	843	2
05/04/2016	C0707	00074EF9B2	PASDOM	844	2
05/04/2016	C0708	00074D9312	PASDOM	845	3
05/04/2016	C0709	00074EDDF4	PASDOM	846	3
05/04/2016	H1866	00074DCBBB	STRSEN	847	3
05/04/2016	C0710	00074DE289	PASDOM	848	3
05/04/2016	H1867	00074F2DE6	STRSEN	849	3
06/04/2016	H1868	00074F01A6	STRSEN	850	4
06/04/2016	H1869	00074EE19F	STRSEN	851	4
06/04/2016	H1870	00074DAD9B	STRSEN	852	4
06/04/2016	C0711	00074DB09A	PYCTIS	853	4
06/04/2016	C0712	00074FB09A	PYCTIS	854	4
06/04/2016	C0713	00074EEF00	PASDOM	855	5
06/04/2016	C0714	00074DB664	PYCTIS	856	5
06/04/2016	H1871	00074FA820	STRSEN	857	5
06/04/2016	H1872	00074EE77A	STRSEN	858	5
06/04/2016	C0715	00074ED8D3	PYCTIS	859	5
06/04/2016	XG00414	00074ED1E5	STRDEC	860	6
06/04/2016	XG00378		STRDEC	861	6
06/04/2016	XG00416	00074F36D7	STRDEC	862	6
06/04/2016	XG00415	00074DC3DC	STRDEC	863	6
06/04/2016	C0716	00074D8D8D	PASDOM	864	6
06/04/2016	C0717	00074FAA25	PASDOM	865	7
06/04/2016	H1873	00074F3676	STRSEN	866	7
06/04/2016	L1089	00074F5BF4	COLLIV	867	7
06/04/2016	L1094	00074F7CFC	COLLIV	868	7
06/04/2016	L2820	00074DDE5E	COLLIV	869	7
06/04/2016	L2821	00074DEA62	COLLIV	870	8
06/04/2016	L2822	00074DE28E	COLLIV	871	8
06/04/2016	L2802	00074EDA80	COLLIV	872	8
06/04/2016	L2823	00074ECF2E	COLLIV	873	8
06/04/2016	L2804	00074DB883	COLLIV	874	8

Procedure

1. **Place the tip discard chute on the worktable so that the chute is over the tip disposal box.**

Ensure that the tip discard chute is open and unblocked. Remove the UV protective cap from the tip chute.

Ensure that the tip disposal box is empty and that the opening is aligned with the tip discard chute.

2. **Switch on the instrument. . The switch is located at the back of the instrument, on the lower left**

3. **Launch the QIAcube HT Software.**

Note: If the QIAcube HT Software is already open, click  in the toolbar.

4. **The following screen appears.**



5. **Select the "QProtocols" tab.**

All Q Protocols that are saved in the appropriate "QProtocols" folder will be listed.

6. **To open the run file, select the Q Protocol and then click "Open". Alternatively, double left-click on the Q Protocol**

7. **A "Protocol Description" of the selected Q Protocol will be displayed and the  icon will appear in the toolbar.**

8. **Check that the Q Protocol meets your requirements, and then click "Close".**

Note: To view the Q Protocol information box again, click on the  icon in the toolbar.

9. **Click  in the toolbar.**

The "Configuration (1)" step of the "Vacuum extraction" wizard opens. This wizard displays protocol parameters. For information about adjusting the parameters, see the *QIAcube HT User Manual*.

- 10. Select the appropriate number of samples arranged in columns in the 96-well plate. Ensure the “Turn the HEPA filter on automatically” option is checked, and click “Jump to End”.**

Reagent and consumable lot numbers can be entered in the “Configuration (1)” window for tracking.

The “Jump to End” button is located at the bottom left of the “Configuration (1)” window.

The “Wizard Summary” window opens. The information in this window can be printed for documentation purposes.

- 11. Confirm the protocol by clicking “Finish”. The wizard closes.**

The QIAcube HT Software calculates the reagent volumes and the number of tips required to complete the protocol. These values are displayed with the worktable layout in the QIAcube HT workspace. For detailed information, see the *QIAcube HT User Manual*.

- 12. Ensure that there are sufficient numbers of tips for at least all steps until and including lysate transfer, that tip boxes are placed in the indicated positions, and that the lids have been removed from the tip boxes.**

Check that the number and position of available and unused tips is the same on the instrument worktable and in the software workspace.

If more tips are required, you will be prompted to replace empty tip racks with new tip racks during the run. Information about the approximate time for refill will be given in the pre run check. For more information, see the *QIAcube HT User Manual*.

In the software workspace, click on a tip in any tip position to open the “tip info” preview.

- 13. Prepare the vacuum chamber as described in “Assembling the vacuum chamber”, page 18. See the *QIAcube HT User Manual* for more information.**

Note: If fewer than 12 columns (96 wells) are to be processed, seal the unused columns of the QIAamp 96 plate with adhesive tape (supplied). Unused wells must be sealed to ensure proper vacuum operation.

Note: Trim any excess tape.

Note: When reusing QIAamp 96 plate, S-Block, or elution plate, take care to avoid cross-contamination.

Note: Be sure the QIAamp 96 plate is aligned to the left in the carriage and that the carriage is positioned to the left inside the vacuum chamber.

14. Add 200 µl sample to the selected S-Block wells. Place the S-Block in the B1 position of the QIAcube HT worktable.

Note: Samples are processed in columns of 8 wells. We recommend covering unused wells during pipetting for subsequent reuse of the S-Block.

Note: If fewer than 8 per columns samples are to be processed, unused wells in the column must contain water or buffer. The volume added to unused wells should be the same as the sample volume to avoid foaming.

15. Transfer the indicated volumes of all reagents, except Buffer VXL mixture, into the corresponding reagent troughs, close the lids, and place them on the indicated positions on the worktable.

16. Prepare the indicated volume of VXL mixture according to table below and mix well.

Table 2. Preparation of Buffer VXL, carrier RNA, internal control (if applicable) and QIAGEN Proteinase K mixture.

Samples	8	16	24	32	40	48
Buffer VXL (ml)	1.4	2.1	2.7	3.4	4.0	4.6
QIAGEN Proteinase K (µl)	360	520	680	840	1000	1160
Carrier RNA (µl)	18	26	34	42	50	58
Internal Control (µl)	90	130	170	210	250	290
Samples	56	64	72	80	88	96
Buffer VXL (ml)	5.3	5.9	6.6	7.2	7.8	8.5
QIAGEN Proteinase K (µl)	1320	1480	1640	1800	1960	2120
Carrier RNA (µl)	66	74	82	90	98	106
Internal Control (µl)	330	370	410	450	490	530

IMPORTANT: Prepare VXL mixture immediately before starting the run.

17. Start the run immediately by clicking .

The pre-run check appears.

18. Perform the pre-run check.

Check the state of the worktable items.

Confirm that worktable is setup correctly (instrument does not perform checks for all items). Check the box to the left of the items. A pre-run report can be saved for documentation purposes by clicking .

19. After completing the pre-run check, close the instrument hood and click "OK".

The "OK" button is disabled until all pre-run check items have been checked.

20. Click "Cancel" when the "Save as" dialog box appears.

Optional: Save the run file with a unique file name. See the *QIAcube HT User Manual* for more details.

21. The protocol run begins.

IMPORTANT: At the beginning of each run an open circuit test and a plate detection test is performed automatically. If the QIAamp 96 plate in the transfer carriage is improperly aligned to the left side of the vacuum chamber you will be prompted to place it correctly. After adjusting the position, click "Retry" to initiate the tests again.

22. Cover the elution plate (EMTR) with the lid and remove from the elution chamber, when the protocol is complete.

See the *QIAcube HT User Manual* for detailed instructions.

Two liquid phases might be found in the Elution Microtubes. If this is the case, TopElute Fluid will be found as a top layer over the elution buffer. It is inert and has no effect on downstream applications.

Cleaning the instrument after completing a run

Annexe 6 : extrait du tableau référençant les oiseaux prélevés plusieurs fois avec les résultats des tests sérologiques

Date	Ring	PIT Tag	Espèce	Site	Echantillon	Plaque	Ligne	Colonne	Résultats IA	Résultats ND
10/10/2016	H0192	000770091A	STRSEN	NARC	2644	30	B	11	N	P
29/01/2017	H0192	000770091A	STRSEN	NARC	1082	13	B	5	N	P
12/10/2016	H0209	000757EB47	STRSEN	SKHBC	2675	30	E	8	N	N
04/12/2016	H0209	000757EB47	STRSEN	SKHBC	3397	38	D	6	N	N
12/10/2016	H0216	00075A705A	STRSEN	SKHBC	2682	30	F	3	N	N
24/11/2016	H0216	00075A705A	STRSEN	SKHBC	3317	37	E	6	N	N
12/10/2016	H0218	00076B3B44	STRSEN	SKHBC	2684	30	F	5	N	P
07/12/2016	H0218	00076B3B44	STRSEN	SKHBC	3469	39	F	3	N	P
19/10/2016	H0247	00077008ED	STRSEN	NARC	2790	31	G	7	N	N
21/02/2017	H0247	00077008ED	STRSEN	NARC	1260	15	A	10	N	N
25/09/2016	H0270	000770C3FB	STRSEN	NARC	2295	26	D	8	N	P
23/02/2017	H0270	000770C3FB	STRSEN	NARC	1262	15	A	12	N	P
25/09/2016	H0271	00076905FD	STRSEN	NARC	2296	26	D	9	N	P
16/11/2016	H0271	00076905FD	STRSEN	NARC	3153	35	G	2	N	P
26/09/2016	H0276	000770E3DF	STRSEN	NARC	2350	27	A	4	N	N
28/11/2016	H0276	000770E3DF	STRSEN	NARC	3343	37	G	8	N	N
27/09/2016	H0281	0007691314	STRSEN	SKHBC	2366	27	B	9	N	N
14/04/2017	H0281	0007691314	STRSEN	SKHBC	1577	18	E	6	N	N
06/11/2017	H0281	0007691314	STRSEN	SKHBC	3859	44	A	5	N	P
27/09/2016	H0289	000770B8E5	STRSEN	SKHBC	2372	27	C	4	N	N
26/02/2017	H0289	000770B8E5	STRSEN	SKHBC	1276	15	C	4	N	N
07/12/2016	H0294	000770FD38	STRSEN	SKHBC	3463	39	H	2	N	N
12/02/2017	H0294	000770FD38	STRSEN	SKHBC	1155	13	H	8	N	N

Quick-Start Protocol

July 2015

QIAquick® Gel Extraction Kit

The QIAquick Gel Extraction Kit (cat. nos. 28704 and 28706) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 12 month.

Further information

- *QIAquick Spin Handbook*: www.qiagen.com/HB-1196
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- This protocol is for the purification of up to 10 µg DNA (70 bp to 10 kb).
 - The yellow color of Buffer QG indicates a pH ≤7.5. DNA adsorption to the membrane is only efficient at pH ≤7.5.
 - Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
 - Isopropanol (100%) and a heating block or water bath at 50°C are required.
 - All centrifugation steps are carried out at 17,900 *x g* (13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge.
1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.
 2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes Buffer QG to 1 volume gel (100 mg gel ~ 100 µl). The maximum amount of gel per spin column is 400 mg. For >2% agarose gels, add 6 volumes Buffer QG.
 3. Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). Vortex the tube every 2–3 min to help dissolve gel. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose). If the color of the mixture is orange or violet, add 10 µl 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The mixture turns yellow.

— Sample to Insight —



-
4. Add 1 gel volume isopropanol to the sample and mix.
 5. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube or into a vacuum manifold. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 1 min or apply vacuum to the manifold until all the samples have passed through the column. Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube. For sample volumes of >800 μ l, load and spin/apply vacuum again.
 6. If DNA will subsequently be used for sequencing, in vitro transcription, or microinjection, add 500 μ l Buffer QG to the QIAquick column and centrifuge for 1 min or apply vacuum. Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube.
 7. To wash, add 750 μ l Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min or apply vacuum. Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube.

Note: If the DNA will be used for salt-sensitive applications (e.g., sequencing, blunt-ended ligation), let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE.

Centrifuge the QIAquick column in the provided 2 ml collection tube for 1 min to remove residual wash buffer.

8. Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
9. To elute DNA, add 50 μ l Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. For increased DNA concentration, add 30 μ l Buffer EB to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min. After the addition of Buffer EB to the QIAquick membrane, increasing the incubation time to up to 4 min can increase the yield of purified DNA.
10. If purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAquick® (QIAGEN Group). 1095985 07/2015 HB-0901-002 © 2015 QIAGEN, all rights reserved.

NOM : BARATEGUI

Prénom : Claudine

TITRE : ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DU VIRUS DE L'INFLUENZA AVIAIRE ET DU VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE CHEZ L'AVIFAUNE SAUVAGE AUX EMIRATS ARABES UNIS

RESUME : L'infection des élevages avicoles par le virus de l'Influenza aviaire et par le virus de la maladie de Newcastle a un impact sanitaire et économique majeur. Le rôle de l'avifaune sauvage dans la transmission de tels virus est souvent étudié même si on manque encore d'informations dans certains pays comme c'est le cas aux Emirats Arabes Unis. Après avoir exposé une synthèse des données scientifiques sur les deux virus étudiés et sur le contexte épidémiologique au Moyen Orient, nous présenterons les résultats de notre étude. Celle-ci vise à connaître le statut épidémiologique de six espèces d'oiseaux sauvages proches d'élevages conservatoires d'outardes houbara (*Chlamydotis macqueenii*) afin d'évaluer le risque potentiel de transmission aux outardes. Notre étude a montré des prévalences faibles pour le virus de l'Influenza aviaire par ELISA et RT-PCR. Les séroprévalences sont plus élevées pour le virus de la maladie de Newcastle mais la prévalence par RT-PCR reste faible. A partir de produits de PCR, nous avons pu séquencer les souches virales du virus de la maladie de Newcastle.

MOTS CLES : Virus de la maladie de Newcastle, virus de l'Influenza aviaire, ELISA, RT-PCR, Outarde houbara (*Chlamydotis macqueenii*)

TITLE : EPIDEMIOLOGICAL STUDY ABOUT AVIAN INFLUENZA VIRUS AND NEWCASTLE DISEASE VIRUS AMONG WILD BIRDS IN UNITED ARAB EMIRATES

SUMMARY : The infection of poultry farming by the avian influenza virus and by the Newcastle Disease Virus has a major health and economic impact. The role of wild birds in the transmission of such viruses is often studied, even though some information is still missing in countries such as the United Arab Emirates. After a synthetic review of scientific data about these two viruses and about epidemiological context in Middle East, we will present the results of our study. The aim of our study is to know the epidemiological status of six wild bird species staying close to protective farms of Houbara bustard (*Chlamydotis macqueenii*) in order to provide an evaluation of the potential risk of transmission to Houbara bustards. Our study has shown low prevalences of Avian Influenza virus by ELISA and RT-PCR. Seroprevalences are higher for the Newcastle Disease Virus but the prevalence by RT-PCR is still low. Thanks to PCR products, we were able to sequence viral strains of the Newcastle Disease.

KEY WORDS : Newcastle disease virus, Avian Influenza virus, ELISA, RT-PCR, Houbara bustard (*Chlamydotis macqueenii*)