

N° d'ordre :

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE de BOBO-
DIOULASSO



INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL
(IDR)

CENTRE NATIONAL de la RECHERCHE
SCIENTIFIQUE et TECHNOLOGIQUE



INSTITUT de RECHERCHE en SCIENCES
de la SANTE (IRSS)

MEMOIRE

Présentée par :

Mme TRAORE/KAM Adèle

Docteur Vétérinaire

pour l'obtention du :

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA)

Option : Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Thème :

**Analyse par RT-PCR de la situation
épidémiologique de l'influenza aviaire au
Burkina Faso.**

Soutenu le 20 mars 2007, devant le Jury :

Directeur de mémoire
Pr Jean-Bosco OUEDRAOGO
Co-Directeur
Dr Zékiba TARNAGDA

Président
Pr Viguié MARTINEZ
Membres
Pr Jean-Bosco OUEDRAOGO

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

Dieu, le tout puissant

Mon père et à ma mère

Mes frères et sœurs

Mon époux et mes filles

Mes oncles et tantes

Mes cousins et cousines

Tout mes amis et connaissances

Mes collègues de la 1^{ère} promotion de DEA BA-MSB de l'UPB

REMERCIEMENTS

Au Professeur Jean Bosco OUEDRAOGO

Pour m'avoir accueilli dans votre institut et pour avoir mis à ma disposition les outils nécessaires à la réalisation de ce travail. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mes sincères remerciements.

Au Professeur Georges Anicet OUEDRAOGO

Veillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance pour avoir facilité mon inscription à ce DEA. Votre disponibilité et votre simplicité suscitent respect et admiration. Profonde gratitude et hommage respectueux.

Au Docteur Zékiba TARNAGDA

Pour avoir guidé ce travail. Votre disponibilité et votre dynamisme inspirent confiance et admiration. Puisse ce travail répondre à vos souhaits. Sincères remerciements et reconnaissances.

Au Docteur Hermann SORGHO

Pour votre disponibilité, votre assistance et vos conseils pour la rédaction de ce mémoire. Recevez ici nos vifs remerciements.

Au Docteur Marc Chritian TAHITA et Mr Issaka YOUNBARE

Pour votre contribution à la réalisation de travail. Nous avons trouvé auprès de vous une collaboration exemplaire. Sincères remerciements.

A mon époux, Koflan TRAORE

Pour votre soutien, votre patience et tout le sacrifice consentis pour que je puisse faire ce DEA. Ce travail est le votre. Veillez trouver ici l'expression de mon indéfectible attachement.

A Mes filles Yasmina et Noura

Pour tous les privations que je vous ai imposées. Grandissez et dépassez votre mère en connaissance. Amour maternel.

A tout le personnel de L'IRSS-Bobo

A tous ceux qui de près ou de loin ont participé à l'élaboration de ce document.

RESUME

Situation du problème: Le virus influenza A hautement pathogène H5N1 a récemment connu une extension spectaculaire avec la déclaration de plusieurs foyers infectés dans de nombreux pays dont le Burkina Faso. Agent étiologique de l'influenza humaine et animale, ce virus appartient à la famille des *orthomyxoviridae*, genre *influenza A*. L'influenza est caractérisée chez les oiseaux (galliformes) par une mortalité fulminante proche de 100% parfois sans symptômes. Pour la forme moins fulminante, on observe des symptômes respiratoires aigus et sévères, digestifs, nerveux et diversement associés. La contamination de l'homme reste exceptionnelle entraînant une infection sévère des voies respiratoires évoluant rapidement vers la mort. La confirmation de l'influenza fait recours au diagnostic de laboratoire.

Matériel et méthodes : Nous avons utilisé la RT-PCR pour analyser la situation dans les foyers suspects de grippe aviaire au Burkina Faso et déterminer sa prévalence chez la volaille. D'avril à mai 2006, nous avons effectué des prélèvements par écouvillonnage trachéal et cloacal sur 283 oiseaux (271 poulets, 2 canards, 5 dindons, 3 vautours, 1 épervier et 1 touraco gris) dans les régions de Bobo Dioulasso et Ouagadougou.

Résultats : Neuf cas d'influenza A ont été détectés dont cinq cas de H5N1, correspondant à des prévalences de 3,2% et 1,77% respectivement. Les cas positifs H5N1 sont composés de deux vautours à Ouagadougou, trois poulets de race locale à Bobo-Dioulasso et Sokoroni.

Conclusion : Le virus influenza A H5N1 est prévalent au Burkina Faso (dans les régions de Ouagadougou et Bobo-Dioulasso) au sein de la volaille domestique et sauvage.

Mots clés : virus influenza A H5N1, RT-PCR, volaille, oiseaux sauvages, Burkina Faso.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNc	: ADN recombinant
AFSSA	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AIV	: Avian Influenza Virus
ARN	: Acide Ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
BET	: Bromure d'éthidium
DTT	: Dithiothréitol
dATP	: Désoxyadénosine-triphosphate
dCTP	: Désoxycytidine-triphosphate
dGTP	: Désoxyguanosine-triphosphate
dNTP	: Désoxynucléosides-triphosphates
HA	: Hemmagglitinine
dTTP	: Désoxythymidines-triphosphates
IAHP	: Influenza Aviaire Hautement Pathogène
IAFP	: Influenza Aviaire Faiblement Pathogène
IRSS	: Institut de Recherche en Sciences de la Santé
OIE	: Office International des Epizooties
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase Chaine Reaction
MV	: Measle virus (virus de la rougeole)
NA	: Neuraminidase
rpm	: Rotation par minute
RP	: Random Primer
RT	: Revers transcription ou Transcription inverse
TBE	: Trizma Base EDTA
VTM	: virus transport medium

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux

Tableau I : Segments génomiques des influenza virus de type A et rôles biologiques des protéines virales.	6
Tableau II : Répartition du nombre d'oiseaux par région de prélèvement.....	31
Tableau III : Statut vaccinal de l'échantillon d'oiseaux de l'étude	32
Tableau IV : Les principaux symptômes observés chez la volaille dans les foyers suspects d'influenza aviaire	33
Tableau V : Les différentes espèces de volailles explorées et les taux de morbidité à l'influenza aviaire	35
Tableau VI : Répartition du nombre de spécimens par région de prélèvement.....	36

Figures

Figure 1 : Schéma du virus influenza A aviaire	7
Figure 2 : Mesure de sécurité pour la collecte et le traitement des spécimens.....	26
Figure 3 : Photo de montrant la détection de l'IAHP-H5 par la RT-PCR	34

I. INTRODUCTION

L'Influenza est une maladie infectieuse, virale et aiguë des voies respiratoires, communément appelée « grippe » affectant les hommes et les animaux depuis des temps anciens (Kuszewski et Brydak, 2000). Cette maladie est connue depuis le 15^{ème} siècle chez la volaille. La maladie se caractérise par sa propagation rapide, sa forte morbidité et sa mortalité très élevée (80% à 100%) infligeant ainsi de graves pertes économiques dans les fermes avicoles et au sein de la volaille familiale. Bien que connue depuis la période de la Renaissance, la survenue d'épidémie (chez l'homme) ou d'épizootie (chez les animaux) a jusque là été de manière cyclique avec des rebonds à des intervalles allant de quelques années à des dizaines d'années. Depuis l'apparition de la grippe du poulet due à un virus influenza A H5N1 à Hong Kong touchant dix huit personnes dont six décès en 1997, on a évoqué pour la première fois un risque avéré de contamination de la poule vers l'homme de l'influenza aviaire qui ne semblait spécifique qu'aux oiseaux.

La réapparition du virus H5N1 à la fin de l'année 2003 en Asie a placé l'influenza aviaire hautement pathogène comme la principale maladie émergente rencontrée actuellement en médecine vétérinaire d'autant qu'elle s'est accompagnée de contaminations humaines (Oner *et al.*, 2006 ; De Jong *et al.*, 2006).

Ces atteintes humaines survenues juste après l'épisode dramatique du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) ayant tué près de 800 personnes en Asie et au Canada en 2003 ont alarmé l'organisation mondiale de la santé (OMS) qui redoute depuis plusieurs années une nouvelle pandémie de grippe humaine (Brugère, 2006). Malgré la mobilisation internationale la grippe aviaire a continué à s'étendre dans le monde. A ce jour 165 personnes sont décédées de la forme humaine de la grippe aviaire sur 271 cas déclarés (OMS, 2007). Partie d'Asie du Sud-est, elle est arrivée en Afrique en ayant franchi au passage plusieurs pays d'Europe. C'est ainsi que Le 7 février 2006, le premier foyer africain de grippe aviaire a été rapporté d'une ferme de l'Etat de Kaduna dans la partie Nord du Nigéria ; ensuite sept autres pays africains (Niger, Egypte, Cameroun, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Soudan et Djibouti) ont officiellement confirmé à l'Organisation Mondiale de la Santé Animale l'apparition de foyers de grippe aviaire chez la volaille sur leurs territoires respectifs (Ducatez *et al.*, 2006). Le Burkina Faso a précisément déclaré son premier foyer de grippe aviaire le 3 avril

2006 après avoir reçu les résultats du laboratoire de référence de Padoue en Italie qui avait reçu les prélèvements aviaires effectués un à deux mois auparavant. Ce délai de confirmation du diagnostic de la grippe aviaire est très favorable à la propagation de cette épizootie. Une psychose s'est alors installée dans les pays sus cités dont le Burkina Faso. Une peur qui se justifie par la perte économique attendue dans la filière avicole et le risque de contamination de la grippe aviaire à l'homme d'une part et d'autre part par l'absence d'une méthode diagnostique précoce et fiable. C'est ainsi que la nécessité d'acquérir une méthode de diagnostic des virus influenza dans la sous région ou au Burkina Faso s'est posée avec acuité. Notre étude s'inscrit dans ce cadre et les objectifs sont les suivants :

II. OBJECTIFS DE L'ETUDE

2.1. OBJECTIF GENERAL

Analyser la situation des infections à influenza dans les foyers suspects de grippe aviaire au Burkina Faso.

2.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES

Déterminer la prévalence de l'influenza aviaire en particulier de la grippe aviaire chez la volaille

III. REVUE DE LA LITTERATURE

3.1. L'AGENT ETIOLOGIQUE

Le nom influenza (en italien) tire ses origines du 15^{ème} siècle en Italie et a été ensuite adopté dans toute l'Europe pour expliquer l'occurrence au Sud d'une épidémie supposée être sous l'influence des étoiles (Kuszewski et Brydak, 2000). Les virus influenza sont classés dans la famille des *Orthomyxoviridae* (du grec *orthos*, « correct, standard » et *myxo*, mucus) à cause de leur habilité à se coller au mucus et pour les distinguer de la seconde famille des virus enveloppés à ARN négatif qu'est celle des *Paramyxoviridae* (virus de Carré et virus de la rougeole). Les *Orthomyxoviridae* sont divisés en deux genres: le genre virus influenza A et B et le genre virus influenza C. Ces trois types de virus se distinguent l'un de l'autre par des différences antigéniques entre leurs nucléoprotéines (NP) et les protéines de la matrice (M). Le type A est le plus fréquent. Tous les virus influenza A isolés chez les mammifères proviennent du pool des gènes influenza aviaires, hébergés par les oiseaux migrateurs sans que ces derniers soient obligatoirement malades.

3.1.1. Caractères morphologiques

Les virus influenza sont des virus enveloppés de forme sphérique ou filamenteuse d'un diamètre variant de 80 à 120 nm. Leur génome est constitué d'ARN de polarité négative segmenté en huit fragments protéiques (Tableau I) qui codent pour dix protéines virales :

- La protéine de matrice M1
- La protéine de matrice M2
- La nucléocapside NP
- L'hémagglutinine HA ou H
- La neuraminidase NA ou N
- La protéine non structurale N1 (inhibitrice de la réponse en interféron)
- Les sous unités de la polymérase PA, PB1, PB2
- Les protéines non structurales NS1 et NS2

Tableau I : Segments génomiques des influenza virus de type A et rôles biologiques des protéines virales (d'après Harimoto et Kawaoka, 2001).

Segment génomique	Protéine codée	Taille (nombre d'acides aminés)	Rôle(s) biologiques(s)
1	PB2	759	Sous unité de la polymérase activité d'addition de la coiffe et d'endonucléase
2	PB1 ²	757	Sous unité de la polymérase active
3	PA	716	Sous unité catalytique de la polymérase
4	HA	566	Hémagglutinine : attachement au récepteur cellulaire et fusion membranaire
5	NP	498	Nuicéocapsidide : liaison à l'ARN viral pour constituer un complexe ribonucléoprotéique (RNP)
6	NA	454	Neuraminidase : hydrolyse du récepteur lors du bourgeonnement de la particule virale
7	M1	252	Protéine de matrice
	M2	97	Canal à ions
8	NS1	230	Protéine non structurale 1, inhibitrice de la réponse en interféron
	NS2 ou NEP	121	Protéine non structurale 2, impliquée dans l'exportation extranucléaire des complexes RNP

La couche interne de l'enveloppe virale est de nature protéique (M1) alors que la couche externe est lipidique. La surface externe du virus est recouverte de deux types de spicules qui jouent un rôle essentiel dans la biologie du virus (Figure 1) : l'hémagglutinine HA et la Neuraminidase NA

- Le spicule hémagglutinine (HA) à l'aspect de bâtonnet de section triangulaire
- Le spicule neuraminidase (NA) apparaît sous forme de champignons (Brugère, 2006 ; Harimoto et Kawaoka, 2001)

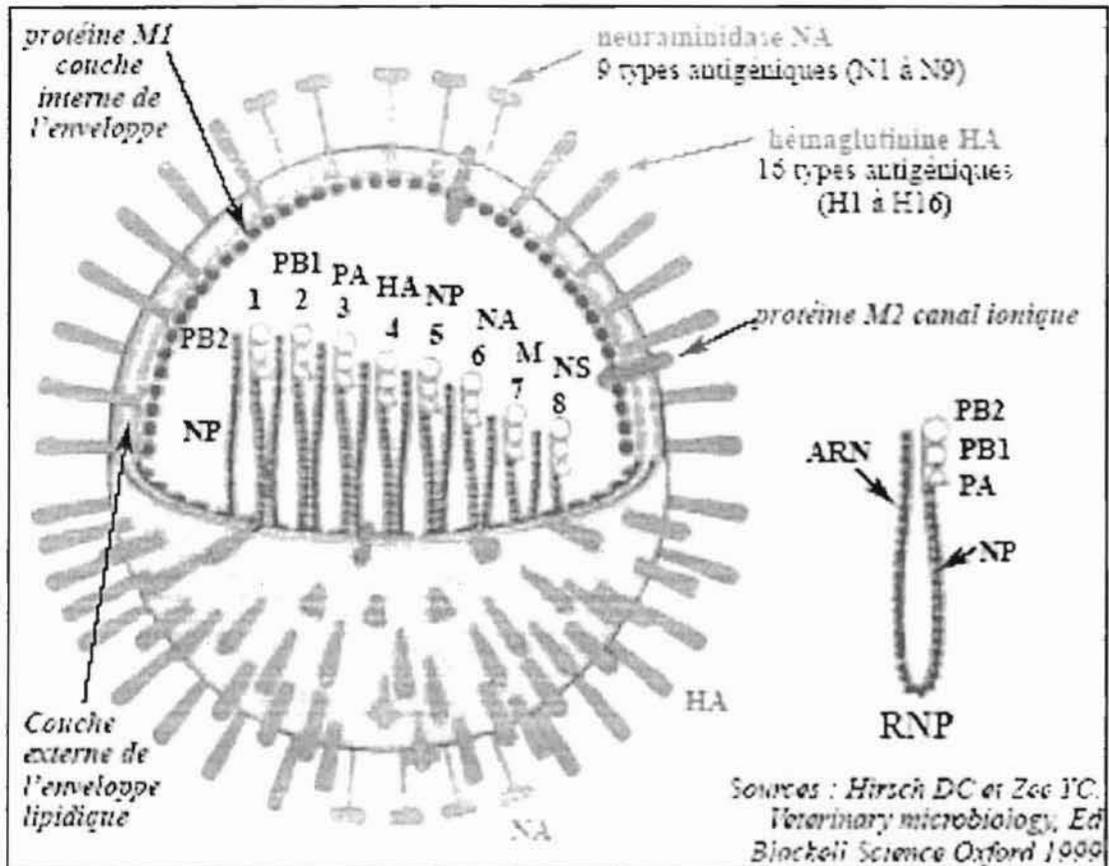


Figure 1 : Schéma du virus influenza A aviaire

Les virus influenza A sont classés en sous types en fonction des caractères antigéniques des glycoprotéines de surface, la neuraminidase (N) et l'hémagglutinine (H). Il existe seize sous types H et neuf sous types N. Ces deux glycoprotéines d'enveloppe sont les principaux inducteurs d'anticorps chez l'hôte infecté par ce virus.

Les virus influenza A sont classés en sous types en fonction des caractères antigéniques des glycoprotéines de surface, la neuraminidase (NA) et l'hémagglutinine (HA). Il existe seize sous types H et neuf sous types N. Ces deux glycoprotéines d'enveloppe sont les principaux inducteurs d'anticorps chez l'hôte infecté par ce virus.

Toutes les combinaisons de sous types H et N ont pu être isolées, ce qui témoigne de l'extrême variabilité antigénique de ces virus influenza qui peuvent toucher de nombreuses espèces (homme, oiseaux, cheval, phoque, vison, baleine).

Chez les oiseaux, seuls les sous types H5 et H7 peuvent présenter des souches hautement pathogènes (IAHP) par opposition aux virus faiblement pathogènes.

3.1.2. Nomenclature

Selon les caractéristiques du virus influenza isolé, la nomenclature officielle correspondra aux informations suivantes (séparées par des traits de fraction) :

- Le type antigénique, les souches sont appelées A, B ou C, en fonction de leur antigène "soluble" ribonucléoprotéique (Brugère, 2006)
- L'espèce animale chez qui le virus a été isolé
- La localisation géographique de l'isolement (région ou pays)
- Un numéro de référence ou le nom de la souche
- L'année de l'isolement
- L'identification des deux sous types H et N ()

Exemple : A/poulet/Hong Kong/220/97(H5N1)

A/dinde/Italie/4580/99(H7N1)

3.1.3. Caractères cultureux

3.1.3.1. Culture du virus

Plusieurs lignées cellulaires sont adaptées pour la culture in vitro du virus influenza. Les cellules les plus sensibles sont les oeufs embryonnés de poule, les cellules primaires de rein de singe, et surtout de rein de chien. Les virus grippaux se multiplient aussi dans les cellules épithéliales ciliées (nez, trachée) de diverses espèces animales et de l'homme. Outre la production de virus on observe un arrêt des battements ciliaires, et une destruction de la couche de cellules épithéliales et muqueuses.

3.1.3.2. Multiplication chez l'animal

Les souches de virus influenza humaines inoculées au furet par voie nasale provoquent une maladie identique à celle de l'homme. Des passages en série à la souris augmentent la virulence pour l'animal qui présente des lésions pneumoniques extensives et meurt. L'embryon de poulet est le support de la multiplication du virus mais habituellement sans lésions décelables et sans que l'on observe la mort de l'embryon.

Le virus influenza est toxique pour les animaux de laboratoire comme les souris et les lapins : cette toxicité est liée à la particule virale car l'administration intraveineuse aux animaux de préparations de virus purifié les tue en 18 à 48 heures avec des hémorragies gastro-intestinales et des lésions nécrotiques de la rate et du foie. Cet effet toxique n'apparaît pas chez les animaux immunisés ayant des anticorps spécifiques (Brugère, 2006).

3.1.4. Propriétés antigéniques.

3.1.4.1. Les antigènes internes.

Les virus influenza A ont été isolés chez l'homme, les porcs, les chevaux, différentes variétés d'oiseaux, et très récemment, chez le chien, le chat et le singe. Toutes ces souches contiennent les mêmes antigènes internes : la nucléoprotéine et la protéine de membrane. Les anticorps dirigés contre les antigènes internes ne sont pas neutralisants; ils fixent le complément ou réagissent en immunodiffusion simple ou double (AFSSA, 2005).

3.1.4.2. Les antigènes d'enveloppe.

Les antigènes d'enveloppe sont essentiellement :

- L'**hémagglutinine (HA)**, très immunogène, elle induit la production d'anticorps inhibant l'hémagglutination et neutralisant le pouvoir infectieux du virus. Ces anticorps sont protecteurs et spécifiques de sous-types et de variants. Ils apparaissent entre les septième et quinzième jours après l'infection, leur titre s'élève pour atteindre un maximum quatre à six semaines après avant de décroître pour se maintenir pendant des années dans le sang (AFSSA, 2005).
- La **neuraminidase (NA)** est moins immunogène que l'HA. Elle induit des anticorps inhibant la NA, non neutralisants mais qui limitent la quantité de virus infectieux produits. *In vivo*, ces anticorps protègent contre les manifestations cliniques de la grippe sans inhiber l'infection biologique. Ces anticorps apparaissent dans les mêmes délais que les anticorps anti-HA mais persistent moins longtemps (AFSSA, 2005).

- L'antigène d'hôte, spécifique des cellules dans lesquelles s'est multiplié le virion, est porté par l'enveloppe. Cet antigène est essentiellement polysaccharidique, lié par liaison covalente aux sous unités HA et NA; il provoque l'élaboration d'anticorps fixant le complément.

3.1.5. La spécificité d'hôtes

La spécificité des virus influenza pour certaines espèces animales est liée à la reconnaissance du récepteur membranaire de la cellule reconnue par l'hémagglutinine virale. Quel que soit le type d'hémagglutinine, les virus aviaires montrent une plus grande affinité pour les oligosaccharides sialylés à leur extrémité terminale avec des acides sialiques de type *Neu5Aca2,3Gal* (acides N-acétylneuraminique). Ces oligosaccharides sialylés sont présents à la surface des cellules épithéliales de la trachée et du tube digestif et largement majoritaires à la surface des cellules aviaires. Ainsi la neuraminidase des virus aviaires n'hydrolyse que des sialoglyconjugés de type *Neu5Aca2,3Gal* (Harimoto et Kawaoka et al., 2001).

Les récepteurs humains sont différents des récepteurs aviaires. Les virus influenza humains se lient préférentiellement à des oligosaccharides sialylés porteurs d'acides sialiques de type *NeuAca2,6Gal*, prépondérants à la surface des cellules humaines.

Le porc a la particularité de présenter ces deux types de récepteurs. Ce qui explique la sensibilité du porc aux virus aviaires et au virus humain. Ceci explique comment le porc peut jouer un rôle dans l'apparition d'une pandémie humaine à la suite d'un réassortiment viral.

3.2. DETERMINANTS MOLECULAIRES VIRAUX DE LA VIRULENCE

La virulence est un aspect lié à la capacité de multiplication d'un agent infectieux chez l'hôte dont un des corollaires est l'étendue des dommages causés à l'hôte. Chez l'homme la base génétique de la virulence est inconnue.

- Chez les oiseaux, l'hémagglutinine constitue un déterminant majeur de la virulence, même si elle n'est pas la seule en cause. Outre sa propriété

d'attachement aux récepteurs cellulaires de l'hôte, l'hémagglutinine commande aussi la pénétration du virus dans la cellule. Pour que cette fonction soit efficace l'hémagglutinine doit être clivée par des protéases cellulaires, sinon les virions produits ne sont pas infectieux et le cycle de répllication du virus s'arrête (AFSSA, 2005 ; Brugère, 2006). L'hémagglutinine des virus Influenza aviaires faiblement pathogènes (IAFP) ne contenant qu'une seule arginine, ne peut être clivée que par des enzymes de type trypsine qui ne sont présentes que dans un nombre restreints de cellules respiratoires et digestives de l'hôte. C'est pourquoi, in vivo, l'infection par des souches de virus avirulentes ou modérément pathogènes reste limitée aux sphères précitées. Au contraire, chez les souches virales hautement pathogènes (IAHP), l'hémagglutinine présente des acides aminés basiques (arginine et lysine) répétés au niveau de son site de clivage qui seront reconnus par des protéases de type furine. Ces protéases sont présentes dans un grand nombre de cellules, ce qui explique le caractère pantrope de la grippe aviaire avec des lésions de type septicémique (AFSSA, 2005 ; Brugère, 2006)

- La neuraminidase en hydrolysant les récepteurs membranaires, favorise la libération des particules virales à l'issue de la phase de bourgeonnement à la surface cellulaire.
- La protéine de matrice M2 qui joue un rôle de canal ionique, permet l'acidification de l'intérieur du virus, favorisant ainsi la reproduction de celui-ci.
- Les sous unités de la polymérase PA, PB1, PB2 jouent également un rôle dans la virulence en intervenant dans la transcription de l'ARN. Elles permettent ainsi la répllication du virus (AFSSA, 2005 ; Brugère, 2006)

3.3. MECANISMES DE VARIATION GENETIQUE DES VIRUS INFLUENZA A

3.3.1. Mutations ponctuelles

Le premier mécanisme qui concourt à la variabilité génétique des virus influenza réside dans l'apparition de mutations ponctuelles, liées à la fréquence élevée des erreurs d'incorporation de nucléotides commises par l'ARN polymérase ARN-dépendant du virus (AFSSA, 2005).

3.3.1.1. Importance chez les virus influenza A humains

Les mutations ponctuelles peuvent être bénéfiques pour le virus si elles affectent un site antigénique car elles peuvent alors lui permettre d'échapper à l'immunité humorale antigrippale. Lorsqu'une mutation aboutit à la modification d'un site antigénique, on parle de glissement antigénique. Le taux d'évolution au niveau des gènes codant l'HA atteint 10^{-3} ($5,7 \cdot 10^{-3}$) par site et par an pour le domaine HA1 de l'HA des virus A (H3N2) humains isolés entre 1984 et 1996 (Fitch *et al.*, 1997). Ce mécanisme explique que, d'une année à l'autre, la séquence des gènes codant l'hémagglutinine H3 des virus de grippe A humaine varie d'environ 0,6%. Ainsi après 5 ans les séquences diffèrent de près de 3%. En effet, les mutations s'accumulent dans le temps et aboutissent à l'émergence progressive et continue de nouvelles lignées de virus de grippe A. Ces mutations sont moindres chez les type B et C. Cette évolution a pour conséquence la révision de la composition du vaccin humain contre la grippe chaque année en février pour l'hémisphère nord et en septembre pour l'hémisphère sud.

3.3.1.2. Importance chez les virus influenza A aviaires

Chez les virus aviaires, l'importance évolutive des mutations ponctuelles est variable selon le gène et l'espèce hôte considérés :

- Chez les oiseaux aquatiques (surtout les différentes espèces de canards, d'oiseaux de rivage et les mouettes) qui constituent un réservoir de virus influenza aviaires, ceux-ci évoluent peu car ils ont atteint un niveau d'adaptation optimal et les mutations ne procurent pas d'avantage sélectif.
- Chez les volailles (les poulets par exemple) qui constituent des hôtes accidentels, l'évolution des virus est beaucoup plus rapide et concerne notamment les gènes codant l'hémagglutinine et la neuraminidase. Pour l'hémagglutinine, le taux d'évolution est de 7 à 10×10^{-3} substitutions par site et par an. Les virus sélectionnés possèdent des gènes permettant de coder une hémagglutinine moins spécifique du récepteur d'origine (par addition de sites de glycosylation au niveau de la partie globulaire de la molécule) et une neuraminidase moins efficace à détacher les virions néoformés (par délétion du fragment codant la tige de la molécule) aboutissant ainsi à compenser le manque d'affinité au récepteur par un

attachement prolongé. Les gènes codant la protéine de matrice ou la nucléoprotéine sont par contre davantage conservés. Des erreurs répétées lors de la copie de l'ARN par la polymérase virale (mécanisme dit de « **bégaiement** »), sont par ailleurs responsables de l'insertion de résidus basiques au site de clivage de l'hémagglutinine, principal mécanisme d'acquisition de la virulence déjà décrit au paragraphe 3.2.

3.3.2. Réassortiment génétique

Un second mécanisme de variation génétique, dit de réassortiment, aboutit au remplacement complet d'une ou plusieurs protéines virales d'une souche virale donnée par les protéines équivalentes d'une autre souche virale. Ce phénomène est rendu possible par la nature segmentée du génome viral. Il existe aussi chez les virus influenza de type B ou C, eux aussi dotés d'un génome segmenté, toutefois il est à noter qu'aucun cas de réassortiment n'a été décrit entre virus influenza appartenant à des types différents (A, B ou C). A l'occasion de la co-infection d'une cellule par deux particules virales provenant de souches virales différentes, il peut se trouver des particules virales hybrides peuvent se trouver excrétées dont une partie des segments génomiques provient de l'un des virus parentaux et le reste des segments génomiques de l'autre.

Le phénomène de réassortiment est particulièrement important pour l'évolution antigénique des virus influenza A humains, dans la mesure où il peut conduire au changement complet d'une molécule de surface telle que l'HA. Cet événement, appelé « cassure antigénique », est caractérisé par le remplacement de l'HA ou/et de la NA par une HA ou/et une NA d'un type moléculaire différent. Il n'existe que chez les virus influenza humains de type A, au sein desquels il peut aboutir à l'apparition de nouveaux sous types.

Une hypothèse actuellement admise fait jouer à l'espèce porcine, qui peut naturellement héberger à la fois des souches virales normalement inféodées à l'homme et des souches virales normalement inféodées aux oiseaux, un rôle essentiel dans ce phénomène de réassortiment. Il est cependant important de souligner qu'un être humain co-infecté par un virus humain et un virus aviaire pourrait tenir, le cas échéant, un rôle comparable. En effet, les virus d'oiseaux, s'ils sont

exceptionnellement capables d'infecter directement les humains (Kurtz *et al.*, 1996 ; Subbarao *et al.*, 1998) se répliquent souvent peu efficacement chez l'homme et se transmettent très difficilement d'un individu à l'autre. Dans ce phénomène, il y a changement complet d'une molécule de surface telle que l'HA. Ce virus réassortant, "humain" dedans et "oiseau" dehors, cumule l'avantage de pouvoir se répliquer efficacement chez l'homme et celui de ne pas rencontrer de défense humorale spécifique contre lui car les HA et NA aviaires ne correspondent pas aux anticorps qui préexistaient dans les populations humaines. C'est alors un virus nouveau chez l'homme qui est potentiellement capable de provoquer une pandémie. C'est le mécanisme initial actuellement admis comme ayant été à l'origine des deux dernières pandémies de grippe en date. Le réassortiment génétique représente - sans doute bien plus que la transmission directe - le mécanisme privilégié de génération de nouveaux virus potentiellement pathogènes pour l'homme (AFSSA, 2002).

3.4. EPIZOOTOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE DE LA GRIPPE AVIAIRE

3.4.1. Espèces affectées

Les virus influenza ont été isolés d'un grand nombre d'espèces avicoles. Des études épidémiologiques effectuées, tant chez la volaille que chez les animaux sauvages démontrent la diffusion considérable de la quasi-totalité de tous les sous types de virus influenza dans ces espèces.

Chez la volaille domestique, l'incidence des contaminations varie en fonction des méthodes d'élevage et la localisation géographique.

Ce sont les oiseaux sauvages et principalement les oiseaux aquatiques migrateurs, notamment les canards, qui constituent le réservoir des virus influenza. La dinde, la poule et le canard sont considérés comme les espèces sensibles. D'autres espèces peuvent être affectées mais l'infection demeure généralement inapparente. C'est le cas du porc du cheval et l'homme.

Les cas de contamination humaine par le virus influenza de la grippe aviaire ont toujours été exceptionnels, toujours liés à des mauvaises conditions hygiéniques et sanitaires. Les personnes exposées sont celles qui ont un contact étroit et prolongé et/ou permanent avec la volaille. L'homme peut être contaminé à partir d'autres espèces telles que le porc à la faveur d'un réassortiment génétique du virus.

Les grandes épizooties de grippe aviaire déclarées dans le monde ont été sporadiques jusqu'à ces dernières années. Certaines de ces épizooties ont été dramatiques comme le cas de Pennsylvanie aux USA qui a entraîné l'abattage de 17 millions de volaille (1999 à 2000). Durant ces cinq dernières années, on a observé des épizooties provoquées par des virus H5 et H7 en Italie avec l'abattage de 14 millions d'oiseaux avec la contamination de la Belgique et de l'Allemagne. En Hollande en 2003 il a eu une épizootie avec le virus H7N7 qui a provoqué l'abattage de 30 millions d'oiseaux (Koopmans *et al.*, 2004).

Chez l'homme de grandes pandémies de grippe meurtrière ont été rencontrées avec les virus H1N1 en 1918 (la grippe espagnole, (Reid *et al.*, 2001)), H2N2 en 1957 (la grippe asiatique (Ghendon, 1994)) H3N2 en 1968 (la grippe de Hong Kong Ghendon, 1994)) et H5N1 en 1997 (la grippe de Hong Kong (Tam, 2002 ; Ligon, 2005)).

3.4.2. Matières virulentes et transmission

Chez les oiseaux le virus se multiplie dans les cellules épithéliales de l'intestin causant une infection asymptomatique. Il en résulte une élimination massive de virus dans les matières fécales qui contamine les eaux des lacs. Le virus peut survivre plus de 4 jours à 22°C et 30 jours dans l'eau de lac. Les dindes guéries de grippe aviaire restent porteuses de virus durant plusieurs mois, elles constituent également une source de contamination pour d'autres volailles. Lors d'une épizootie, les oiseaux infectés excrètent le virus au niveau du cloaque, de la cavité buccale, des narines et de la conjonctive. Les animaux guéris restent également porteurs du virus influenza pendant plusieurs mois assurant ainsi la pérennité de l'infection dans l'élevage en l'absence d'une éradication. Compte tenu du mode d'excrétion, les produits dérivés facilement souillés par les fientes, tels que les plumes et les œufs constituent également une source potentiellement importante de virus influenza. Des précautions hygiéniques importantes (nettoyage, désinfection) doivent être appliquées afin d'éviter la propagation de la maladie.

Les voies naturelles de transmission entre oiseaux sont le contact direct ou indirect avec des sujets infectés. Il n'y a pas de cas documenté de transmission verticale de l'influenza aviaire. Cependant, les œufs pondus 3 et 4 jours après

infection expérimentale peuvent être contaminés superficiellement et à l'intérieur de l'oeuf, et des oeufs naturellement contaminés ont été mis en évidence lors d'une épizootie d'influenza aviaire en Pennsylvanie (Easterday *et al.*, 1996).

Chez l'homme en plus de la transmission par contact direct ou indirect avec des sujets infectés, il existe une voie qui est la transmission indirecte de virus aviaire après réassortiment chez le porc avec le virus humains. Une étude, publiée en 1994, relate en effet l'infection de deux enfants aux Pays-Bas par des virus porcins (Claas *et al.*, 1994). Ces virus résultaient du réassortiment entre des virus humains dont ils portaient les antigènes de surface H3 et N2 et des virus aviaires.

Le grand nombre d'espèces atteintes par le virus H5N1 à amené beaucoup de spécialistes des virus influenza à considérer le sous type H5N1 comme l'agent probable pour une pandémie.

3.4.3. Tableau clinique de la grippe

3.4.3.1. Signes cliniques chez la volaille

L'apparition de la maladie dans un élevage fait suite à un contact avec les oiseaux infectés suite à une introduction d'oiseaux infectés, de produits aviaires ou de matériels contaminés. La période d'incubation est de 3 à 5 jours (maximum 21 jours).

Chez les oiseaux domestiques, notamment les galliformes, le premier signe d'alerte permettant de suspecter l'infection due au virus influenza hautement pathogène est le taux de mortalité fulminant et excessif proche de 100% avec des morts subites sans symptômes préalables. Lorsque la maladie est moins fulminante et que l'on peut observer sur trois à sept jours, les oiseaux présentent :

- Des symptômes généraux (apathie, diminution de l'activité et de consommation d'aliments, prostration chute de la ponte)
- Des symptômes nerveux (ataxie, tremblements de la tête et du cou, paralysie des ailes, postures anormales),
- Des symptômes respiratoires (dyspnée, râles, toux, jetage)
- Symptômes digestifs (diarrhée avec les fientes parfois blanchâtres, éventuellement hémorragiques)
- Des symptômes d'attaque systémique (hémorragies, oedèmes et des pétéchies)

- Des symptômes cutanés (congestion nécrose au niveau des crêtes et des barbillons.

Ces symptômes sont isolés ou diversement associés

3.4.3.2. Signes cliniques chez l'homme

Les cas humains restent exceptionnels : l'homme est naturellement résistant à la grippe aviaire. Il faut des contacts étroits et répétés avec des oiseaux malades ou morts pour que la contamination se produise. L'homme est infecté par voie oculaire et développe alors une conjonctivite en générale bénigne (cas du virus H7N7 de 2003 aux Pays Bas) ou par inhalation profonde de particules et peut alors développer une infection respiratoire sévère (cas observés en Asie en 2003 avec le virus H5N1). Après une incubation de 2 à 8 jours (maximum 17 jours) on observe les symptômes souvent une forte fièvre, des maux de tête, des symptômes précoces de diarrhées et vomissements ; des douleurs abdominales et thoraciques ; des saignements du nez et des gencives. Ces symptômes évoluent rapidement chez certains individus vers de graves troubles respiratoires (difficultés puis une détresse respiratoire, la raucité de la voix et des craquements à l'inspiration) pouvant entraîner la mort (Oner *et al.*, 2006).

3.5. LE DIAGNOSTIC DE LA GRIPPE AVIAIRE

3.5.1. Le diagnostic clinique

Il est basé sur l'observation de mortalité élevée chez les animaux associés diversement à des symptômes respiratoires, digestifs ou nerveux et des lésions de septicémie sur tous les organes. Ces symptômes n'étant pas très spécifiques il est nécessaire de faire un diagnostic différentiel qui consiste à différencier la grippe aviaire d'autre affections responsables de mortalité importante et brutale dans les élevages ainsi que d'autre affections respiratoires infectieuse des oiseaux telles que :

3.5.2. Le diagnostic différentiel

3.5.2.1. La maladie de Newcastle

La maladie de Newcastle est une zoonose des oiseaux due un paramyxovirus. La morbidité et la mortalité varient fortement selon la virulence de la souche, l'immunité et l'état de l'animal et d'autres facteurs environnementaux. Elle peut être facilement confondue avec la grippe aviaire (peste aviaire) dont les symptômes sont identiques. La maladie de Newcastle est alors appelée pseudo peste aviaire. Seule l'analyse en laboratoire permet de différencier ces deux affections soumises à une déclaration obligatoire.

3.5.2.2. Le choléra des poules

La pasteurellose aiguë ou choléra des poules, due à *Pasteurella multocida* peut ressembler également à une peste aviaire lorsqu'elle touche un nombre important de volailles, avec l'apparition d'une mortalité subite et des lésions de septicémie rappelant celles des pestes aviaires. Elle frappe en général les adultes et peut se présenter sous plusieurs formes. La forme suraiguë tue très soudainement et sans autres signes des oiseaux en apparence sains. Les oiseaux sont prostrés cessent de s'alimenter ou de boire, souffrent de diarrhée et perte rapide de poids avec un œdème des crêtes et des barbillons. Les pattes et les articulations peuvent être gonflées. On observe une chute spectaculaire de la ponte. Dans la forme chronique l'infection est généralement localisée et provoque souvent un œdème douloureux de la crête et des barbillons.

3.5.2.3. La salmonellose à salmonella Pullorum gallinarum,

Cette affection peut se révéler très meurtrière chez les jeunes poussins, allant jusqu'à 100% de mortalité chez les poussins dans leur deuxième semaine de vie (pullorose).

3.5.2.4. Affections respiratoires des oiseaux

La **laryngotrachéite infectieuse aviaire (LTI)** peut-être responsable de formes suraiguës entraînant un taux de mortalité de 100%. Une épizootie de LTI est facile à reconnaître à cause de la localisation trachéale de l'infection s'accompagnant de troubles respiratoires aigus (dyspnée, toux intense, expectoration de caillots sanguins...) et de lésions spécifiques (trachéite avec inclusion intranucléaires éosinophiles dans les cellules épithéliales, obstruction de la trachée). L'agent infectieux est un herpes virus et les espèces touchées sont des poules, des faisans, des dindes et des paons.

La **bronchite infectieuse** est une maladie virale aviaire due à un coronavirus, qui se manifeste chez le jeune par des symptômes respiratoires et chez les adultes par des troubles de ponte. C'est une maladie très contagieuse qui peut évoluer sous forme d'épizootie. Les symptômes généraux observés sont : l'apathie, l'anorexie, la polydipsie, les animaux se mettent en boule. Les symptômes spécifiques sont caractérisés par un syndrome respiratoire avec râle, toux, jetage avec une possible extension aux autres organes pour donner des conjonctivites et sinusite. Ces symptômes évoluent en trois à dix jours soit vers la guérison avec un retard de croissance soit vers une apparition d'une maladie respiratoire chronique.

La **pneumovirose ou rhino-trachéite de la dinde** une affection qui frappe essentiellement la dinde et accessoirement le poulet. Sa transmission est très rapide (peut se propager dans tout le poulailler en 24 heures) et la mortalité peut atteindre 20 à 30% lors de la primo-infection. Elle atteint les animaux de tout âge mais plus fréquemment les jeunes. Les dindonneaux présentent des épisodes diarrhéiques avec des fientes gélatineuses, une toux grasse la sinusite la conjonctivite, une dyspnée importante. Il y a des symptômes généraux très importants : anorexie abattement et prostration. Chez les pondeuses on observe une chute de ponte de 20 à 25% et une décoloration des œufs pendant 15 jours. L'agent pathogène en cause est un pneumovirus qui a un tropisme pour les voies respiratoires et pour la trachée.

3.5.2.5. Autres affections

D'autres affections rapidement mortelles peuvent toucher des poussins vers l'âge de quelques semaines telles l'encéphalomyélite infectieuse aviaire, l'encéphalomalacie, le botulisme et les intoxications au plomb ou aux pesticides.

3.5.3. Diagnostic de laboratoire de la grippe aviaire

La grande variabilité des symptômes et des lésions non spécifiques rencontrées dans les infections dues à un virus influenza aviaire hautement pathogène démontre surtout les difficultés du diagnostic clinique et lésionnel de cette affection et la nécessité de recourir au diagnostic de laboratoire pour confirmer les suspicions. Plusieurs méthodes de diagnostic sont utilisées pour la détection (ELISA l'hémagglutination et l'inhibition de l'hémagglutination (IHA), l'immunodiffusion en gélose l'immunofluorescence etc...) avec plus ou moins des limites. La seule méthode de confirmation restant la RT-PCR (WHO, 2005).

3.5.3.1. La réaction d'agglutination

Le virus influenza est hémagglutinant. Mais il faut alors le différencier d'autres virus comme de la maladie de Newcastle, également hémagglutinant, ceci par un test d'inhibition de l'hémagglutination spécifique. L'IHA permet aussi d'identifier le sous type du virus influenza avec des anticorps monospécifiques (H5 et H7). Ces tests ont beaucoup plus d'intérêt pour les enquêtes épidémiologiques. Elles présentent peu d'intérêt pour le diagnostic car les anticorps apparaissent 8 à 10 jours après l'infection.

3.5.3.2. La réaction d'immunodiffusion

La technique d'immunodiffusion en milieu gélosé permet aussi d'identifier le virus grippal. Mais il s'agit d'une méthode peu sensible qui peut se révéler faussement négative avec certains oiseaux. Meilin *et al* (2004) en Chine ont trouvé que le test ELISA était plus indiqué pour la prévention à long terme et pour le contrôle.

3.5.3.3. La réaction d'immunofluorescence (IFA)

Elle peut être utilisée dans le diagnostic de l'influenza mais les prélèvements doivent être effectués pendant la haute virémie (WHO, 2005). Cette contrainte rend l'immunofluorescence inadaptée pour les études non contrôlées c'est-à-dire les études de terrain.

3.5.3.4. Isolement du virus et caractérisation du pouvoir pathogène

L'inoculation par la voie allantoïdienne d'oeufs embryonnés de poule âgés de neuf à onze jours a été beaucoup utilisée pour l'isolement du virus H5N1. Une mortalité embryonnaire est généralement observée en moins de six jours si le virus est hautement pathogène.

La caractérisation du pouvoir pathogène se fait par la détermination de l'indice de pathogénicité par inoculation intra veineuse ou intra parentérale du virus à des poulets de six semaines et un suivi clinique de 10 jours. L'indice de pathogénicité est déterminé en fonction de la gravité des signes présentés (Campitelli *et al.*, 2002). Ces techniques d'isolement et de caractérisation du pouvoir pathogène du virus sont limitées pour un diagnostic rapide à cause de leur durée qui va de 6 à 10 jours. En plus l'isolement du virus n'est pas encore possible au Burkina Faso car il nécessite un laboratoire niveau P3 ou P4 et une autorisation de l'Organisation Internationale des Epizooties (OIE) et de l'OMS.

3.5.3.5. Le diagnostic moléculaire

La détection de l'ARN viral est présentement la technique de choix qui permet une détection spécifique de l'influenza hautement pathogène (WHO, 2005). Des nombreuses techniques de détections de l'ARN virale existante la RT-PCR est la plus utilisée. Cette méthode permet non seulement un diagnostic rapide, mais elle permet également de différencier les sous types d'hémagglutinine et neuraminidase. Hoffmann *et al.*, (2001) ont démontré que tous les huit segments du génome du virus influenza sont amplifiés par RT-PCR et ils ont établi des primers spécifique pour détecter les quinze sous type HA et neuf sous type NA. Oner *et al.*, (2006) ayant utilisé trois tests différents à savoir un test ELISA, un test rapide de détection

d'antigène et la PCR, ont montré que la PCR était plus indiquée pour le diagnostic par rapport à l'ELISA et au test rapide qui ont donné des résultats faussement négatifs. Un autre avantage de la RT-PCR réside dans la durée de la réaction. Conventionnellement le diagnostic virologique se fait par l'isolement du virus en culture cellulaire, suivi de l'identification par des réactions d'hémagglutination. Cela peut durer une semaine. Par contre par la RT-PCR il est possible d'identifier et déterminer le sous type en 24 heures et cela sur du matériel biologique. Actuellement il y a une véritable révolution dans l'utilisation de la RT-PCR avec la PCR en temps réel. Cette dernière technique permet de mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent (Di Trani *et al.*, 2006). Elle nécessite un appareil de PCR en temps réel dont le prix est très onéreux, ce qui n'est souvent pas à portée des pays en développement comme le Burkina Faso. Par contre la RT-PCR peut bien se réaliser à l'aide de thermocycleur plus simples (de type Mastercycler, Eppendorf) dont les prix sont abordables.

- La RT-PCR

La Polymérase Chaîne Réaction (PCR) ou Réaction en chaîne par polymérase en français est une technique de réplique ciblée *in vitro*. Elle permet d'obtenir à partir d'un échantillon complexe, peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique. La PCR permet de repérer un gène particulier dans un génome entier en multipliant spécifiquement le segment d'ADN d'intérêt.

L'acronyme RT-PCR signifie Reverse transcriptase PCR. Il correspond à une PCR après une transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire ou ADNc. C'est une étape nécessaire lorsqu'on doit amplifier des ARN messagers. La RT-PCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR. Elle est la méthode la plus sensible pour détecter et éventuellement quantifier les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

- Principe de la Reverse Transcription

L'étape de la RT va consister à synthétiser le brin complémentaire (ADNc) des ARN à partir d'une amorce oligonucléotidique grâce à une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse. Les éléments intervenant dans la RT sont :

- L'ARN matrice : ARNm
- L'enzyme : la transcription inverse (MNLV). C'est une enzyme produite par les rétro virus qui permet de recopier un ARN en un ADN.
- Les amorces : oligoT qui sont des oligonucléotides de synthèse composés de 12 à 18 T en générale capable de s'hybrider à la région polyA des ARNm.
- Les inhibiteurs de RNAses : Ces inhibiteurs sont destinés à protéger l'ARN de la dégradation par les RNAses

- Principe de la PCR

Il s'agit de réaliser une succession de réaction de répliation d'une matrice double brin d'ADNc obtenue après une transcription inverse d'un ARN viral. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-primés pointent l'une vers l'autre. Les amorces définissent en la bordant la séquence à amplifier. Les produits de chaque étape de synthèse sont utilisés comme matrices pour les étapes suivantes. On obtient ainsi une amplification exponentielle de la matrice originale.

La technique de la PCR a été imaginée par Kary Mullis en 1985 (Mullis et Faloona, 1985). Elle a connu un essor considérable à partir de 1988 avec la commercialisation d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées, la Taq-polymérase, qui a permis une automatisation de la technique.

- Déroulement de la PCR

La PCR se déroule dans un petit tube lui-même placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Le thermocycleur chauffe le tube aux températures voulues pendant les durées programmées et de recommencer en effectuant des cycles. Un cycle de PCR reproduit trois températures pendant des durées différentes. La durée d'un cycle est de l'ordre d'une minute. Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes :

- **La dénaturation** : elle se déroule à une température de 94°C. A cette température, les liaisons faibles qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.
- **L'hybridation (annealing)** : Elle se fait de 40° à 65°C L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires.
- **Elongation** : Elle se déroule à 72°C. Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides présents dans le mélange. Elle se fait sous l'action de la Taq-polymérase. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Les éléments intervenant dans la PCR sont :

- l'ADN à amplifier (ADNc obtenu après la transcription inverse de l'ARN viral),
- des oligonucléotides ou amorces spécifiques du segment d'ADNc,
- l'ADN polymérase (Taq-polymérase). C'est une enzyme extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*, espèce bactérienne vivant dans les eaux chaudes et qui présente une grande résistance à la dénaturation thermique. Elle peut toujours travailler à 80°C et à 90°C.
- un mélange des quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADNc. Ce sont dATP, dTTP, dGTP et dCTP.

Au cours du premier cycle, les brins initiaux sont donc copiés, chacun servant de matrice pour l'autre. Le nombre de brin obtenu est le double du nombre de brin initial. A chaque cycle la quantité d'ADN double dans le tube. De façon théorique, en partant de deux brins d'ADN initiaux, on obtient on a une progression exponentielle de la quantité d'ADN.

- La révélation des produits de la RT-PCR

Elle se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. L'électrophorèse est le phénomène physique par lequel des particules chargée d'une solution colloïdale se déplacent sous l'effet d'un champ électrique. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par deux physiciens Linder et Picton ; il a rapidement servi de base à une méthode de séparation des particules qui est maintenant très employée. Elle permet la séparation des fragments d'ADN de 300 à 10000 paires de base.

Les fragments d'ADN avant d'être déposés dans les puits, sont mélangés avec une solution de charge qui contient :

- un alourdisseur (glycérol de saccharose) pour entraîner l'ADN au fond du puit
- des marqueurs de mobilité (colorants visibles : bleu de bromophénol)
- un agent dénaturant pour arrêter les réactions enzymatiques

Après la migration, les bandes d'ADN sur le gel d'agarose sont révélées par coloration. Quelques gouttes de bromure d'éthidium (BET) ont été ajoutées au gel pendant sa préparation. Le BET devient cent fois plus fluorescent sous une illumination ultraviolette lorsqu'il est lié à l'ADN.

IV. MATERIEL ET METHODES

4.1. PRELEVEMENTS AVIAIRES

Tout prélèvement aviaire étant potentiellement très pathogène, des mesures de biosécurité recommandées par l'OIE et l'OMS ont été prises : le port des combinaisons Tyvek, des lunettes, de bavette, de couvre manches, de couvre chaussures et de gants de nitrile (Figure 3a).

Nous avons effectué des prélèvements chez des oiseaux domestiques et sauvages dans des foyers où une mortalité évocatrice de grippe aviaire a été notifiée. Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage trachéal et cloacal dans deux régions du Burkina Faso d'avril à mai 2006. De Chaque oiseau prélevé, un spécimen trachéal et un spécimen cloacal ont été collectés séparément dans des cryotubes à vis (de 1,8 à 2ml) contenant 200 à 300µl de milieu de transport « virus transport medium » (VTM) qui est un milieu de culture (milieu de Hank) additionné d'antibiotiques et d'antifongiques (Fouchier *et al.*, 2004). Ces spécimens sont immédiatement étiquetés et une fiche de renseignements cliniques(annexe) a été établie pour chaque oiseau prélevé. Le transport des spécimens du terrain au laboratoire s'est fait dans une glacière contenant de la glace dans un délai n'excédant pas deux heures. Au laboratoire, les spécimens sont rangés dans des cryoboîtes, identifiés sous une hotte à flux laminaire vertical de niveau 2 (Figure 3b), et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.

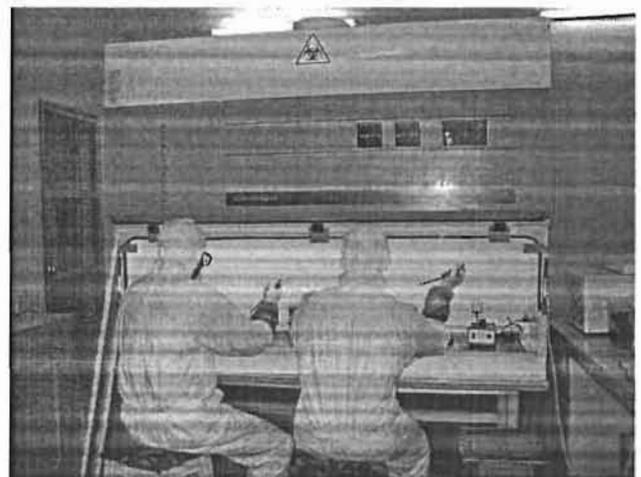


Fig. 3a : Mesures de protection pour la collecte des spécimens sur le terrain

Fig. 3b : Mesures de protection lors des travaux au laboratoire

Figure 2 : Mesure de sécurité pour la collecte et le traitement des spécimens.

4.2. ANALYSE DES SPECIMENS

4.2.1. Extraction de l'ARN viral

- L'extraction de l'ARN a été réalisée à l'aide de kits d'extraction « QiAmp viral RNA Mini kit » suivant le protocole du fournisseur (Qiagen, Germany). Afin d'extraire l'ARN viral, les spécimens sont décongelés à température ambiante sous la hotte à flux laminaire puis vortexés et centrifugés à 8000 rpm pendant 30 sec. Une colonne (de 2 ml) est étiquetée et deux microtubes (de 1,8 ml) pour la lyse et la collecte de l'ARN. Un volume de 560 µl de solution de lyse est distribué dans chaque microtube avant d'y ajouter. 140 µl d'échantillon (70 µl du surnageant du spécimen trachéal et 70 µl du surnageant du spécimen cloacal) ou 140 µl de VTM pour les contrôles négatifs,
- Des « pools » de 3 spécimens sont constitués pour contrôler d'éventuelles présences d'inhibiteurs. Pour ce faire, dans chaque pool, 20 µl de solution de Measle virus (MV) ou virus rougeoleux plus 40 µl de chaque échantillon (20 µl du spécimen trachéal + 20µl du Spécimen cloacal). Les échantillons ainsi préparés sont d'abord vortexés 15 sec, ensuite incubés à température ambiante pendant 10 mn et enfin centrifugés (Short centrifugation) pour obtenir une bonne lyse. Chaque microtube est débarrassé de son surnageant et l'ARN est précipité par ajout de 560 µl d'éthanol à 99°. Ensuite l'ARN est récupéré sur des colonnes de silicate et purifié par deux séries de lavage successives (à l'aide des solutions AW1 et AW2) intercalées de centrifugation (8000 rpm pendant 1 min pour AW1 et 14000 rpm pendant 3 min pour AW2). La dernière étape de l'extraction de l'ARN viral est l'élution de l'ARN lavé en déposant délicatement 50 µl de solution d'élution sans toucher la membrane du filtre de la colonne et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min. L'ARN est alors collecté dans un cryotube avant d'être transcrit ou congelé à -80°C.

4.2.2. La reverse transcription (RT)

Durant cette étape l'ARN obtenu précédemment est retro-transcrit en ADNc. Brièvement 7 µl du Mix-1(H₂O + Randum primer + DNTP) ont été ajoutés à 5 µl de chaque extrait d'ARN (matrice) dans des cupules d'une microplaque de PCR (voir schema de plaque en annexe2). La plaque est chauffée à 65°C pendant 5 min sur le thermocycleur (Mastocyclor Gradient). Après 7 µl du Mix-2(Tampon 5X + DTT + Rnase OUT) sont ajoutés dans chaque cupule et chauffer à 37°C pendant 2 min. Ensuite 1 µl d'enzyme (M-MNV) est ajouté à chaque cupule et la retro-transcription se fait à 37°C pendant 50mn.

4.2.3. Détection de virus influenza A par amplification des ADNc obtenus

4.2.3.1. Amplification des ADNc obtenus

Elle a été fait à partir des ADNc obtenus après la reto-transcription (ADNc des échantillons aviaires, ADNc des contrôles négatifs et ADNc des pools). Nous avons associé un contrôle positif connu (ADNc positif au virus influenza A H5 reçu du LNS Luxembourg). Un couple d'amorces spécifiques (ChenF :5' CTTCTAACCGAGGTCGAAACG 3'; ChenR : 5' AGGGCATTGGACAAKCGTCTA 3') ont été associées au Mix AIV (voir composition du Mix AIV en annexe 2) pour une amplification sélective des fragments spécifiques au virus influenza A. A cet effet sur 22,5 µl du mixte AIV (contenant la tag polymérase) déposés dans les cupules d'une plaque sont ajoutés 2,5 µl de l'ADNc dilué. L'amplification a été faite par chauffage pendant 50mn suivant le programme de la PCR GA(Annexe2). Un couple d'amorces spécifiques au virus rougeoleux Nf1alt5 et Nralt1g (Nf1alt5 : 5'-CGGGCAAGAGATGGTAAGGAGGTCAG ; Nr7alt1g : 5'-AGGGTAGGCGGATGTTGTTCTGG) ont été associées dans le Mix des pools pour assurer l'amplification les ADNc des pools. Ceci a permis de contrôler à chaque fois les éventuelles inhibitions de la réaction par des facteurs endogènes ou exogènes aux spécimens aviaires.

4.2.3.2. Révélation des produits amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose

A la fin de l'amplification, les produits obtenus sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% contenant du bromure d'éthidium (Annexe 3). Un volume de 5 µl de chaque échantillon est mélangé à une goutte du bleu de charge puis déposé dans le puit de gel (Plan du gel en annexe3). La migration est ensuite réalisée à 400 mA, 80 volts pendant 45 mn. A la fin de la migration, le gel est examiné sur un transilluminateur à rayons ultraviolets et une photo du gel est réalisée.

A l'observation du gel sous rayons ultra violets la présence d'ADNc dans les puits est matérialisée par des bandes. La taille des fragments d'ADNc migré est déterminée par rapport à l'étalonnage du marqueur de poids moléculaire. Ainsi l'ADN obtenu après la RT de l'ARN viral et l'amplification de l'ADNc a une taille de 350bp. La RT-PCR est validée lorsqu'à l'observation du gel, les contrôles positifs sont positifs (présence de bande) et que les contrôles négatifs sont négatifs (absence de bande).et lorsque les pools qui au départ étaient 100% positifs (au virus de la rougeole) apparaissent positifs (présence de bande) démontrant ainsi qu'il n'y a pas eu d'inhibition de la retro-transcription (Figure 3). Les échantillons aviaires révélés positifs après cette PCR-AIV sont considérés positifs pour le virus influenza A. Pour la détermination spécifique du virus influenza A sous type H5, une seconde PCR-H5 a été pratiquée.

4.2.3.3. Amplification pour la recherche du virus influenza A H5

Tous les échantillons aviaires détectés positifs au virus influenza A, ont été amplifiés à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques Kha-1 et Kha-3 (H5-kha-1: CCTCCAGARTATGCMTAYAAAATT GTC ; H5-kha-3: TACCAACCGTCTACCATKCCYTG) et ont permis de déterminer le sous type H5

4.2.3.4. Détermination du sous-type N1 du virus influenza A (H5N1)

Les ADNc issus de nos échantillons ont été caractérisés par l'Institut d'Immunologie du Luxembourg dans le cadre d'une collaboration scientifique entre l'IRSS et le LNS Luxembourg. Une PCR en temps réel pratiquée au LNS a permis de

confirmer les résultats obtenus à l'IRSS (Ducatez *et al.*, 2007) et un séquençage dont la méthode est décrite par Ducatez *et al.*, (2006) a déterminé le N1.

4.3. ANALYSE DES DONNEES

Les données collectées ont été saisies puis analysées avec les logiciels Excel et SPSS. Le test du χ^2 a été utilisé pour la comparaison des proportions avec un seuil de significativité de 5%.

V. RESULTATS

5.1. LES OISEAUX DE NOTRE ECHANTILLON

Pendant le mois d'Avril et de Mai 2006, 283 oiseaux ont été examinés et des écouvillonnages cloacal et trachéal réalisés dans les régions de Ouagadougou et de Bobodioulasso au Burkina Faso

Les différentes espèces examinées étaient les suivants :

- des oiseaux domestiques comprenant du poulet de race local, des poulets de race améliorée (Leghorn et Isa Brown), deux canards et cinq dindons ;
- des oiseaux sauvages dont 3 charognards, 1 épervier et 1 touraco gris

Tableau II : Répartition du nombre d'oiseaux par région de prélèvement

Localité	Espèces	Nombre d'oiseaux
Région du Centre (Ouagadougou) :	Oiseaux domestiques	76
	Oiseaux sauvages	4
	Total Centre	80
Région de l'Ouest (Bobo et Sokoroni) :	Oiseaux domestiques	202
	Oiseaux sauvages	1
	Total Ouest	203
TOTAL		283

5.2. LE STATUT VACCINAL DES OISEAUX DE L'ECHANTILLON

L'analyse des fiches d'enquête de terrain a permis de constater que les vaccinations portaient sur la bronchite infectieuse, la maladie de Newcastle et la bursite infectieuse. Le statut vaccinal des oiseaux dont sont issus les prélèvements aviaires était le suivant: Seuls 17,7% de la volaille (en majorité des poulets de races améliorées) avaient à la fois été vaccinés soit contre la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse et la maladie de Gumboro; 1,8% contre deux maladies (maladie

de Gumboro et Newcastle); 4,2% contre la maladie de Newcastle ; 73,9% des oiseaux explorés dans notre étude n’avaient reçu aucun vaccin (Tableau I).

Tableau III : Statut vaccinal de l’échantillon d’oiseaux de l’étude

Maladie	Nombre d’oiseaux vaccinés	Pourcentage de vaccination
Newcastle	12	4.2%
Newcastle, bronchite infectieuse, maladie de Gumboro	50	17.7%
Newcastle et bronchite infectieuse	5	1.8%
Oiseaux non vaccinés	209	73.9%
Statut inconnu	7	2.5%
Total	283	100%

5.3. LES SYMPTOMES OBSERVES PENDANT LES PRELEVEMENTS AVIAIRES

Nous avons observé que la dyspnée était le symptôme le plus fréquent et surtout associé à la paralysie générale et la perte de ponte (tableau III). Par contre la majorité des oiseaux étaient asymptomatiques.

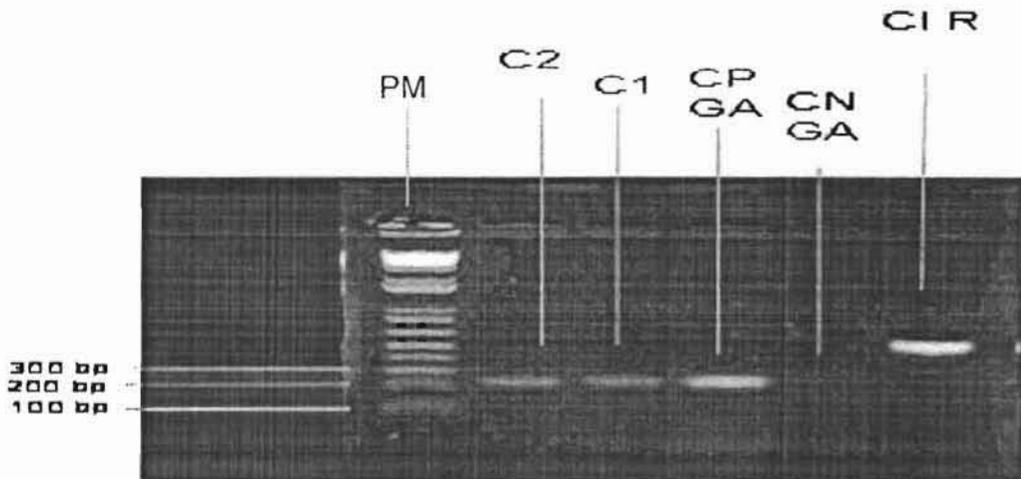
Tableau IV : Les principaux symptômes observés chez la volaille dans les foyers suspects d'influenza aviaire

Symptômes	Cas rencontrés	
	Nombre	Pourcentage
Dyspnée et d'apathie	04	0,8 %
Dyspnée et de diarrhée	06	1,2 %
Dyspnée et d'asthénie	13	2,5 %
Dyspnée et perte de ponte	19	3,7 %
Dyspnée et ataxie locomotrice	09	1,7 %
Dyspnée et paralysie générale	20	3,9 %
Cas asymptomatiques	212	75 %
Total	283	100 %

5.4. LA PREVALENCE DES VIRUS INFLUENZA A AU SEIN DE L'ECHANTILLON D'OISEUX DE L'ETUDE

La retro-transcription suivie d'une amplification spécifique de régions cibles de l'ADNc nous a permis de mettre en évidence la présence de virus parmi nos spécimens collectés (Figure 3).

220406-gel58



PM : Marqueur de poids moléculaire
C1, C2 : Charognard 1 et 2
CPGA : Contrôle positif grippe aviaire
CNGA : Contrôle négatif grippe aviaire
CIR : Contrôle d'inhibition (virus rougeoleux)

Figure 3 : Photo de montrant la détection de l'IAHP-H5 par la RT-PCR

Sur les 283 oiseaux prélevés, nous avons mis en évidence la présence de virus influenza A chez 9 sujets soit une prévalence de 3,2% au total. Parmi ces derniers 5 étaient positifs pour influenza A-H5N1. En fonction des espèces nous avons 2/3 vautours infectés soit une prévalence de 66,6% et 7/219 poulets locaux infectés soit une prévalence de 3,2% (Tableau IV).

Tableau V : Les différentes espèces de volailles explorées et les taux de morbidité à l'influenza aviaire

Oiseaux	Nombre d'oiseaux examinés	Positifs à l'influenza A	Positifs à H5N1
	n	n	n
Touraco gris	1	0	0
Vautours	3	2	2
Dindons	3	0	0
Canards	2	0	0
Isa Brown	25	0	0
Leghorn	30	0	0
Poulets locaux	219	07	3
Total oiseaux	283	09	5

Nos investigations ont mise en évidence la présence d'influenza A dans la ville de Ouagadougou chez 2 vautours, à Bobo-Dioulasso chez 5 poulets locaux et à Sokoroni chez 2 poulets locaux (Tableau V). Parmi ces 9 positifs à l'influenza A 5 ont été positifs au H5. IL s'agit des 2 vautours de Ouagadougou, 2 poulets de Sokoroni et 1 poulet de Bobo Dioulasso.

Tableau VI : Répartition du nombre de spécimens par région de prélèvement

	Région du Centre (Ouagadougou)			Région de l'Ouest (Bobo-Dioulasso et Sokoroni)		
	Oiseaux domestiques	Oiseaux sauvages	Total	Oiseaux domestiques	Oiseaux sauvages	Total
Nombre de spécimens testés	76	4	80	202	1	203
AIV positive	0	2	2	7	0	7
H5 positif	0	2	2	3	0	3

La prévalence de l'influenza A au sein de la population de poulet est de 3,2% et elle est de 66,7% chez les vautours. Les calculs statistiques donnent un $\chi^2 = 57,31$ et $p=0,001$. La différence de pourcentage observée entre les deux groupes est donc significative. La prévalence du virus H5N1 chez les vautours et chez les poulets est respectivement 66,7% et 0,4%. Le χ^2 est de 30,65 et $p = 0,004$. La différence entre les deux groupes est significative.

Le virus influenza A et plus spécifiquement le virus H5N1 est plus fréquent chez les vautours que chez les poulets

VI. DISCUSSION

La RT-PCR est maintenant une technique de biologie moléculaire beaucoup utilisée en diagnostic clinique (Cave *et al.*, 2003). Parmi les méthodes couramment utilisées pour le diagnostic de la grippe aviaire (hémagglutination, immunodiffusion, isolement du virus et RT-PCR), la RT-PCR elle s'est avérée plus sensible, plus spécifique et plus fiable pour un diagnostic précoce. En effet la présence du virus est détectée par amplification d'un fragment spécifique du génome viral. Les amorces (primers) utilisées correspondent aux régions conservées du génome viral donc moins affectées par les mutations. Elles permettent une détection spécifique du génome considéré. Le choix des amorces est donc très important pour la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR.

- Plusieurs stratégies ont été utilisées pour améliorer la sensibilité et la spécificité de la RT-PCR pour le diagnostic des virus influenza comme le démontre les travaux de Lee *et al.*, (2001) en Taiwan qui ont établi des amorces spécifiques pour les sous types H1 à H15. Par ailleurs Hoffmann *et al.*, (2001) au USA qui ont, eux aussi, déterminé des amorces pour amplifier par RT-PCR les huit segments du génome du virus influenza A. Enfin Cobb *et al.*, (1994) ont défini des conditions nécessaire pour optimiser la RT-PCR.

L'amplification permet de détecter de très petites quantités d'ARN dans le matériel biologique. En effet au bout de 40 cycles, la quantité d'ARN qui a été transcrite en ADNc est énormément amplifié donc facilement détectable dans les spécimens traités.

Dans notre étude, nous avons utilisé des amorces ChenF et ChenR (primers désignés par Fouchier *et al.*, (2000) pour détecter le virus influenza A et ensuite des amorces Kha1 et Kha3 pour déterminer le sous type H5. Ces mêmes amorces ont été utilisés par Ducatez *et al.*, (2006) au Nigeria en 2006.

Nos résultats ont montré une prévalence de 3,2% de AIV soit 9 oiseaux infectés par le virus influenza A dont 5 cas confirmés de virus influenza A H5N1. Cela représente une sérieuse menace d'une part pour la volaille du Burkina Faso dont l'effectif est chiffré à 32 millions (rapport MRA, 2006) et d'autre part pour la population humaine d'autant plus le virus H5N1 est reconnu comme l'agent de la

grippe aviaire chez l'homme . Les trois cas positifs du virus influenza A H5N1 au sein des poulets locaux dans la région Ouest du pays (un cas à Bobo-Dioulasso et deux cas à Sokoroni à la frontière du Mali) et surtout les deux cas positifs influenza A H5N1 chez des vautours à Ouagadougou, témoigne de la transmission rapide et à de longues distances entre oiseaux sauvages et volailles domestiques et *vis versa*. Le charognard est classé dans le tableau A des animaux au Burkina se nourrit principalement de charognes (cadavres d'animaux ou d'oiseaux morts) est un grand voyageur (vole plusieurs dizaines de Km en quelques heures. Il pourrait alors être un des réservoirs importants dans la transmission de la grippe aviaire. Le vautour est présent dans la majorité des villages au Burkina Faso et dans la sous région où l'élevage de volaille est de type extensif. Le risque de transmission du virus Influenza A H5N1 à la volaille domestique est très grand, ce qui peut entraîner une catastrophe économique, politique et socioculturelle. En milieu rural, la population paysanne cohabite avec la volaille, cela représente un risque potentiel de transmission du virus influenza A H5N1 de la volaille à l'humain surtout à la frange la plus vulnérable qu'est celle des femmes et des enfants (cette frange est plus en contact avec la volaille).

Les vautours se seraient peut être contaminés soit par contact avec des oiseaux sauvages migrateurs porteurs de virus ou par consommation de carcasses infectées. Quand aux poulets elles ont dues être contaminés au contact de vautours ou d'une autre source infectée par des oiseaux migrateurs

Vu les difficultés d'éradication de cette infection et les graves conséquences qu'elle peut entraîner toutes les précautions doivent être prises pour la détection et le contrôle des foyers.

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Devant la menace que constitue l'infection par l'influenza virus, son diagnostic précoce s'avère une nécessité absolue pour la réussite d'un plan de riposte contre l'influenza aviaire hautement pathogène. En effet la RT-PCR à cause de sa spécificité, sa sensibilité et sa rapidité se révèle être un outil de choix pour la détection rapide d'une infection surtout dans les pays moins développés où des problèmes majeurs existent pour la mise en place d'une prophylaxie sanitaire efficace qui est seule capable d'éradiquer la maladie. L'influenza hautement pathogène est devenu un problème de santé publique. En Afrique la promiscuité des volailles et des gens dans les villages augmente les cas de survenue de cas humains d'où la nécessité d'une grande mobilisation pour faire face à ce fléau.

De nombreuses questions restent posées sur l'épidémiologie du virus H5N1 à savoir : les conditions dans lesquelles le virus H5N1, d'ordinaire peu virulent devient très agressif, le rôle des oiseaux sauvages, le transport du virus à longue distance.

PERSPECTIVES

Comme perspectives, cette étude pourrait se poursuivre :

- D'une part par la détecter influenza A H5N1 chez les oiseaux sauvages au Burkina Faso.
- D'autre part par le séquençage des isolats positifs pour déterminer leur phylogénie et l'origine des épizooties. Cela Permettrait de caractériser les virus isolés, de faire une comparaison des séquences et obtenir ainsi assez d'informations sur la nature, l'origine des virus influenza identifiés.

RECOMMANDATIONS

Nous recommandons vivement

- ☞ Extension de cette étude à d'autres régions du Burkina Faso
- ☞ L'adoption et la diffusion de la RT-PCR comme outil de diagnostic précoce et fiable de l'influenza H5N1.

L'extension de cette étude à d'autres régions du Burkina Faso

L'adoption et la diffusion de la RT-PCR comme outil de diagnostic précoce et fiable de l'influenza H5N1

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA (Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments), 2002. Rapport du groupe de travail sur le risque de transmission à l'homme des virus influenza aviaires. 90p.
- Alberts B., 2003. DNA replication and recombination. *Nature*, 421, 23, 431-435.
- Wallensten A., 2006. *Influenza A Virus in wild Birds*. Doctoral thesis. Department of molecular and clinical medicine, Linköping University, Sweden 86p.
- Beard C.W., Avian influenza antibody detection by immunodiffusion. *Avian Diseases*, 2, 337-341.
- Beigel J.H. and The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on human influenza A/H5, 2005. Avian Influenza A (H5N1) infection in humans *New England Journal of Medicine* 353, 1374-1385.
- Brugère J., 2006. Le Point sur l'influenza aviaire. Supplément technique n°97 à la Dépêche Vétérinaire du 24 Décembre 2005 au 6 Janvier 2006
- Camitelli, L., Ciccozzi, M., Saleni, M., Taglia, F., 2006. H5N1 influenza virus evolution: a comparaison of epidemics in birds and humans. *Journal of General Virology*, 87, 955-960.
- Campitelli L., Ciccozzi M., Salemi M., Taglia F., Boros S., Donatelli I. And Rezza D., 2006. H5N1 influenza virus evolution: a comparison of different epidemics in birds and humans (1997-2004). *Journal of General Virology*, 87, 995-960.
- Campitelli L., Fabiani C., Puzelli S. Fioretti A., Foni E., De Marco A., Krauss S., Webster R.G. and Donatelli I., 2002. H3N2 influenza viruses from domestic chickens in Italy : an increasing role for chickens in the ecology of influenza? *Journal of General Virology*, 83, 413-420.
- Caterina K.M., Frasca S. Jr., Girshick T. and Khan MI, 2004. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 5, 293-298.
- Cattoli G., Drago A., Maniero S., Toffan A., Bertoli E., Fassina S., Terregino C., Robbi C., Vicenzoni G. and Capua I., 2004. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathology*, 33, 4, 432-437.

- Cave H., Acquaviva C., Bieche I., Brault D., de Fraipont F., Fina F., Loric S., Maisonneuve L., Namour F., Tuffery S., 2003. La RT-PCR en diagnostic clinique. *Annale de Biologie Clinique*, 61, 6, 635-644.
- Choi Y.K., Ozaki H., Webby R.J., Webster R.G., Peiris J.S., Poon L., Butt C., Leung Y.H.C. and Guan Y., 2004. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China, *Journal of Virology*, 8609-8614.
- Claas E.C., Kawaoka Y., de Jong J.C., Masurel N. and Webster R.G., 1994. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology*, 204, 1, 453-457.
- Claas E.C.J., Osterhaus A., Beek R.V., De Jong J.C Rimmelzwaan G.F., D.A. Senne, Krauss S., Shortridge K.F. and Webster R.G,1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*, 351, 472-477.
- Cobb B.D. and Clarkson J.M., 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*, 22, 18, 3801-3805.
- De Jong M.D., Simmons C.P., Thanh T.T., Hien V.M., Smith G.J., Chau T.N., Hoang D.M., Chau N.V., Khanh T.H., Dong V.C., Qui P.T., Cam B.V., Ha D.Q., Guan Y., Peiris J.S., Chinh N.T., Hien T.T. and Farrar J., 2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature Medicine*, 12, 10, 1203-1207.
- Di Trani L., Bedini B., Donatelli I., Campitelli L., Chiappini B., De Marco M.A., Delogu M., Buonavoglia C. and Vaccari G., 2006. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infectious Diseases*, 6, 87. doi:10.1186/1471-2334-6-87.
- Ducatez M.F., Olinger C.M., Owoade A.A., De Landtsheer S., Ammerlaan W., Niesters H.G., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Muller C.P., 2006. Avian flu : multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature*, 442, 7098, 37.
- Easterday B.C., Hinshaw V.S. and Halvorson D.A., 1996. *Influenza. In diseases of poultry*, 10th edition, edited by B.W. Calnek, Iowa state University press, Ames, Iowa, USA, pp. 583-605.
- Fitch W.M., Bush R.M., Bender C.A. and Cox N.J., 1997. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94, 15, 7712-7728.

- Fouchier R.A.M., Bestebroer T.M., Herfst S., Van Der Kemp L., Rimmelzwaan G.F. and Osterhaus A.D.M.E., 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4096-4101.
- Fouchier R.A.M., Schneeberger P.M., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Kemink S.A.G., Munster V., Kuiken T., Rimmelzwaan G.F., Schutten M., van Doornum G.J.J., Koch G., Bosman A., Koopmans M. and Osterhaus A.D.M.E., 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 5, 1356-1361
- Ghendon Y., 1994. Introduction to pandemic influenza through history. *European Journal of Epidemiology*, 4, 451-453.
- Govorkova E.A., Rehg J.E., Krauss S., Yen H-L., Guan Y., M et al, 2005. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *Journal of Virology*, 2191-2198
- Harvey R., Martin A.C.R., Zambon M. and Barclay W.S., 2005. Restrictions to the adaptation of influenza A virus H5 hemagglutinin to the human host. *Journal of Virology*, 78, 1, 502-507.
- Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G and Perez D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 146, 2275-2289.
- Horimoto T. and Kawaoka Y., 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clinical Microbiology Review*, 14, 1, 129-149
- Jin M., Wang G., Zhang R., Zhao S., Li H., Tan Y. and Chen H., 2004. Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. *Avian Diseases*, 48, 870-878.
- Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M., Natrop G., van der Nat H., Vennema H., Meijer A., van Steenbergen J., Fouchier R., Osterhaus A. and Bosman A., 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*, 363, 9409, 587-593.

- Kurtz J., Manvell R.J. and Banks J., 1996. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet*, 348, 9031, 901-902.
- Kuszeński K. and Brydak L., 2000. The epidemiology and history of influenza. *Biomedecine and Pharmacotherapy*, 54, 4, 188-195.
- Lee C-W., Swayne D.E., Linares J.A., Senne D.A. and Suarez D.L., 2005. H5N2 Avian Influenza outbreak in Texas in 2004 : the First highly pathogenic strain in the united states in 20 years? *Journal of Virology*, 11412-11421.
- Ligon B.L., 2005. Avian influenza virus H5N1: A review of its history and information regarding its potential to cause the next pandemic. *Seminars in Pediatrics Infectious Diseases*, 16, 326-335.
- Mahy B.W.J.; Brown C.C., 2000. Emerging Zoonoses : Crossing the species barrier. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19, 1, 33-40.
- Mullis K.B. and Faloona F., 1985. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Ng L.F., Barr I., Nguyen T., Noor S.M., Tan R.S., Agathe L.V., Gupta S., Khalil H., To T.L., Hassan S.S. and Ren E-C., 2006. Specific detection of H5N1 avian influenza A virus in field specimens by a one-step RT-PCR assay. *BMC Infectious Diseases*, 6, 40. doi:10.1186/1471-2334-6-40.
- Oner A.F., Bay A., Arslan S., Akdeniz H., Sahin H.A., Cesur Y., Epcacan S., Yilmaz N., Deger I., Kizilyildiz B., Karsen H. and Ceyhan M., 2006. Avian influenza A (H5N1) infection in Eastern Turkey in 2006. *New England Journal of Medicine*, 355, 21, 2179-2185.
- Reid A.H., Taubenberger J.K. and Fanning T.G., 2001. The 1918 Spanish influenza : integrating history and biology. *Microbes and Infection*, 3, 81-87.
- Saegerman C., Meulemans G., Van Reeth K., Marlier D. Yane F., Vindevogel H., Brochier B., van den Berg T. et Thiry E., 2004. Evaluation, contrôle et prévention du risque de transmission du virus influenza aviaire à l'homme. *Annale de Médecine Vétérinaire*, 148, 65-77.
- Schrader C., Süß J., 2004. Molecular epidemiology of porcine H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1982 and 2001. *Intervirology*, 47, 72-77.
- Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K. and Cox

- N., 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 279, 5349, 393-396.
- Tam J.S., 2002. Influenza A (H5N1) in Hong Kong : an overview. *Vaccine*, 20, 577-581.
- Uiprasertkul M., Puthavathana P., Sangsiriwut K., Pooruk P., Srisook K., Peiris M., Nicholls J.M., Chokephaibulkit K., Vanprapar N. and Auewaraku P., Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 7, 1036-1041.
- Webster R.G., 1999. 1918. Spanish influenza : The secrets remain elusive. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96, 1164-1166.
- World Health Organisation, 2005. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. 7p. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/index.html
- Woodhead, M., Ewig, S., Torres, A., 2003. Severe acute respiratory syndrome (SARS). *European Respiratory Journal*, 21, 739-740.
- Yu H., Shu Y., Hu S., Zhang H., Gao Z., Chen H., Dong J., Xu C., Zhang Y., Xiang N., Wang M., Guo Y., Cox N., Lim W., Li D., Wang Y., Yang W., 2006. The first confirmed human case of avian influenza A (H5N1) in Mainland China. *Lancet*, 367, 9504, 84.

IX. ANNEXES

TABLE DES MATIERES

Liste des Sigles et Abreviations	1
Liste des Tableaux et Figures	2
I. INTRODUCTION	3
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE	4
2.1. Objectif général	4
2.2. Objectifs spécifiques	4
III. REVUE DE LA LITTERATURE	5
3.1. L'agent étiologique	5
3.1.1. Caractères morphologiques.....	5
3.1.2. Nomenclature.....	8
3.1.3. Caractères cultureux	8
3.1.4. Propriétés antigéniques.....	9
3.1.5. La spécificité d'hôtes.....	10
3.2. Déterminants moléculaires viraux de la virulence	10
3.3. Mécanismes de variation génétique des virus influenza A	11
3.3.1. Mutations ponctuelles	11
3.3.2. Réassortiment génétique	13
3.4. Epizootologie et épidémiologie de la grippe aviaire	14
3.4.1. Espèces affectées	14
3.4.2. Matières virulentes et transmission	15
3.4.3. Tableau clinique de la grippe	16
3.5. Le diagnostic de la grippe aviaire	17
3.5.1. Le diagnostic clinique	17
3.5.2. Le diagnostic différentiel	18
3.5.3. Diagnostic de laboratoire de la grippe aviaire	20
IV. MATERIEL ET METHODES.....	26
4.1. Prélèvements aviaires	26
4.2. Analyse des spécimens	27
4.2.1. Extraction de l'ARN viral.....	27
4.2.2. La reverse-transcription (RT).....	28
4.2.3. Détection de virus influenza A par amplification des ADNc obtenus	28
4.3. Analyse des données.....	30
V. RESULTATS	31
5.1. Les oiseaux de notre échantillon	31
5.2. Le statut vaccinal des oiseaux de l'échantillon	31
5.3. Les symptômes observés pendant les prélèvements aviaires.....	32
5.4. La prévalence des virus influenza A au sein de l'échantillon d'oiseux de l'étude.....	33
VI. DISCUSSION	37
VII. CONCLUSION.....	39
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41
IX. ANNEXES	46

ANNEXE 1 : FICHE SIGNALÉTIQUE D'ÉCHANTILLON DE VOLAILLE

Numéro du troupeau (identique à celui indiqué sur le tube)	
Numéro de l'échantillon (identique à celui indiqué sur le tube)	
Espèce, Race	
Date de prélèvement	
Nom de la ferme (identifiant)	
Localisation de la ferme (pays, ville)	
Type de ferme (familiale/industrielle)	
Nombre de troupeau dans la ferme	
Taille du troupeau (nombre d'animaux)	
Etat sanitaire du troupeau	
Type de volaille	
Age de l'animal (en semaine)	
Vaccination effectuée sur l'animal (MDV, NDV, IBDV, IBV, CAV, APV, ILT, REO, AIV...)	
Symptôme	
Maladie(s) suspectée(s)	
Organe(s) prélevé(s)	
Numéro d'autre échantillons prélevés sur le même animal et numéro de troupeau	

ANNEXE 2 : PREPARATION DES MIXTES

La Reverse- Transcription (RT)

Préparation des mixtes

Cette opération est réalisée dans une salle spécifique appelée salle des mixtes qui est une salle « DNA and RNA-free » absence totale d'ADN et d'ARN.

Composition du Mix-1		Composition Mix-2	
Réactif	Quantité pour 1 spécimen	Réactif	Quantité pour 1 spécimen
H2O	1 µL	Tampon 5X	4 µL
RP (0,03µg/µL)	5 µL	DTT	2 µL
DNTP (10µM)	1 µL	Rnase OUT	1 µL

La Polymerase Chain Réaction :

PCR AIV

Préparation du mixte AIV

Réactif	Volume pour 1 spécimen
H2O	17,3 µL
Buffer (10X)	2,5 µL
MgCl2 (50 mM)	1 µL
dNTP (10 mM)	0,5 µL
Primer ChenF (25 mM)	0,5 µL
Primer ChenR (25 mM)	0,5 µL
Platinum Taq (5U/µl)	0,2 µL
Template (1:5)	2,5 µL
Total	25 µL

PCR MV

Préparation du mixte MV

Réactif	Volume pour 1 spécimen
H ₂ O	14,49 µL
Buffer (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,91 µL
dNTP (10 mM)	0,5 µL
Primer Nf1alt5 (10 mM)	2 µL
Primer Nr7alt1g (10 mM)	2 µL
Platinum Taq (5U/µl)	0,1 µL
Template (1:5)	2,5 µL
Total	25 µL

PCR-H5

Préparation du mixte-H5

Réactif	Volume pour 1 spécimen
H ₂ O	17,4 µL
Buffer (10X)	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,9 µL
dNTP (10 mM)	0,5 µL
Primer Kha-1 (25 mM)	0,5 µL
Primer Kha-3 (25 mM)	0,5 µL
Platinum Taq (5U/µl)	0,2 µL
Template (1:5)	2,5 µL
Total	25 µL

Le programme de la PCR-GA

Ce programme comporte 40 cycles d'amplification et chaque cycle se compose comme suit : Dénaturation : 30s à 94°C ; amorçage : 30s à 60°C et élongation : 1mn à 72°C.

Schéma de plaque RT-PCR

..... N° :..... Date :/...../.....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

ANNEXE 3 : PREPARATION DU GEL D'AGAROSE

Préparation du TBE 10X

Formulation pour 1000ml de TBE 10X, pH 8,3

- Peser exactement 108 g de Trizmabase, 55,2g d'acide borique et 9,9 g d'EDTA
- Dissoudre dans 800ml d'eau distillée
- Agiter et ajuster le pH à 8,8 si nécessaire
- Filtrer sur un filtre 0,22 µm
- Diluer au 1/10 pour obtenir du TBE 1X

Préparation du gel

- Peser 2 g d'agarose et dissoudre dans 150ml de TBE (Dilué au 1/10 c a d 15ml de TBE pur pour 135 ml d'eau).
- Chauffer à ébullition au four micro-onde
- Refroidir et ajouter 5µl de BET
- Homogénéiser puis couler dans les cuves contenant les peignes.

Dépôt des échantillons et migration

- Faire un plan de migration
- Prélever 5 µL de chaque échantillon et ajouter une goutte du bleu de charge
- Déposer dans les puits. Le dépôt d'un marqueur de poids moléculaire dans un puit permettra de déterminer la taille des fragments d'ADNc

Plan de gel de migration électrophoretique

PCR..... N° :..... Date :/...../.....

| Gel N° :..... |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 : | 1 : | 1 : | 1 : | 1 : |
| 2 : | 2 : | 2 : | 2 : | 2 : |
| 3 : | 3 : | 3 : | 3 : | 3 : |
| 4 : | 4 : | 4 : | 4 : | 4 : |
| 5 : | 5 : | 5 : | 5 : | 5 : |
| 6 : | 6 : | 6 : | 6 : | 6 : |
| 7 : | 7 : | 7 : | 7 : | 7 : |
| 8 : | 8 : | 8 : | 8 : | 8 : |
| 9 : | 9 : | 9 : | 9 : | 9 : |
| 10 : | 10 : | 10 : | 10 : | 10 : |

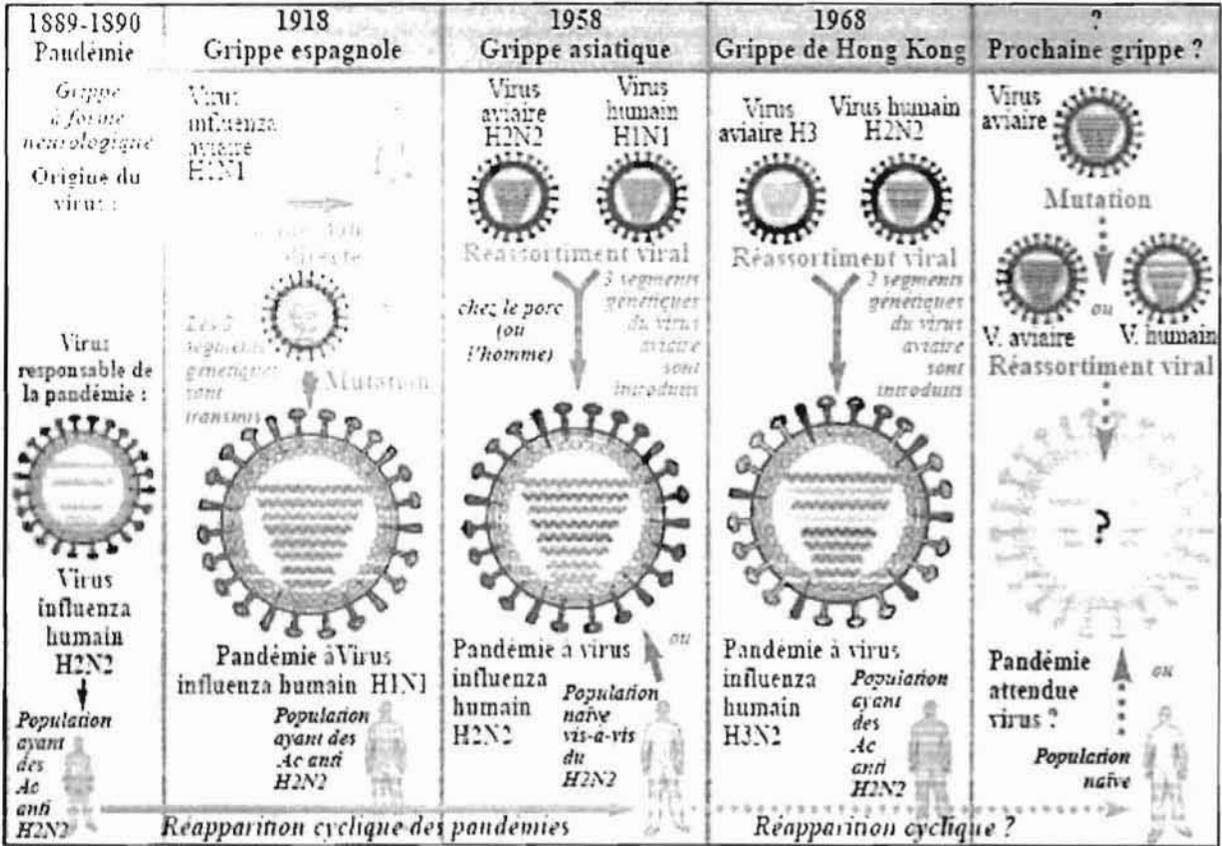
ANNEXES 4 : Epizooties de virus IAHP recensées dans le monde de 1955 à 2005 (en gras épizooties survenant après un épisode reconnu de contamination par un virus IAHP) (source : modifié de Perdue M.L. et Swayne D.E., *Avian Diseases*, 2005, 49, 3, 317-327).

	Espèces	Référence de souches	Années	Région ou pays
1.	Poulet	H5N1	1959	Ecosse
2.	Sterne	H5N3	1961	Afrique du Sud
3.	Dinde	H7N3	1963	Angleterre
4.	Dinde	H5N9	1966	Ontario
5.	Poulet	H7N7	1976	Victoria
6.	Poulet	H7N7	1979	Allemagne
7.	Dinde	H7N7	1979	Angleterre
8.	Poulet	H5N2	1983	Pennsylvanie
9.	Dinde	H5N8	1983	Irlande
10.	Poulet	H7N7	1985	Victoria
11.	Dinde	H5N1	1991	Angleterre
12.	Poulet	H7N3	1992	Victoria
13.	Poulet	H7N3	1995	Queensland
14.	Poulet	H5N2	1994	Mexique
15.	Poulet	H7N3	1995	Pakistan
16.	Poulet	H5N1	1997	Hong Kong
17.	Poulet	H7N4	1997	Nlle Galles du S. (Australie)
18.	Poulet	H5N2	1997	Italie
19.	Dinde	H7N1	1999	Italie
20.	Poulet	H7N3	2002	Chili
21.	Poulet	H7N7	2003	Pays-Bas
22.	Poulet	H5N1	2003-2005	Asie de l'Est
23.	Poulet	H7N3	2004	Canada
24.	Poulet	H5N2	2004	Texas
25.	Autruches	H5N2	2004	Afrique du Sud
26.	Volailles basse-cour	H5N1	2005	Roumanie
27.	Volailles basse-cour	H5N1	2005	Turquie
28.	Cygnés	H5N1	2005	Croatie
29.	Poulet	H5	2005	Ukraine

ANNEXES 5 : Nombres cumulés de cas humains de grippe aviaire confirmés et reportés par l'Organisation Mondiale de la Santé (3 Février 2007).

Country	2003		2004		2005		2006		2007		Total	
	cas	décès	cas	décès	cas	décès	cas	décès	cas	décès	cas	décès
Azerbaïdjan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	8	5
Cambodge	0	0	0	0	4	4	2	2	0	0	6	6
Chine	1	1	0	0	8	5	13	8	0	0	22	14
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Egypte	0	0	0	0	0	0	18	10	1	1	19	11
Indonésie	0	0	0	0	19	12	56	46	6	5	81	63
Irak	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	3	2
Nigeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Thaïlande	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	25	17
Turquie	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	0	0	93	42
Total	4	4	46	32	97	42	116	80	8	7	271	165

ANNEXE 6 : Les trois théories retenues pouvant expliquer l'arrivée de la prochaine pandémie (source : schéma adapté de Robert B.B., *New England Journal of Medicine*, 2005, 353, 21, 2209-2211).



SUMMARY

Background: The highly pathogenic influenza A virus has recently known a spectacular spread with outbreak in several countries including Burkina Faso. Responsible of human and animal's influenza infection, this virus belong to the family of *orthomyxoviridea*, type influenza A. In avian species, notably the gallinacean a clear case of influenza (bird flu) causes an excessive death rate close to 100 %, sometimes without clinical signs. When the disease is less fulminate it causes acute respiratory symptom, digestive and nervous symptom all associate in various ways. In human whose infection is exceptional it leads to a severe respiratory disease.

Materiel and method: We have used the RT-PCR for analyse the epidemiological situation in suspect sources of bird flu in Burkina Faso. The study took place from April to May 2006, around the towns of Bobo-Dioulasso and Ouagadougou. We collected tracheal and cloacal swabs from 283 birds including 271 chickens, 2 ducks, 5 turkeys, 3 vultures, 1 sparrow hawk and 1 tourraco.

Results : We detected 9 cases of influenza A virus including 5 cases of H5N1 virus giving respectively the prevalence of 3.2 % and 1.77 %.The positives cases of H5N1 virus were found in 2 vultures at Ouagadougou, 3 local chickens Bobo-Dioulasso and Sokoroni.

Conclusion: Our results showed for the first time, the presence of influenza H5N1 virus in domestic and wild birds in Ouagadougou and Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

Key words: Influenza H5N1virus, poultry, Burkina Faso