

**Evaluation de l'état sanitaire de l'avifaune sauvage
de deux réserves de chasse et de faune sauvage
vis à vis de deux maladies partagées par les
oiseaux sauvages et domestiques : l'Influenza
aviaire (peste aviaire) et la maladie de
Newcastle (pseudo-peste aviaire)**

PROGRAMME ONCFS-AFSSA 2000-2003

Rapport final

**HARS J¹., LOUBOUTIN K.², LE POTIER V.², ROUSSET J.²,
FOURNIER JY³., LERAY G⁴, BUREAU E⁵., BAUNE M⁶, JESTIN V².**



¹ ONCFS, Unité sanitaire de la faune, 38610 GIERES

² AFSSA-Ploufragan, Laboratoire de virologie, immunologie et parasitologie aviaires et cunicoles, Zoopôle les Croix, BP 53, 22440 PLOUFRAGAN, France.

³ ONCFS, CNERA Avifaune migratrice, 01330 BIRIEUX

⁴ ONCFS, CNERA Avifaune migratrice, réserve de chasse et de faune sauvage du Massereau, 44320 FROSSAY

⁵ Parc des Oiseaux, 01330 VILLARS LES DOMBES

⁶ Le verger de la Barre, 44470 CARQUEFOU

Cette étude a été initiée en 1999 par l'Unité sanitaire de la faune de l'Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS) qui a passé en 2000 une convention (N° 2000/68) d'une durée de trois ans avec l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) pour la gestion, le traitement et l'analyse des prélèvements, ainsi que l'interprétation des résultats.

Le sujet a été l'objet d'une thèse de doctorat vétérinaire qui a été soutenue le 5 juin 2003 par Marianne BAUNE¹.

1. Contexte de l'étude :

1.1. Contexte général

Les oiseaux sauvages interviennent dans un certain nombre de cycles épidémiologiques d'agents pathogènes ou potentiellement pathogènes, en tant qu'hôtes principaux ou secondaires, réservoirs essentiels ou vecteurs occasionnels. On peut hiérarchiser les maladies de l'avifaune sauvage en distinguant : celles qui ont une importance pour la biologie et la démographie des espèces, celles qui peuvent avoir, en plus, un impact économique et celles qui représentent un risque pour la santé publique.

- **Les pathologies qui restent plutôt cantonnées à l'avifaune sauvage.**

Elles peuvent prendre un caractère dramatique et mettre en péril les populations touchées. On peut citer deux exemples :

- la spectaculaire épizootie de trichomonose (maladie parasitaire due à *Trichomonas gallinae*) survenue en France pendant l'hiver 1996 chez le pigeon ramier (*Columba palumbus*).
- Le botulisme aviaire (maladie infectieuse due à *Clostridium botulinum*) de type C qui tue chaque année dans le monde plusieurs millions d'oiseaux sauvages et qui est en recrudescence depuis 1994 en France dans l'avifaune aquatique. Le cycle sauvage de cette maladie reste principalement inféodé aux oiseaux d'eau et à leur milieu, même si la transmission aux oiseaux domestiques est sans doute possible (des foyers sont régulièrement décrits dans des élevages de l'Ouest de la France). Par contre, la transmission à l'Homme est rarissime car il est très peu sensible à la toxine de type C.

- **Les pathologies qui sont transmissibles aux oiseaux domestiques.**

Les élevages industriels modernes, le plus souvent intensifs et en bâtiment, sont relativement isolés du monde extérieur ; le passage direct d'un agent pathogène d'un oiseau sauvage à un poulet en batterie est alors peu probable. Le problème est tout différent quand il s'agit d'élevages en plein air ou de petites basses-cours traditionnelles qui peuvent être facilement contaminées et qui peuvent constituer un relais de transmission dans les élevages intensifs par voisinage ou par introduction d'animaux infectés lors de transactions commerciales. Les maladies partagées entre avifaune sauvage et domestique sont nombreuses. On peut citer :

- la peste du canard à un *Herpèsvirus*,
- la tuberculose due à *Mycobacterium avium*,
- les mycoplasmoses,
- les aspergilloses ...

¹ « Etude de l'infection de l'avifaune et de canards domestiques sentinelles par les virus Influenza et le virus de la maladie de Newcastle sur deux sites ». 129 p. *Après une étude bibliographique sur les pestes aviaires, elle présente le protocole et les résultats de la première campagne de prélèvements. Plusieurs éléments de cette thèse sont repris dans ce rapport.*

- Le choléra aviaire dû à *Pasteurella multocida*, qui a été responsable d'épizooties catastrophiques sur les populations de canards des Etats-Unis dans les années 60.
- la maladie de Newcastle ou pseudopeste aviaire qui est une maladie virale majeure en élevage aviaire du fait de sa contagiosité et de sa létalité. Due à un *Paramyxovirus* de type 1 (A/PMV-1), elle peut affecter la majorité des espèces aviaires sauvages et domestiques. En ce qui concerne les volailles commerciales, l'Europe (sauf quelques foyers ponctuels et temporaires) et les Etats-Unis (avec une parenthèse lors de l'épizootie 2002-2003) en sont indemnes alors que la maladie de Newcastle est enzootique sur les continents asiatiques et africains. On considère actuellement que, dans de nombreux pays du globe, les oiseaux sauvages représentent un réservoir de virus soit virulents, soit avirulents -mais susceptibles d'acquérir de la virulence après circulation chez les volailles- et que l'avifaune migratrice est responsable d'une dissémination du virus à longue distance. La maladie de Newcastle est inscrite sur la liste A (maladies majeures pour des raisons économiques ou sanitaires) établie par l'Office International des Epizooties.
 - **Les pathologies qui sont non seulement transmissibles aux oiseaux domestiques, mais aussi aux mammifères et en particulier à l'homme.**

Les trois principales sont :

- L'Influenza aviaire (ou peste aviaire ou encore grippe aviaire), due à un orthomyxovirus du genre *Influenza*. On distingue trois types de virus grippaux *Influenza* (A, B, C). Le type A contient de nombreux sous-types adaptés aux oiseaux et, pour certains d'entre eux, à l'homme, au porc et au cheval. Au sens phylogénétique, les virus grippaux humains et porcins seraient d'origine aviaire (LUDWIG et al, 1995). On considère que la Chine est le principal épicode de la grippe aviaire. Dans ce pays, les canards sauvages pourraient contaminer les canards domestiques, élevés conjointement avec des porcs chez lesquels apparaîtraient de nouveaux virus réassortants potentiellement dangereux pour l'homme (MANUGUERRA, 1996). De plus, en mai 1997 à Hong Kong, on a assisté au premier cas de transmission de grippe aviaire à l'homme à partir de poulets. Cette épidémie a provoqué la mort de 6 personnes. Durant l'épizootie de 2002 aux Pays-Bas, plusieurs cas de conjonctivites et de syndromes grippaux ont été constatés parmi le personnel d'élevage et d'abattage des oiseaux infectés. Un vétérinaire est décédé de complications pulmonaires. On comprend donc l'intérêt croissant que portent les autorités sanitaires et scientifiques internationales à ce sujet. En 2003 et 2004, plusieurs cas humains mortels ont été déclarés en Asie.
- Les salmonelloses à *Salmonella enteritidis* et *typhimurium* qui sont largement portées par les volailles et l'avifaune sont, en France, la cause principale des toxiinfections alimentaires humaines, suite à l'ingestion de nourriture contaminée.
- La chlamydie aviaire ou ornithose/psittacose, due à *Chlamydia psittaci* qui sévit de manière enzootique dans le monde chez les psittacidés, les canards et les pigeons, provoque une grave pneumonie chez les hommes infectés.

Parmi ces maladies, le choix pour notre étude s'est orienté vers les deux maladies virales inscrites, du fait de leur importance économique majeure, sur la liste des maladies réglementées « réputées contagieuses » (MRC) (article 225 du nouveau code rural): l'Influenza aviaire et la maladie de Newcastle .

1.2. Rôle des oiseaux migrateurs dans l'épidémiologie de la maladie de Newcastle.

L'infection par le *Paramyxovirus* aviaire de type 1 (A/PMV-1) a fait l'objet d'enquêtes sérologiques, notamment en Europe, avec les résultats suivants :

- En Allemagne, ZIEDLER K. et al (1993) observèrent une séroprévalence de 9% sur 26 espèces d'oiseaux sauvages et MULLER T. et al (1998) une prévalence de 45% sur des oies rieuses et des oies des moissons.
- En Espagne, ASTORGA R.J. et al (1994) relevèrent une très faible prévalence (0,2%) sur 13 espèces d'oiseaux d'eau du delta du Guadalquivir ; MALDONADO A. (1995) note également de faibles prévalences sur 24 espèces d'oiseaux d'Andalousie.
- En Suisse, SCHELLING et al (1999) ont comparé la présence d'anticorps sur des oiseaux tués à la chasse et dans des élevages de volailles et a considéré que les échanges commerciaux sont un facteur de risque plus important que la contamination par l'avifaune.
- En France, ARTOIS M. et al (2002) ont observé une séroprévalence de 19% sur 53 cormorans examinés en Lorraine entre 1997 et 1999.

Des paramyxovirus de type 1, en général peu ou pas virulents, ont été isolés à partir de nombreuses espèces d'oiseaux sauvages:

- En Italie, par CAPUA I. et al (1994) sur des faisans d'élevage importés d'Europe de l'Est
- En Israël, par SHIMANTER E. et al (1997) sur plusieurs espèces d'oiseaux domestiques et sauvages
- En Amérique du Nord, par LEIGHTON A. et al (1994), puis par KUIKEN T. (1998, 1999), sur les cormorans à double crête qui ont été victimes de plusieurs épizooties de NDV depuis 1990 et ont transmis la maladie à des dindes d'élevage (HECKERT R. A. et al, 1996)
- En Alaska et Sibérie, par TAKAKUWA H. et al (1998) sur des oiseaux migrateurs, porteurs de souches peu virulentes mais dont la pathogénicité s'est accrue en passant sur des poulets d'élevage.
- En Europe, au Japon, en Israël et au Soudan, par ALEXANDER D.J. (1985).
- En Grande-Bretagne, par ALEXANDER D. J. qui, en 1997, a suspecté l'apport de virus par des oiseaux migrateurs venant de Scandinavie, comme étant à l'origine de 11 foyers sur des dindons et des poulets ; cependant cette hypothèse n'a pas pu être démontrée. Par ailleurs, GRAHAM D.A. et al (1999) n'ont pas pu établir de lien direct entre l'avifaune sauvage et l'apparition de la grave épizootie de NDV qui a frappé les volailles en Irlande du Nord, en 1997.

Il faut retenir que les souches de PMV1 hébergées par l'avifaune sont le plus souvent avirulentes, mais certaines ont des caractéristiques de virulence et se sont avérées pathogènes au moins pour les volailles. Par ailleurs, on constate que la transmission du virus entre le compartiment sauvage et domestique est souvent suspectée, mais plus rarement démontrée.

On remarquera enfin que le virus de la maladie de Newcastle a été très largement détecté sur l'avifaune sauvage, mais que les données concernant le territoire français sont rares, sans doute parce que la France n'a pas eu à subir d'épizootie meurtrière depuis 1976.

1.3. Rôle des oiseaux migrateurs dans l'épidémiologie des virus Influenza

Les virus influenza de type A ont été retrouvés chez plus de 90 espèces d'oiseaux sauvages (Alexander, 2000). Parmi les nombreuses références bibliographiques disponibles sur le sujet, on retiendra les travaux menés :

- En France, par HANNOUN C. (1977, 1980, 1999) et DEVAUX J.M. (1979) sur l'avifaune aquatique de la Baie de Somme où 93 souches de virus ont été isolées entre 1976 et 1985, avec un pic d'infection au mois d'octobre. L'existence d'un réservoir sauvage permanent a été confirmé. Plus récemment, l'étude sérologique menée par ARTOIS M. et al (2002) n'a pas mis en évidence d'anticorps Influenza A sur des cormorans de Lorraine.
- En Espagne, par ASTORGA R.J. et al (1994) sur les oiseaux du Parc de Doñana qui constituent également un réservoir sauvage de virus.
- En Alaska, par ITO T. et al (1995), sur des canards porteurs de virus et ayant contaminé durablement l'eau des lacs de la région étudiée.
- Au Japon, où le virus a été isolé de fientes d'oiseaux migrateurs par OTSUKI K. et al (1987)
- Aux Etats Unis, par STALLKNECHT D.E. et al (1990) et par CLAUDIA P. et al (1995) qui ont révélé respectivement sur les canards, en Louisiane, une prévalence virale maximale de 3%, et en Pennsylvanie, une prévalence de 8%.
- En Allemagne de l'Est, par SUSS J. et al (1994) qui a isolé plusieurs sous-types de virus sur les canards et autres oiseaux sauvages.

Il ressort de ces études que :

La plupart des espèces concernées ont un habitat aquatique et sont migratrices. Les anatidés constituent le principal réservoir de virus.

Tous les sous-types d'hémagglutinine et de neuraminidase, diversement associés, ont été retrouvés avec une fréquence variable chez les oiseaux sauvages.

Les virus influenza isolés chez l'avifaune sont le plus souvent apathogènes ou peu pathogènes pour leur hôte d'origine, mais ils peuvent devenir pathogènes pour les espèces domestiques.

Les virus influenza se répliquent préférentiellement dans le tube digestif et sont excrétés en grandes quantités dans les fientes. Le cloaque constitue donc le meilleur site de prélèvement en vue de l'isolement viral.

Les virus Influenza peuvent persister dans les eaux contaminées par les oiseaux, notamment lorsque les températures sont basses.

La France n'a pas fait l'objet d'étude récente sur la présence du virus *Influenza A* chez les oiseaux sauvages.

2. Justification de l'étude

L'influenza aviaire, provoqué par divers sous-types de virus influenza de type A (Orthomyxovirus) et la maladie de Newcastle, due des souches de Paramyxovirus aviaire de type 1 (APMV-1), sont des maladies virales des volailles d'une grande importance sanitaire et économique pour la filière avicole. L'influenza aviaire est également une préoccupation de santé publique, puisque les virus aviaires peuvent dans des cas assez rares se transmettre directement à l'Homme, provoquant parfois de sévères zoonoses, ou se réassortir avec des virus humains et risquer de provoquer une pandémie.

Les oiseaux sauvages, migrateurs en particulier, jouent un rôle important dans l'épidémiologie de ces virus. En effet, l'avifaune migratrice héberge une grande variété de Paramyxovirus et de sous-types de virus influenza de type A et représente un véritable réservoir de virus. Toutefois, le statut sanitaire de l'avifaune française est mal connu car les données sont rares. Nous tenterons dans notre étude de combler partiellement ces lacunes.

3. Objectifs de l'étude

Les différents objectifs de cette étude étaient les suivants :

- Dépister, par des analyses sérologiques et virologiques, l'infection par des virus Influenza et des paramyxovirus aviaires de 4 espèces migratrices d'oiseaux sauvages,
- Évaluer le risque d'introduction de virus par les oiseaux migrateurs,
- Estimer les risques de transmission de ces deux MRC aux oiseaux domestiques en étudiant en parallèle l'infection de volailles sentinelles,
- Typier les souches virales et évaluer leur virulence,
- Comparer les souches sauvages et domestiques.

4. Partenaires

Maître d'ouvrage financeur: ONCFS . Responsable de la coordination du programme et des opérations de terrain : Jean HARS (Unité sanitaire de la faune)

Maître d'œuvre: AFSSA. Organisation des prélèvements, relations avec les laboratoires relais, analyses, interprétation.

Responsable scientifique du programme : Véronique JESTIN, (chef de l'Unité virologie, immunologie, parasitologie aviaires et cunicoles à l'AFSSA Ploufragan, laboratoire national de référence pour l'Influenza aviaire et la maladie de Newcastle

Partenaires

ONCFS:

- CNERA avifaune migratrice :
 - responsable terrain site du Massereau : Gilles LERAY
 - responsable terrain site de la Dombes : Jean-Yves FOURNIER
- Services départementaux 01 et 44

Parc des oiseaux de Villars les Dombes (directeur scientifique = Dr Eric BUREAU)

IDAC 44 et LDA 01

ENVN (thésarde vétérinaire Marianne BAUNE)

DDSV 44 et 01

5. Protocole

Le protocole général de l'étude a été basé sur deux campagnes de prélèvements (2000/2001 et 2001/2002) menées parallèlement dans deux sites d'étude dans l'Ain et la Loire Atlantique, sur quatre espèces d'oiseaux sauvages et sur des canards domestiques sentinelles, en vue de recherches sérologiques et virologiques.

5.1. Sites d'étude

Les deux sites choisis, situés sur les deux trajets migratoires principaux empruntés par les anatidés en France (Fig 1), sont des lieux d'hivernage importants pour les oiseaux qui font l'objet de nombreux travaux de gestion et de recherche.

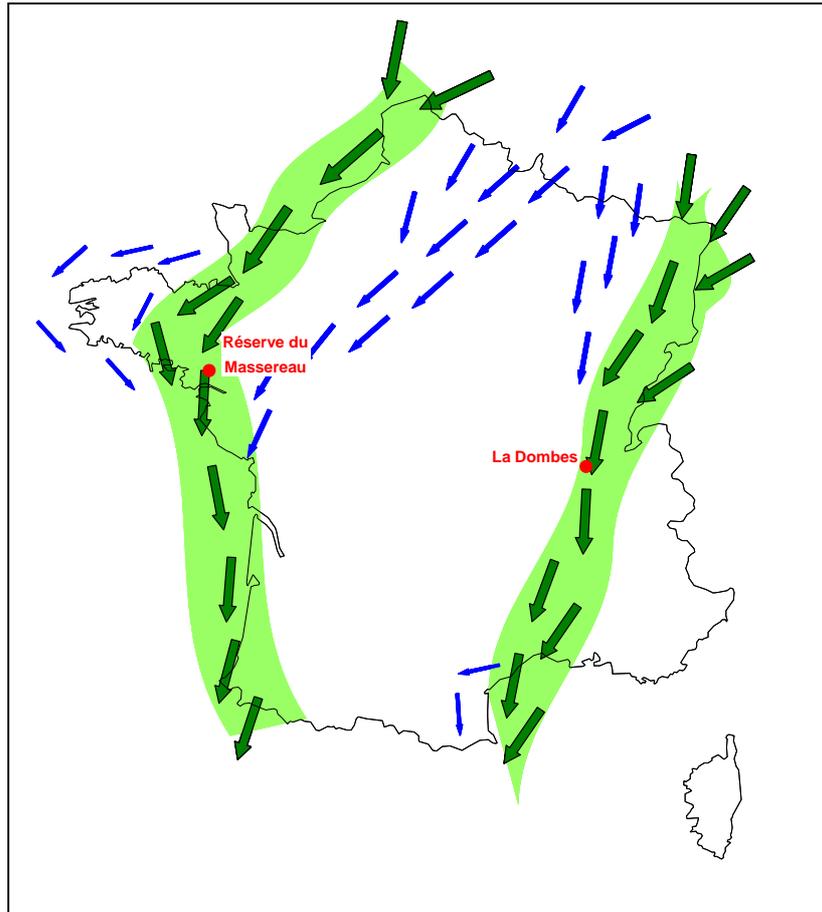


Figure 1 : Principaux axes migratoires empruntés par les anatidés à travers la France (d'après Schricke, 1992) et sites d'étude.

- La réserve de chasse et de faune sauvage du Massereau couvre 390 hectares au sein d'une grande zone humide de 18 000 ha que constitue l'estuaire de la Loire. Elle est le second site français d'hivernage de la Sarcelle d'hiver après la Camargue et accueille de nombreuses autres espèces migratrices (dont le Canard colvert, la Foulque macroule, l'Avocette, le Bécasseau variable....)
- La réserve de Villars-les-Dombes couvre 214 ha au sein de l'immense zone humide de 100 000 ha que constitue la Dombes (11 000 ha d'étangs). Le Parc des Oiseaux, dans lequel la plupart des prélèvements ont été effectués sur des oiseaux venant librement y séjourner, se situe à proximité immédiate de la réserve. La Dombes est la zone humide la plus importante en France pour la reproduction des anatidés.

Ces deux sites d'étude sont localisés dans d'importantes régions d'élevage avicole où la pratique du plein air est largement utilisée.

5.2. Espèces étudiées

Quatre espèces sauvages largement décrites dans la thèse de M. BAUNE (p. 63 à 75) ont fait l'objet de prélèvements :



- Le Canard colvert (*Anas platyrhynchos*), gros canard de surface appartenant à la famille des anatidés. L'espèce est très largement répandue en France. Les effectifs se partagent en individus nicheurs, sédentaires et migrateurs, sachant qu'une bonne partie des colverts tués à la chasse sont des oiseaux issus de lâchers.



- La sarcelle d'hiver (*Anas crecca*), petit canard de surface de la famille des anatidés. L'espèce est migratrice ; elle passe, comme son nom l'indique, l'hiver en Europe et l'été en Union soviétique et en Scandinavie où elle nidifie.



- La Foulque macroule (*Fulica atra*), oiseau aquatique de la famille des rallidés. L'espèce est très répandue dans les milieux humides français (marécages, plan d'eau peu profond) ; les foulques sont majoritairement sédentaires , mais une partie des effectifs migre vers le sud en hiver.



- Le Grand Cormoran (*Phalacrocorax carbo*) fait partie de la famille des Phalacrocoracidae (oiseaux proches des pélicans, fous, frégates...). Cette espèce côtière fréquente de plus en plus les plans et cours d'eau de l'intérieur des terres. Bien qu'étant une espèce protégée (Directive oiseaux 79/409/CEE), son importante consommation de poissons a amené à la classer parmi les espèces nuisibles. C'est le cas dans l'Ain où sont prises des mesures de limitation des populations. Partiellement migrateur, ses effectifs ont décuplé en dix ans.

Parallèlement aux investigations faites sur les oiseaux sauvages, des canards domestiques sentinelles de race Pékin ont été élevés sur les sites d'étude et prélevés régulièrement afin de détecter d'éventuelles contaminations virales. Placés à l'âge d'un jour pour une quarantaine d'un mois dans une animalerie protégée de l'AFSSA Ploufragan, ces oiseaux ont été contrôlés sérologiquement et virologiquement négatifs avant d'être acheminés et placés sur les sites d'étude.



En 2000-2001, 60 canards domestiques ont été élevés au Massereau dans un enclos où ils partageaient le même milieu que les canards sauvages. Ils ont été mis en place le 05.10.2000. En 2001-2002, 30 canards ont été élevés au Massereau comme précédemment (mis en place le 18.10.2001) et 30 autres au Parc des oiseaux de Villars les Dombes dans un enclos communiquant avec le reste du parc par le réseau d'eau (mis en place le 23.10.2001).

A l'issue des campagnes de prélèvements, les canards sentinelles ont été euthanasiés et incinérés.

5.3. Protocole de terrain

➤ Captures

Les canards colvert, sarcelles d'hiver et foulque macroule ont pour la plupart été capturés dans des nasses (3 nasses au Massereau) ou des cages-piège à fermeture manuelle (2 cages à Villars les Dombes) agrainées au blé. Sur le site du Massereau, cette technique a été complétée pour les canards, à deux reprises, par des captures au filet vertical.



Nasse au Massereau



Cage-piège en Dombes

Les cormorans ont été tirés au dortoir, dans la Dombes uniquement, par les gardes de l'ONCFS chargés des opérations de limitation d'effectifs de cette espèce « nuisible ».

Les canards sentinelles étaient facilement attrapés dans les enclos à l'épuisette.



➤ Prélèvements

Oiseaux sauvages

Chaque oiseau sauvage a été identifié (bague CRBPO), mesuré, pesé. Il a fait l'objet d'un prélèvement sanguin, le plus souvent à la veine alaire pour les canards et foulques et dans le cœur ou à la section de la tête pour les cormorans, et d'un écouvillonnage cloacal. Une fiche de commémoratifs accompagnait tous les prélèvements jusqu'au laboratoire vétérinaire départemental.

Les périodes de prélèvements apparaissent dans le tableau n°1

Canards sentinelles.

En 2000-2001 au Massereau, deux bandes de 20 canards repérées grâce à des marques colorées ont été prélevées alternativement toutes les deux semaines. Sur une période de 16 semaines, 8 séances de prélèvements ont permis d'obtenir 160 prises de sang et 160 écouvillons cloacaux (tableau n°1).



Prélèvement sanguin

En 2001-2002, pour des raisons techniques de disponibilité de personnel, la campagne de prélèvements a été écourtée sur le site du Massereau (cf Tableau n°1). Sur chaque site, un lot de 20 canards marqués ont été prélevés toutes les deux semaines. Ceci a permis de collecter 80 prises de sang et écouvillons par site.

	2000-2001		2001-2002	
	Oiseaux sauvages	Oiseaux sentinelles	Oiseaux sauvages	Oiseaux sentinelles
Massereau	18/10/2000 – 05/02/2001	26/10/2000 – 01/02/2001	27/09/2001 – 13/12/2001	30/10/2001 – 17/12/2001
Dombes	10/11/2000 – 06/02/2001		25/09/2001- 24/02/2002	30/11/2001 – 20/02/2002

Tableau n°1

5.4. Protocole de laboratoire

➤ **Circuit des prélèvements**

Les sangs et écouvillons ont été transmis sous couvert du froid aux LDA 01 et IDAC 44 une à deux fois par semaine en fonction de la fréquence des prélèvements.

Après extraction des sérums, le LDA 01 a effectué les analyses sérologiques Newcastle et Influenza, tandis que l'IDAC 44 n'a pris en charge que les sérologies Newcastle. Les sérologies influenza du Massereau ont été faites à l'AFSSA Ploufragan.

Les écouvillons ont été conservés à – 70° jusqu'à leur envoi groupé à l'AFSSA Ploufragan où les analyses virologiques ont été faites.

➤ **Analyses sérologiques**

Les sérums récoltés ont été soumis aux deux techniques de référence :

- test d'inhibition de l'hémagglutination (test IHA) pour la maladie de Newcastle : seuil de positivité = 1/16
- technique d'immunodiffusion double en gélose (test IDG) pour l'influenza aviaire : résultat Pos/Neg.

Pour l'influenza, les sérums ont été traités également avec un test ELISA par compétition, ayant une meilleure sensibilité, mis au point à l'AFSSA Ploufragan (communication Joint annual meeting of european national reference laboratories for avian influenza and Newcastle disease, Décembre 2003, Bruxelles).

➤ Analyses virologiques

Le criblage des prélèvements positifs s'est fait par ovoculture à partir des écouvillons cloacaux (provenant d'une même espèce, d'un même site et effectués à une même date) groupés par pools de 5 car cette technique est très lourde. En cas de mise en évidence d'une positivité, les écouvillons correspondants ont été testés individuellement pour déterminer le(s)quel(s) étai(en)t positif(s), afin d'isoler et d'identifier le(s) virus correspondant(s) Les écouvillons des individus trouvés séropositifs par le test IHA et/ou le test IDG ont été d'emblée inoculés individuellement aux œufs.



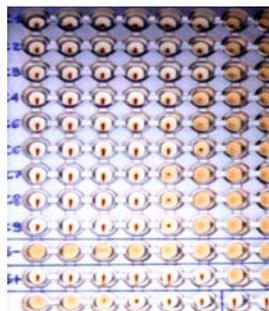
ovoculture

L'identification de la souche virale a été réalisée par une série de tests IHA et d'inhibition de la neuraminidase avec des antisérums et anticorps monoclonaux de référence pour déterminer respectivement les sous-types d'hémagglutinine et de neuraminidase.

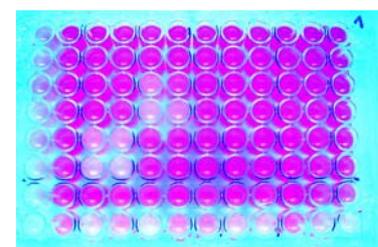
La pathogénicité de chaque virus a été évaluée par une épreuve in vivo pour déterminer l'IPIIC (paramyxovirus aviaires de type 1 PMV1) et l'IPIV (virus influenza). De plus, des tests de biologie moléculaire de rétrotranscription, polymérisation en chaîne (RT-PCR) et de séquençage ont été mis en œuvre pour déterminer le motif des sites de clivage de la protéine de fusion (PMV1) et de l'hémagglutinine des virus influenza de sous-types H7 et H6.

Les techniques précitées (RT-PCR/séquençage) ont été aussi appliquées pour déterminer la séquence des gènes de l'hémagglutinine (H1, H6, H7, H9), de la neuraminidase (N1,N2) de la protéine de matrice (M) sur un fragment d'en moyenne 1000 paires de bases ; ces séquences ont été comparées à celles déjà disponibles dans les banques de données de séquences pour réaliser une étude phylogénique.

Inhibition de l'hémagglutination (IHA)(a)
et de la neuraminidase (b)



a



b

6. Résultats

6.1. Bilan des prélèvements et analyses

Le nombre d'oiseaux prélevés et analysés dans chaque site apparaît dans les tableaux n° 2 et 3

Massereau	Période 2000-2001		Période 2001-2002	
	PS	Ecouv	PS	Ecouv
Colvert	9	9	29	54
Sarcelle	23	21	2	45
Foulque	94	94	2	3
Divers	5	4	2	2
sentinelles	160	160	80	80

Tableau n° 2

Les nasses, agrainées tous les jours, ont été relevées 3 à 5 jours par semaine. On constate que dans la seconde période l'effort a été porté sur la capture des canards colverts mais qu'un problème technique au laboratoire a rendu impossible le traitement d'une partie des sangs, en particulier des sarcelles.

Dombes	Période 2000-2001		Période 2001-2002	
	PS	Ec	PS	Ec
Colvert	62	62	104	105
Foulque	104	104	105	105
Cormoran	87	77	61	74
sentinelles	Non concerné	Non concerné	80	80

Tableau n°3

Au parc des Oiseaux de Villars les Dombes, sur les 2 périodes, 44 tentatives de captures ont permis 16 séries de prélèvements de canards et de foulques avec, comme pour le Massereau, un meilleur rendement pour les canards en seconde période (du aux conditions météo plus froides donc plus favorables).

Pour les cormorans, 29 séries de tirs ont été nécessaires pour prélever 157 oiseaux (87 + 70) sur les deux périodes.

Au final, le bilan des prélèvements soumis à analyses et exploitables apparaît dans le tableau n° 4

	Analyses sérologiques			Analyses virologiques	Pourcentage dans l'échantillon provenant d'oiseaux sauvages
	IHA Newcastle	IDG Influenza	ELISA Influenza		
Canard colvert	175	205	148	230	30%
Sarcelle d'hiver	20	25	0	66	9%
Foulque macroule	285	283	177	306	40%
Grand Cormoran	98	118	78	151	20%
Divers	4	5	0	6	1%
TOTAL sauvages	582	636	403	755	100%
sentinelles	228	302	200	320	

Tableau n°4

L'objectif du programme, qui était de prélever 800 oiseaux sauvages, a donc été presque atteint.

6.2. Résultats des analyses sérologiques

Les résultats des analyses sérologiques exploitables sont présentés dans le tableau n°5. Pour la 2^{ème} année de collecte, ils portent essentiellement sur le site de la Dombes, pour les raisons déjà mentionnées.

Influenza

Aucun anticorps influenza n'a été détecté par le test IDG sur les oiseaux sauvages. Par contre, avec ce même test, 3% des canards sentinelles étaient séropositifs en première période. Avec le test Elisa sur les 200 sérums provenant de canards sentinelles et 403 sérums provenant des oiseaux sauvages un taux de positivité respectivement de 40,5 % chez les canards sentinelles, 9 % chez les foulques macroule, 62 % chez les canards colvert et 1,3 % chez les Grands Cormorans a été révélé. Les sarcelles n'ont pu être retestées en raison de l'épuisement des sérums correspondants.

Newcastle

Sur les 2 périodes et les 2 sites suivis, 8% de colverts, 4.9 % de foulques et 22.7 % de cormorans ont présenté des anticorps détectés par le test IHA Newcastle. Cependant les titres d'anticorps sont dans la plupart des cas faibles, proches du seuil de positivité et ne dépassent pas 64-128. Ils traduisent une infection par des paramyxovirus aviaires, pas spécifiquement de type 1 compte tenu des réactions croisées possibles et de l'isolement aussi de PMV appartenant à d'autres types (voir virologie).

	IDG Influenza (Nb positifs/Nb testés)		IHA Newcastle (Nb positifs/Nb testés)	
	Massereau	Dombes	Massereau	Dombes
Colvert	0/8 0/29	0/63 0/105	0/7 non exploitable	4/63 10/105
Sarcelle	0/23 0/2	non concerné non concerné	2/20 non exploitable	non concerné non concerné
Foulque	0/75 volume insuffisant	0/103 0/105	9/78 non exploitable	4/103 1/104
Cormoran	non concerné non concerné	0/57 0/61	non concerné non concerné	15/36 7/62
divers	0/5 volume insuff.	non concerné non concerné	0/4 vol.insuffisant	non concerné non concerné
Sentinelles	5/160 0/62	non concerné 0/80	24/148 non exploitable	non concerné 0/80

Tableau n°5 : résultats des analyses sérologiques.
(en noir, période 2000-2001 ; en bleu, période 2001-2002)

6.4. Résultats des analyses virologiques

6.4.1. Résultats globaux

Le bilan des résultats des analyses virologiques est présenté dans les tableaux n°6 et 7

		Période 2000-2001		Période 2001-2002	
		APMV	AIV	APMV	AIV
Massereau	Avifaune	2 PMV6 1 PMV4	RAS	1 PMV1 1 PMV9	1 H1N3 2 H7N1 1 H9N3 1 H3 N8
	Sentinelles	8 PMV1 ^(a) 3 PMV6 ^(b) 1 PMV4	2 H6N2	3 PMV1	1 H1N1
Dombes	Avifaune	RAS	RAS	1 PMV1 2 PMV4	2 H1N1
	Sentinelles	Non concernés	Non concernés		2 H9N2

(a) respectivement 2 et 6 isolats contemporains entre eux

(b) tous les 3 isolats sont à la même date

Tableau 6 :

Bilan des isolements dans l'avifaune et chez les sentinelles sur les 2 sites et au cours des 2 périodes de suivi

Espèce	Isolements AIV		Isolements APMV1		Isolements autres APMV	
	Fréquence	%	fréquence	%	fréquence	%
Colverts	6/230	2.6	2/230	0.9	3/230	1.3
Sarcelles	1 /66	1.5	0/66	0	2/66	3.0
Foulques	0/306	0	0/306	0	1/306	0.3
Grands cormorans	0/151	0	0/151	0	0/151	0

AIV= virus influenza aviaires

APMV1= paramyxovirus aviaires de type 1/virus de la maladie de Newcastle

Autres AMPV = paramyxovirus aviaires de types 2 à 5

Tableau 7 :

Fréquence des isolements dans l'avifaune sauvage

6.4.2. Détail des résultats pour chaque isolat

Les détails, isolat par isolat, figurent dans les tableaux 8 et 9 en appliquant les règles internationales pour la nomenclature (type virus influenza/espèce d'origine/lieu d'isolement/référence de l'isolat/année d'isolement).

Les indices de pathogénicité figurent en dernière colonne. Rappelons qu'un virus Influenza est considéré comme pathogène quand son IPIV est supérieur à 1,2 et qu'un paramyxovirus de type 1 est considéré comme pathogène quand son IPIC est supérieur à 0,7.

Tableau 8 Bilan des isolements 2000/2002 de virus influenza aviaires					
	Date	Isolement	Sous-type	Motif de Clivage	IPIV
Saison 2000/2001	Mise en place des sentinelles le 05/10/2000				
	23/11/2000	A/PK Sentinelle/Massereau/43/00	H6N2	PQVETR/G	0,0
	20/12/2000	A/PK Sentinelle/Massereau/92/00	H6N2	PQVETR/G	0,0
Saison 2001/2002	Mise en place des sentinelles le 18/10/2001				
	29/11/2001	A/PK Sentinelle/Massereau/2060/01	H1N1	(*)	0,0
	04/10/2001	A/Colvert/Massereau/2515/01	H3N8	(*)	1,3 a
					0,0 b
					1,0 a
					0,2 b
	04/10/2001	A/Colvert/Massereau/2518/01	H9N3	(*)	0,0
	08/10/2001	A/Colvert/Massereau/2525/01	H7N1	PEIPKGR	≤0.2 #
	08/10/2001	A/Colvert(*)/Massereau/2526/01	H7N1	PEIPKGR	≤0.2 #
	16/11/2001	A/Sarcelle/Massereau/2546/01	H1N3	(*)	0,0
	Mise en place des sentinelles le 23/10/2001				
	21/01/2002	A/PK Sentinelle/Dombes/1043/02	H9N2	(*)	0,0
	20/02/2002	A/PK Sentinelle/Dombes/1080/02	H9N2	(*)	0,0
	21/01/2002	A/Colvert/Dombes/691/02	H1N1	(*)	0,1
21/01/2002	A/Colvert/Dombes/710/02	H1N1	(*)	0,5	

motif de clivage = gène HA

(*) non concerné

a et b correspondent à deux isolats différents

IPIV index de pathogénicité par voie intraveineuse

- - - - délimitation entre sentinelles et avifaune sauvage pour un même site et une même période

mortalité non spécifique ne permettant pas de donner une valeur exacte

Des AIV ont été isolés à partir des anatidés uniquement en 2001-2002, à partir des sentinelles sur les 2 périodes. Plusieurs sous-types d'AIV sont observés : H1N1 a été isolé sur les 2 sites tantôt à partir de sentinelles tantôt à partir de colverts dont 2 isolats à la même date à partir de 2 individus différents ; le sous-type d'hémagglutinine H9 est également présent sur les 2 sites et il est associé avec les sous-types de neuraminidase soit N2 soit N3 ; H6N2 et H9N2 sont retrouvés 2 fois à environ 1 mois d'intervalle sur des canards sentinelles différents du Massereau et de la Dombes respectivement ; le sous-type H7N1 a été isolé le même jour à partir de 2 colverts différents. Site par site, les sous-types mis en évidence dans l'avifaune sauvage et chez les sentinelles ne sont pas les mêmes ; 4 des 6 isolats AIV obtenus de l'avifaune sont antérieurs à la mise en place des sentinelles.

Aucune coinfection par des AIV n'a été observée. Il est à noter que tous ces virus AIV (sauf 1) ont une pathogénicité nulle ou faible (indice IPIV inférieur à 1.2). Les 2 isolats H3N8 pourtant dérivés de la même origine présentent des IPIV radicalement différents; ce résultat sera abordé dans la discussion.

Tableau 9 Bilan des isolements 2000/2002 de paramyxovirus aviaires

	Date	Isolement	Sérotype	motif de clivage	IPIC
Saison 2000/2001	Mise en place des sentinelles le 05/10/2000				
	26/10/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/12/00	PMV1	GKQGRL	0,1
	26/10/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/4/00	PMV1	GKQGRL	0,1
	09/11/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/25/00	PMV1	GKQGRL	0,1
	09/11/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/26/00	PMV1	GKQGRL	0,0
	09/11/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/33/00	PMV1	GKQGRL	NR
	09/11/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/34/00	PMV1	GKQGRL	NR
	09/11/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/37/00	PMV1	GKQGRL	NR
	09/11/2000	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/40/00	PMV1	GKQGRL	NR
	23/11/2000	A/PMV6/PK Sentinelle/Massereau/44/00	PMV6	(*)	(*)
	23/11/2000	A/PMV6/PK Sentinelle/Massereau/54/00	PMV6	(*)	(*)
	23/11/2000	A/PMV6/PK Sentinelle/Massereau/55/00	PMV6	(*)	(*)
	18/01/2001	A/PMV4/PK Sentinelle/Massereau/128/01	PMV4	(*)	(*)
	20/11/2000	A/PMV6/Sarcelle/Massereau/54/00	PMV6	(*)	(*)
21/11/2000	A/PMV4/Sarcelle/Massereau/63/00	PMV4	(*)	(*)	
23/11/2000	A/PMV6/Foulque/Massereau/77/00	PMV6	(*)	(*)	
Saison 2001/2002	Mise en place des sentinelles le 18/10/2001				
	30/10/2001	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/2016/01#	PMV1	(**)	0,1
	29/11/2001	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/2041-2044/01♠	PMV1	(**)	0,2
	17/12/2001	A/PMV1/PK Sentinelle/Massereau/2061-2064/01♠	PMV1	(**)	0,5
	02/10/2001	A/PMV1/Colvert/Massereau/2504/01	PMV1	GKQGRL	0,0
	11/10/2001	A/PMV9/Colvert/Massereau/2528/01	PMV9	(*)	(*)
	06/11/2001	A/PMV4/Colvert/Dombes/561/01	PMV4	(*)	(*)
	10/12/2001	A/PMV1/Colvert/Dombes/623/01	PMV1	(**)	0,0
21/01/2002	A/PMV4/Colvert/Dombes/709/02	PMV4	(*)	(*)	

NR : Non Réalisé

motif de clivage = du gène F

(*) Non Concerné

(**) absence de résultats avec les jeux d'amorces classiques

IPIC indice de pathogénicité par voie intra-cérébrale

- - - - - délimitation entre sentinelles et avifaune sauvage pour un même site et une même période

♠ pool constitué de 4 isolats provenant de 4 sentinelles dont 1 commun aux 2 dates 29/11/01 et 17/12 /01

ce canard sentinelle était aussi positif le 29 /11 /01

Sur les 2 sites des APMV1 ont été mis en évidence à partir de colverts, mais dans la Dombes les sentinelles ne le révèlent pas alors que les APMV1 sont isolés de façon prépondérante chez les sentinelles du Massereau. Deux canards sentinelles du Massereau ont été trouvés positifs à 1 mois d'intervalle. Tous ces APMV1 ont une pathogénicité nulle ou faible (indice IPIC inférieur au seuil de 0.7) mais l'indice de l'isolat référencé 2061-2064 se rapproche du seuil.

Les APMV4 sont présents sur les 2 sites, de plus au Massereau des APMV6 et 1APMV9 ont été isolés.

Aucune co-infection par des APMV différents et/ou des AIV n'a donc été observée. Bien que les fréquences d'isolement d'AIV et d'APMV soient faibles, le colvert et la sarcelle représentent les espèces les plus pertinentes à cet égard, encore qu'il n'ait pas été isolé d'APMV1 à partir de sarcelles.

6.4.2. Analyse phylogénétique des virus Influenza

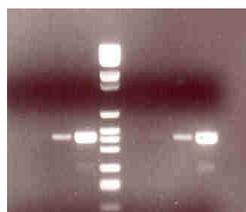
Les gènes de l'hémagglutinine, de la neuraminidase et de la protéine de matrice des isolats de virus influenza aviaries de sous-types H7N1 et H6N2 en particulier ont été séquencés et ont fait l'objet d'analyses phylogénétiques.

- Pour le *gène de l'hémagglutinine de sous-type H7* (motif de clivage excepté), les virus de l'avifaune se sont montrés identiques entre eux et très proches de virus isolés aux Pays Bas : l'un faiblement pathogène isolé en 2000 à partir d'un colvert, l'autre hautement pathogène isolé de poulet en 2003 dans le cadre de l'épizootie d'influenza aviaire qui a occasionné la perte de 30 millions de volailles. Les virus H7N1 isolés en 1999-2000 dans le cadre de l'épizootie d'influenza aviaire en Italie sont un peu plus distants (Figure 2).

- Pour le *gène de la neuraminidase de sous-type N1*, ces mêmes virus H7N1 isolés de l'avifaune sont identiques à 1 nucléotide près et se sont révélés relativement proches de souches asiatiques dont la souche H5N1 « goose Guangdong 96 » donneuse des gènes de l'hémagglutinine et de la neuraminidase à l'origine de l'émergence des virus H5N1 responsables de la « grippe de Hong Kong » en 1997 responsable de 6 cas mortels chez l'homme. En ce qui concerne, la question de la proximité avec les neuraminidases des isolats obtenus dans le cadre de la récents crise asiatique, les analyses restent à faire. Les séquences N1 des virus H7N1 de l'avifaune sont beaucoup plus distantes de celles des souches italiennes précitées.

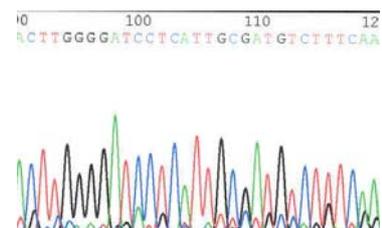
- Pour le *gène de l'hémagglutinine de sous-type H6*, les séquences des virus isolés des sentinelles se sont révélées très proches de celles des souches contemporaines isolées de volailles dans le même département ; ces souches françaises forment avec des souches isolées de dindes en Allemagne entre 1998 et 2002 un sous-groupe d'un groupe plus large constitué d'isolats asiatiques de poulets et canards .

- Pour le *gène de la neuraminidase de sous-type N2*, les séquences des virus isolés de l'avifaune se sont montrés très proches entre eux qu'ils proviennent de la Dombes ou du Massereau et qu'ils soient combinés avec le sous-type H6 ou le sous-type H9. Ces virus se sont aussi montrés proches d'un virus H9N2 isolé de faisan en Irlande en 1997. Par contre, ils ne sont pas regroupés avec des isolats asiatiques H9N2 obtenus depuis 1997.



← Amplification génique RT-PCR

Electrophorégramme indiquant la séquence des gènes →



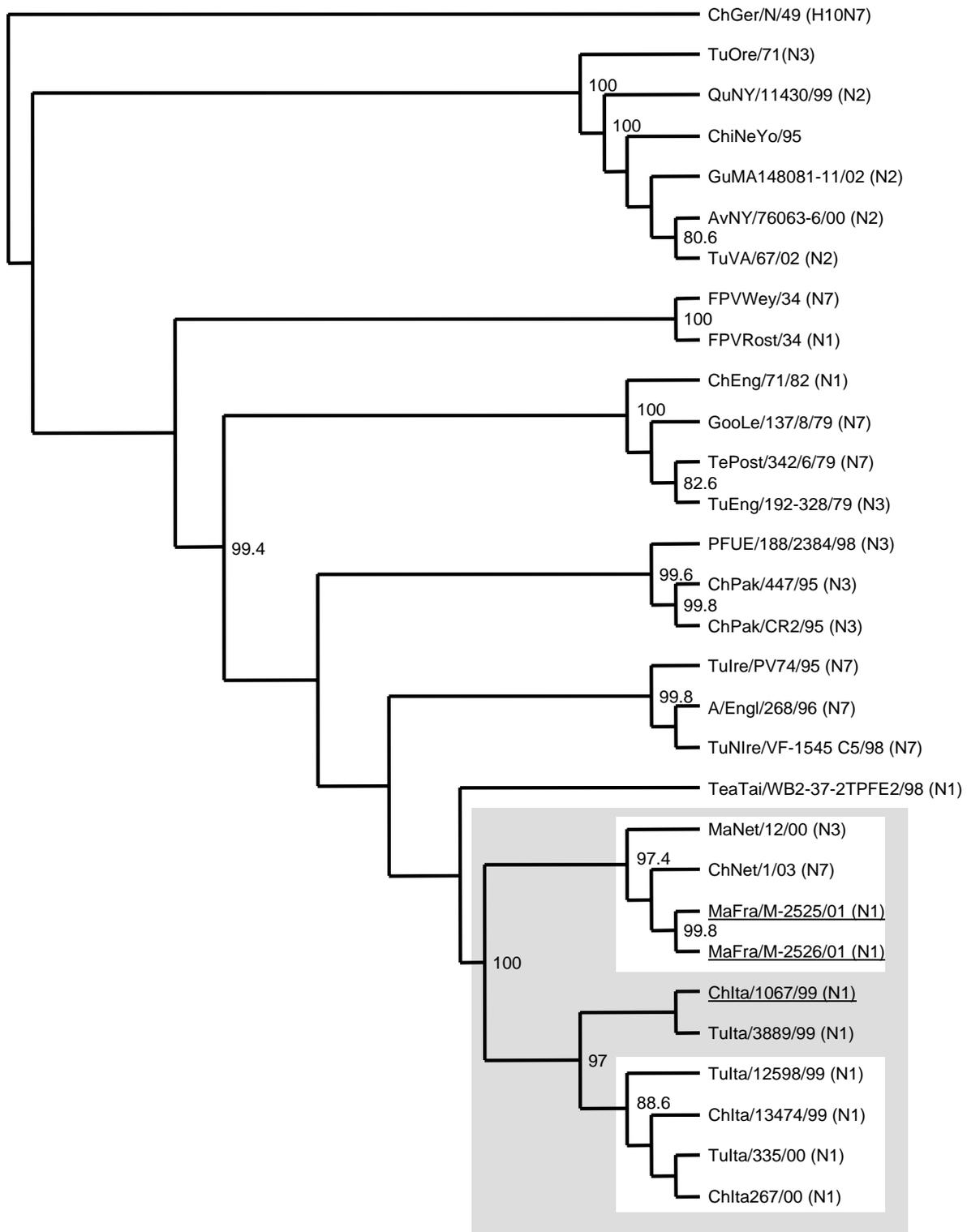


Figure 2 : Arbre phylogénétique des virus Influenzas : dans le cadre grisé, les virus isolés aux Pays-Bas en 2000-2003, en France (Massereau) en 2001 et en Italie en 1999-2000

7. Discussion

La présente étude permet d'apporter des informations nouvelles sur l'infection par des virus influenza aviaires et des Paramyxovirus des oiseaux sauvages capturés i) dans 2 sites français placés sur les 2 trajets migratoires principaux (Ouest et Est), des anatidae en provenance de Scandinavie et ii) dans deux zones de production avicole importantes la Loire Atlantique et l'Ain à la fois du fait des densités et des pratiques d'élevage en plein air. En effet à notre connaissance, les données françaises préexistantes concernant les anatidae (tadornes majoritairement), datent de plus d'une quinzaine d'année (HANNOUN et DEVAUX, 1980) ; elles portent essentiellement sur le site du Marquenterre dans la baie de Somme Ouest et ne renseignent pas sur les interactions avec les volailles domestiques. Par ailleurs, notre présente étude complète les données plus récentes (1997-1999), mais uniquement sérologiques concernant l'infection des Grands Cormorans de Lorraine par ces mêmes virus (ARTOIS et al., 2002).

7.1. Echantillonnage

Les 2 sites choisis devaient permettre de cibler 3 espèces intéressantes par rapport à l'objectif poursuivi : pour l'aspect virus influenza aviaire la sarcelle d'hiver au Massereau, le Colvert dans la Dombes et le Massereau, pour l'aspect paramyxovirus aviaire de type 1 les Grands Cormorans dans la Dombes. Les Foulques présentes sur les 2 sites devaient être testées accessoirement. Un automne-hiver 2000-2001 assez doux a fait que durant la 1^{ère} période d'étude, les Sarcelles et Colverts ont été moins nombreux que prévu si bien qu'au final les Foulques ont constitué 40 % des prélèvements alors que les espèces réellement ciblées se sont partagées le reste (sauf 1 % divers) avec 30 % pour les Colverts, 20 % pour les Grands Cormorans et seulement 9 % pour les Sarcelles d'hiver.

7.2. Sérologie

- **Influenza**

Au plan sérologique, il a été confirmé le caractère inapproprié du test IDG à révéler une infection par des virus influenza. Par contre notre test ELISA influenza par compétition a révélé un taux de séropositivité très élevé chez les colverts et les sentinelles en contact (respectivement 62% et 40.5%). Le pourcentage observé chez les canards colvert français est presque 2 fois supérieur à celui observé à l'aide d'un test ELISA bloquant chez des canards colvert de Nouvelle Zélande (32.5% selon STANISLAWEK et al 2002). Les autres espèces étudiées dans notre étude (à l'exception des sarcelles dont les sérums n'ont pu être analysés en double avec notre test ELISA) révèlent aussi des séropositivités allant de 1,3 à 9 %. A notre connaissance il n'existe pas de données sérologiques ELISA publiées concernant ces espèces, permettant de confronter nos résultats. Cependant, ceux-ci sont cohérents avec des données de la littérature mentionnant les foulques et les cormorans comme susceptibles d'être infectés par les virus influenza. Néanmoins les 2 tests ELISA précités basés sur la détection d'anticorps spécifiques de la nucléoprotéine révèlent des infections plus ou moins anciennes quel que soit le sous-type impliqué et ne permettent pas de préjuger du caractère à risque ou non en terme de portage.

- Newcastle

En ce qui concerne les séropositivités détectées par le test IHA Newcastle elles restent faibles et sont difficilement interprétables compte tenu de la possibilité de réactions croisées avec d'autres types de Paramyxovirus aviaires. La présence de près d'1/4 de Grands Cormorans séropositifs est en cohérence avec des données déjà publiées démontrant un pourcentage de séropositivité de 19% (10/53) (ARTOIS et al., 2002). L'épuisement des sérums n'a pas permis de les retester avec un test ELISA bloquant strictement spécifique des PMV1.

7.3. Virologie

Les résultats virologiques, par contre, apportent des informations détaillées précieuses, même si le pourcentage d'isolement est faible.

- Influenza

Pour les virus influenza aviaires, les pourcentages d'isolement sont compatibles avec les données basses de la littérature (établies sur un échantillonnage beaucoup plus important) pour des colverts adultes en migration d'automne (6 % selon SLEMONS et al., 1991, HINSHAW et al., 1980), des sarcelles adultes (1,7 % selon STALLKNECHT et al., 1990), les foulques et les cormorans (respectivement 1 % et 0,4 % selon SUSS et al., 1994).

Tous les isolats AIV (sauf un) sont faiblement virulents. Pour l'isolat H3N8, nous avons émis l'hypothèse d'un contaminant mais nous n'avons pas pu le démontrer. Cet isolat méritera des investigations complémentaires.

7 sous-types de virus influenza ont été observés dont certains plus rares comme le sous-type H9N3, alors que d'autres comme H1N1 et H6N2 sont plus ou moins ponctuellement isolés chez les volailles. En ce qui concerne H1N1, ce sous-type est bien implanté chez le porc et l'homme. **La mise en évidence en France du sous-type H9N2 est nouvelle, l'émergence du sous-type d'hémagglutinine H9 est à surveiller tant dans l'avifaune que chez les volailles** pour des aspects de santé animale mais aussi de santé publique compte tenu de son potentiel zoonotique.

A notre connaissance, il n'existe pas de données phylogénétiques publiées relatives aux isolats français et notre présente étude apporte donc des éléments nouveaux à cet égard.

L'étude des relations existant entre souches de sous-types H7 est d'un intérêt majeur en terme de surveillance de l'influenza aviaire. Les relations génétiques entre les virus H7N1 mis en évidence en Loire Atlantique et les virus H7N3 ou H7N7 isolés aux Pays-Bas respectivement de colverts en 2000 et de poulets infectés par le virus influenza aviaire hautement pathogène en 2003, prouvent la gravité d'une infection éventuelle des volailles françaises par ces virus. Il est étonnant de constater que les canards sentinelles n'ont montré aucune trace d'infection par ces virus. Mais il est rassurant de savoir que les enquêtes de surveillance effectuées chez les volailles dans cette zone de production ont été négatives vis-à-vis de ce sous-type (source données LNR influenza aviaire – DGAL 2001-2003).

Inversement il est étonnant de constater qu'aucun virus de sous-type H5 n'a été isolé de l'avifaune alors que ce sous-type constitue une préoccupation pour les élevages de canards prêts à gaver du Grand Ouest (source données LNR influenza aviaire – DGAL 2003). On peut donc en conclure que soit l'échantillonnage d'oiseaux sauvages était trop restreint, soit les espèces ciblées n'étaient pas les bonnes, soit ces virus sont déjà enzootiques dans la population de canards domestiques.

En revanche, la présente étude a permis de **montrer les relations phylogénétiques existant entre les isolats de l'avifaune et ceux provenant de volailles aux mêmes périodes**. Or l'infection par ces virus, de volailles telles que les dindes, a des conséquences économiques très nettes et justifie de continuer à s'y intéresser.

Notre étude phylogénétique ne s'est pas limitée aux gènes de l'hémagglutinine. Ainsi les gènes de la neuraminidase et de la protéine de matrice ont été analysés. Toutes les données obtenues permettent de sélectionner des souches plus représentatives pour nos recherches en matière de vaccinologie. Il serait aussi nécessaire sinon d'étendre les études phylogénétiques aux autres gènes, du moins de vérifier si tous les virus isolés possèdent ou non des gènes appartenant à d'autres lignées qu'à la lignée aviaire, ceci dans l'optique d'identifier des virus réassortants éventuels qui pourraient s'adapter plus facilement à d'autres espèces animales, voir à l'homme et montrer ainsi un potentiel zoonotique.

- Newcastle

Pour les Paramyxovirus aviaires, nos isolements de PMV1 sont rares : 2 isolats de colverts soit un taux d'isolement de 0,9 % ; mais tous les PMV1 isolés sont avirulents. L'étude néozélandaise précitée rapportait 3,1 % de colverts viropositifs (APMV1) mais des écouvillons trachéaux étaient aussi analysés. Une étude réalisée au Canada dans l'Etat d'Alberta révélait chez les colverts des viropositivités (APMV1) de 0 à 2,5 % selon les années et chez des sarcelles (aux ailes bleues) des viropositivités APMV1 de 0 à 1,9 % (HINSHAW et al., 1980). Il n'a pas été isolé d'APMV1 à partir des Grands Cormorans de la Dombes. Mais les isolements de virus pathogènes effectués à partir de cormorans à double crête sur le continent nord américain ne l'ont été qu'en été et qu'à partir de juvéniles (KUIKEN, 1999) et il a été suggéré par plusieurs auteurs (cité dans KUIKEN, 1999) que les cormorans adultes pourraient réexcréter le virus au printemps lorsque la saison de reproduction démarre. Par ailleurs KUIKEN et al. 1998 ont montré que des Cormorans infectés expérimentalement avec un virus de la maladie de Newcastle pathogène avait des anticorps détectables par HI test pendant 10 semaines alors que le virus était au plus excrété pendant 4 semaines. Donc, dans la situation française constatée, on peut faire l'hypothèse que l'infection par des APMV1 détectée sérologiquement est suffisamment ancienne pour que les virus ne soient plus détectables.

Des Paramyxovirus aviaires de types 4 et 6 ont déjà été isolés de canards sauvages (STANISLAWEK, 2002 ; TUMOVA et al., 1989; MANUGUERRA J.C., communication personnelle).

Compte tenu de l'importance plus grande en terme de risque des virus influenza, ceux-ci ont été prioritairement analysés et l'étude des paramyxovirus aviaires isolés n'a pas été aussi poussée. Elle reste donc à faire pour les paramyxovirus de type 1, les paramyxovirus de types 4 et 6 présentant moins d'intérêt même si ce dernier a déjà été isolé de volailles en France (MARIUS-JESTIN et al., 1987).

8. Conclusion

Tous les objectifs de cette étude ont été remplis (cf §3).

Elle a permis de confirmer le portage par l'avifaune sauvage de diverses souches de virus Influenza, pour certaines nouvellement identifiées en France, et de paramyxovirus aviaires. A l'exclusion d'un isolat H3N8 montrant des résultats d'index de pathogénicité discordants nécessitant des investigations complémentaires, les souches isolées sont peu ou pas pathogènes ; cependant la possibilité de transmission aux oiseaux domestiques est démontrée.

Par ailleurs, l'analyse phylogénétique des virus Influenza isolés dans l'avifaune est éminemment intéressante puisqu'elle permet d'établir des relations avec les virus qui ont été responsables des récentes épizooties chez les volailles en Europe.

La poursuite des investigations sur les virus des pestes aviaires chez les oiseaux sauvages est donc d'un intérêt majeur.

Outre les données scientifiques qu'elle nous a fourni, cette étude constitue un excellent rodage technique et scientifique pour la mise en place du programme de surveillance permanente de l'Influenza aviaire chez les oiseaux sauvages préconisé par la Décision de la communauté Européenne 2002/649/CE.

Bibliographie

- Alexander, D.J. (1997). Avian influenza in the Eastern Hemisphere (excluding the Pacific basin) during 1992-1997. In : United States Animal Health Association (ed.) *Fourth International Symposium on Avian Influenza*, Athens, Georgia, pp. 9-13.
- Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, **74**, 3-13.
- Alexander, D.J. (2003). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses. In Diseases of Poultry 11 th edition (Saif Y.M. et al eds) Iowa State University Press, Ames, Iowa. Pp 63-92
- Artois, M., Manvell, R., Fromont, E. et Schweyer, J.B. (2002). Serosurvey of Newcastle Disease and avian influenza A virus antibodies in great cormorants from France. *Journal of Wildlife Diseases*, **38**, 169-171.
- Astorga R. J., Cubero M.J., Leon Vizcaino L., Maldonado A., Arenas A., Tarradas M.C., Perea A (1994) . Avian Influenza in wild waterfowl and shorebirds in the Doñana national Park : serological survey using the ELISA test. *Avian Pathology*, **23** (2) :339-334.
- Burton, R. et Demoly, D. (1995) *La migration des oiseaux*. Arthaud, Paris. 315 p.
- Capua I., Manvell R., Antonucci D., Scaramozzino. (1994). Isolation of the pigeon PMV 1 variant of Newcastle virus from imported pheasants. *J. Vet. Med. B.*, **41** (10) : 675-678.
- Claudia P.A., Barrett S.C., van Campen H. (1995). Influenza A viruses isolated in two wildlife management areas of Pennsylvania. *J. Wildl. Dis.*, **31** (2) : 179-185.
- Deibel, R., Emord, D.E., Dukelow, W., Hinshaw, V.S. et Wood, J.M. (1985) Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the Atlantic flyway, 1977-1983, including an H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. *Avian Diseases*, **29**, 970-985.
- Devaux J.M. (1979). Contribution à l'étude des virus grippaux (orthomyxovirus de type A) isolés chez les oiseaux sauvages. *Thèse Doct. Vet. Alfort* 56 p.
- Graham, D.A., German, A., Abernethy, D., McCullough, S.J., Manvell, R.J. et Alexander, D.J. (1999). Isolation of ortho- and paramyxoviruses from wild birds in Northern Ireland during the 1997 Newcastle disease epizootic. *The Veterinary Record*, **145**, 20-21.
- Hannoun C.(1977). Isolation from birds of influenza viruses with human neuraminidases. International symposium on influenza immunization (II), Genève, 1977. *Devel. Biol. Standard, ed Karger*, Bâle, **39** : 469-472.
- Hannoun C. et Devaux M. (1981). Circulation enzootique permanente de virus grippaux dans la baie de la Somme. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. **3**, 177-183.
- Heckert R.A., Collins M.S., Manvell R.J., Strong I., Pearson J.E., Alexander D.J. (1996). Comparison of Newcastle disease viruses isolated from cormorants in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. *J ; Vet. Res.*, **60** : 50 – 54.
- Hinshaw V.S., Webster R.G. and Turner B. (1980). The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Canadian Journal of Microbiology*. **26**, 622-629.
- Ito T., Okazaki K., Kawaoka Y., Takada A., Webster R.G., Kida H. (1995). Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch. Virol.*, **140** : 1163-1172.

- Kuiken, T., Wobeser, G., Leighton, F.A., Haines, D., Chelack, B., J., B., Hassard, L., Heckert, R.A. et Riva, J. (1999). Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan, with comparison of diagnostic methods. *Journal of Wildlife Diseases*, **35**, 8-23.
- Leighton A., Wobeser G., Bollinger T, Barker I. K. (1994). Epizootics of Newcastle in 1990 and 1992 in the double crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) in North America. *BIPAS*, 10 : 67-69.
- Leray, G. (1992). Hivernage des canards et foulques dans l'estuaire de la Loire. Evolution des stationnements. *Bulletin Mensuel de l'O.N.C. (Office National de la Chasse)*, **164**, 7-18.
- Ludwig, S., Haustein, A., Kaleta, E.F. et Scholtissek, C. (1994). Recent influenza A (H1N1) infections in pigs and turkeys in northern Europe. *Virology*, **202**, 281-286.
- Maldonado, A., Arenas, A., Tarradas, M.C., Luque, I., Astorga, R., Perea, A. et Miranda, A. (1995). Serological survey for avian paramyxoviruses from wildfowl in aquatic habitats in Andalusia. *Journal of Wildlife Diseases*, **31**, 66-69.
- Marius-Jestin, V., Cherbonnel, M., Picault, J.P. et Bennejean, G. (1987). Isolation from mule ducks of a highly pathogenic duck plague virus strain and a paramyxovirus (PMV-6). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **10**, 173-186.
- Müller, T., Hlinak, A., Mühle, R.U., Kramer, M., Liebherr, H., Ziedler, K. et Pfeiffer, D.U. (1999). A descriptive analysis of the potential association between migration patterns of bean and white-fronted geese and the occurrence of Newcastle disease outbreaks in domestic birds. *Avian Diseases*, **43**, 315-319.
- Nettles, V.F., Wood, J.M. et Webster, R.G. (1985). Wildlife surveillance associated with an outbreak of lethal H5N2 avian influenza in domestic poultry. *Avian Diseases*, **29**, 733-741.
- Otsuki K., Takemoto O., Fujimoto R., Yamazaki K., Kubota N., Hosaki H., Mitani T., Tsubokura M. (1987). Isolation of influenza A viruses from migratory waterfowl in San-in District, western Japan in the winter of 1983-84. *Research in veterinary science*, 43 : 177-179.
- Pfitzer, S., Verwoerd, D.J., Gerdes, G.H., Labuschagne, A.E., Erasmus, A., Manvell, R.J. et Grund, C. (2000). Newcastle disease and avian influenza A virus in wild waterfowl in South Africa. *Avian Diseases*, **44**, 655-660.
- Rosenberger, J.K. et Krauss, W.C. (1974). Isolation of Newcastle disease and type-A influenza viruses in migratory waterfowl in the Atlantic flyway. *Avian Diseases*, **18**, 610-613.
- Schelling E., Thur B., Griot C., Audige L. (1999). Epidemiological study of Newcastle disease in backyard poultry and wild bird populations in Switzerland. *Avian Pathology*, 28 : 263-272.
- Schricke, V. (1989). Synthèse bibliographique sur les études relatives à la migration pré-nuptiale des Anatidés en France. *Bulletin Mensuel de l'O.N.C. (Office National de la Chasse)*, **137**, 5-12.
- Sharp, G.B., Kawaoka, Y., Jones, D.J., Bean, W.J., Pryor, S.P., Hinshaw, V. et Webster, R.G. (1997). Coinfection of wild ducks by influenza A viruses : distribution patterns and biological significance. *Journal of Virology*, **71**, 6128-6135.

- Sharp, G.B., Kawaoka, Y., Wright, S.M., Turner, B., Hinshaw, V. et Webster, R.G. (1993). Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza subtypes. *Epidemiology and Infection*, **110**, 161-176.
- Shimanter E., Weisman Y., Manvell R., Alexander D., Lipkind M. (1997). Mixed Paramyxovirus infection of wild and domestic birds in Israël. *Vet. Microbiol.* 58 (1) : 73-78.
- Sinnecker, H., Sinnecker, R. et Zilske, E. (1982) Detection of influenza A viruses by sentinel domestic ducks in an ecological survey. *Acta Virologica*, **26**, 102-104.
- Slemmons R.D., Shieldcastle M.C., Heyman L.D., Bednarik K.E. and Senne D.A. (1991). Type A Influenza viruses in waterfowl in Ohio and implications for domestic turkeys. *Avian Diseases*. **35**, 165-173.
- Spalatin, J. et Hanson, R.P. (1975). Epizootiology of Newcastle disease in waterfowl. *Avian Diseases*, **19**, 573-582.
- Stallknecht, D.E. (1997). Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations : waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc. In : United States Animal Health Association (ed.) *Fourth International Symposium on Avian Influenza*, Athens, Georgia, pp. 61-69.
- Stallknecht, D.E., Shane, S.M., Zwank, P.J., Senne, D.A. et Kearney, M.T. (1990b). Avian influenza viruses from migratory and resident ducks in coastal Louisiana. *Avian Diseases*, **34**, 398-405.
- Stanislawek, W.L., Wilks, C.R., Meers, J., Horner, G.W., Alexander, D.J., Manvell, R.J., Kattenbelt, J.A. et Gould, A.R. (2002). Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Archives of Virology*, **147**, 1287-1302.
- Süß, J., Schäfer, J., Sinnecker, H. et Webster, R.G. (1994). Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Archives of Virology*, **135**, 101-114.
- Takakuwa H., Ito T., Okazaki K., Kida H. (1998). Potentially virulent Newcastle disease viruses maintained in migratory waterfowl populations. *Jap. J. Vet. Res.*, 45 (4) : 207-215.
- Tumova B., Bachmann P.A, Eichborn W., Ploger A., Stumpa A. (1989). Further evidence of the circulation of PMV4 and influenza viruses with N2-1957 enzyme in the migratory waterfowls. *Acta Virologica*. **33**, 573-576.
- Vickers, M.L. et Hanson, R.P. (1982). Characterization of isolates of Newcastle disease virus from migratory birds and turkeys. *Avian Diseases*, **26**, 127-133.
- Ziedler K., Hlinak A. (1993). Nachweis von anticorpen gegen das virus der Newcastle disease bei Wiuldvoegen. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.*, 106 (9) : 302-305.