L'ETUDE DE L'EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE H5N1 HAUTEMENT PATHOGENE AU NIGERIA INDIQUE QUE PLUSIEURS VIRUS DISTINCTS Y ONT ETE INTRODUITS *

Mariette F. Ducatez [1], Christophe M. Olinger [1], Ademola A. Owoade [2], Sébastien De Landtsheer [1], Wim Ammerlaan [1], Hubert G.M. Niesters [3], Ab D. M. E Osterhaus [3], Ron A.M. Fouchier [3] et Claude P. Muller [1]

***RESUME** : Le Nigéria est le premier pays africain à annoncer être touché par une souche hautement pathogène du virus de la grippe aviaire H5N1. Le virus a tout d'abord été détecté dans le Nord et il est maintenant signalé dans la moitié des Etats fédéraux nigérians. Nous comparons ici des séquences génétiques d'isolats de H5N1 provenant de deux élevages dans l'Etat de Lagos avec un isolat de la première épizootie signalée dans l'Etat de Kaduna. Malgré la proximité des deux élevages dans l'Etat de Lagos, ils ont été infectés par des virus de deux lignées différentes, toutes deux également distinctes de celle observée dans le Nord (Etat de Kaduna). Ces données appuient la thèse de l'introduction indépendante de trois lignées de H5N1. Cependant, la voie d'introduction des virus reste obscure puisqu'elle peut être expliquée par l'arrivée d'oiseaux migrateurs tout comme par importations commerciales indépendantes.*

Mots-clés : Grippe aviaire, Nigéria, H5N1.

***SUMMARY**: Nigeria was the first country in Africa to report highly pathogenic avian influenza (HPAI) caused by HPAI virus H5N1. The virus was first detected in the North from where it initially seemed to have spread to other regions of the country. Here we report the comparison of genomic sequences of H5N1 isolates from two farms in Lagos State with one of the earliest outbreak in Kaduna state. Despite the vicinity of the two Lagos state farms, they proved to be infected by viruses of two different lineages, both of which are clearly distinct from that found in the North. These data support the independent introduction of three H5N1 lineages along routes that coincide with migratory bird flyways. But independent trade imports cannot be excluded.*

Keywords: Avian influenza, Nigeria, H5N1.

---

* Texte de la communication orale présentée lors de la Journée AESA-AEEMA, 18 mai 2006

1 Institute of Immunology, National Public Health Laboratory, 20A rue Auguste Lumière, L-1950 Luxembourg

2 Department of Veterinary Medicine, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

3 Department of Virology, Erasmus Medical Center, Dr. Molewaterplein 50, 3015 GE Rotterdam, Netherlands

Depuis la mi-janvier 2006, une forte mortalité a touché un puis plusieurs élevages au Nord du Nigéria : dans les Etats de Kaduna, puis de Kano. Les symptômes observés ont tout d'abord été attribués au virus de la maladie de Newcastle, capable lui aussi de décimer des troupeaux. Ce n'est que le 7 Février que la FAO (Food and Agriculture Organisation) a officiellement confirmé un cas de grippe aviaire hautement pathogène (HPAI pour Highly Pathogenic Avian Influenza) H5N1 dans un élevage de poules pondeuses en batterie à Igabi, dans l'Etat de Kaduna. Le diagnostic de la maladie de Newcastle dans la région s'est révélé erroné. Depuis lors, le virus s'est propagé dans le pays et a pu être officiellement détecté dans 14 des 31 Etats fédéraux (www.oie.int, 06/07/2006).

Le Nigéria est le plus gros producteur de volailles en Afrique avec, en 2005, 211 000 tonnes métriques de viande de poulet et 416 000 tonnes métriques d'œufs produits (www.faostat.fao.org). La filière avicole est la seconde industrie après la filière pétrolière dans le pays. De par les nombreuses importations de volailles au Nigéria souvent sans mesure de biosécurité rigoureuse, l'industrie avicole est particulièrement vulnérable à l'introduction d'agents infectieux. Cette vulnérabilité est accrue par la présence de nombreux sites de rassemblement d'oiseaux migrateurs en provenance du sud de la Russie, d'Asie de l'Ouest et d'Europe [Olsen *et al.*, 2006]. Cependant, une étude séro-épidémiologique a montré l'absence d'anticorps contre la grippe aviaire dans le sérum de plus de 1000 volailles d'élevages industriels dans le Sud-ouest du Nigéria (Etats de Lagos, Ogun, Oshun et Oyo), entre 1999 et mai 2004 [Owoade *et al.*, 2006].

Le but de notre étude était de caractériser au niveau moléculaire certaines souches de grippe aviaire présentes au Nigéria afin d'essayer de comprendre l'origine du virus et/ou sa progression dans la région [Ducatez *et al.*, 2006].

Des écouvillons cloacaux et pharyngés de 456 oiseaux issus de 118 troupeaux et de 100 élevages ont été testés par PCR pour la présence de génome du virus de la grippe aviaire avec des amorces génériques pour tous les virus de type A [Munster, *et al.*, 2005]. Parmi les échantillons positifs, 18 isolats ont été obtenus soit après propagation sur œufs embryonnés SPF (specific pathogen free) de poule, soit après culture sur cellules MDCK. Ainsi, les virus présents sur deux élevages dans l'Etat de Lagos (élevage « SO », échantillonné le 24 Février, et élevage « BA », échantillonné le 8 Mars) ont pu être caractérisés. Le séquençage des souches a permis de confirmer le sérotype des souches : H5N1. Le gène de l'hémagglutinine a été entièrement séquencé et le site de clivage de l'hemaglutinine PQGERRRKKRG, est identique à celui observé chez les souches récentes de H5N1 hautement pathogènes identifiées en Europe, Russie, et Asie de l'ouest. La figure 1 montre que les souches nigérianes sont très clairement groupées avec les souches de 2005-2006 trouvées en Asie de l'ouest (Mongolie ; Qinghai en Chine ; Crimée en Ukraine ; Kurgan, Astrakhan et Novosobirsk en Russie ; Iran et Irak), en Europe (Turquie ; Croatie ; France ; Italie et Allemagne) et en Afrique (Egypte). Elles sont distinctes des souches de H5N1 hautement pathogènes caractérisées en Asie du Sud-est.

La distance génétique pour le gène de l'hémaglutinine entre les souches isolées dans les trois élevages nigérians est comprise entre 0.79 et 1.14%. La séquence du virus présent dans les élevages Kaduna, SO et BA est respectivement plus proche de A/chicken/Kurgan/3/2005, A/chicken/Egypt/960N3-004/2006, et A/Cygnus olor/Astrakhan/Ast05-2/2005 (figure 1, voir aussi [Ducatez *et al.*, 2006]). Malgré la faible distance séparant les élevages SO et BA (<50 km), les souches de l'élevage BA sont plus proches de la souche de l'Etat de Kaduna que des souches de l'élevage SO.

Nous en déduisons que les souches de H5N1 hautement pathogène isolées dans trois élevages nigérians appartiennent à trois lignées génétiques distinctes et qu'elles ont sans doute été introduites de façon indépendante dans le pays [Ducatez *et al.*, 2006]. Même si il est difficile de déterminer une origine géographique exacte pour ces lignées (Europe, Russie, Asie de l'Ouest, Afrique du Nord), nos résultats sont incompatibles avec l'hypothèse d'une importation du virus d'Asie du Sud-est.

Le vecteur ayant permis la propagation du virus H5N1 jusqu'au Nigéria est également difficile à identifier : la présence de sites de rassemblement d'oiseaux en Afrique de l'ouest ne nous permet pas d'écarter la thèse des oiseaux migrateurs, mais il est également possible que des importations commerciales indépendantes aient permis au virus de s'implanter dans les élevages nigérians.

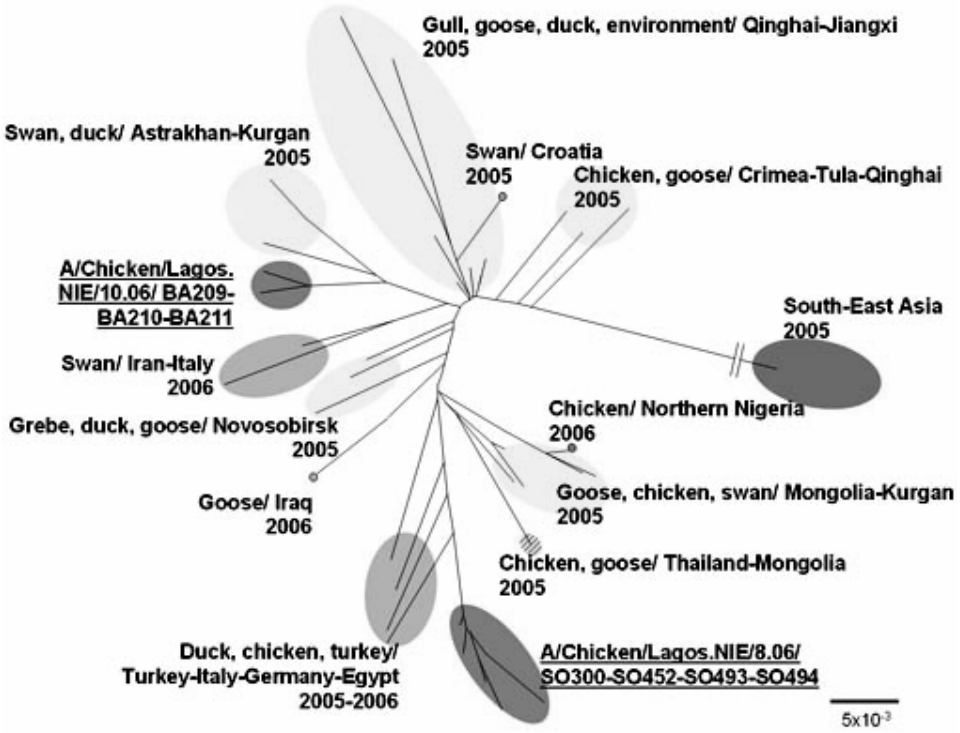
Depuis le début de l'épizootie au Nigéria, le nombre d'Etats fédéraux touchés par H5N1 a

atteint 14 sur 31. Un cordon sanitaire a été mis en place le 20 février dernier au centre du pays pour éviter la propagation du virus du Nord au sud-ouest (principale zone de production avicole). A l'annonce des premières épizooties dans le Sud, certains ont douté de l'efficacité de ce cordon sanitaire. Notre étude permet de montrer que ce n'est pas le virus isolé initialement dans l'Etat de Kaduna qui a infecté les élevages SO et BA de l'Etat de Lagos. Cependant, il est difficile d'imaginer un contrôle de la grippe aviaire au Nigéria sans mesures d'abattage sanitaire, de désinfection des établissements touchés, de dépistage systématique et de vaccination de masse.

Figure 1

Phylogénie du gène de l'hémagglutinine de lignées nigérianes de H5N1 et des souches les plus proches.

Le groupe de souches d'Asie du Sud-est, en gris très foncé, n'est pas à l'échelle.
Les souches nigérianes sont représentées en gris foncé et leurs noms sont en gras souligné ; les souches isolées en 2006 sont en gris clair et les souches d'Asie de l'ouest et de Russie (isolées en 2005) sont en gris très clair.



BIBLIOGRAPHIE

Ducatez M.F., Olinger C.M., Owoade A.A., De Landtsheer S., Ammerlaan W., Niesters H.G.M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Muller C.P. – Multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature*, 2006, **442**, 37.

Munster V.J., Wallensten A., Baas C., Rimmelzwaan G.F., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. - Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, **11**(10), 1545-1551.

Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenstrom J., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. - Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science*, 2006, **312**(5772), 384-388.

Owoade A.A., Ducatez M.F., Muller C.P. - Seroprevalence of Avian Influenza Virus, Infectious Bronchitis Virus, Reovirus, Avian Pneumovirus, Infectious Laryngotracheitis Virus, and Avian Leukosis Virus in Nigerian Poultry. *Av. Dis.*, 2006, **50**(2), 222-227.

Remerciements

Les données décrites dans ce manuscrit ont été publiées le 6 Juillet 2006 dans la revue *Nature*. Les auteurs remercient le soutien moral et financier des Ministères de la Coopération, de la Santé et de la Recherche. Le soutien moral de la FAO et de l'OMS a également été apprécié. Les auteurs remercient le Dr. Oyewola, Président de l'antenne de la "Nigerian Veterinary Medical Association" de l'Etat d'Oyo et le Dr. Oriade, à la tête de l'Unité avicole du « Veterinary Hospital Mokola » de l'Etat d'Oyo, à Ibadan ; le Dr. Hassan, Président de la « National Farmers Association » pour leur soutien et leur enthousiasme à organiser les prélèvements. Nous remercions également l'hospitalité de l'Université d'Ibadan (UI), le support du vice-recteur Prof. Bamiro et des députés-vice-recteurs Profs. Odejide et Ogunkunle, le doyen de la Faculté de Médecine Vétérinaire, Prof. Ogundipe et le directur du Département de Médecine Vétérinaire. Merci aussi à Judith Guldemeester, Pascal Lexmond, Chantal Baas, Theo Bestebroer, Erasmus University Rotterdam et à Jacques Kremer, Institute of Immunology, National Public Health Laboratory, Luxembourg pour leurs conseils et leur aide technique. L'unité avicole de l'UI est en partie financée par une bourse de recherché de l'"University of Ibadan Senate". M.F.D. et C.M.O. ont une bourse du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur de Luxembourg. Enfin, nous remercions les éleveurs Nigérians qui ont participé à ce travail, principalement dans les Etats d'Oyo, d'Ogun et de Lagos, pour le prélèvement d'échantillons, leur patience et leur courage dans cette période difficile.