



ACTES du colloque DES SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

Du 9 au 13 Octobre 2023
Faculté des Sciences
Université d'Antananarivo

1^{ère} EDITION



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture

AMBASSADE
DE FRANCE
À MADAGASCAR
Liberté
Égalité
Fraternité



Etude de la pathogénicité du virus de la maladie de Newcastle chez les poulets à Madagascar

Nirijaona HM¹, Razafindrafara MS^{2,3}, Gil P⁴, Andriantsimahavandy AA^{1,6} Servan de Almeida R⁴,
Maminiaina OF^{2, 3, 5, 6}

- ¹Domaine Sciences et Technologies, Université d'Antananarivo, BP 906 Antananarivo 101 (Madagascar)
- ²Centre National de Recherche - Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires (IMVAVET), BP 04, Rue Farafaty, Antananarivo (Madagascar)
- ³Centre National de Recherche – FOFIFA-Département de Recherches Zootechniques, Vétérinaires et Piscicoles (FOFIFA-DRZVP), BP 1690, Rue Farafaty, Antananarivo (Madagascar)
- ⁴ASTRE, CIRAD, INRA, Univ Montpellier, Montpellier (France)
- ⁵Département d'Enseignement des Sciences et Médecine Vétérinaires, Ambatobe Masinandriana Ilafy BP 04 Antananarivo (Madagascar)
- ⁶Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de L'Environnement (SVE), Antananarivo (Madagascar)
- ► *E-mail : mirantsoarazaf@gmail.com

Résumé

La maladie de Newcastle est causée par un virus appelé virus de la maladie de Newcastle (VMN). Elle constitue une menace constante pour la production de volailles du fait de l'apparition annuelle d'épizooties meurtrières qui engendrent de lourdes pertes économiques. Une approche prophylactique ou thérapeutique plus efficace mérite alors d'être envisagée. Toutefois, la connaissance des facteurs intervenant dans la gravité de la maladie, notamment la virulence des souches virales, la distribution géographique, et la nature des variants des souches, est indispensable. Dans la présente étude, la pathogénicité des isolats du VMN, isolés à partir de foyers de la maladie chez les poulets, a été évaluée. A partir des prélèvements dans les zones d'études, l'isolement viral sur œuf embryonné de poule et le test d'inhibition d'hémagglutination ont été réalisés. L'indice de pathogénicité intracérébrale (IPIC) des isolats obtenus a ensuite été déterminé. Cette étude a permis d'identifier 30 isolats. Variant de 1,1 à 1,8, les profils IPIC obtenus pour 13 isolats révèlent 4 isolats modérément virulents ou mesogènes et 9 isolats fortement virulents ou velogènes. Les différences d'IPIC entre les souches virales reflètent la diversité des souches de VMN dans les élevages aviaires malgaches. En conclusion, la présente étude a fourni des informations concernant la virulence du VMN chez les poulets à Madagascar. Dans l'avenir, la caractérisation moléculaire des souches de VMN est nécessaire afin d'étudier la variation génétique et de comprendre l'impact de la divergence génétique des souches dans la protection conférée par les vaccins actuellement utilisés sur le terrain. Ces informations peuvent aider les décideurs (Etat, chercheurs, vétérinaires) à prendre des mesures de lutte adéquates pour le développement du secteur avicole à Madagascar et ailleurs.

Mots-clés : maladie de Newcastle, volaille, VMN, pathogénicité, IPIC

Abstract

Newcastle disease is caused by a virus called Newcastle disease virus (NDV). It constitutes a constant threat to poultry production due to the annual occurrence of deadly epizootics which cause heavy economic losses. A more effective prophylactic or therapeutic approach should then be considered. However, knowledge of the factors involved in the severity of the disease, particularly the virulence of viral strains, the geographical distribution and the nature of strain variants, is essential. In the present study, the pathogenicity of Newcastle disease virus isolates, isolated from disease outbreaks in chickens, was evaluated. From the samples in the study areas, viral isolation on embryonated chicken eggs and hemagglutination inhibition tests were carried out. The intracerebral pathogenicity index (ICPI) of the isolates obtained was then determined. This study made it possible to identify 30 isolates. Ranging from 1.1 to 1.8, the ICPI profiles obtained for 13 isolates revealed 4 moderately virulent or mesogenic isolates, and 9 highly virulent or velogenic isolates. The differences

in IPIC between viral strains reflect the diversity of NDV strains in Malagasy poultry farms. In conclusion, the present study provided information regarding the virulence of NDV in chickens in Madagascar. In the future, molecular characterization of NDV strains would be necessary to study the genetic variation and understand the impact of the genetic divergence of strains in the protection conferred by vaccines currently used in the field. This information could help decision-makers (State, researchers, and veterinarians) to take appropriate control measures for the development of the poultry sector in Madagascar and elsewhere.

Keywords: Newcastle disease, poultry, NDV, pathogenicity, ICPI

Introduction

La maladie de Newcastle est l'une des viroses aviaires hautement contagieuses affectant la production de volaille. L'agent responsable est un paramyxovirus aviaire nommé virus de la maladie de Newcastle (VMN). Le VMN est un virus à ARN(-) appartenant à l'ordre des Mononégavirales, à la famille des Paramyxoviridae et au genre *Orthoavulavirus* [1]. Il a été démontré que le VMN peut infecter plus de 200 espèces d'oiseaux, mais la gravité de la maladie produite varie à la fois selon l'hôte et la nature du virus [2]. Les souches du VMN ont été classées comme lentogènes, mésogènes et vélogènes. Les souches lentogènes sont des souches avirulentes qui n'entraînent pas de mortalité. Les souches mésogènes sont faiblement virulentes mais peuvent entraîner une légère mortalité. Les souches vélogènes sont très virulentes et capables d'entraîner une mortalité élevée pouvant affecter 90-100% des sujets infectés [3]. Dans le passé, des tests tels que le temps de mort moyen des embryons, l'indice de pathogénicité intraveineuse et l'indice de pathogénicité intracérébrale ont été utilisés pour évaluer la virulence du VMN [4]. Toutefois, un accord international a imposé une évaluation définitive de la virulence du virus sur la base du test de pathogénicité intracérébrale ou IPIC [2]. Selon l'office international des épizooties (OIE), la forme virulente de la MN est causée par un VMN qui présente un IPIC sur des poussins (*Gallus gallus*) d'un jour égal ou supérieur à 0,7. Toutefois, les souches sont classées comme mesogènes si son IPIC est entre 0,7 - 1,5 puis vélogènes s'il est supérieur à 1,5 [2].

La maladie de Newcastle (MN) reste une limitation majeure de la production avicole qui est considérée comme une source importante de revenus et de sécurité alimentaire pour de nombreuses communautés [5]. Son impact économique est important du fait de la morbidité et de la mortalité élevée, de la réduction de la production et de la détérioration de la qualité des œufs. Le secteur avicole revêt deux aspects différents : traditionnel et commercial. Dans l'aviculture commerciale, la vaccination est la mesure de prévention appliquée régulièrement afin d'assurer la protection des volailles contre la MN. Cependant, des cas sporadiques de la MN dans des fermes commerciales vaccinées ont été signalés dans plusieurs régions dans le monde comme en Chine [6], dans le sud de la Californie et dans les États adjacents [7], en Malaysia [8], au Cameroun, au Nigéria et au Burkina Faso [9]. Dans l'aviculture villageoise, la MN constitue une menace mondiale, en particulier dans les zones rurales d'Afrique et d'Asie [10]. De plus, la promiscuité entre les volailles dans l'aviculture villageoise aggrave la situation. En effet, la présence des espèces qui peuvent servir d'hôtes d'amplification comme les palmipèdes augmente la probabilité d'exposition des oiseaux sensibles à une grande quantité de virus en circulation. Compte tenu de l'ampleur de cette exposition, il est nécessaire d'évaluer la virulence et la localisation géographique des isolats du VMN afin de reconnaître les schémas de propagation de la maladie et d'étudier les relations entre les isolats dans différentes zones géographiques. Dans la présente étude, la pathogénicité des isolats du VMN circulant à Madagascar est déterminée en évaluant l'indice de pathogénicité intracérébrale chez le poussin d'un jour.

Matériel et Méthodes

Echantillons

Des échantillons d'oiseaux suspectés d'infection par la MN de différentes zones géographiques ont été collectés lors des foyers de la maladie en 2018 et 2019, et envoyés au laboratoire du Département de Recherches Zootechniques, Vétérinaires et Piscicoles du Centre National de Recherche Appliquée au Développement Rural, Ampandrianomby Antananarivo (FOFIFA/DRZVP). Au total, 49 prélèvements ont été

analysés pendant l'étude.

Isolement du VMN

Cent microlitres (100 µl) de suspensions d'échantillons d'organes provenant d'oiseaux morts additionnés d'antibiotiques (pénicilline : 2000 UI/ml, streptomycine : 2 mg/ml, gentamycine : 50 µg/ml, fungisone : 2 mg/ml) sont inoculés dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés de poule âgés de 9 à 11 jours et exempts d'organisme pathogène spécifique ou EOPS [2]. Les œufs sont incubés à 37°C pendant 4 à 7 jours et soumis à une observation quotidienne. Au cours des observations, si la mort de l'embryon est constatée, les œufs correspondants sont enlevés. Le liquide allantoïdien de chaque œuf est ensuite récolté séparément et un deuxième passage sur œuf embryonné est réalisé. La positivité en VMN est confirmée par l'autopsie de l'embryon mort ainsi que par le test de l'hémagglutination (HA) et par le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) réalisés sur le liquide allantoïdien en utilisant un sérum contenant des anticorps spécifiques au VMN.

Test HA et test IHA

Le titrage du VMN par test HA et le titrage des anticorps spécifiques contre le VMN par test IHA est réalisé en suivant le protocole décrit par l'OIE [2]. Pour le test IHA, un sérum de poulet immunisé par la souche Mukteswar (titre IHA = 7 log₂) et un sérum de poulet EOPS sont utilisés respectivement comme contrôles positif et négatif. Les résultats positifs du test IHA sont marqués par la formation de précipités de globules rouges au fond des puits en raison de la formation du complexe Ag-Ac empêchant ainsi le VMN d'agglutiner les globules rouges.

Test d'Indice de Pathogénicité Intracérébrale (IPIC)

Le test IPIC est réalisé selon le protocole de l'OIE [12]. Le poussin d'un jour utilisé provient de la ferme de l'Institut Malgache des Vaccins Vétérinaires (IMVAVET). Le liquide allantoïdien infectieux présentant une activité hémagglutinante de titre 2⁴ (>1/16) est dilué au 10ème dans du soluté isotonique de chlorure de sodium stérile. Un volume de 50 µl est ensuite injecté par voie intracérébrale à 10 poussins (*Gallus gallus domesticus*). Les poussins sont suivis quotidiennement pendant 8 jours. A chaque observation, un score clinique est attribué : 0 si l'état est normal, 1 si le poussin est malade et 2 s'il est mort. L'IPIC est le score moyen obtenu par poussin et par observation sur une période de huit jours.

Résultats

Distribution géographique des isolats virulents

La Figure 1 montre la localisation géographique des isolats du VMN dont l'IPIC a été déterminé. Les isolats proviennent de poulets présentant des signes cliniques de VMN dans les régions Vakinankaratra (6/13 ; 46,15%), Atsinanana (2/13 ; 15,38%), Analamanga (2/13 ; 15,38%), Vatovavy Fitovinany (1/13 ; 7,69%), Sava (1/13 ; 7,69%) et Atsimo Andrefana (1/13 ; 7,69%). Pour les 13 isolats, 9 (69,23%) sont obtenus de poulets de basse-cour prélevés en 2018 et 4 isolats (20,76%) sont issus de poulets commerciaux (race chair) prélevés en 2018 et en 2019.

Isolement et identification du virus

Parmi les 49 échantillons analysés, 30 entraînent la mort des embryons de poule inoculés entre 24 et 72h. Ces 30 échantillons sont tous positifs par le test HA et sont soumis au test IHA en utilisant des anticorps anti-VMN spécifiques. Tous les échantillons sont également positifs au test IHA. Le Tableau 1 montre la description des souches isolées dans cette étude.

Pathogénicité du virus

L'IPIC a été déterminé pour 13 isolats et est présenté dans le Tableau 2. Selon la valeur des IPIC qui varie de 1,1 à 1,8, neuf isolats sont classés en souche virulente (velogène) et 4 en souche faiblement virulente (mesogène).



Figure 1 : Localisation de 13 souches du VMN dont l'IPIC a été déterminé

Tableau 1 : Description des souches isolées

Echantil- lons	Localisation	Espèce	Race	Année	Résultats de test	
					HA	IHA
1	Atsimo Andre- fana	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
2	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
3	Matsiatra Am- bony	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
4	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
5	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
6	Fitovinany	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
7	Fitovinany	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
8	Fitovinany	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
9	Fitovinany	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
10	Fitovinany	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
11	Fitovinany	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
12	Sava	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
13	Sava	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
14	Atsinanana	Poulet de chair	Amélio- rée	2019	+	+
15	Atsinanana	Poulet de chair	Amélio- rée	2019	+	+
16	Matsiatra Ambony	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
17	Matsiatra Ambony	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
18	Atsimo Andrefana	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
19	Atsimo Andrefana	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
20	Analamanga	Poulet de chair	Amélio- rée	2018	+	+
21	Analamanga	Poulet de chair	Amélio- rée	2018	+	+
22	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
23	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
24	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
25	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
26	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
27	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+

28	Vakinankaratra	Poulet gasy	Locale	2018	+	+
29	Analamanga	Poulet de chair	Améliorée	2018	+	+
30	Analamanga	Poulet de chair	Améliorée	2018	+	+

Tableau 2 : Valeur d'IPIC et interprétation des résultats

Isolats	Code	Valeur IPIC	Pathogénicité
1	V7V_1/18	1,8	velogène
2	SAVA_3/18	1,6	velogène
3	ATSI_1/19	1,4	mesogène
4	ATSI_2/19	1,6	velogène
5	ATAN_5/18	1,1	mesogène
6	VAK_7/18	1,6	velogène
7	VAK_8/18	1,6	velogène
8	VAK_9/18	1,5	mesogène
9	VAK_10/18	1,5	mesogène
10	VAK_11/18	1,6	velogène
11	VAK_13/18	1,6	velogène
12	ANAL_7/18	1,8	velogène
13	ANAL_8/18	1,6	velogène

Discussion

Douée d'une capacité à se propager à l'échelle internationale et à provoquer des flambées majeures, la MN constitue une menace pour les pays en développement où les problèmes d'insécurité alimentaire sont apparus au fil des décennies [13]. Plusieurs vaccins sont actuellement disponibles pour limiter l'infection au niveau des espèces sensibles. Cependant, les épizooties fréquentes du VMN constituent une menace constante pour l'industrie avicole, que ce soit dans le secteur commercial ou dans le secteur villageois [14]. Le contrôle de cette maladie est extrêmement important et figure parmi les priorités. Toutefois, la connaissance des facteurs intervenant dans la gravité de la maladie et dans l'échec de la protection conférée par la vaccination quand elle est appliquée s'avère primordiale afin d'apporter les solutions définitives.

Dans la présente étude, l'isolement viral et le calcul de l'indice de pathogénicité intracérébrale (IPIC) ont été réalisés pour la caractérisation de la virulence des isolats du VMN obtenus à Madagascar entre 2018 et 2019. Il est généralement admis que l'étude de la virulence des souches est indispensable à la mise en place d'une approche prophylactique ou thérapeutique efficace contre les maladies virales [15]. Dans le cadre de l'isolement viral, 30 souches de VMN sont isolées. Sur les 30 isolats, plus de la moitié (19 soit 63 %) proviennent de quatre régions: Analamanga, Vakinankaratra, Atsinanana et Matsiatra Ambony. La proximité géographique de ces régions et l'accessibilité des routes ont permis l'expédition rapide des échantillons vers le laboratoire d'analyse. De ce fait, l'isolement viral a été réalisé rapidement sur des prélèvements frais sans remettre en cause la viabilité des virus dans les prélèvements. En revanche, pour les échantillons des autres régions, l'isolement viral n'a pu être réalisé qu'après plusieurs jours: une telle situation aurait été à l'origine d'une charge virale plus faible susceptible de conduire à un résultat négatif de l'isolement viral. Bien que stockés sous froid jusqu'au laboratoire d'analyse, les échantillons auraient pu ne pas être totalement à l'abri d'éventuelles altérations en raison de la longueur du trajet et de la difficulté de l'entretien de la chaîne du froid.

Tout en apportant des indications sur la pathogénicité des souches de VMN, l'IPIC est l'un des tests officiels de mesure de la virulence [2]. Cependant, l'analyse moléculaire du site de clivage de la glycoprotéine F est nécessaire car il s'agit du principal déterminant moléculaire de la pathogénicité [16]. De plus, l'analyse

du génome complet des souches de VMN isolées dans cette étude pourrait également apporter des informations sur la virulence du VMN à Madagascar. Sur les 30 isolats obtenus dans cette étude, l'IPIC a été déterminé pour 13 seulement en raison de la faible disponibilité des poussins d'un jour au moment de l'analyse. Les essais *in vivo* sur poussins ont montré que ces souches ont un IPIC variant de 1,1 à 1,8, confirmant leur caractère modérément virulent ou très virulent [17]. Ces souches ont été isolées à la fois à partir de poulets de race exotique (poulet de chair) et de poulets de race autochtone. Ces observations suggèrent que les souches virulentes circulent chez les volailles aussi bien rurales que commerciales à Madagascar. Selon une étude similaire effectuée au Pakistan, les isolats virulents peuvent circuler chez des volailles commerciales et chez des volailles de basse-cour [18].

Conclusion

En conclusion, l'analyse des isolats provenant de fermes avicoles commerciales et des isolats issus de volailles de basse-cour fournit des données précieuses sur la virulence des souches de VMN circulant à Madagascar. Les souches sont considérées comme virulentes, et classées comme mesogènes ou velogènes. Ces informations sont essentielles dans la prévention des flambées et dans la prise de mesures de lutte adéquates. Dans l'avenir, la caractérisation moléculaire des isolats du VMN est nécessaire afin d'étudier la variation génétique et de comprendre l'impact de la divergence génétique des souches dans la protection conférée par les vaccins actuellement utilisés sur le terrain.

Remerciements

Ce travail a été soutenu financièrement par le projet JEAIRD-ViroMada, projet CRESI et par le programme IFS ou *International Foundation for Sciences (Grant agreement no.I-1-b-6122)*.

Références bibliographiques

- [1] Amarasinghe GK, Ayllón MA, Bào Y, Basler CF, Bavari S, *et al.*. 2019. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Archives of virology* 164: 1967-1980.
- [2] OIE. 2018. Newcastle disease (Infection with Newcastle disease virus). Chapter 3.3.14. OIE Terrestrial Manual. Office International des Epizooties, 964-983.
- [3] Alexander DJ. 2003. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. *Diseases of Poultry* 11: 63-99.
- [4] Alexander DJ, Senne DA. 2008. Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M, Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135-141.
- [5] Al-Shammari AM, Hamad MA, Al-Mudhafar MA, Raad K, Ahmed A. 2020. Clinical, molecular and cytopathological characterization of a Newcastle disease virus from an outbreak in Baghdad, Iraq. *Vet Med Sci* 6: 477-484.
- [6] Yu L, Wang Z, Jiang Y, Chang L, J K. 2001. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. *Journal of clinical microbiology* 39: 3512-3519.
- [7] Kapczynski D, King D. 2005. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23: 3424-3433.
- [8] Berhanu A, Ideris A, Omar A, Hair-Bejo M. 2010. Molecular characterization of partial fusion gene and C-terminus extension length of hemagglutinin-neuraminidase gene of recently isolated Newcastle disease virus isolates in Malaysia. *Virology journal* 7: 183.
- [9] Snoeck C, Ducatez M, Owoade A, Olufemi F, Alkali B, *et al.* 2009. Newcastle disease virus in West Africa: New virulent strains identified in non-commercial farms. *Archives of Virology* 154: 47-54.
- [10] Walugembe M, Amuzu-Aweh EN, Botchway PK, Naazie A, Aning G, *et al.* 2020. Genetic Basis of Response of Ghanaian Local Chickens to Infection With a Lentogenic Newcastle Disease Virus. *Frontiers in*

Genetics 11:1-16.

[11] Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. 1972. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *The Journal of hygiene* 70: 767-777.

[12] OIE. 2009. Newcastle disease. Chapter 2.3.14. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds and Bees. Office International des Epizooties, Paris (May 2009) 576-589.

[13] Erokhin V, Gao T. 2020. Impacts of COVID-19 on Trade and Economic Aspects of Food Security: Evidence from 45 Developing Countries. *International journal of environmental research and public health* 17: 1-28.

[14] da Silva AP, Aston EJ, Chiwanga GH, Birakos A, Muhairwa AP, *et al.* 2020. Molecular Characterization of Newcastle Disease Viruses Isolated from Chickens in Tanzania and Ghana. *Viruses* 12: 1-14.

[15] Dortmans JCFM, Koch G, Rottier PJM, Peeters BPH. 2011. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Veterinary research* 42: 1-11.

[16] Peeters BP, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of virology* 73: 5001-5009.

[17] Alexander D, Aldous E, Fuller C. 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian pathology* 41: 329-335.

[18] Munir M, Cortey M, Abbas M, Qureshi Z, Afzal F, *et al.* 2012. Biological characterization and phylogenetic analysis of a novel genetic group of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in commercial poultry and from backyard poultry flocks in Pakistan. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12: 1010-1019.