

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique
Université Saad Dahleb BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



THESE DE DOCTORAT

En Biologie
Spécialité : Microbiologie

Thème :
IDENTIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DU
VIRUS DE L'INFLUENZA AVIAIRE H5NX DANS LES
ELEVAGES AVICOLES EN ALGERIE

Présentée par : AMMALI Naouel

Devant le jury :

Présidente : KHALDOUN H. Université Blida 1..... Professeure.

Examineur : BENCHABANE M.Université Blida 1..... Professeur.

Examineur : BARBERIS A.CRBT Constantine..... MRA.

Directeur de thèse : GUETARNI D.Université Blida 1..... Professeur.

Co-directeur de thèse : MOHAMED SAID R.Université Blida 1.....MCA.

Invité : CHEBLOUNE Y.....Université Grenoble-Alpes.....PhD-DR.

Année universitaire : 2024/2025

REMERCIEMENTS

Avant tout je remercie Dieu tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage, la volonté et la patience pour accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Pr Guetarni Djamel, pour son encadrement attentif, sa patience et sa disponibilité sans faille. Vos conseils avisés et votre passion pour la recherche m'ont permis de surmonter les défis de ce projet et d'apprendre bien au-delà de ce dernier.

Je remercie également Dr. Mohamed Said Ramdane d'avoir aidé et contribué à la réalisation de cette thèse en restant disponible et à l'écoute.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie particulièrement Pr Khaldoun Hassina pour avoir accepté de présider ce jury, Pr Benchabane Messaoud et Dr Barberis Abdelhaq pour l'intérêt qu'ils ont accordé à ce travail en acceptant de l'examiner.

Je remercie chaleureusement l'honorable Pr Chebloune Yahia d'avoir accepté d'ajouter sa contribution inestimable et de m'avoir guidé avec patience et rigueur tout au long de cette étude.

Je souhaite également témoigner ma profonde reconnaissance à Dr Kara Radhouane pour son implication totale dans le projet en mettant son expertise et sa clinique à la disposition de l'équipe de recherche, ainsi que pour ses précieux conseils et son soutien.

Je ne peux oublier de remercier les biologistes Mme Gacem Wahiba et Mme Laadjali Farida exerçant à la clinique de Dr Kara, pour leur collaboration, leurs encouragements, et leur sens du partage qui ont rendu ces années de recherche à la fois enrichissantes et plaisantes.

Je tiens à remercier Mr Seninet El Hadi pour son aide et son temps précieux et qui m'a orienté à plusieurs reprises.

Je remercie également Dr Benmesbah Kamilia pour ses encouragements et les beaux moments passés ensemble.

REMERCIEMENTS

Je dédie ce modeste travail :

À ma chère maman et à mon cher papa,

Merci pour votre amour inconditionnel, votre patience et vos encouragements. Vous m'avez inculqué les valeurs de la persévérance, du respect et du travail bien fait qui m'ont guidé tout au long de ma vie. Vous avez toujours été là, dans les moments de doute comme dans les moments de succès, et vos sacrifices n'ont jamais cessé de m'inspirer.

Je vous aime.

À ma sœur IMEN et à mon frère MOHAMED BACHIR,

Votre présence parsemée d'humour et de rire, m'a permis de rester motivée même dans les moments les plus difficiles.

À mes oncles, mes tantes, mes nombreux cousins que j'adore RABAH, YACINE, AHMED, MOHAMED....etc. et mes cousines.

À mes amies MARIA et AFFAF pour leur appui et encouragement tout au long de mon parcours et Inchallah pour la vie.

Enfin, cette thèse est bien plus qu'un travail individuel ; elle est le fruit d'un cheminement collectif, soutenu par tant de mains tendues et de cœurs généreux. À vous tous, merci du fond de mon cœur.

RESUME

La présente étude est une contribution à la caractérisation des souches d'Influenza aviaire hautement pathogène (H5Nx) responsables de problèmes respiratoires associés à une importante mortalité chez la volaille en Algérie en vue d'une stratégie préventive. En effet, deux épizooties de grippe aviaire ont été dévastatrices pour le secteur avicole sur le plan financier pour les éleveurs, d'une part et sur la disponibilité des produits et sous-produits avicoles pour le consommateur, d'autre part. L'expression clinique et nécropsique particulière, jamais rencontrée par les vétérinaires auparavant, a contribué à la difficulté du diagnostic et au contrôle de cet événement sanitaire.

L'objectif du présent travail vise (i) à identifier les souches virales au sein des élevages avicoles en Algérie et les sous types existants et (ii) la caractérisation moléculaire et l'étude phylogénétique des souches AIV circulantes.

Sur la base des observations nécropsiques, une atteinte systémique des organes avec un syndrome congestivo-hémorragique a été constaté sur les cas de morbidité et mortalité de 167 élevages distribués dans la région centrale du nord de l'Algérie. A partir des organes cibles prélevés, une extraction d'ARN suivie d'une série de PCR real time (RRT-PCR) a été réalisée en vue de détecter le gène de la matrice (M) du virus de la grippe ainsi que la PCR conventionnelle (RT-PCR) pour effectuer le sous-typage de la souche en caractérisant le gène HA et NA.

Les résultats obtenus ont permis de détecter 77 élevages positifs à l'AIV et de définir une première épizootie, durant la période de décembre 2020 à mai 2021, causée par la souche H5N8 (13 élevages) ainsi qu'une deuxième de septembre 2022 à juillet 2023 causée par la souche H5N1 (10 élevages).

Afin de approfondir la caractérisation moléculaire, d'étudier la phylogénie et d'avoir une idée sur l'origine du virus, un séquençage par la méthode de Sanger a été lancé pour les déterminants antigéniques HA et NA après amplification des gènes cibles avec une RT-PCR et une PCR semi-nichée. Le traitement des séquences obtenues a montré que les souches algériennes appartenaient au pathotype hautement pathogène après la détection d'un site de clivage qui présente un motif d'acides aminés multi-basiques 'PLREKRRKR/GLF'. Les deux séquences conservées du gène H5 des deux sous-types présentaient une différence de 34 bases représentant 7 acides aminés (AA) sur les 567 AA alignés. La matrice de similitude conduite entre les séquences de chaque gène a montré une homologie nucléotidique entre 99 et 100% pour les deux gènes du sous type H5N8 et de plus de 99% pour les deux gènes du sous type H5N1. L'alignement réalisé entre les séquences du gène H5 (H5N1) avec la séquence de la souche vaccinale a montré une homologie nucléotidique entre 90 et 91% et peptidique entre 92 et 94%.

L'étude phylogénétique du sous-type H5N8 a montré une proximité génétique pour le gène H5 avec des souches isolées au Nigeria et en Chine (>99%) ainsi que pour le gène N8 avec des souches isolées en France et au Kazakhstan (>98%). Les deux gènes du sous type H5N1 étaient apparentés à une souche isolée en Mauritanie avec plus de 98% d'homologie.

L'appartenance de nos souches à la lignée eurasienne des virus H5Nx a été également recherchée avec une analyse phylogénétique, même si le gène N1 semble être proche des deux lignées (eurasienne et nord-américaine). Pour ce qui est du risque zoonotique, le danger est certes réel pour les travailleurs des fermes avicoles. Par conséquent, des plans d'action bien établis et des gestes corrects doivent être appliqués dans les exploitations avicoles lors des épizooties afin de minimiser la transmission des pathogènes.

En conclusion, l'étude a permis de caractériser les virus H5N8 et H5N1 qui circulaient en Algérie entre 2020 et 2023 ainsi leur probable origine ce qui nous donne une idée sur la provenance des virus H5Nx lors de leurs futures introductions.

Mots clés : Influenza aviaire, H5N1, H5N8, Algérie, Influenza hautement pathogène.

ABSTRACT

The present study is a contribution to the characterization of highly pathogenic avian influenza (H5Nx) strains responsible for respiratory problems associated with high mortality in Algerian poultry, with a view to a preventive strategy. Two avian Influenza outbreaks have had a devastating impact on the poultry sector, both financially for farmers and in terms of the availability of poultry products and by-products for consumers. The particular clinical and necropsy expression, never encountered before by veterinarians, has contributed to the trouble of diagnosing and controlling this sanitary event.

The aim of the present work is (i) to identify the viral strains present in Algerian poultry farms and the subtypes that exist, and (ii) the molecular characterization and phylogenetic study of the circulating AIV strains.

Based on necropsy observations, systemic organ damage with congestive-hemorrhagic syndrome was observed in morbidity and mortality cases from 167 farms. RNA was extracted from the target organs, followed by a series of real time PCR (RRT-PCR) tests to detect the matrix (M) gene of the influenza virus, and conventional PCR (RT-PCR) to subtype the strain by characterizing the HA and NA genes.

The results detected 77 AIV-positive farms and defined a first epizootic event from December 2020 to May 2021 caused by H5N8 (13 farms) and a second from September 2022 to July 2023 caused by H5N1 (10 farms).

In order to deepen molecular characterization, study phylogeny and gain insight into the origin of the virus, Sanger sequencing was launched for HA and NA antigenic determinants after amplification of target genes with RT-PCR and semi-nested PCR. Sequence processing showed that the Algerian strains belonged to the highly pathogenic pathotype, following the detection of a cleavage site with a multi-basic amino acid motif 'PLREKRRKR/GLF'. The two conserved sequences of the H5 gene from the two subtypes showed a difference of 34 bases, corresponding to 7 amino acids (AAs) out of the 567 aligned AAs. The similarity matrix conducted on the sequences of each gene revealed a nucleotide homology of 99 to 100% for the two H5N8 subtype genes, and over 99% for the two H5N1 subtype genes. Alignment between the H5 (H5N1) gene sequences and the vaccine strain sequence showed a nucleotide homology between 90 and 91% and a peptide homology between 92 and 94%.

The phylogenetic analysis of the H5N8 subtype showed a close genetic relationship for the H5 gene with strains isolated in Nigeria and China (>99%), and for the N8 gene with strains isolated in France and Kazakhstan (>98%). The two genes of the H5N1 subtype were related to a strain isolated in Mauritania, with more than 98% homology.

The affiliation of our strains with the Eurasian lineage of H5Nx viruses was also investigated through phylogenetic analysis, even though the N1 gene appears to be closely related to both lineages. (Eurasian and North American). In terms of zoonotic risk, the danger is certainly real for poultry farm workers. Consequently, well-established action plans and correct gestures must be applied on poultry farms during

epizootics to minimize pathogen transmission.

In conclusion, the study enabled us to characterize the H5N8 and H5N1 viruses circulating in Algeria between 2020 and 2023, as well as their probable origin, which gives us an idea about the origin of H5Nx in their future viruses introductions.

Keywords: Avian influenza, H5N1, H5N8, Algeria, Highly pathogenic influenza.

ملخص

تساهم هذه الدراسة في توصيف سلالات إنفلونزا الطيور شديدة الأمراض (H5Nx) والمسؤولة عن مشاكل تنفسية مصحوبة بموت جماعي للدواجن في الجزائر، وذلك من خلال وضع استراتيجيات وقائية. فقد كان لنوعين من وباء إنفلونزا الطيور تأثير مالي مدمر على القطاع الداجني للمربين من جهة، وعلى توافر المنتجات ومشتقات الدواجن للمستهلك من جهة أخرى. فقد ساهم التعبير السريري والتشريحي الخاص، الذي لم يسبق للأطباء البيطريين مواجهته من قبل، في صعوبة التشخيص والتحكم في هذا الحدث الصحي.

يهدف هذا العمل إلى (i) تحديد السلالات الفيروسية داخل مزارع الدواجن في الجزائر والأنواع الفرعية الموجودة، و(ii) التوصيف الجزيئي والدراسة التطورية الوراثة للسلالات المنتشرة من فيروس إنفلونزا الطيور (AIV). لوحظ بناءً على الملاحظات التشريحية إصابة جهازية للأعضاء مع المتلازمة النزفية الاحتقانية في حالات المرض والنفوق في 16 مزرعة موزعة في المنطقة الوسطى لشمال الجزائر. من بين الأعضاء المستهدفة التي تم جمعها، تم استخلاص الحمض النووي الريبي (ARN) متبوعاً بسلسلة من تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي (RRT-PCR) للكشف عن جين المادة (M) لفيروس الإنفلونزا، بالإضافة إلى تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي (RT-PCR) لتحديد النوع الفرعي للسلالة من خلال توصيف جيني HA وNA.

أظهرت نتائج الكشف عن 77 مزرعة إيجابية لفيروس إنفلونزا الطيور، وتحديد أول وباء خلال الفترة من ديسمبر 2020 إلى ماي 2021، سببته سلالة H5N8 (13 مزرعة)، ووباء ثانٍ من سبتمبر 2022 إلى جويلية 2023 سببه سلالة H5N1 (10 مزارع).

لتعميق التوصيف الجزيئي، ودراسة التطور، وفهم أصل الفيروس، تم إجراء تسلسل باستخدام طريقة سانجر للمحددات المستضدية HA وNA بعد تكثيف الجينات المستهدفة بواسطة RT-PCR وتفاعل بوليميراز متسلسل الشبه المتداخل. أظهر تحليل التسلسلات أن السلالات التي عزلت في الجزائر بأنها تنتمي إلى النمط الإيمراضى العالى بعد الكشف عن موقع تقطع يحتوي على نمط أحماض أمينية متعددة القواعد 'PLREKRRKR/GLF'. أظهرت التسلسلات المحفوظة لجين H5 للنوعين الفرعيين اختلافاً قدره 34 قاعدة تمثل 7 أحماض أمينية (AA) من أصل 567 حمضاً أمينياً محادياً. كما أظهرت مصفوفة التشابه بين تسلسلات كل جين تجانساً للقواعد النكليوتيدية بين 99 و100% لجيني النوع الفرعي H5N8، وأكثر من 99% لجيني النوع الفرعي H5N1. أظهر المحاذاة بين تسلسلات جين H5 (H5N1) والتسلسل الخاص بالسلالة اللقاحية تجانساً نكليوتيدياً بين 90 و91% وتجانساً بيبتيدياً بين 92 و94%.

أظهرت الدراسة التطورية للنوع الفرعي H5N8 تقارباً جينياً لجين H5 مع سلالات معزولة من نيجيريا والصين (<99%)، وكذلك لجين N8 مع سلالات معزولة من فرنسا وكازاخستان (<98%). بينما ارتبط جينا النوع الفرعي H5N1 بسلالة معزولة من موريتانيا بأكثر من 98% تجانساً

تم أيضاً البحث عن انتماء السلالات المعزولة إلى السلالة الأوراسية لفيروسات H5Nx من خلال التحليل التطوري، بالرغم من أن جين N1 يبدو قريباً من السلالتين (الأوراسية والشمال أمريكية). فإن خطر الانتقال إلى البشر حقيقي عبر عمال مزارع الدواجن. لذلك يجب تطبيق خطط عمل محددة وإجراءات صحية في المزارع أثناء الأوبئة لتقليل انتقال مسببات الأمراض في الختام، مكنت هذه الدراسة من توصيف فيروسات H5N8 وH5N1 التي انتشرت في الجزائر بين 2020 و2023، وكذلك أصلها المحتمل، مما يعطينا فكرة عن مصدر فيروسات H5Nx في حالات انتشارها المستقبلية.

الكلمات المفتاحية: إنفلونزا الطيور، H5N1، H5N8، الجزائر، إنفلونزا عالية الأمراض.

TABLE DES MATIERES

Pages

REMERCIEMENTS

RESUME

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : INFLUENZA AVIAIRE	02
I.1. Découverte et Historique	02
I.2. Histoire des épizooties grippales	02
I.3. Taxonomie	02
I.4. Morphologie et principaux composants structuraux et non-structuraux	03
I.4.a. Hémagglutinine	03
I.4.b. Neuraminidase	04
I.4.c. Pompe M2	04
I.4.d. Protéine matricielle M1	05
I.4.e. ARN polymérase	05
I.4.f. Génome viral	05
I.5. Sous-typage	06
I.6. Cycle viral.	06
I.7. Variabilité génétique du virus	09
I.7.a. Glissements antigéniques (Antigenic drift)	09
I.7.b. Cassures antigéniques (Antigenic shift)	09
I.8. Sous-type AIV-H5	09
I.8.a. Pathotype	09
I.8.b. Transmission	10
I.9. Hôte et pathogénicité	11
I.9.a. Oiseaux sauvages	11
I.9.b. Oiseaux domestiques	13
I.9.c. L'Homme	14
I.9.d. Le porc	15
I.10. AIHP H5 en Algérie	15
I.11. Persistance du virus dans l'environnement	16
Chapitre II : DIAGNOSTIC CONVENTIONNEL ET MOLECULAIRE DE L'INFLUENZA AVIAIRE	16
II.1. Diagnostic conventionnel	16
II.2. Diagnostic moléculaire	17
Chapitre III : SURVEILLANCE	18
III.1. Mesures de biosécurité en cas d'épizootie AI	20
III.1.a Au niveau de la ferme	20
III.1.b Au niveau du laboratoire	20
III.2. La prévention par la vaccination	21
III.3. Les organismes internationaux de surveillance	22
III.3.a. Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA)	22
III.3.b. Organisation Mondiale de la Santé (OMS)	22
III.3.c. Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC)	22

TABLE DES MATIERES

PARTIE EXPERIMENTALE	
PARTIE 1 : Nécropsie , détection de l'AIV et sous-typage	
I. MATERIEL ET METHODES	23
I.1 Nécropsie	23
I.1.a. Prélèvements	24
I.2. Détection du virus et sous-typage	25
I.2.a. Diagnostic de l'AIV	25
I.2.b. Sous-typage	26
II. RESULTATS	27
II.1. Lésions nécropsiques	27
II.2. Recherche du gène M de l'AIV	29
II.2.a. Distribution temporelle	30
II.2.b. Distribution géographique	31
II.3. Sous-typage H5	32
II.3.a. Distribution temporelle	35
II.3.b. Distribution géographique	35
II.4. Sous-typage NA	36
III. DISCUSSION	38
PARTIE 2: Caractérisation moléculaire et analyse phylogénétique	
I. MATERIEL ET METHODES	42
I.1. RT-PCR des gènes HA et NA	42
I.2. PCR semi-nichée des gènes HA et NA	42
I.3. Purification de l'ADN et contrôle de la qualité de l'ADN purifié	43
I.4. Préparation des échantillons pour le séquençage	43
I.5. Annotation des séquences	43
I.6. Phylogénie	44
I.7. Détermination des pathotypes	44
II. RESULTATS	45
II.1. RT-PCR des gènes HA	45
II.2. RT-PCR des gènes NA	45
II.3. PCR semi-nichée du gène HA	47
II.4. PCR semi-nichée du gène NA	47
II.5. Sélection des produits PCR pour la purification de l'ADN	48
II.5.a. Contrôle de la purification de l'ADN à partir des produits PCR	49
II.5.b. Contrôle de la purification de l'ADN à partir du gel d'agarose après séparation par électrophorèse	49
II.6. Préparation des échantillons pour le séquençage	50
II.7. Résultats du séquençage	52
II.8. Annotation des séquences	53
II.8.a. Assemblage	53
II.8.b. Contrôle qualité des séquences	53
II.8.c. Alignement multiple	55
II.9. Détermination des pathotypes	63
II.10. Phylogénie	64
II.10.a. Gène H5 (H5N8)	64
II.10.b. Gène NA-N8	66
II.10.c. Gène H5 (H5N1)	68

TABLE DES MATIERES

II.10.d. Gène NA-N1	70
III-DISCUSSION	74
CONCLUSION	78
PERSPECTIVES	79

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

	Pages
Figure 1 : Structure du virus de l'influenza A.	03
Figure 2 : Structure de l'hémagglutinine.	03
Figure 3 : Structure de la neuraminidase.	04
Figure 4 : Structure du canal M2.	04
Figure 5 : Structure de la protéine matrice M1.	05
Figure 6 : Structure de l'enzyme RNpv.	05
Figure 7 : Position des acides sialiques sur les glycoprotéines cellulaires.	06
Figure 8 : Les interactions électrostatiques existants entre la protéine M1, les protéines transmembranaires HA et NA, les RNP et la pompe M2.	07
Figure 9 : Import des ARNv du cytoplasme vers le noyau par les IMP α/β .	07
Figure 10 : Cycle viral du virus de l'Influenza.	08
Figure 11 : Les deux mécanismes de variabilité génétique présents chez l'Influenza.	09
Figure 12 : Les deux pathotypes du virus AI-H5, le motif du CS et leurs tropismes tissulaires.	10
Figure 13 : Spectre d'hôte de l'influenza aviaire.	10
Figure 14 : Les routes migratoires de l'Est de l'Atlantique, du Nord de la Méditerranée et de l'Est de la mer Noire traversant l'Algérie.	12
Figure 15 : Circulation du clade 2.3.4.4-B du virus AIV-H5 entre 2015 et 2018.	12
Figure 16 : Incidence des virus H5N1 HP et H5N8 HP dans le monde durant la dernière décennie (2014-2024) chez les animaux domestiques selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).	13
Figure 17 : Nombre de cas H5N1 humains confirmés rapportés à l'OMS entre 2003-2024.	14
Figure 18 : Cas de H5N1 aviaire déclarés en Algérie.	15
Figure 19 : Les trois étapes de la PCR.	17
Figure 20 : PCR en temps réel.	17
Figure 21 : stratégies de surveillance et modes de transmission du virus influenza aviaire.	18
Figure 22 : Processus d'analyse des risques biologiques au laboratoire.	21
Figure 23 : Laboratoires et centres faisant partie du réseau GISRS.	22
Figure 24 : Différents prélèvements effectués durant l'étude.	24
Figure 25 : Lésions nécropsiques observées.	28
Figure 26 : Distribution temporelle des cas positifs AIV.	30
Figure 27 : La distribution géographique des cas critiques.	31
Figure 28 : Répartition des cas critiques confirmés AI par rapport à l'espèce et au type de production.	32
Figure 29 : Résultats de sous-typage H5 des cas critiques analysés par RT-PCR et révélés par électrophorèse.	32
Figure 30 : La distribution temporelle des élevages positifs H5.	35

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 31 : Distribution géographique des élevages atteints du virus H5 hautement pathogène en Algérie durant les deux épizooties.	35
Figure 32 : Résultats de sous-typage N1 et N8 des cas critiques analysés par RT-PCR.	36
Figure 33 : Tendances saisonnières de l'incidence au niveau mondial de l'IAHP chez la volaille.	40
Figure 34 : La distribution temporelle des élevages positifs H5.	40
Figure 35 : Déclarations du H5Nx des pays africains à l'OMSA-WAHIS.	41
Figure 36 : Résultats de la RT-PCR du gène H5.	45
Figure 37 : Résultats de la RT-PCR du gène NA.	45
Figure 38 : Résultats de la PCR semi-nichée du gène H5 des deux sous-types révélés par électrophorèse.	47
Figure 39 : Résultats de la PCR semi-nichée du gène N8 (H5N8) révélés par électrophorèse.	47
Figure 40 : Résultats de la PCR semi-nichée du gène N1 (H5N1) révélés par électrophorèse.	47
Figure 41 : Résultats de la purification des produits PCR obtenus par RT-PCR et par PCR semi-nichée révélés par électrophorèse.	49
Figure 42 : Résultats de la purification des produits PCR obtenus par RT-PCR, révélés par électrophorèse.	49
Figure 43 : Alignement des séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N8.	54
Figure 44 : Séquences d'acides aminés au niveau du site de clivage du gène HA-H5 des sous-types H5N1 et H5N8.	63
Figure 45 : Séquences d'acides aminés au niveau du site de clivage du gène HA-H5 des deux sous-types et de celui de la souche vaccinale.	63
Figure 46 : Arbre phylogénétique des séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N8 étudiées.	64
Figure 47 : Arbre phylogénétique du consensus du gène HA-H5 du sous-type H5N8, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasienne et Nord-Américaine).	65
Figure 48 : Arbre phylogénétique des séquences du gène NA-N8 du sous-type H5N8 étudiées.	66
Figure 49 : Arbre phylogénétique du consensus du gène NA-N8 du sous-type H5N8, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasienne et Nord-Américaine).	67
Figure 50 : Arbre phylogénétique des séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N1 étudiées.	68
Figure 51 : Arbre phylogénétique du consensus du gène HA-H5 du sous-type H5N1, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée asiatique et Nord-Américaine).	69
Figure 52 : Arbre phylogénétique des séquences du gène NA-N1 étudiées.	70
Figure 53 : Arbre phylogénétique du consensus du gène NA-N1 du sous-type H5N1, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée asiatique et Nord-Américaine).	72
Figure 54 : Récapitulatif des homologies nucléotidiques enregistrées entre les séquences H5 du 1 ^{er} cas H5N8 (PP422233) et les huit séquences des cas restants et H5N1 (PP422959) et les quatre séquences des cas restants.	74
Figure 55 : Les différences observées sur les sites de clivage de nos séquences HA-H5 avec ceux des cas ayant présentés des lésions similaires.	75
Figure 56 : Positionnement des couloirs migratoires des oiseaux sauvages par rapport aux zones humides du nord de l'Algérie. Carte originale réalisée avec ArcGIS for Desktop Basic, modifiée.	76

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPPHIQUES ET TABLEAUX

	Pages
Tableau I : L’histoire des épizooties grippales importantes au fil du temps.	02
Tableau II : Le génome du virus Influenza, la taille et les protéines correspondantes.	06
Tableau III : Modalités de surveillance du virus influenza aviaire.	19
Tableau IV : Résumé des procédures à entreprendre selon l’élément contaminé.	20
Tableau V : Amorces et sondes utilisées pour la recherche du gène M.	25
Tableau VI : Amorces et sondes utilisées pour le sous typage du gène HA-H5.	26
Tableau VII : Amorces utilisées pour le sous typage des gènes H5, N1 et N8.	26
Tableau VIII : La synthèse des résultats de la recherche du gène M en fonction du statut sanitaire.	30
Tableau IX : comparaison des moyennes des Ct enregistrés ciblant le gène M de l’influenza aviaire pour les deux épizooties.	31
Tableau X : Interprétation des résultats du sous typage HA-H5.	34
Tableau XI : Interprétation des résultats du sous typage du gène NA N1, et N8.	37
Tableau XII : Lésions enregistrées en Algérie et celles signalées au Nigeria, en Angleterre, en Serbie, en Hollande, au Kosovo, en France et en Italie.	38
Tableau XIII : Amorces utilisées.	42
Tableau XIV : Interprétation des résultats de la RT-PCR ciblant le gène HA-H5, NA-N1 et N8.	46
Tableau XV : Interprétation des résultats de la PCR semi nichée ciblant les gènes HA-H5, NA-N1 et N8.	48
Tableau XVI : Les ADN purifiées sélectionnés pour le séquençage.	51
Tableau XVII : Informations liées aux séquences obtenues.	52
Tableau XVIII : Résultats d’alignement des deux séquences conservées HA-H5 des sous-types H5N8 et H5N1.	55
Tableau XIX : Résultats d’alignement multiples HA-H5(H5N8).	56
Tableau XX : Résultats d’alignement multiples des séquences NA-N8(H5N8).	58
Tableau XXI : Résultats d’alignement multiples HA-H5 (H5N1).	59
Tableau XXII : Résultats d’alignement multiples NA-N1 (H5N1).	60
Tableau XXIII : Les résultats de l’alignement de nos séquences avec celle de la souche vaccinale.	62

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acides aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AIV : Avian Influenza Virus- Virus de l'influenza aviaire

ARN : Acide ribonucléique

AS : Acide sialique

CS : Cleavage Site- site de clivage

HA : Hémagglutinine

L : Lysine

M : Matrice

NA : Neuraminidase

NLS : Nuclear Localization Signals

PCR : Polymerase Chain Reaction- Réaction de polymérisation en chaîne

R : Arginine

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction- Réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse

RRT-PCR : Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction- Réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse en temps réel.

INTRODUCTION

L'aviculture est une filière conditionnée par la hausse de la population mondiale et des besoins en protéines. La consommation de viande de volaille dans le monde devrait augmenter de 16% d'ici 2033, et représente près de la moitié de l'augmentation totale de la consommation de viandes. Cette situation pourrait s'expliquer par son prix abordable, sa composition nutritionnelle favorable, ainsi que son impact environnemental moindre par rapport aux viandes rouges. La volaille devrait ainsi représenter 43% de la consommation totale de protéines carnées à l'échelle mondiale, confirmant sa place dominante dans les préférences des consommateurs (FAO, 2024).

Le secteur de l'aviculture algérien est en expansion depuis la mise en œuvre d'un programme national visant à atteindre l'autosuffisance du pays en viandes blanches et en œufs de consommation. Bien que la filière a beaucoup progressée en matière de présentation du produit final et en investissant dans des infrastructures de production sophistiquées (Poulet et dinde de chair, poulet et dindes reproducteurs, les accoueurs...), la maîtrise des mesures de biosécurité qui visent à diminuer les problèmes sanitaires n'est pas encore bien introduite au sein des élevages avicoles (Kaci, 2022). Le statut sanitaire de ces élevages est souvent compromis par les maladies bactériennes, parasitaires mais également virales dont le Newcastle disease virus (NDV), la maladie de Marek (MDV), la maladie de Gumboro (IBD) ainsi que l'influenza aviaire (AIV) (Lounas et Mesbah, 2009, Alloui, 2011, Kaci, 2022).

Les *Alpha-influenza-virus* sont des virus à ARN simple brin segmenté faisant partie de la famille des Orthomyxoviridae, ayant une affinité pour le système respiratoire et digestif et doté d'une grande variabilité génétique (Bouvier et al, 2008, Devi et Serala 2021). Leur variabilité génétique est acquise soit par un cumul de mutations, soit par le réassortiment qui est possible grâce à son génome segmenté (Blot et al, 2019). Ils peuvent se propager aisément au sein des élevages avicoles et créer des épidémies à l'échelle mondiale ; cependant la gravité des épizooties diffère selon le sous type et le degré de pathogénicité des souches AIV (Lee et al, 2014). L'hémagglutinine (HA) est la protéine responsable de l'attachement à l'acide sialique lié en $\alpha 2,6$ chez l'Homme ou en $\alpha 2,3$ chez les espèces aviaires au galactose- $\beta 1,4$ -N-acétylglucosamine porté par des glycoprotéines sur les cellules épithéliales (Munier et al, 2010) alors que la neuraminidase clive ces liaisons permettant la libération des virions à la fin du cycle (Pleschka, 2013). Le sous-typage des AIV de type A est basée sur l'hémagglutinine et la neuraminidase (NA) et dix-huit types de HA et onze de NA ont été identifiées (Harder et Warner, 2017).

Le sous type H5 est présent sous deux pathotypes, le hautement (HP) et le faiblement pathogène (FP) ; ce dernier est transmis du réservoir aux oiseaux domestiques où il évolue vers la forme hautement pathogène en amont de sa transmission aux poulets et dindes provoquant des mortalités alarmantes (Wood et al, 1995, Brugere-Picoux, 2005). Le réservoir du virus n'est autre que les oiseaux sauvages migrateurs qui agissent comme des vecteurs des différents sous-types entre les continents et sont tenus responsables de l'introduction de ce dernier dans les élevages de volailles (Blagodatski et al, 2021, Nagy et al, 2023, Zeng et al, 2024). Les deux sous types les plus préoccupants sont bien le H5N1 et le H5N8 HP, provoquant des épidémies récurrentes chez les volailles, plus particulièrement le H5N1 depuis son émergence en 1996 en Chine (A/goose/Guangdong/1/1996).

Le risque zoonotique des deux souches a été détecté à plusieurs reprises pour le H5N1 depuis

son apparition avec 52% de mortalité de 887 cas humains entre 2003 et 2024, cependant ce n'est qu'en 2021 que le H5N8 a infecté des travailleurs en Russie sans causer de maladie ni de mortalité (OMS, 2021, OMS, 2023). Les deux souches appartenant au clade 2.3.4.4b sont largement distribuées en Asie, en Afrique et en Europe depuis 2018 pour le H5N8 et 2021 pour le H5N1 (Peiris et al, 2004, Shi et al, 2023, Zeng et al, 2024).

En Algérie, deux études ont été lancées en 2017 pour diagnostiquer les souches circulantes et les résultats ont montré l'existence du H9N2 avec un taux de mortalité qui a atteint les 60% à Batna (Barberis et al, 2020) et à Fouka (Jeevan et al, 2019). Cependant, les épidémies survenues en 2020-2021 ont été plus dévastatrices avec un nombre accru de cas, des lésions graves et une mortalité dépassant 70%. Un schéma similaire s'est produit en 2022-2023, avec une mortalité plus faible, se situant autour de 40%.

La présente étude est une contribution sur la situation épidémiologique de la grippe aviaire, à travers :

- La détection du H5Nx au sein des élevages avicoles en Algérie et l'identification des sous types existants.
- La caractérisation moléculaire et l'étude phylogénétique des souches AIV circulantes.

Les résultats du présent travail pourraient permettre d'initier la production d'un vaccin et d'interpeler les pouvoirs publics à prendre les mesures nécessaires pour limiter la propagation de ce virus.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : INFLUENZA AVIAIRE

I.1. Découverte et Historique :

Les premières traces de l'AIV ont été décrites à la fin du XIX^{ème} siècle en Europe chez la volaille. Ce dernier fut appelé 'la peste aviaire' car il était confondu avec le choléra avant sa caractérisation en tant que virus au début du XX^{ème} siècle par Centanni and Savunzzi en 1901. Durant cette période, plusieurs fermes avicoles témoignant une mortalité accrue se sont déclarées en Europe suite à la co-circulation du choléra, de la 'pseudo-peste aviaire', caractérisée Newcastle Disease Virus (NDV) aujourd'hui, et le virus grippal (Jacotot, 1950, Lupiani et Reddy, 2009, FLU, 2023).

Ce n'est qu'en 1955 que Von Werner Schäfer a pu prouver, avec des examens sérologiques, que ce virus appartient au groupe des Influenza de type A déjà décrit chez l'Homme (Schäfer, 1955).

I.2. Histoire des épizooties grippales

Les épizooties qui ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique sont les suivantes :

Tableau I : L'histoire des épizooties grippales importantes au fil du temps.

Année	Evènement	Référence
1878	Première mortalité décrite dans les élevages de poulet en Italie liée à l'AIV	(Lupiani et Reddy, 2009)
1959	Une mortalité notable dans un élevage de poulet en Ecosse causée par un H5N1	(Becker et Uys, 1967)
1961	Une première caractérisation de l'AIV hautement pathogène chez des sternes en Afrique du Sud (H5N3)	(Becker, 1966, Lupiani et Reddy, 2009)
1963	Des pertes dans deux élevages de dinde en Angleterre (H7N3)	(Capua et Alexander, 2013)
1966 et 1976	Au Canada, une perte de 8000 dindes en Ontario (H5N9) et 58000 poules à Victoria (H7N7)	
1979	Un élevage de poulet et d'oie en Allemagne (H7N7)	
1983	Quatre élevages infectés en Irlande par le H5N8	(OMS, 1987)
1996 et 1997	Elevage d'oie touchée par le H5N1 HP en Chine	(Wan, 2012)
1999	Elevages de dindes en Italie frappés par le H7N1	(Alexander et Brown, 2009)
2003	Des élevages de poulets touchés dans plusieurs pays d'Europe, d'Asie et d'Afrique par le H5N1	
2004	Perte de plus de 17 000 000 poulets au Canada par le H7N3	

I.3. Taxonomie

Les influenza font partie de la famille des Orthomyxoviridae qui comporte les genres *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Thogotovirus*, et les *Quarantavirus*. L'Influenza responsable de l'atteinte chez les oiseaux et les humains est représentée par l'espèce *Alphainfluenzavirus influenzae* (ICTV, 2022).

I.4. Morphologie et principaux composants structuraux et non-structuraux

L'AIV est un virus enveloppé avec la membrane plasmique issue de la cellule hôte ou les glycoprotéines (HA et NA) et des pompes ioniques (M2) sont ancrées. L'intérieur de l'enveloppe est tapissé d'une protéine matricielle (M1) lui conférant la forme sphérique. Le génome viral est un ARN simple brin à polarité négative fragmenté en huit segments liés chacun à une ARN polymérase (Harder et Warner, 2017, McVey et al, 2022) (Cf. figure 1).

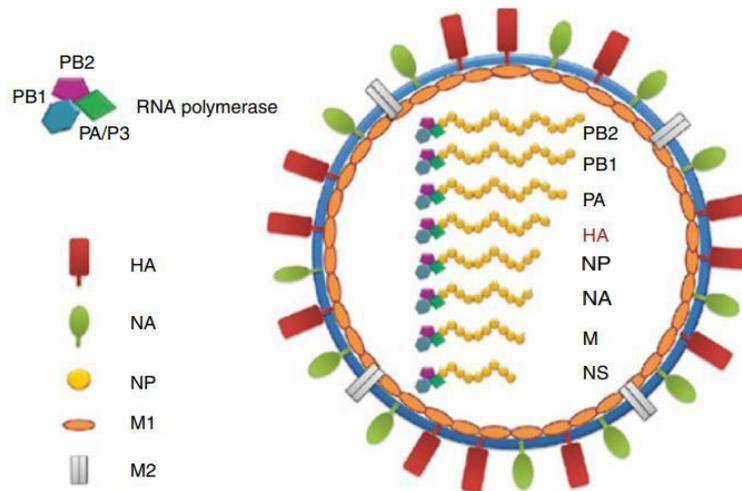


Figure 1 : Structure du virus de l'influenza A (McVey et al, 2022).

I.4.a. Hémagglutinine

C'est une protéine transmembranaire de type 1, c'est-à-dire que la partie N-terminal est extracellulaire, la partie transmembranaire est une hélice et la partie C-terminal est cytosolique. L'hémagglutinine est composée de trois sous-unités identiques (homotrimère) (Cf. figure 2.a) issues chacune d'une protéine précurseur HA0 clivée en HA1 (Cf. figure 2.b) et HA2 polymérase (Chou et Elrod, 1999, Harder et Warner, 2017, McVey et al, 2022) (Cf. figure 2.c).

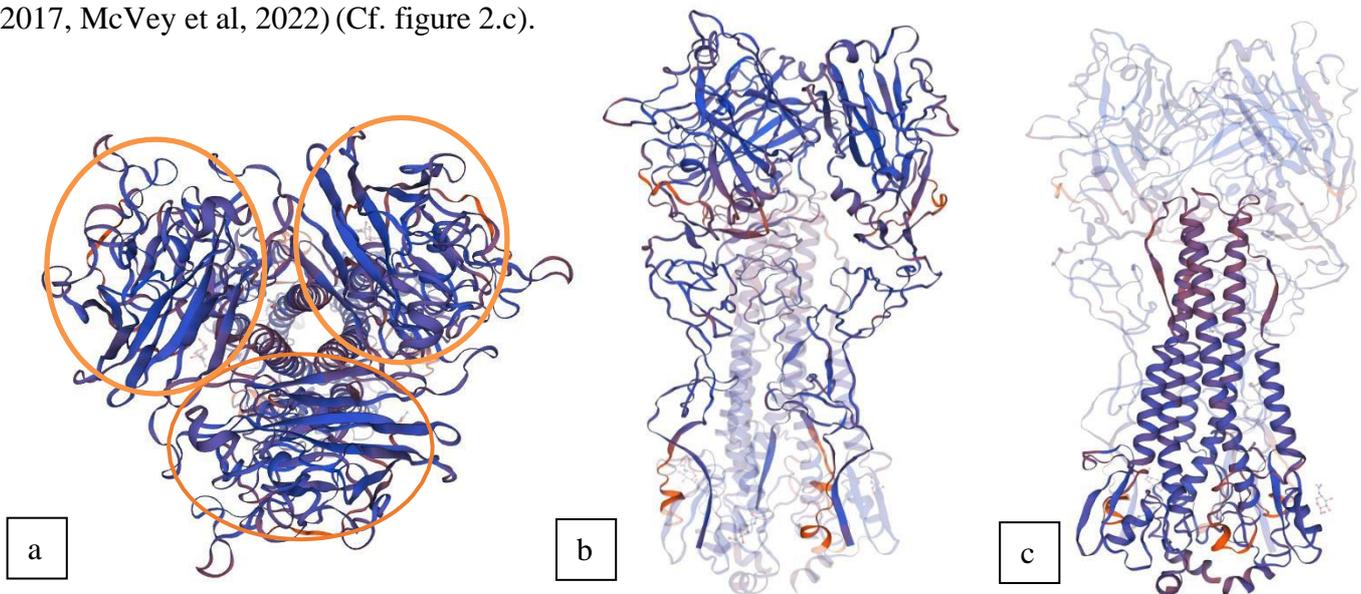


Figure 2 : Structure de l'hémagglutinine (P11132-HEMA_I83A3 sur PDB). a) les trois sous-unités, b) la chaîne polypeptidique HA1, c) la chaîne polypeptidique HA2.

I.4.b. Neuraminidase

La neuraminidase est une protéine transmembranaire de type II, c'est-à-dire que la partie N-terminal est cytosolique, la partie transmembranaire est une hélice et la partie C-terminal est extracellulaire, à fonction enzymatique exosialidique (Cf. figure 3). Elle comporte quatre sous-unités identiques (homotetramère) (Chou et Elrod, 1999, Shtyrya et al, 2009).

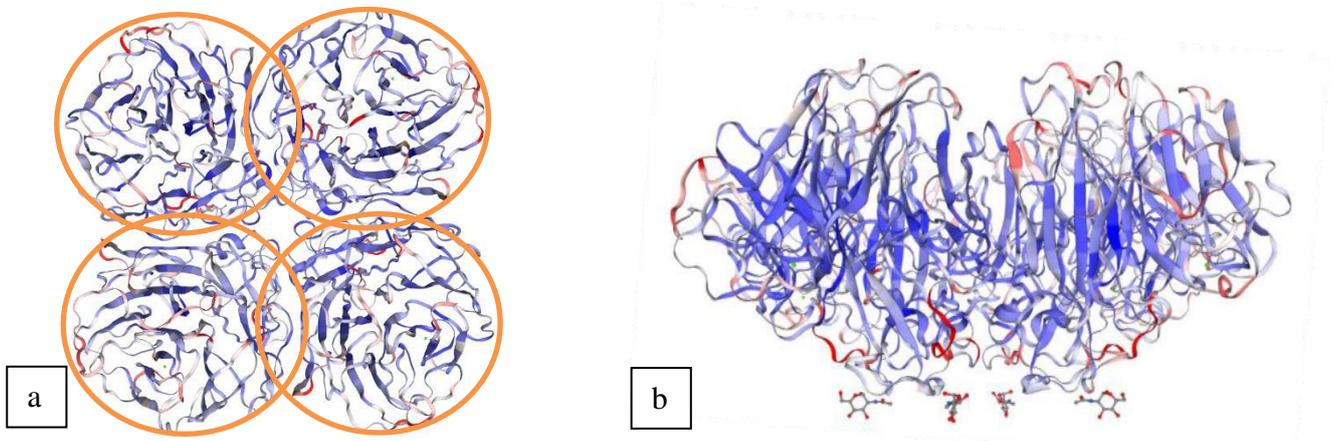


Figure 3 : Structure de la neuraminidase (Q6DPL2-NRAM_I04A1 sur PDB). a) les quatre sous-unités, b) Forme globale.

I.4.c. Pompe M2

La pompe M2 est un canal à proton composé de quatre sous-unités identiques (homotetramère) appartenant au groupe de protéines transmembranaires de type I (Schnell et Chou, 2008, Pielak et Chou, 2011) (Cf. figure 4).

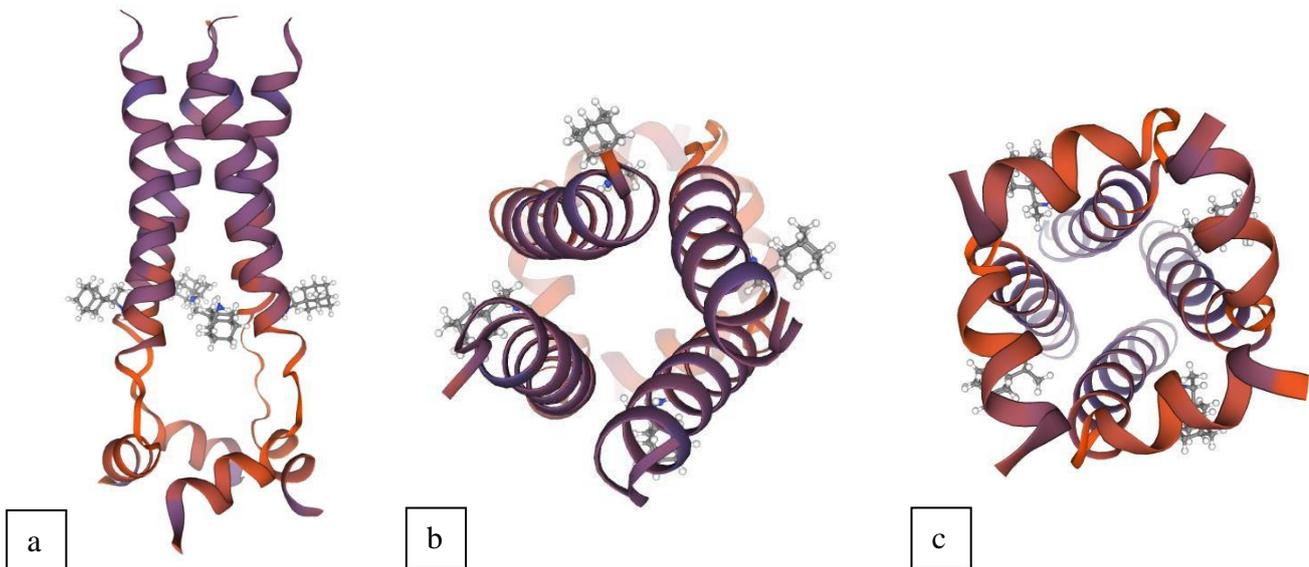


Figure 4 : Structure du canal M2 (P0C5T2-M2_I01A2 sur PDB). a) les quatre sous-unités, b) Partie extracellulaire N-terminale, c) Partie cytosolique C-terminal.

I.4.d. Protéine matricielle M1

C'est une protéine de 252 acides aminés qui forme un oligomère recouvrant l'intérieur de l'enveloppe responsable du maintien et de la stabilité de la forme sphérique du virus. La position de cette matrice lui permet d'interagir également avec le reste des constituants viraux (Hilsch et al, 2014) (Cf. figure 5).

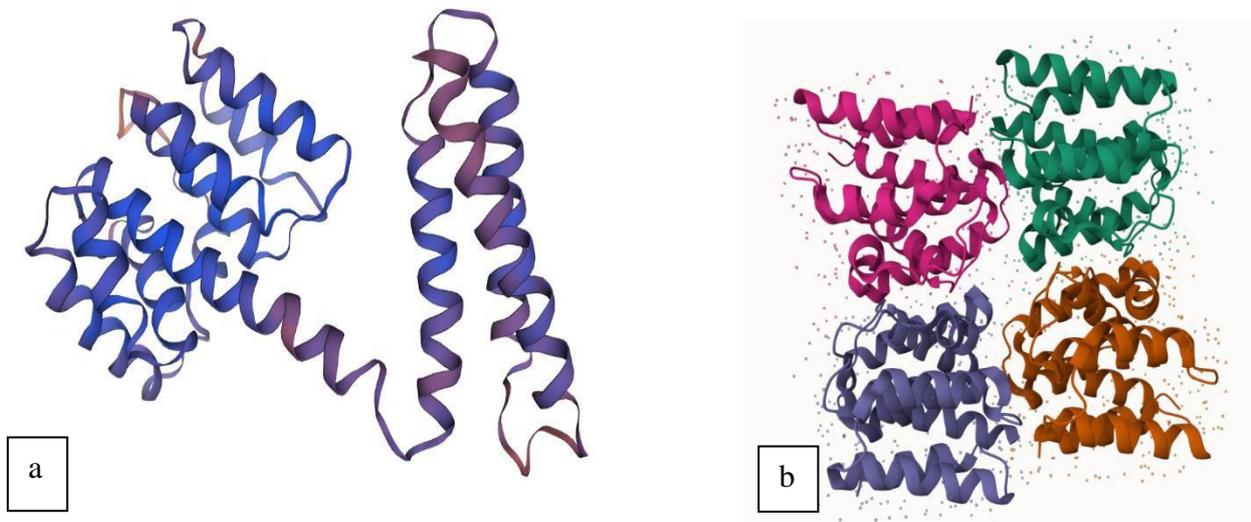


Figure 5 : Structure de la protéine matricielle M1. a) Protéine M1(A0A076VG73_9INFA sur PDB) b) un tétramère de protéine M1.

I.4.e. ARN polymérase

Une enzyme faisant partie de la superfamille des polymérases d'acides nucléiques dépendantes de la matrice, constituée de trois sous-unités à savoir la polymérase basique 2 (PB2), polymérase basique 1 (PB1) et la polymérase acide (PA) (Stubbs et te Velthuis, 2014) (Cf. figure 6).

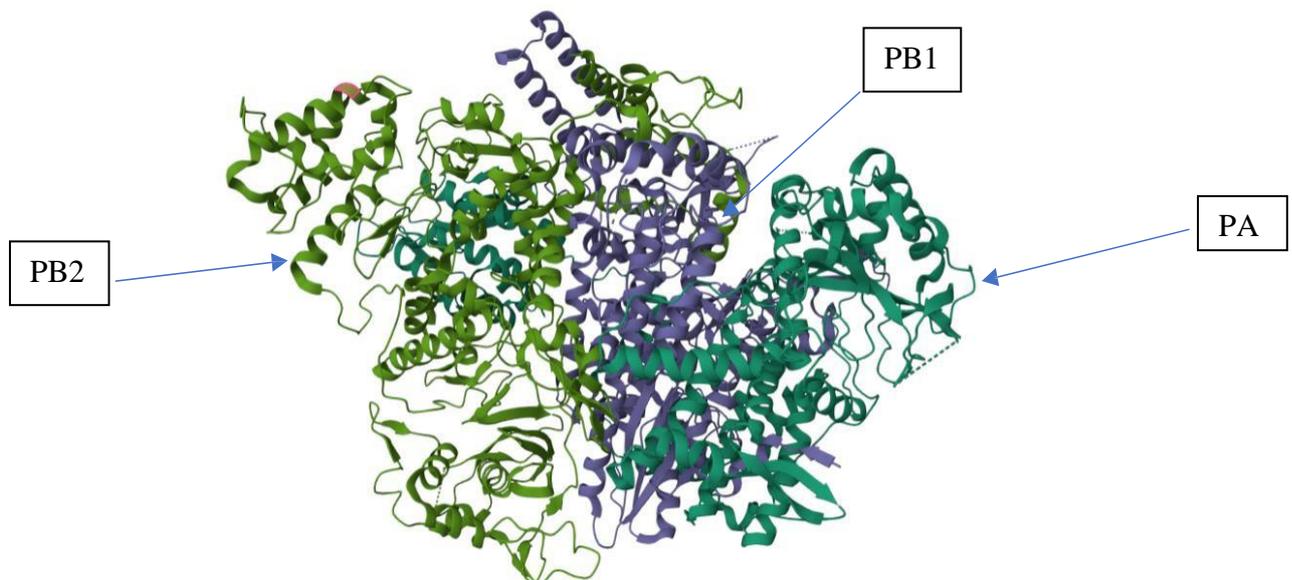


Figure 6 : Structure de l'enzyme ARNpv (5D98 sur PDB).

I.4.f. Génome viral

Le génome viral est constitué de huit segments d'ARN monocaténaire à polarité négative codants pour dix protéines (Cf. tableau II) (Chauhan et Gordon, 2022, McVey et al, 2022, Lal Bhukya et al, 2023). Chaque segment est lié à des nucléoprotéines et une copie de l'ARNpv constituant le complexe ribonucléoprotéine (RNP) (Chauhan et Gordon, 2022).

Tableau II : génome du virus Influenza, la taille et les protéines correspondantes (Lal Bhukya et al, 2023).

Segment ARNv	Protéine codée	Taille (pb)
1	Polymérase basique 2 (PB2)	2316
2	Polymérase basique 1 (PB1)	2316
3	Polymérase acide (PA)	2208
4	Hémagglutinine (HA)	1752
5	Nucléoprotéine (NP)	1540
6	Neuraminidase (NA)	1434
7	Protéine matricielle (M1) et pompe ionique (M2)	1002
8	Protéine non structurale (NS1) et protéine d'export nucléaire (NEP)	865

I.5. Sous-typage

Le sous-typage des AIV de type A est basée sur l'antigénicité des glycoprotéines transmembranaires qui sont l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). En suivant ces critères, dix-huit types de HA et onze de NA ont déjà été détectés. Le sous-type complet est donc déterminé par l'association des deux déterminants antigéniques HA et NA respectivement (Harder et Warner, 2017).

I.6. Cycle viral

○ Attachement et entrée du virus

L'hémagglutinine est la protéine responsable de l'attachement à l'acide sialique lié en $\alpha 2,6$ ou en $\alpha 2,3$ au galactose- $\beta 1,4$ -N-acétylglucosamine porté par des glycoprotéines sur les cellules épithéliales (Cf. figure 7) (Munier et al, 2010). L'acide sialique lié en $\alpha 2,3$ est présent en abondance dans le tractus respiratoire chez les oiseaux à contrario de l'Homme qui possède la conformation $\alpha 2,6$ au niveau des voies supérieures. Cette adhésion est possible après clivage grâce à une protéase, de la HA0 en HA1 et HA2 (Kida et al, 2021), ou le HA1 forme la tête globulaire responsable de la reconnaissance et l'attachement à l'acide sialique (Eriksson, 2019).

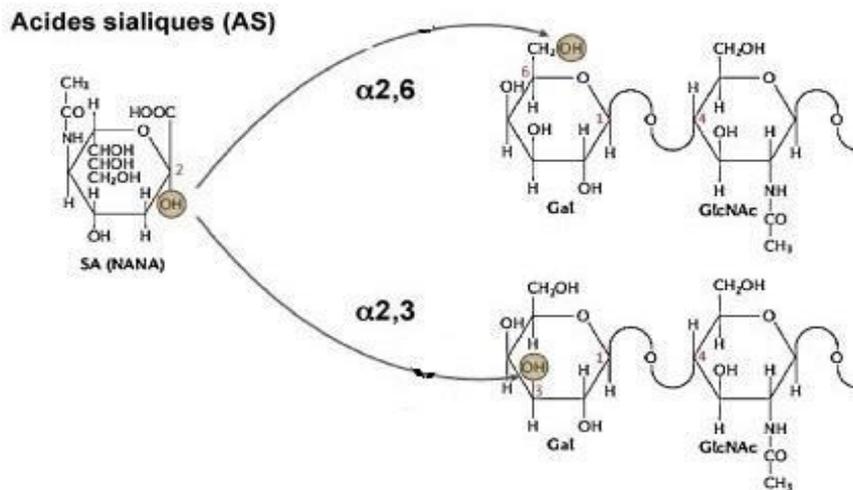


Figure 7 : Position des acides sialiques sur les glycoprotéines cellulaires (Munier et al, 2010).

Une fois le récepteur est lié à la HA, l'entrée du virus par endocytose est réalisée soit par un système spécifique, étant l'endocytose médiée par les clathrines, ou non-spécifique, étant l'endocytose par macropinocytose (Chauhan et Gordon, 2022).

○ **Décapsulation et libération du génome viral**

Le virus à l'intérieur de l'endosome est réactif au milieu acide car la pompe M2 est activée et un transport de H^+ et de K^+ vers l'intérieur du virus est produit. Cette acidification déclenche le HA2 de l'hémagglutinine qui permet la fusion des deux membranes (endosomale et virale) (Lal Bhukya et al, 2023). Le milieu acide de la particule aide à affaiblir les interactions électrostatiques entre les protéines M1 et les NP des RNP (Cf. figure 8) pour permettre leur libération dans le cytoplasme cellulaire et la décapsulation (Pielak et Chou, 2011).

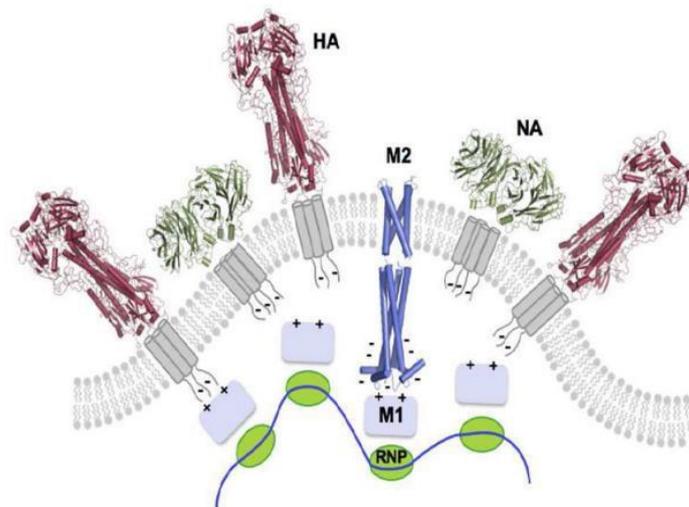


Figure 8 : Les interactions électrostatiques existants entre la protéine M1, les protéines transmembranaires HA et NA, les RNP et la pompe M2 décapsulation (Pielak et Chou, 2011).

○ Réplication et transcription du génome viral

Les segments ARNv libérés dans le cytoplasme sont transportés vers les pores nucléaires par des IMP α/β de la cellule hôte (Importines) (Cf. figure 9) (Miyake et al, 2023). L'importine α fait partie de la famille des karyopherines qui se fixent aux molécules comportant le signal NLS (Nuclear Localization Signals), par la suite c'est l'importine β qui transporte l'ARNv vers le noyau (Di Ventura et Kuhlman, 2016). Au niveau du noyau, la réplication du génome viral est réalisée par l'ARN polymérase qui synthétise en premier lieu les ARN à polarité positive (complémentaire). L'ARN⁺ est utilisé comme matrice pour la synthèse des ARN⁻ génomiques. Par la suite, une partie des ARN⁻ sont utilisés pour la transcription. En premier lieu, la PB2 se lie au 5'-Cap (coiffe- m^7G -cap) (Cap snatching), promoteur de transcription cellulaire. En deuxième lieu, la PA s'implique grâce à son activité endocnucleolytique en clivant la partie fixée par le PB2 pour produire des amorces ARN coiffées. En dernier lieu, la PB1 va utiliser ces amorces ARN cellulaire pour transcrire l'ARNv en ARNm car l'ARN polymérase virale est ARN dépendante (De Vlugt et al, 2018, Gopal et al, 2021).

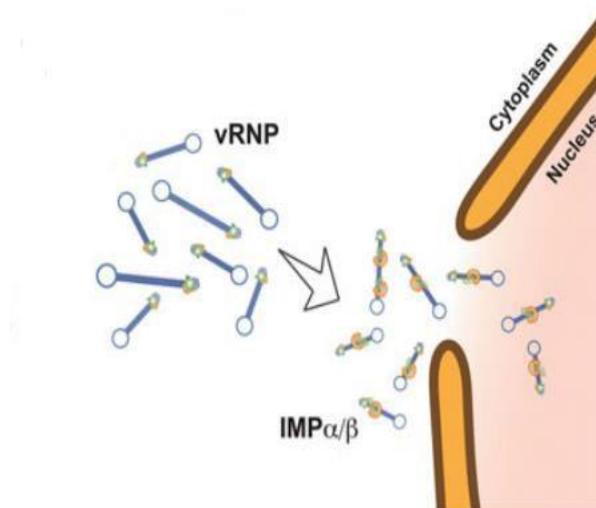


Figure 9 : Import des ARNv du cytoplasme vers le noyau par les IMP α/β (Miyake et al, 2023) modifiée.

○ Synthèse et assemblage des protéines virales

Les ARNm néosynthétisés sont traduits par les ribosomes de la cellule hôte et les protéines M1, PB1, PB2, PA et NP sont importées grâce aux IMP α/β vers le noyau pour se lier au ARNv et former les RNPs. Par la suite, les NEP/NS2 et les CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1 ou exportin1) cellulaires, qui font partie de la superfamille des importines β , exportent les RNPs hors du noyau (Hutten et Kehlenbach, 2007, Gopal et al, 2021). La NS1 est produite précocement durant le cycle viral car il arrive à bloquer l'activité antivirale de la cellule hôte (Song et al, 2021). Les protéines HA, NA et M2 sont transportées vers l'appareil de Golgi pour incorporer la membrane cytoplasmique cellulaire (Gopal et al, 2021).

○ Libération des virions

Les RNPs et les protéines fixées sur la surface de la cellule hôte interagissent avec les M1 et se dirigent vers la membrane cellulaire avec les NS1 et les NS2/NEP. Les M1 bloquent l'import des RNPs vers le noyau car elles masquent les sites d'attachement des IMP α/β . La sortie des virions est effectuée par bourgeonnement

PARTIE BIBLIOGRAPHIE

après assemblage des constituants viraux. La dernière étape consiste à libérer les virions grâce à l'activité de la neuraminidase qui clive les liaisons qui peuvent se créer avec les HA une fois à nouveau en contact avec l'acide sialique en position $\alpha 2,6$ -Gal ou en $\alpha 2,3$ -Gal (Cf. figure 10) (Pleschka, 2013, Behillil, 2019, Gopal et al, 2021).

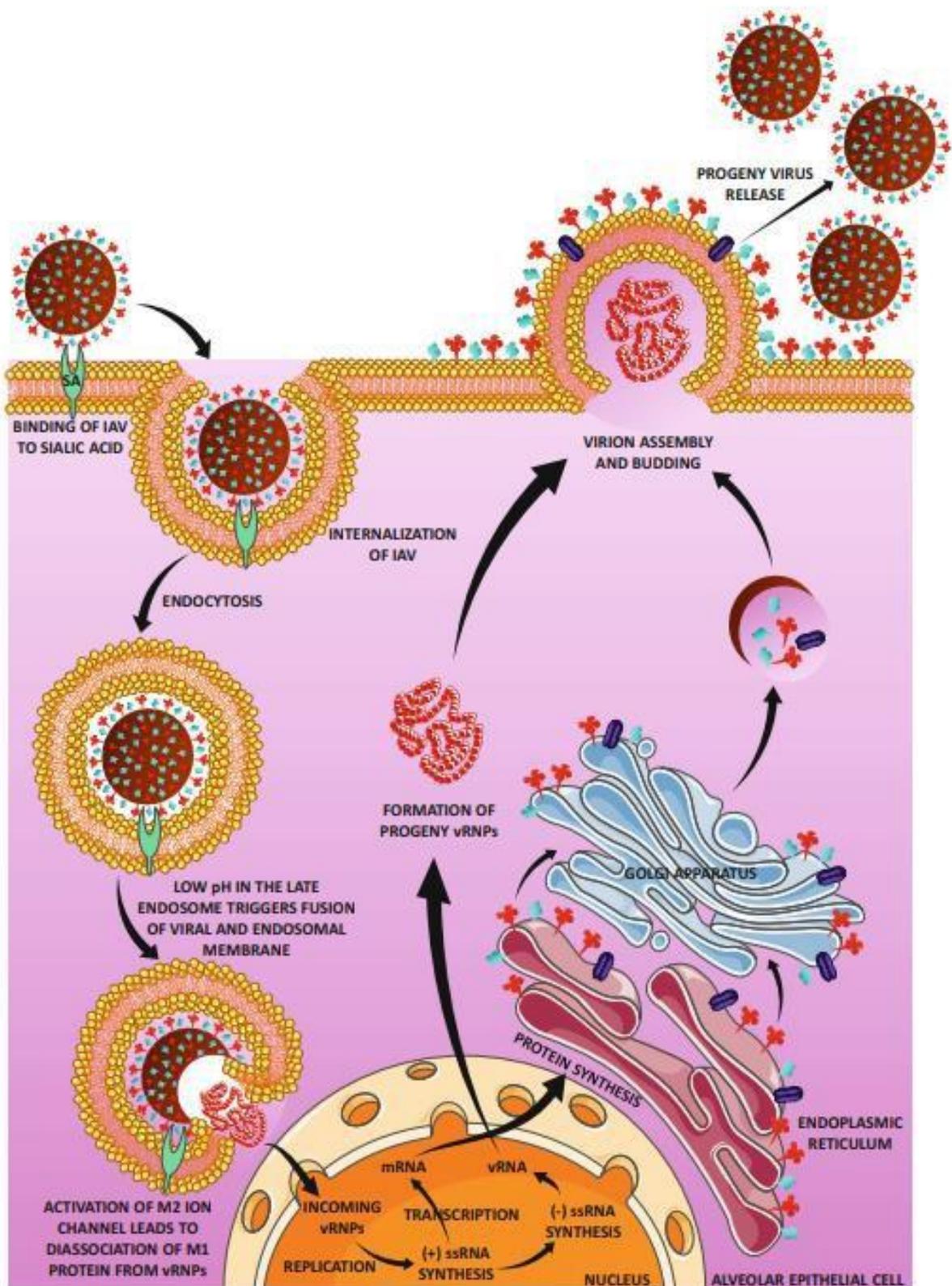


Figure 10 : Cycle viral du virus de l'Influenza (Gopal et al, 2021).

I.7. Variabilité génétique du virus

I.7.a. Glissements antigéniques (Antigenic drift)

C'est un changement au niveau phénotypique des protéines antigéniques HA et NA grâce à un cumul de mutations successives (Landmann et al, 2024). Ces mutations sont dues à l'absence de l'activité 3'-5' exonucléase correctrice des bases erronées de l'ARN polymérase virale avec un taux de mutation d'environ 10^{-4} (Cf. figure 11.a) (Mostafa et al, 2018, Blot et al, 2019, Adnet et Dina, 2021). Le glissement antigénique lui confère une protection contre le système immunitaire qui ne reconnaît plus le virus et peut même élargir son propre spectre d'hôtes (Blot et al, 2019, Payne, 2023).

I.7.b. Cassures antigéniques (Antigenic shift)

C'est un réassortiment des gènes segmentés du virus lors d'une co-infection au sein du même hôte entre deux virus différents (Cf. figure 11.b) (Blot et al, 2019, Adnet et Dina, 2021, Payne, 2023). Ce changement de gènes peut se produire chez le porc car il est détenteur des deux types de récepteurs qui portent l'acide sialique lié en $\alpha 2,6$ (virus humain) et en $\alpha 2,3$ au galactose (virus aviaire) (Scholtissek, 1994). Ces réassortiments donnent lieu à des virus qui peuvent infecter l'Homme en portant les caractères du virus aviaire comme cela s'est produit lors de la grippe espagnole en 1918, la grippe asiatique en 1958 et la grippe de Hong Kong en 1968 causant jusqu'à 40 millions de morts (Pleschka, 2013).

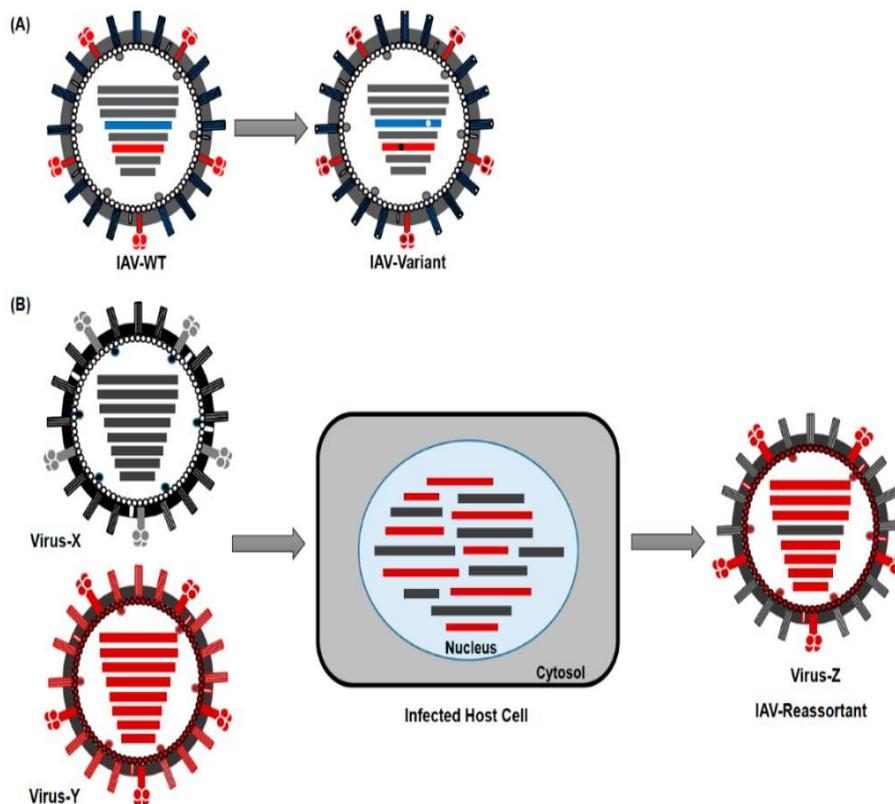


Figure 11 : Les deux mécanismes de variabilité génétique présents chez l'Influenza, a) Glissement antigénique, b) Cassure antigénique (Blot et al, 2019).

I.8. Sous-type AIV-H5

I.8.a. Pathotype

Le pathotype des souches AIV est défini par (i) le site de clivage de l'hémagglutinine (HA0 en HA1 et HA2), (ii) l'indice de pathogénicité intraveineuse (IVPI) supérieur à 1,2 ou (iii) une mortalité de plus de 75% en 10

PARTIE BIBLIOGRAPHIE

jours enregistrée chez les poules inoculées par la souche, caractérisant ainsi les souches hautement pathogènes (HPAI) et celles faiblement pathogènes (LPAI) (Susanti et al, 2015, OMSA, 2021). Concernant le premier critère, les HPAI sont déterminés par la présence de plusieurs AA basiques, particulièrement la lysine et l'arginine, au niveau du site de clivage (CS) permettant au virus AI-H5 de se disséminer de façon systémique grâce à la reconnaissance de ce site multi-basique par les enzymes subtilisin-like extracellulaires (furine, protéine convertases ...) présentes dans tous les tissus. Les LPAI, présentent un site mono ou dibasique au niveau du CS accessible aux enzymes trypsin-like (trypsine, neurotrypsine...) exprimées au sein du système respiratoire et gastrointestinal, restreignant la dissémination du virus (Cf. figure 12) (Vojcic et al, 2015, Harder et Warner, 2017, Baird, 2017, Payne, 2023).

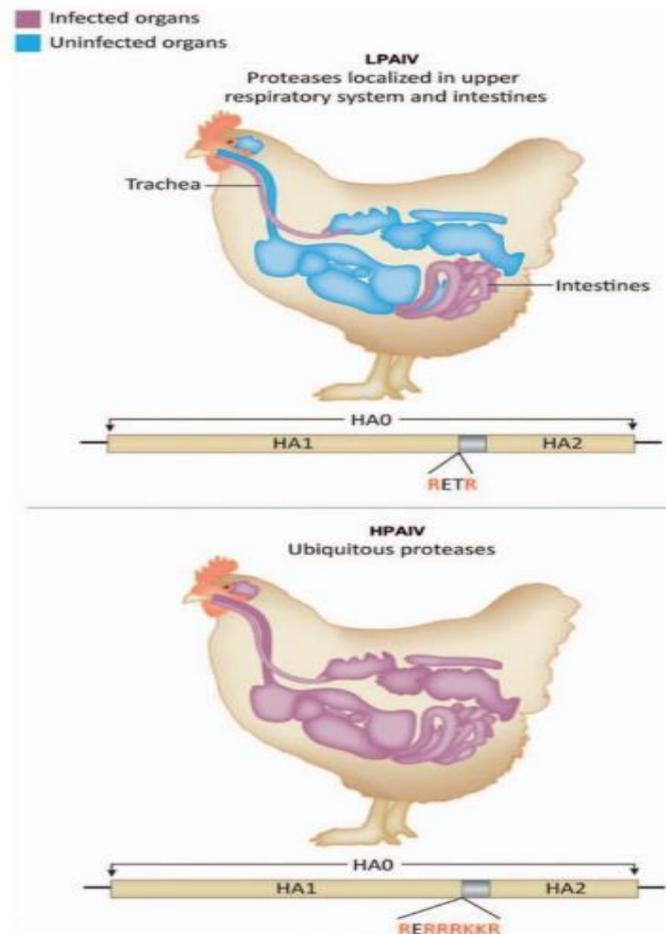


Figure 12 : Les deux pathotypes du virus AI-H5, le motif du CS et leurs tropismes tissulaires (Payne, 2023).

I.8.b Transmission

Le virus de l'influenza aviaire peut infecter les mammifères dont les humains, les porcs, les félins, les chiens, les mustélinés et les chevaux (Cf. figure 13) (Capua et Alexander, 2013, McVey et al, 2022). Le virus peut être transmis de façon directe, principalement à travers les voies respiratoires ou par transmission oro-fecale. L'ingestion d'eau contaminée par les fèces des oiseaux malades, les fomites et les insectes (transport mécanique) peuvent être considérées comme des moyens de transmission indirecte (Yashpal et al, 2021).

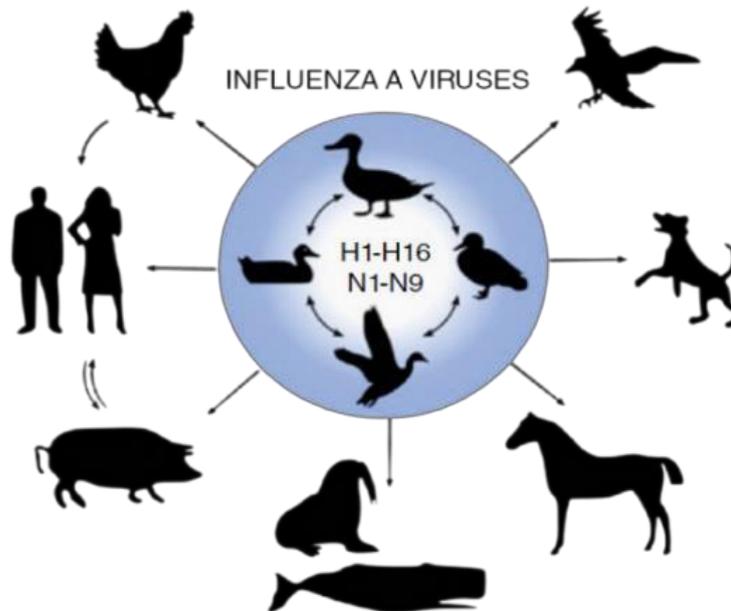


Figure 13 : Spectre d'hôte de l'influenza aviaire (McVey et al, 2022).

I.9. Hôte et pathogénicité

I.9.a. Oiseaux sauvages

Les oiseaux sauvages aquatiques sont considérés comme le réservoir naturel de l'Influenza, particulièrement les Anseriformes (canard et oie), Charadriiformes (mouette et limicole), et Gruiformes (grues) (MacLean et Beaufrère, 2015, Harder et Warner, 2017, Reperant et Osterhaus, 2023.). Le premier cas d'influenza isolé d'un oiseau sauvage était en 1961 en Afrique du Sud (A/tern/South Africa/61 (H5N3)), et depuis, la surveillance, au sein de la population des oiseaux migrateurs, a débuté dans les années 70 (Becker, 1966, Lupiani et Reddy, 2009, Capua et Alexander, 2013).

Les formes faiblement pathogènes du virus AI-H5 sont généralement isolées chez les oiseaux migrateurs qui ne présentent pas de symptômes (Brown, 2010, Yashpal et al, 2021). Ces derniers sont incriminés lors des épizooties à AI-H5 même s'ils portent la forme LPAI. En effet, des études ont montré que les formes HPAI détectés chez les oiseaux d'élevages étaient à l'origine des LPAI qui ont mutées lors de leur transmission et ces changements au niveau du CS sont, soit (OMSA, 2021) :

- Des substitutions d'acides aminés (AA) non basiques par d'autres basiques (arginine ou lysine).
- Des duplications de codons à partir du CS.
- Des insertions des AA de source inconnue.
- Allongement du CS par des insertions des séquences appartenant aux autres gènes du virus ou de l'hôte.
- Perte de sites de glycosylation spécifique associée à des AA basiques.

Le virus est transporté par les oiseaux migrateurs pour de longues distances et des réassortiments entre les différents sous-types peuvent se produire lors de leurs rassemblements au niveau des différents points d'eau présents sur leur trajectoire suite à une excrétion du virus dans l'eau jusqu'à 20 jours après l'infection (OMSA, 2016, Killian, 2020).

➤ Circulation géographique

Les oiseaux sauvages empruntent huit flux migratoires différents selon l'espèce, ceux de l'Amérique du Nord atterrissent au Sud du même continent alors que ceux de l'Asie s'arrêtent en Afrique (Perdue et Seal, 2000, Yashpal et al, 2021). L'avifaune migratrice traversant le territoire algérien suit les routes migratoires de l'Est de l'Atlantique, du Nord de la Méditerranée et de l'Est de la mer Noire. Les *Anseriformes* et les *Charadriiformes*, réservoir naturel de l'AIV, atterrissent dans les zones humides d'Algérie (Cf. figure 14) (Hamoudi et al, 2020). Les oiseaux sauvages d'Asie du Sud-Est empruntent également une route migratoire qui traverse le centre de l'Algérie pour atteindre l'Amérique centrale (Xie et al, 2023).

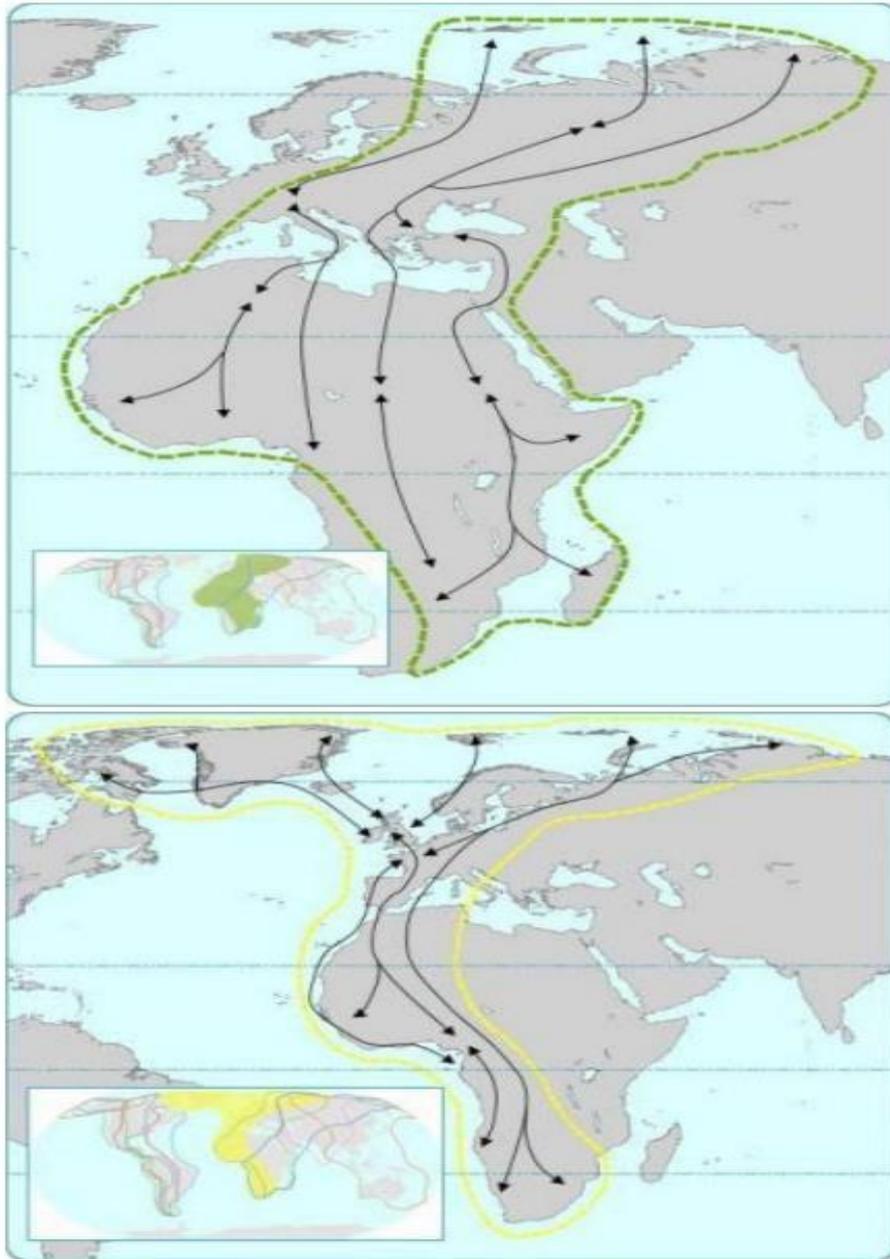


Figure 14 : Les routes migratoires de l'Est de l'Atlantique, du Nord de la Méditerranée et de l'Est de la mer Noire traversant l'Algérie (Hamoudi et al, 2020).

Selon Fusaro et al. (2019), l'introduction des virus H5 (Clades 2.2, 2.3.2.1c et 2.3.4.4-B) entre 2005 et 2018 en Afrique est très probablement de l'Est et du Nord-Centrale asiatique (Cf. figure 15).

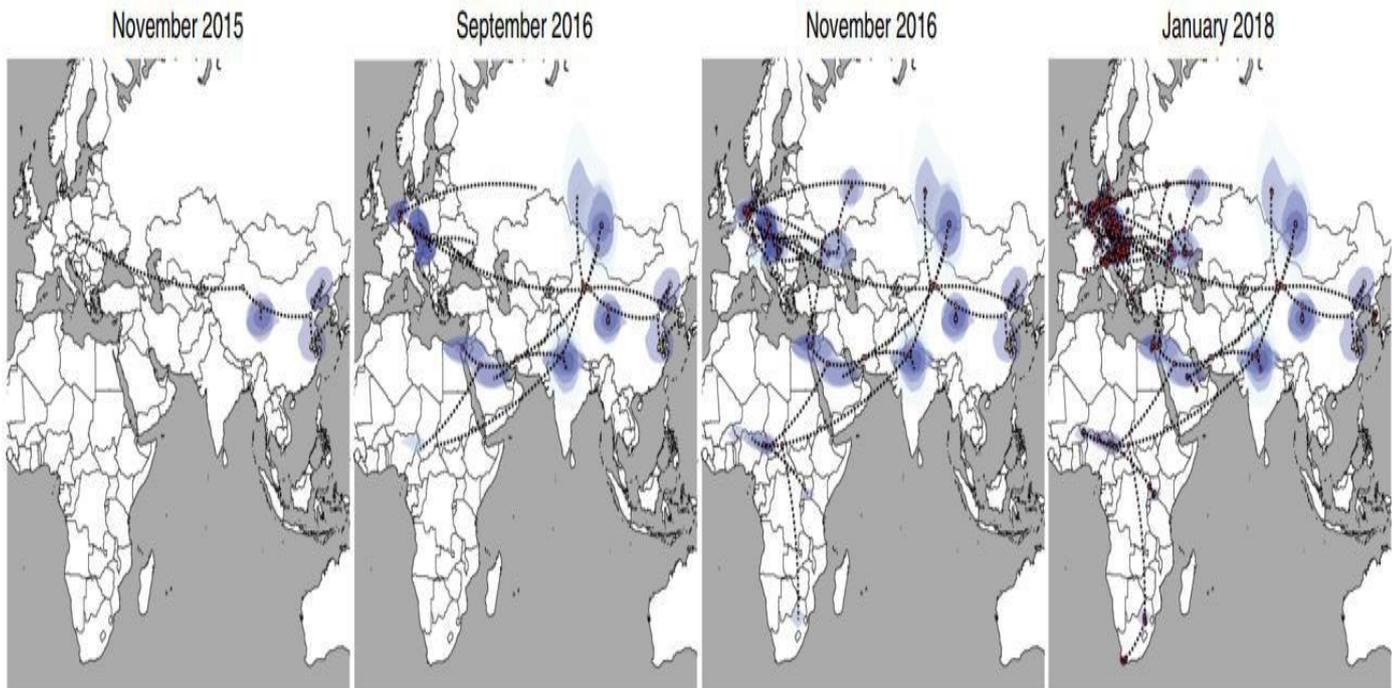


Figure 15 : Circulation du clade 2.3.4.4-B du virus AIV-H5 entre 2015 et 2018 (Fusaro et al, 2019).

I.9.b. Oiseaux domestiques

La volaille (poules, dindes et canards) contracte le virus AIV-H5 par les oiseaux sauvages par voie directe ou indirecte. La souche isolée d'un élevage d'oies de Guandong en Chine en 1996 (A/goose/Guangdong/1996(H5N1)) est considérée comme l'ancêtre des souches virulentes HP causales de mortalité accrue dans les élevages avicoles en Asie, Europe et en Afrique (Alexander et Capua, 2008, Wan et al, 2012,). Le sous-type H5N8 HP a été isolé également en Chine en 2010 d'un élevage de poulets, résultant d'un réassortiment avec le H5N1 asiatique ancestral (Zhao et al, 2013).

L'incidence du virus H5N1 et H5N8 HP dans le monde durant la dernière décennie (2014-2024) chez les animaux domestiques est représentée dans la figure 16.a et 16.b respectivement.

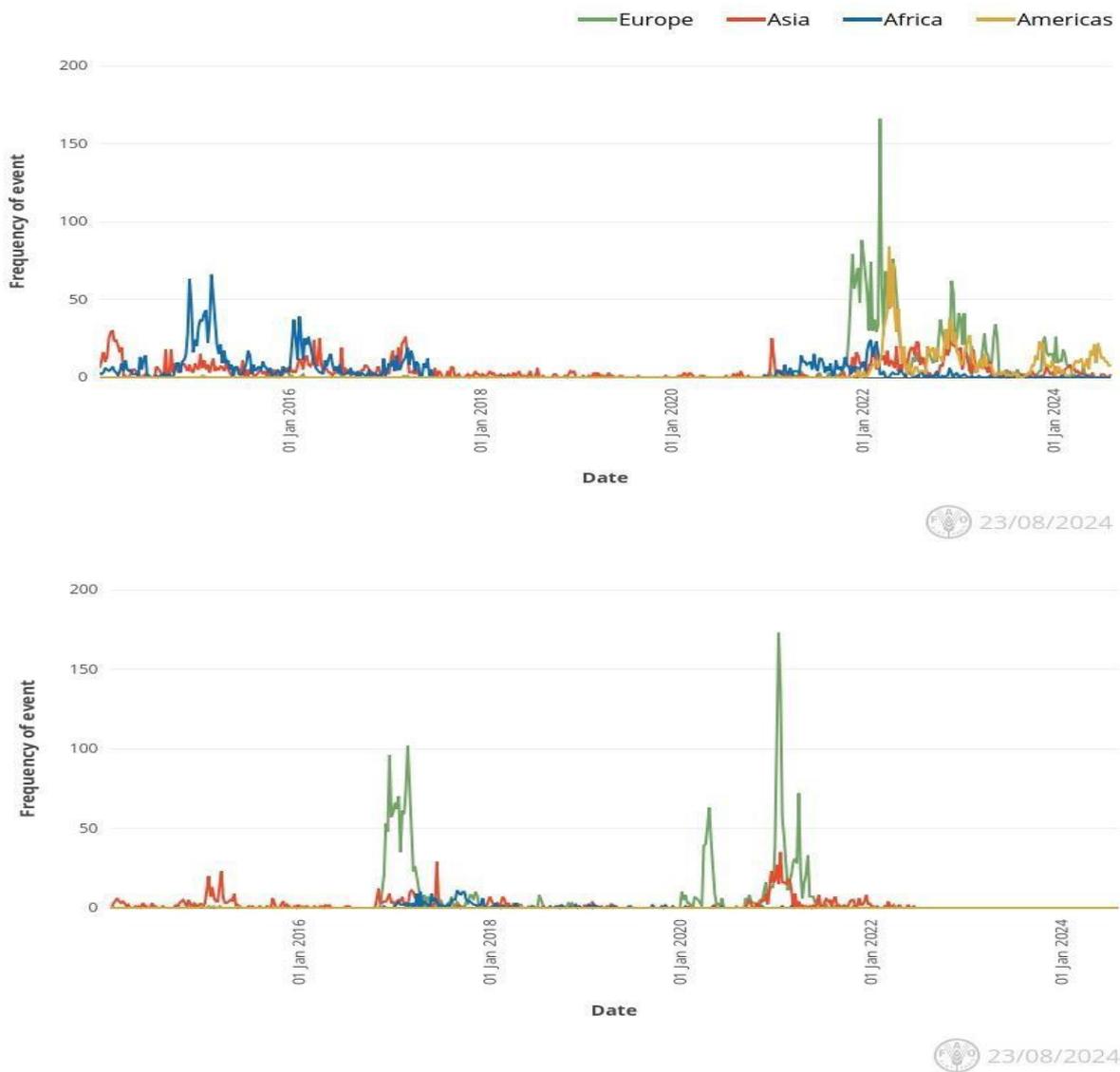


Figure 16 (a, b) : Incidence des virus H5N1 HP (a) et H5N8 HP (b) dans le monde durant la dernière décennie (2014-2024) chez les animaux domestiques selon l’Organisation des Nations Unies pour l’alimentation et l’agriculture (FAO) (FAO, 2024).

La forme HPAI contractée par la volaille donne lieu à une mortalité de 100% entre 48 et 72 H chez les dindes et les poulets, cependant, il n’existe pas de lésions pathognomoniques chez les oiseaux liées au sous type AIV-H5 (Thomas et al, 2007, Capua et Alexander, 2013). Les signes cliniques varient selon plusieurs facteurs dont l’état de l’hôte, l’espèce, la souche virale, l’âge et l’environnement. Les souches hautement virulentes provoquent une mort subite sans expression de symptômes (cas suraigus). Les signes cliniques incluent la détresse respiratoire, la cyanose des caroncules, de la crête et des jarrets, des yeux et des sinus humides, un œdème de la tête et des paupières, des plumes hérissées, une diarrhée et des signes nerveux (incoordination). Chez les espèces ponduses, une baisse de ponte est remarquée, rarement réversible (Harder et Warner, 2017, FAO, 2024).

Sur le plan lésionnel, des hémorragies et des congestions au niveau des séreuses et des muqueuses sur le parenchyme des viscères incluant le proventricule, les poumons, la trachée, l’épicarde et péricarde, la rate, le pancréas, les amygdales caecales. Chez la dinde, on peut guetter la congestion des reins. La forme LPAI est plus grave chez la dinde que chez le poulet, qui peut causer une mortalité pouvant atteindre les 90% et 2

PARTIE BIBLIOGRAPHIE

à 3% respectivement, souvent aggravée par les surinfections bactériennes (*Mycoplasmes*, *Pasteurellas* ou par des *Escherichia coli*) ou virales (HEV, NDV, Adénovirus, réovirus...). Chez la dinde, les signes cliniques sont limités à une détresse respiratoire, perte de poids, plumage ébouriffée, apathie, perte de production des œufs ... etc. Les observations nécroscopiques ont montré la présence de congestions au niveau des trachées, des poumons, de la rate et du pancréas accompagnée de pétéchies sur les amygdales caecales et l'épicarde. Chez le poulet, les signes balancent entre râles et toux associés parfois à une conjonctivite, une somnolence et une perte d'appétit. A la nécropsie, une congestion trachéale (parfois catarrhale) et pulmonaire peuvent être observée (Capua et Alexander,2013).

I.9.c. L'Homme

L'être humain peut contracter la maladie par inhalation des particules virales portées par des aérosols ou diffusée par les fèces, ou même celles présentes sur des conjonctivites ou des plaies extérieures sur la volaille ou des cadavres. Les populations les plus susceptible à être contaminées sont les travailleurs dans les fermes avicoles et les laborantins manipulant le virus (Song et al, 2021). Les premiers cas humains connus causés par le sous-type H5 étaient dû au H5N1 en Chine en 1997 ou 18 personnes ont été infectées et 6 sont mortes à la suite d'une épizootie de H5N1 en mars de la même année (Tam, 2002, Capua et Alexander,2013). Les cas de H5N1 humain enregistrés entre 2003 et 2024 sont de 887 dont 52% de mortalité selon l'OMS, avec 359 cas enregistrés en Egypte (Cf. figure 17) (OMS,2024).

Country	2003-2009*		2010-2014*		2015-2019*		2020		2021		2022		2023		2024		Total	
	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths
Azerbaijan	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	1	0	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1
Cambodia	9	7	47	30	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4	5	1	67	42
Canada	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Chile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
China	38	25	9	5	6	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	55	32
Djibouti	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ecuador	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Egypt	90	27	120	50	149	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	359	120
India	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
Indonesia	162	134	35	31	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	168
Iraq	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Lao People's Democratic Republic	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Myanmar	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nepal	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Nigeria	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Pakistan	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1
Spain	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0
Thailand	25	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	17
Turkey	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	4
United Kingdom	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	5	0
United States of America	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Viet Nam	112	57	15	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	128	64
Total	468	282	233	125	160	48	1	0	2	1	6	1	12	4	5	1	887	462

Figure 17 : Nombre de cas H5N1 humains confirmés rapportés à l'OMS entre 2003-2024 (OMS,2024).

Les cas H5N1 humains les plus récents appartiennent au clade 2.3.4.4b, dont celui de Victoria en Australie en mai 2024 et celui du Texas aux Etats-Unis en avril 2024 (Kang et al, 2024). Avant 2021, aucun cas humain de H5N8 n'a été enregistré jusqu'à ce que la Russie déclare sept travailleurs dans un élevage déclaré H5N8 appartenant au clade 2.3.4.4b qui n'ont exprimé aucun symptôme (OMS,2024). Dans le cas où les patients expriment des symptômes, on a un tableau standard de la grippe (fièvre, toux, maux de tête, asthénie, écoulement nasal), cependant, ils peuvent s'aggraver en virémie, atteinte du système gastro intestinal et nerveux (Song et al, 2021, Kang et al, 2024).

I.9.d. Le porc

Le porc est particulièrement affecté par les sous-types H1N1, H3N2, et H1N2, cependant, il est considéré comme une cuve pour tous les sous-types ayant une préférence pour l'Homme et l'espèce aviaire (Lipatov et al, 2008, Sreenivasan et al, 2019). Il a été démontré que l'excrétion du virus commence après 24h de l'infection et dure entre 7 et 10 jours et que la dinde est plus susceptible au virus influenza porcin que le poulet (Pleschka, 2013, Manuel terrestre-OMSA,2021). Le virus H5N1 semble ne pas provoquer un tableau clinique inquiétant chez le porc, l'excrétion et la dissémination tissulaire du virus est également réduite (Lipatov et al, 2008).

I.10. AIHP H5 en Algérie

L'Algérie a déclaré deux cas de H5N8 en 2021 à l'Organisation mondiale de la santé animale (OMSA), le premier étant à Oum Bouaghi (08/02/2021) dans un élevage de volaille et un deuxième à Batna (31/03/2021) chez des grives musiciennes (Centre national de veille zoonitaire en Tunisie ,2021, Notifications immédiates en Afrique – OMSA). En ce qui concerne le H5N1, quatre élevages de volailles ont été notifié à l'OMSA durant le dernier trimestre de 2022, à Médéa le 24/09/2022, à Mila le 20/11/2022, à Sétif le 21/11/2022 et à Bordj Bou Arreridj le 22/11/2022 (Cf. figure 18) (WAHIS, 2022).



Figure 18 : Cas de H5N1 aviaire déclarés en Algérie (WAHIS, 2022)

I.11. Persistance du virus dans l'environnement

La charge virale peut atteindre 10^7 particules virales/g, il peut survivre plus de 44 jours dans les excréments des oiseaux atteints (Capua et Alexander, 2013). Dans les eaux de surface, les virions peuvent rester infectieux jusqu'à 7 mois à une température qui avoisine le 0°C et un PH neutre (Blagodatski et al, 2021). Il a été démontré que le sous-type H5N1 peut tenir jusqu'à 26 heures sur les surfaces en plastique et 4.5 heures sur la peau humaine (Bandou et al, 2022). Les conditions optimales pour la survie du virus dans la nature incluent un PH entre 7.4– 8.2, une température de moins de 17 C° et une salinité entre 0–20,000 parties par millions (ppm) (Brown et al, 2009).

CHAPITRE II : DIAGNOSTIC CONVENTIONNEL ET MOLECULAIRE DE L'INFLUENZA AVIAIRE

Le diagnostic de l'AIV est établi selon les méthodes recommandées par l'OMSA (Capua et Alexander,2013), soit avec des méthodes directes et conventionnelles soit via des outils de biologie moléculaire.

II.1. Diagnostic conventionnel

- **Isolement viral**

L'isolement du virus de l'influenza nécessite des œufs de poule embryonnés exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) (9 à 11 jours) inoculés par des échantillons déjà collectés et préparés. L'injection de l'échantillon est réalisée dans le liquide allantoïdien. Les œufs sont par la suite incubés à 37°C pendant 7 jours, et le liquide allantoïdien est retirée pour détecter la présence du virus par les tests suivants :

- **Test d'hémagglutination sur boîte de Petri (test HA rapide)**

La multiplication virale est vérifiée par la mise en évidence de l'activité hémagglutinante de la protéine HA. Le liquide allantoïdien est mis en contact avec une suspension des globules rouges (1%) sur une boîte de Pétri pendant 30 à 60 secondes.

- **Test d'hémagglutination sur microplaque (test de micro-neutralisation)**

Le test consiste à préparer des suspensions de virus et de globules rouges, puis à les ajouter dans une microplaque de 96 puits. Une dilution de la suspension virale est réalisée avant d'ajouter celle des globules rouges, par la suite, la plaque est incubée à 4°C pendant 40 min ou à une température ambiante pendant 30 min. L'agglutination des globules rouges indique la présence du virus. L'intensité de l'agglutination permet de déterminer le titre viral et donc la charge virale présente dans l'échantillon.

- **Test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)**

Le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est réalisé pour détecter un sous-type spécifique du virus de l'influenza dans un échantillon. Le protocole nécessite une suspension de globules rouges de poulet, une solution tampon (PBS), un antisérum et une suspension virale. L'antisérum est ensuite dilué en série dans une plaque de micro-titration de 96 puits. On ajoute ensuite une quantité fixe du virus de l'influenza à chaque puits contenant les dilutions de sérum et on incube la plaque à 4°C pendant 40 min ou à une température ambiante pendant 30 min. Une deuxième incubation est réalisée après ajout de la suspension d'érythrocytes dans les mêmes conditions. L'inhibition complète de l'hémagglutination indique que le virus du sous-type correspondant est présent dans l'échantillon. D'autres tests sont recommandés tel le test d'inhibition de la neuraminidase (caractérisation de la NA), le test de pathogénicité in vivo (Evaluation de la virulence) ou les tests Elisa (détection des anticorps contre l'Influenza A).

II.2. Diagnostic moléculaire

• PCR après transcription inverse (RT-PCR)

La RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) est une technique de biologie moléculaire visant à amplifier un gène spécifique par une ADN polymérase I issue de la bactérie *Thermus aquaticus*. Dans le cas du virus de l'influenza, un virus à ARN, un ADN complémentaire est formé avant l'étape de l'amplification proprement dite par une retro-transcriptase (Larzul,1989). Une extraction du génome viral est réalisée en aval à la PCR. La réaction comprend les 3 étapes suivantes entre 30 et 40 répétitions : dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces, synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase (Cf. figure 19). La RT-PCR peut être effectuée en deux étapes (Transcription inverse séparée de l'amplification) ou en une étape (transcription inverse et amplification dans la même réaction). La révélation de l'ADN est possible par électrophorèse sur gel d'agarose.

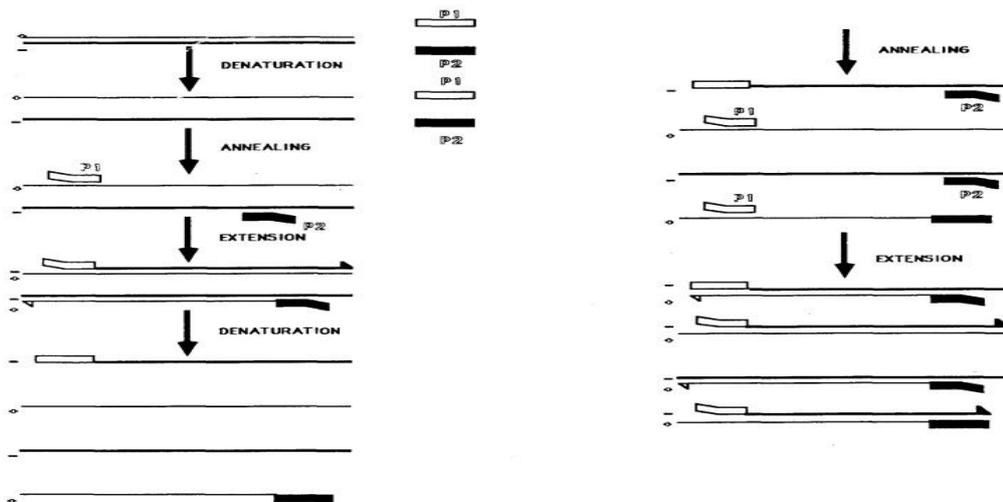


Figure 19 : Les trois étapes de la PCR (Larzul,1989).

• PCR en temps réel

L'amplification en chaîne par polymérase en temps réel est une PCR quantitative basé sur l'émission de fluorescence à chaque production d'une copie d'ADN par l'ADN polymérase. Plusieurs types d'émetteur de fluorescence sont utilisés dont la technologie Taqman (hydrolyse des sondes). A chaque fois que la sonde, portant le reporter et le quencher, fixée sur un brin d'ADN est libérée par la Taq, un signal est émis par le reporter et est réceptionné par le logiciel donnant lieu à une courbe témoignant l'amplification du gène cible (Poitras et Houde, 2002) (Cf. figure 20.a et b).

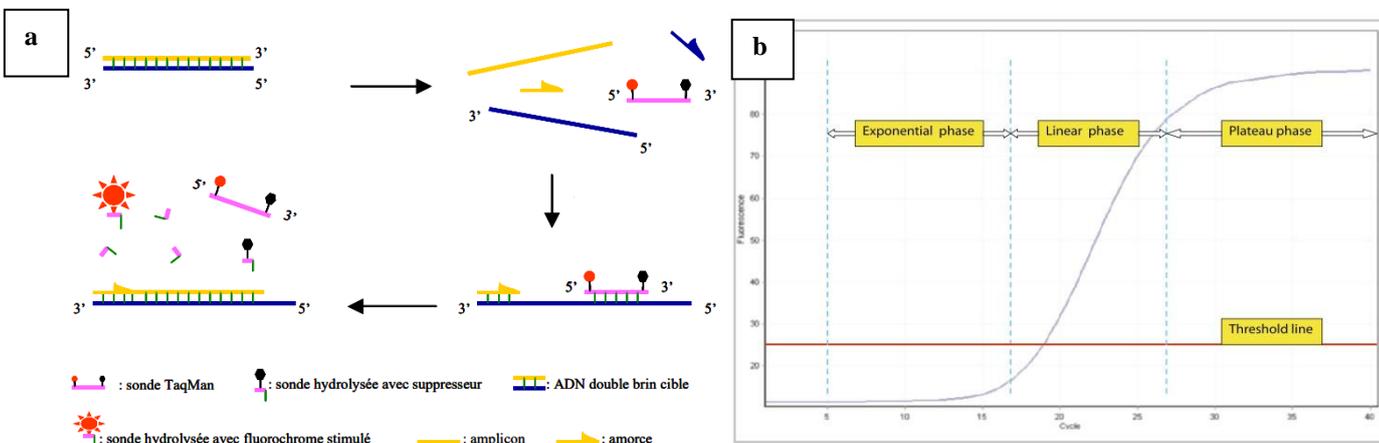


Figure 20 : PCR en temps réel. a) Hydrolyse des sondes (Taqman), b) Courbe d'amplification de la PCR en temps réel (Poitras et Houde, 2002).

CHAPITRE III : SURVEILLANCE

L'influenza aviaire hautement pathogène, indépendamment du sous-type, est une maladie à déclaration obligatoire à l'OMSA chez les oiseaux domestiques (volaille ou autres) et sauvages (Influenza aviaire – OMSA). La surveillance de l'Influenza aviaire devrait être axée sur l'environnement, le réservoir, en l'occurrence les oiseaux sauvages, les oiseaux d'élevage et l'Homme (Cf. figure 21 et tableau III) (Duan et al, 2023).

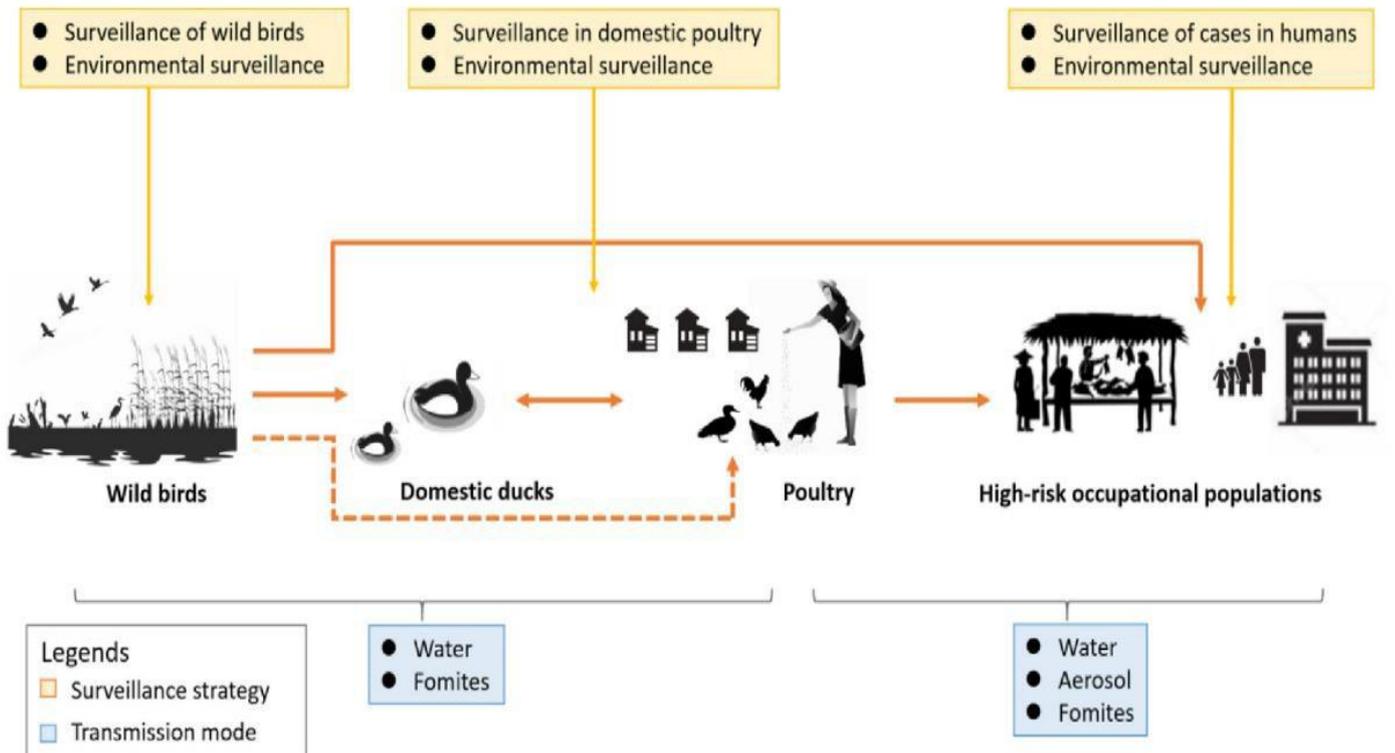


Figure 21 : stratégies de surveillance et modes de transmission du virus influenza aviaire (Duan et al, 2023).

Tableau III : modalités de surveillance du virus influenza aviaire (Duan et al, 2023).

	Priorités	Échéances	Zones	Modes
Oiseaux sauvages	Les espèces migratrices telles que les oies sauvages et les canards	La migration a lieu d'août à décembre, tandis que le risque d'épidémie est plus élevé de février à mars.	Les zones humides, les lacs et les zones environnantes de ces oiseaux	Surveillance Active : Réaliser des enquêtes et des surveillances régulières sur le terrain pour détecter les signes précoces de grippe aviaire. Surveillance Régulière : Surveillance continue des schémas migratoires et de la santé des populations d'oiseaux sauvages.
Volaille et Environnement	Les marchés de volaille vivante, les abattoirs, les fermes, et les sources potentielles de contamination comme les fientes et les surfaces.	La surveillance doit être effectuée tout au long de l'année pour garantir un suivi constant.	Concentrer les efforts sur les régions ayant des foyers précédents, les plans d'eau densément peuplés, les zones d'élevage d'oiseaux d'eau et les habitats des oiseaux migrants	Surveillance Active : Inspections et tests dans les marchés de volaille vivante, les fermes et les abattoirs. Surveillance en Temps Réel : Mise en place de technologies et de pratiques fournissant des retours immédiats sur la santé de la volaille. Surveillance Sentinelle : Désignation de fermes ou de marchés spécifiques comme sites sentinelles pour suivre les tendances et détecter les épidémies tôt.
Population Exposée Professionnellement	Cibler les personnes ayant un contact direct avec des oiseaux vivants ou leurs déjections.	Mettre l'accent sur les saisons d'hiver et de printemps (octobre à mars) lorsque le risque est plus élevé.	Zones similaires à celles pour la volaille et l'environnement, y compris les lieux de travail et les résidences en contact avec les oiseaux.	Surveillance Active : Suivi et évaluation des personnes exposées pour détecter les infections précoces. Surveillance Régulière : Surveillance continue de la santé des travailleurs exposés. Surveillance Sentinelle : Utilisation de groupes spécifiques comme sentinelles pour détecter les premiers signes de grippe aviaire parmi la population exposée.
Infections Humaines par la Grippe Aviaire	Concentrez-vous sur les individus ayant un historique épidémiologique pertinent.	Surveillance tout au long de l'année	Divers établissements médicaux à l'échelle nationale.	Surveillance Passive : Surveillance basée sur la détection des cas dans les installations médicales, avec signalement des infections suspectées ou confirmées

III.1. MESURES DE BIOSECURITE EN CAS D'ÉPIZOOTIE AI

III.1.a. Au niveau de la ferme

En cas d'épizootie AI, des mesures de biosécurité sont à appliquer rapidement pour éviter la dissémination du virus. La biosécurité est approchée par deux méthodes principales :

- **La bioexclusion** : éviter la contamination des locaux par le pathogène circulant.
- **La biocontention** : éviter la dissémination du pathogène à partir du local contaminé (première zone touchée).

La décontamination nécessite une désinfection des lieux, réalisée en aval à un nettoyage. Les désinfectants les plus efficaces sont les détergents (dénaturation des lipides), les alcalis (dénaturation protéique), les agents oxydants (dénature l'ADN et les protéines) et les aldéhydes (alkylation des groupements amino et sulfhydriles des protéines et l'azote des bases purines). La désinfection du personnel, des équipements, des vêtements, de l'eau et de tout ce qui en contact avec les bâtiments touchés, est aussi primordial à une bonne décontamination (Cf. tableau IV). En addition de la décontamination, l'élimination des carcasses est réalisée par ensevelissement, incinération, compostage ou équarrissage (Capua et Alexander,2013).

Tableau IV : résumé des procédures à entreprendre selon l'élément contaminé (Capua et Alexander,2013).

Élément destiné à être désinfecté	Désinfectant/produit chimique/ procédure
Oiseau vivant	Abattre humainement
Carcasses	Enfouir, brûler ou envoyer à l'équarrissage
Habitation pour animaux/équipement	Savons et détergents, agents oxydants, alcalis
Alentours	N/A
Humains	Savons et détergents, acide citrique
Eau - Réservoirs - Dignes	Si possible, les évacuer dans les pâturages, si cela est faisable. Autrement N/A.
Équipement électrique	Formaldéhyde
Nourriture	Enfouir, brûler
Effluent, fumier	Enfouir ou brûler, appliquer les alcalis où les acides
Habitations humaines	Savons et détergents, agents oxydants
Appareils, véhicules	Savons et détergents, alcalis
Vêtements	Savons et détergents, agents oxydants, alcalis
Avions	Savons et détergents, agents oxydants

L'échec de la contention de l'épizootie peut être due à plusieurs actes tel le mouvement continu du personnel et équipements entre les bâtiments, l'absence des produits de désinfection, une proximité des habitations d'occupation humaine et de la volaille...etc (Behailu, 2022).

III.1.b. Au niveau du laboratoire

Le laboratoire est contraint à être exposé aux agents pathogènes, cependant une procédure claire doit être établie pour une meilleure gestion de l'établissement et limiter la contamination du personnel.

En premier lieu, le pathogène doit être identifié et des mesures quotidiennes peuvent faciliter le processus dont :

- Inventaire du matériel biologique détenu par et/ou manipulé par le laboratoire.

- Minimiser le risque d'exposition du personnel pendant la manipulation des échantillons.
- Les conditions de transport et stockage des agents pathogènes doivent répondre aux risques découlant d'un contact accidentel ou d'un accès non autorisé à des toxines et à des agents biologiques.
- Les dangers physiques et chimiques lors de la manipulation des échantillons et des animaux doivent être pris en considération.
- En cas de manipulation des animaux, des blessures peuvent être engendrées aux personnels.

En deuxième lieu, l'appréciation du risque biologique consiste à définir le risque potentiel du pathogène identifié. En dernier lieu, il faut gérer la situation en agissant en fonction de la nature du risque biologique et de la gravité de la maladie potentielle, grâce à l'identification et au contrôle continu des voies d'expositions probables (Cf. figure 22) (Manuel terrestre-OMSA, 2021).

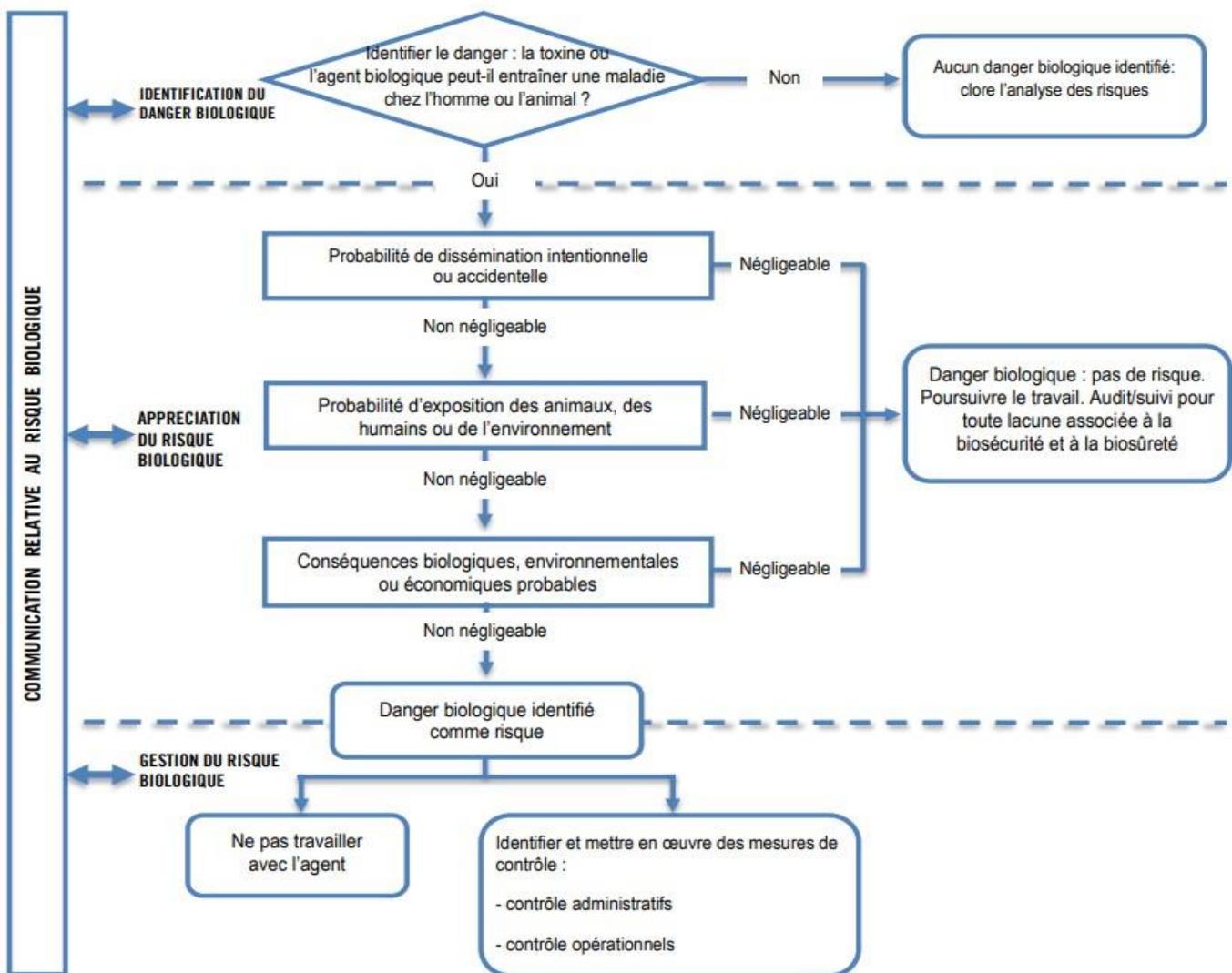


Figure 22 : Processus d'analyse des risques biologiques au laboratoire (Manuel terrestre-OMSA, 2021).

III.2. La prévention par la vaccination

La vaccination est recommandée lors de la suspicion d'une circulation d'un pathogène dans les alentours de la ferme avicole (Behailu, 2022). En France, l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, l'Environnement et du Travail), recommande la vaccination contre le AI-H5 à titre préventif à partir de l'automne 2023 des espèces avicoles de tout type de production (Anses, 2022).

Concernant les technologies adoptées pour la création des vaccins contre le AI-H5 HP, il existe principalement trois types :

- **Virus inactivé dans une émulsion huileuse** en utilisant des souches d'origine humaine comportant des déterminants antigénique aviaire (Nobilis Influenza H5N2, CEVAC Flu-Kem H5N2, Zoetis H5N3....).
- **Vaccin vectorisé** sur des HVT (Herpes virus turkey), des FPV (Fowl Pox virus) ou des NDV (Newcastle virus) comportant la protéine HA de l'AI-H5 (Vectormune AI + H5N1 Re-6, Trovac-H).
- **Vaccin recombinant, HA exprimée sur des baculovirus** et amplifié sur des cellules d'insectes (Volvac B.E.S.T. AI + ND, disponible en Algérie) (Nielsen et al, 2023).

III.3. LES ORGANISMES INTERNATIONAUX DE SURVEILLANCE

III.3.a. Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA)

L'OMSA (anciennement nommée Organisme International des Epizooties-OIE) est une organisation intergouvernementale créée en 1924 qui compte actuellement 183 pays et territoires membres. L'organisation a pour mission principale de collecter et diffuser l'information relative aux maladies et épizooties aux services vétérinaires des états membres. Les pays faisant partie de l'organisme déclarent à l'OMSA les maladies listées comme maladies à déclaration obligatoire (OMSA, Angot, 2009).

III.3.b. Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

L'OMS surveille les évènements zoonotiques de la grippe aviaire via le Système mondial de surveillance de la grippe et de riposte (GISRS) (Cf. figure 23). La contribution de l'OMS sert à orienter les états membres en cas d'épizooties à risque zoonotique en collaborant de près avec l'OMSA, la FAO (l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) et les laboratoires de référence (OMS,2024).

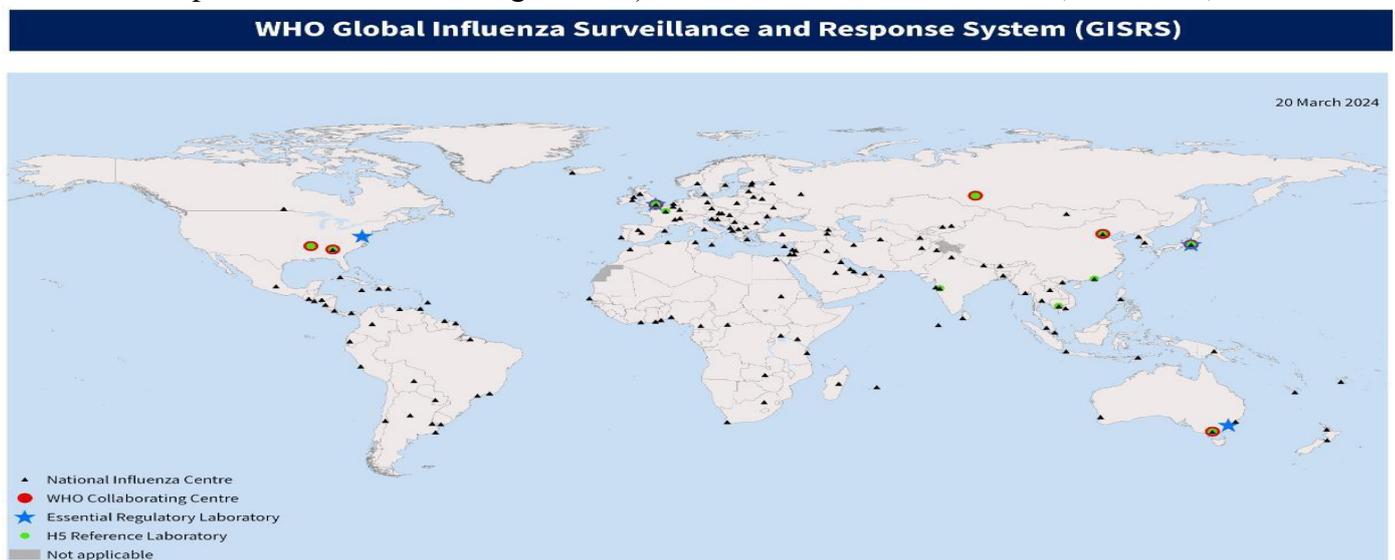


Figure 23 : Laboratoires et centres faisant partie du réseau GISRS (OMS,2024).

III.3.c. Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC)

Les CDC ont pour mission d'améliorer le contrôle et la prévention à l'échelle mondiale de la grippe saisonnière y compris la grippe aviaire, et d'adapter la préparation et la réponse aux pandémies. Le centre travaille de près avec l'OMS et plus particulièrement avec le GISRS en cas d'évènements zoonotiques (CDC, 2020, CDC, 2024).

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie 1

Pour atteindre le premier objectif de la présente étude, nous avons adopté une démarche expérimentale qui repose sur trois volets, à savoir :

1. La nécropsie ;
2. La caractérisation moléculaire de l'influenza aviaire.
3. Le sous-typage H5, N1 et N8.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

• Lieu et période d'étude :

La présente étude a porté sur des élevages avicoles de la région Nord du pays durant la période de décembre 2020 à juillet 2023. Aucune région n'avait été définie préalablement, car tous les éleveurs ayant présenté des animaux malades avec une forte mortalité étaient retenus à la clinique pendant la période de l'épidémie.

• Échantillonnage

Des échantillons (cas de morbidité et de mortalité) de 167 élevages de poulets (poulet de chair, poule pondeuse, reproductrice de chair) et de dindes (dinde de chair, dinde reproductrice de chair) présentant des problèmes respiratoires avec une forte mortalité ont été examinés à la clinique vétérinaire (spécialisé en pathologie aviaire sise à Blida).

A la réception des échantillons, les renseignements suivants sont pris en considération pour l'anamnèse :

- La race et l'espèce de la volaille.
- L'âge, le sexe et l'effectif de l'élevage.
- Le taux de mortalité et les symptômes exprimés avant la mort de l'animal en notant le degré de leur propagation au sein de l'élevage.
- Le type d'aliment et la source d'eau d'abreuvement.
- Les vaccins et les traitements pris par la volaille.

Les sujets morbides étaient ramenés dans des cages tout en tenant compte des mesures de sécurité. Les cages étaient désinfectées après avoir sorti les oiseaux. Les spécimens sélectionnés pour l'examen nécropsique présentaient des symptômes similaires à ceux observés chez le reste de l'élevage.

Les cas de mortalité ont été triplement emballés et envoyés de la ferme dans des sacs étanches qui avaient été désinfectés et étiquetés avec des informations générales sur l'animal (sexe, âge, race, taux de mortalité, symptômes). Les emballages sont préparés et scellés au sein de l'installation avicole. Les sacs ont été désinfectés dès leur arrivée dans la salle de nécropsie et dès la mise en place des cadavres sur la table, les sacs sont éliminés. La sélection des sujets à examiner se fait en fonction de leur état (non altéré) car l'autolyse peut survenir rapidement et entraîner des lésions qui n'ont aucun rapport avec la maladie. Une telle sélection permet de minimiser le risque de perturber le diagnostic et de garantir la fiabilité des résultats.

I.1. NECROPSIE

A la réception des échantillons en salle de nécropsie et après un constat minutieux des symptômes, les cas morbides sont euthanasiés par administration de Pentobarbital sodique par voie intraveineuse pour préserver les organes d'une altération non liée à la maladie.

A l'ouverture de la carcasse, des examens nécropsiques aseptiques ont été menés sur des poulets et des dindes conformément aux directives de l'OIE pour l'examen post-mortem de l'Influenza aviaire (Capua et Alexander, 2013). À la suite de l'examen interne, les organes présentant les lésions caractéristiques de l'IA ont été prélevés à l'aide de scalpels et de forceps. Dans la plupart des cas, la trachée, les amygdales caecales et le cerveau ont été retirés et placés dans des conteneurs d'échantillons stériles destinés à l'analyse moléculaire.

I.1.a. Prélèvements

Le prélèvement de trachée a été réalisé par ablation d'une longueur de trachée qu'on place directement dans un pot stérile (Cf. figure 24.a).

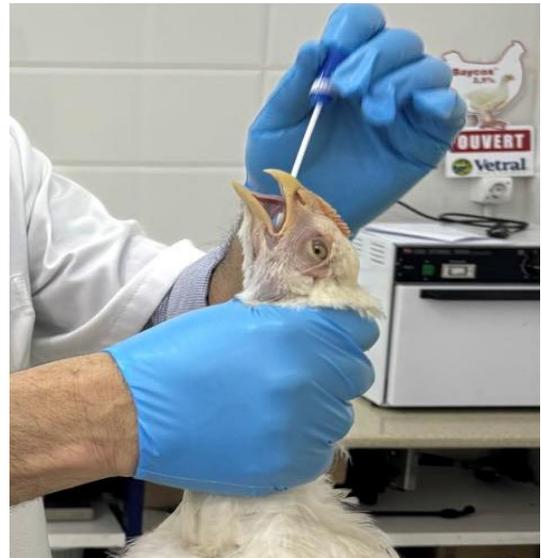
L'écouvillonnage trachéal a été réalisé en frottant un écouvillon avec tige en plastique sur la muqueuse du larynx ou de la trachée et sa réinsertion dans le milieu de transport pour virus (MTV) (Cf. figure 24.b).

Les amygdales caecales, situées à l'intérieur du cloaque, à environ 1 à 2 cm de l'ouverture anale sont prélevées à l'aide de pinces et de ciseaux stérilisés (Cf. figure 24 .c).

Le cerveau a été prélevé à l'aide d'une pince après avoir introduit un ciseau dans le foramen occipital et enlever la voûte crânienne (Cf. figure 24.d).



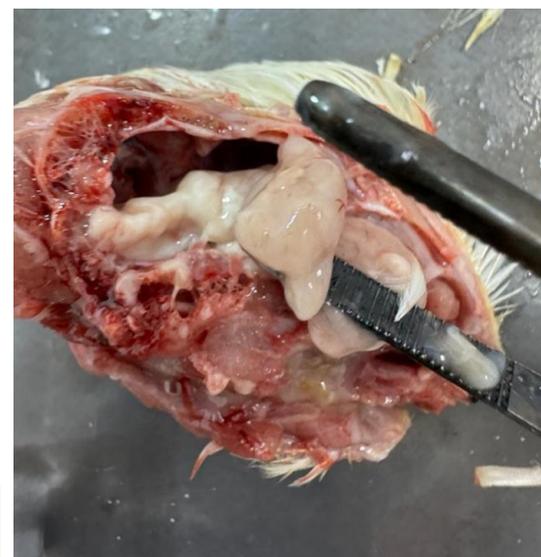
a



b



c



d

Figure 24 : Différents prélèvements effectués durant l'étude. a) Trachées, b) écouvillons trachéales, c) Amygdales caecales, d) Cerveau.

I.2. Détection du virus et sous-typage.

- **Préparation des prélèvements**

Les prélèvements encore entiers à ce stade, sont systématiquement découpés en petits morceaux pour permettre l'extraction du liquide biologique contenant le virus ou son acide nucléique afin de réaliser les tests moléculaires.

Le traitement des échantillons est le même pour tous les organes. Devant un bec Bunsen, on dépose sur une boîte de Petri stérile l'organe contenu dans le pot stérile. Au moyen d'un bistouri et d'une pince, on procède au découpage de l'organe en petits morceaux qui sont transférés aseptiquement dans un cryotube dûment identifié (nom de la ferme, type de production, âge, type et la date de préparation de l'échantillon), puis on rajoute la solution PBS jusqu'au goulot (très souvent c'est 1 à 2 ml). Après broyage des pools d'organes et décharge des écouvillons au vortex, une centrifugation à 3000rpm pendant 10 minutes a été réalisée (Cf. annexe A).

- **Extraction de l'acide nucléique**

Le surnageant a servi pour l'extraction d'ARN en utilisant le kit QIAamp[®] viral RNA (QIAGEN) par deux méthodes : la méthode manuelle et celle utilisant un automate (Cf. annexe A).

- **Lecture**

La qualité des extraits d'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur de 1.5% d'agarose (Cf. annexe A). La révélation de bandes claires exemptes de dégradation sont synonymes de la bonne qualité d'ARN.

I.2.a. Diagnostic de l'AIV.

Le diagnostic de l'AIV a été réalisé sur la base d'un screening du gène M pour tous les cas présumptifs AIV, suivi d'un sous-typage des gènes HA et NA mené sur les cas suspectés H5 hautement pathogène.

- **Recherche du gène M par RRT-PCR**

Les extraits d'ARN ont fait l'objet d'une amplification par RT-PCR en temps réel (RRT-PCR) de la région conservée du gène de la matrice (M) en utilisant la sonde M+64 à une concentration finale de 0.1µM et les amorces spécifiques M+25 et M-124 à une concentration finale de 0.3µM chacune (Cf. tableau V) (Cf. annexe A).

La réaction a été réalisée dans un volume final de 25µl avec le profil thermique suivant : 1 cycle de 50°C pendant 20min et un cycle de dénaturation à 95°C pendant 15min suivi par 40 cycles de 94°C pendant 45sec et 60°C pendant 45 sec (Capua et Alexander, 2013).

Tableau V : Amorces et sondes utilisées pour la recherche du gène M.

Amorce/Sonde	Séquence 5'--- 3'	Références
M+ 25	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	(Spackman et al, 2002, Capua et Alexander, 2013)
M -124	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG	
M+ 64	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA	

I.2.b. Sous-typage

- **Sous typage H5 par RRT-PCR.**

Les extraits d'ARN ont fait l'objet d'une RRT-PCR ciblant le gène de l'Hémagglutinine (HA) réalisée uniquement pour les échantillons de la deuxième épizootie. Le sous type H5 a été recherché avec les amorces H5 + 1456 et H5 - 1685 à une concentration finale de 0.4µM chacune et la sonde H5 - 1637 à une concentration finale de 0.3µM (Cf. tableau VI).

La réaction a été réalisée dans un volume final de 25µl avec le profil thermique suivant : 1 cycle de 50°C pendant 30min et un cycle de dénaturation à 95°C pendant 15min suivi par 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 10 sec et d'élongation à 54°C pendant 30 sec (Capua et Alexander, 2013, Spackman et al, 2002).

Tableau VI : Amorces et sondes utilisées pour le sous typage du gène HA-H5.

Amorce/Sonde	Séquence 5'--- 3'	Références
H5 + 1456	ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA G	(Spackman et al, 2002, Capua et Alexander, 2013)
H5 - 1685	AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC	
H5 - 1637	FAM-TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA	

- **Sous-typage H5, N1 et N8 par RT-PCR**

Les extraits d'ARN ont fait l'objet d'une amplification par RT-PCR en ciblant le gène HA, réalisée pour les échantillons de la première épizootie, et les sous-types N1 et N8 en ciblant le gène de la Neuraminidase (NA) en utilisant les amorces spécifiques au gène H5 (H5N1-HA-4Fv2 et H5N1-HA-4RV2), au gène N1 (H5N1-na_6Fv2 et H5N1-na_6Rv2) et au gène N8 (H5N8-N8-F et H5N8-N8-R) à une concentration finale de 0.4µM chacune (Cf. tableau VII) (Cf. annexe A).

La réaction a été réalisée dans un volume final de 25µl avec le profil thermique suivant : 1 cycle de 50°C pendant 15min et un cycle de dénaturation à 94°C pendant 2min suivi par 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15sec, une hybridation à 50°C pendant 30sec et une élongation à 72°C pendant 2min (Höper et al, 2009) modifié. Les produits PCR ayant une taille de 1,7kb pour le gène H5 et 1.4 kb pour les gènes N1 et N8 ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Tableau VII : Amorces utilisées pour le sous typage des gènes H5, N1 et N8.

Cibles	Amorces	Séquence 5'--- 3'	Références
Gène HA	H5N1-HA-4Fv2	AGCAGGGGTTCAATCTGTCAAAA	(Höper et al, 2009)
	H5N1-HA-4RV2	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTAACTA	
Gène NA	H5N1 -na_6Fv2	AGC AAA AGC AGG AGT TTA AAA TGA	
	H5N1-na_6Rv2	TAG AAA CAA GGA GTT TTT TGA ACA AAC	
	H5N8-N8-F	TAG CGA CCA TTG GCT CCA TC	Cette étude
	H5N8-N8-R	CTC CAT CGT GCC ATG ACC AA	

II. RESULTATS

Au total cent soixante-sept (167) fermes avicoles présentant des signes respiratoires (râles sévères et éternuements) et accusant une mortalité (faible, modérée et élevée) ont été retenus à la clinique pour suspicion d'atteinte de l'influenza aviaire durant la période de décembre 2020 jusqu'à juillet 2023.

II.1. Lésions nécropsiques.

A la nécropsie, nous avons observé les lésions les plus fréquemment rencontrées, à savoir :

- Pétéchies au niveau des phanères des pieds (Cf. figure 25.a),
- Une crête et des bourbillons cyanosée-hémorragique (Cf. figure 25.b),
- Une conjonctivite (Cf. figure 25.c),
- Hémorragies et congestions de la trachée (Cf. figure 25.d), des intestins (Cf. figure 25.e), du pancréas (Cf. figure 25.f), du proventricule (Cf. figure 25.g), des poumons œdémateux (Cf. figure 25.h), du foie avec une nécrose lymphoïde (Cf. figure 25.i), de la rate (Cf. figure 25.j), du cœur (sillons coronaire et myocarde) (Cf. figure. 25.k) et des amygdales caecales. (Cf. figure 25.l).



a) Phanères des pieds hémorragiques



b) Bourbillons et crête hémorragiques



c) Conjonctivite

Figure 25 : Lésions nécropsiques observées. (photos originales de Dr KARA).



d) Trachéite



e) Intestins hémorragiques



f) Pancréas hémorragique



g) Pétéchiés sur le proventricule



h) Poumons congestionnés



i) Foie hémorragique



j) Rate hémorragique



k) Congestion du cœur



l) Hémorragies des amygdales caecales

Figure 25 : Lésions nécropsiques observées (suite) (photos originales de Dr KARA).

En plus des lésions rapportées ci-dessus, nous avons observé :

- Une congestion des ovaires et une hémorragie des follicules ovariens chez les poules pondeuses et les poules/dindes reproductrices de chair (Cf. figure 25.m).
- Une orchite hémorragique chez le coq (Cf. figure 25.n).

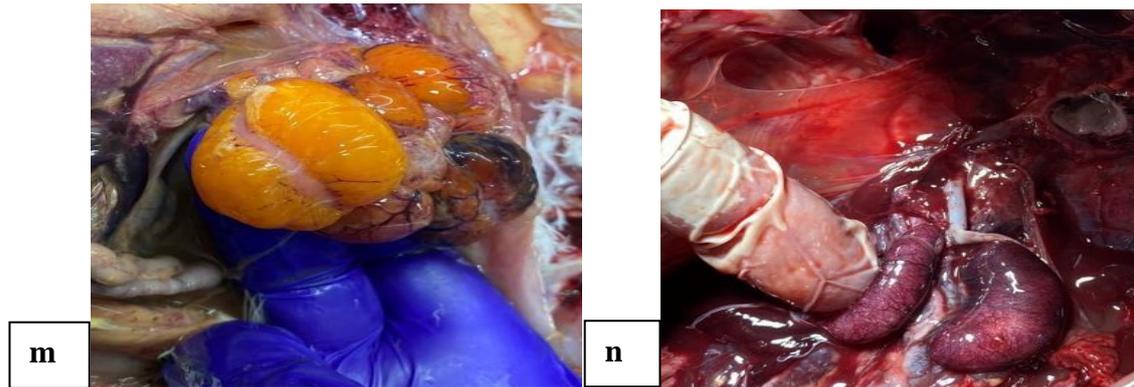


Figure 25 : Lésions nécropsiques observées (suite). m) ovaires congestionnés. n) orchite.

Les cas des poules pondeuses enregistrés durant la deuxième épizootie n'exprimaient que des ovaires congestionnés avec une crête et des bourbillons hémorragiques, exemptes des autres atteintes.

Le statut sanitaire des élevages a été défini sur la base de la mortalité accusée, d'une part et des lésions observées, d'autre part :

- Quatre-vingt-dix-huit (98) élevages à faible mortalité présentant de légères lésions que nous avons classés « Cas FM ».
- Trente-deux (32) élevages à mortalité modérée (< 40%) accusant des lésions plus ou moins prononcés (trachée et poumons hémorragiques) que nous avons classés « Cas MM ».
- Trente-sept (37) élevages à mortalité élevée (de 40 à 70%) présentant des hémorragies et des congestions au niveau de divers organes accompagnés de signes neurologiques (incoordination des mouvements, torticolis, un état léthargique) et des signes digestifs (diarrhées) que nous avons classés « cas critiques ».

II.2. Recherche du gène M de l'AIV

Les résultats de la recherche du gène M sont rapportés dans le tableau I de l'annexe B.

Nous avons tenu compte de la courbe et de la valeur du Ct pour l'interprétation du résultat de la RRT-PCR du gène M de l'influenza aviaire et nous avons considéré le résultat positif lorsque la courbe présente les trois phases d'amplification accompagnée d'un Ct inférieur au Ct seuil de 32 / 33.

Les résultats ont révélé 77 cas positifs et 90 cas négatifs (Cf. tableau VIII).

Le traitement des résultats de la recherche du gène M en fonction du statut sanitaire (taux de mortalité et lésions), rapporté dans le tableau II, fait ressortir ce qui suit :

- Huit (08) parmi les quatre-vingt-dix-huit (98) élevages, accusant une faible mortalité et présentant de légères lésions, sont positifs au gène M et confirmés AI. A noter que parmi les quatre-vingt-dix cas négatifs AIV, six cas sont positifs NDV et dix-neuf cas sont positifs IBV.

- Les trente-deux (32) élevages accusant une mortalité modérée et présentant des lésions plus ou moins prononcées ainsi que les trente-sept (37) élevages classés « cas critiques » sont tous positifs au gène M et confirmés AI.

Tableau VIII : La synthèse des résultats de la recherche du gène M en fonction du statut sanitaire.

Statut sanitaire	Gene M (+)	Gene M (-)
Élevages présentant une faible mortalité avec lésions légères (cas FM)	08	90
Élevages présentant une mortalité modérée avec lésions plus ou moins prononcées (cas MM)	32	00
Cas critiques	37	00

Les résultats de la RRT-PCR des élevages en fonction du statut sanitaire sont rapportés dans les tableaux II, III, IV de l'annexe B.

II.2.a. Distribution temporelle

La distribution temporelle des élevages positifs AIV est rapportée dans la figure ci-dessous.

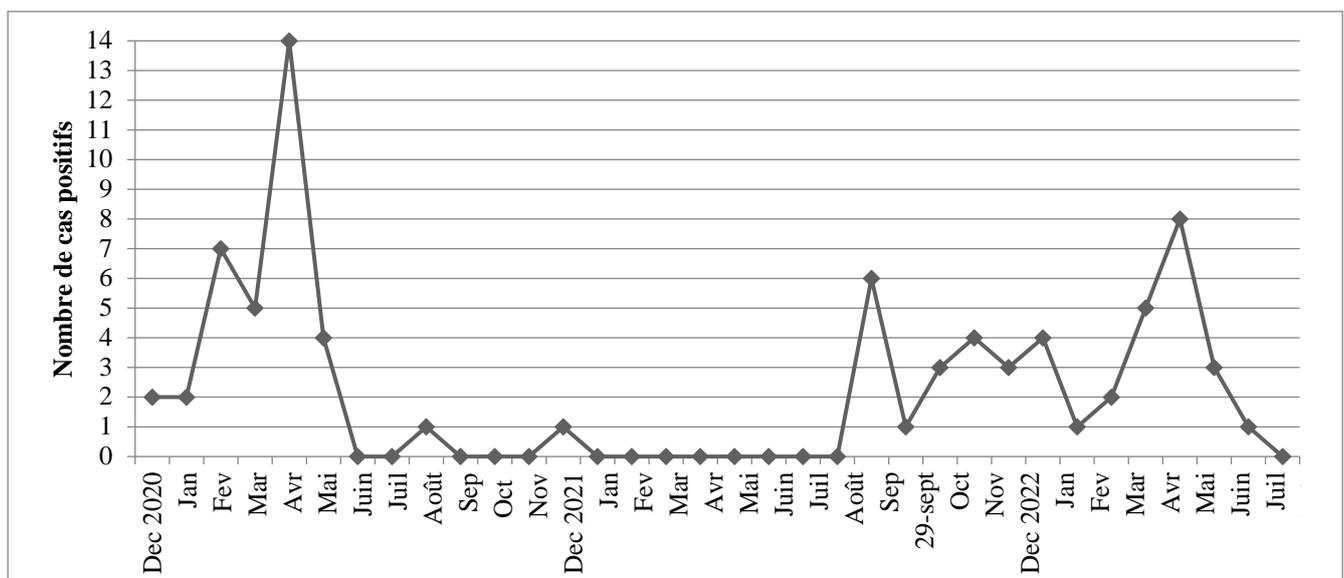


Figure 26 : Distribution temporelle des cas positifs AIV

La distribution des cas positifs AIV montre une répartition en trois périodes :

- La première, s'étalant de décembre 2020 à mai 2021, comportant vingt-sept élevages « cas critiques » et sept élevages « cas MM » qui caractérise la première épizootie.
- La deuxième, s'étalant de juin 2021 à Aout 2022, comportant huit élevages « cas FM » qui caractérise une accalmie.
- La troisième, du 29 septembre 2022 à juillet 2023, comportant dix élevages « cas critiques » et vingt-cinq élevages « cas MM » qui caractérise la deuxième épizootie.

II.2.b. Distribution géographique.

La distribution géographique des trente-sept (37) élevages classés « cas critiques » fait ressortir leur localisation dans treize (13) wilayas comme rapporté dans la figure suivante.



Figure 27 : La distribution géographique des cas critiques.

La comparaison des valeurs des Ct enregistrés a montré que ceux obtenus pour les cas critiques (n=37) étaient plus faibles que ceux des cas modérés (n=32) (Cf. tableau V-Annexe B). La comparaison des moyennes des Ct enregistrés a montré qu'il existe une différence significative par le test de Student ($p=0.05$) entre les Ct des cas critiques et ceux des cas modérés pour la première épizootie mais pas pour la deuxième (Cf. tableau IX). En effet, il semble qu'il existe une relation inversement proportionnelle entre le Ct enregistré et la charge virale présente dans l'échantillon.

Tableau IX : comparaison des moyennes des Ct enregistrés ciblant le gène M de l'influenza aviaire pour les deux épizooties

Statut sanitaire de l'élevage	Première épizootie		Deuxième épizootie	
	Nombre d'élevages	Moyenne des Ct	Nombre d'élevages	Moyenne des Ct
Cas MM	7	22.72	25	20.55
Cas critiques	26	18.98	10	20.43
Test de Student	$t=+/- 2.71$		$t=+/-2.64$	

La répartition des cas critiques confirmés AI par rapport à l'espèce et au type de production, a montré que la poule pondeuse était plus touchée par le virus de l'influenza aviaire durant la deuxième épizootie avec un taux de 60% (06 cas), alors que la poule reproductrice de chair et la dinde de chair étaient celles plus atteintes durant la première avec un taux de 44.44% (12 cas) et 29.62% (08 cas) respectivement. (Cf. figure 28.)

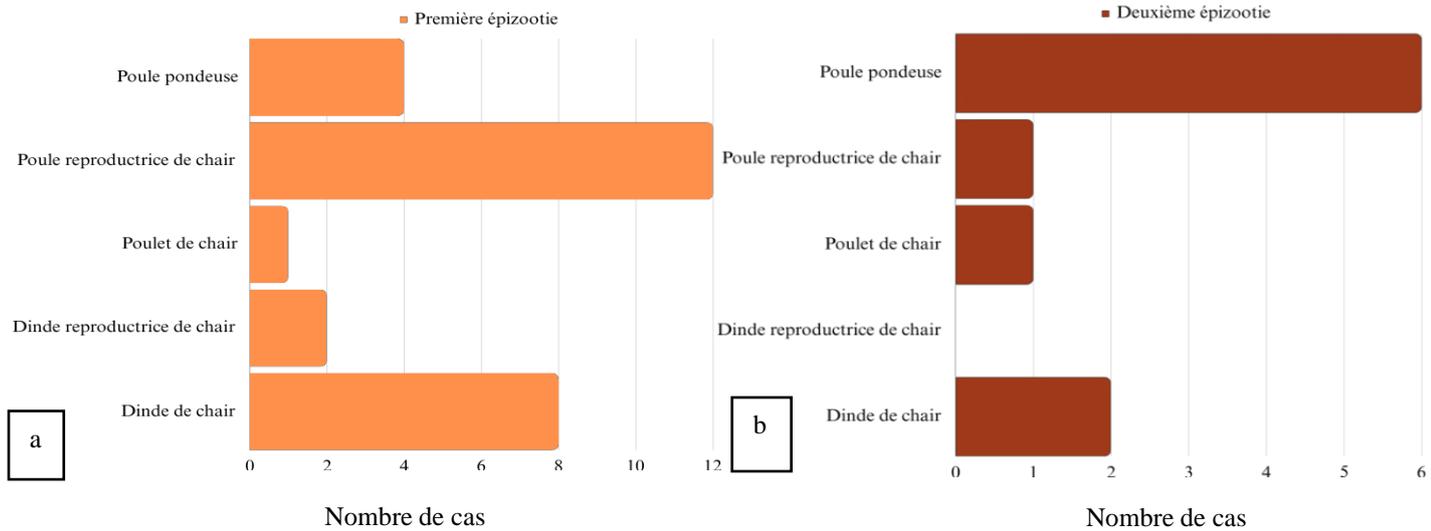


Figure 28 : Répartition des cas critiques confirmés AI par rapport à l'espèce et au type de production. a) première épizootie. b) deuxième épizootie.

II.3. Sous-typage H5

La bande de 1,7 kb, correspondant au gène HA-H5, révélée par électrophorèse pour les échantillons des cas critiques suspectés H5 hautement pathogène de la première épizootie (27 élevages), est représentée dans la figure ci-dessous.

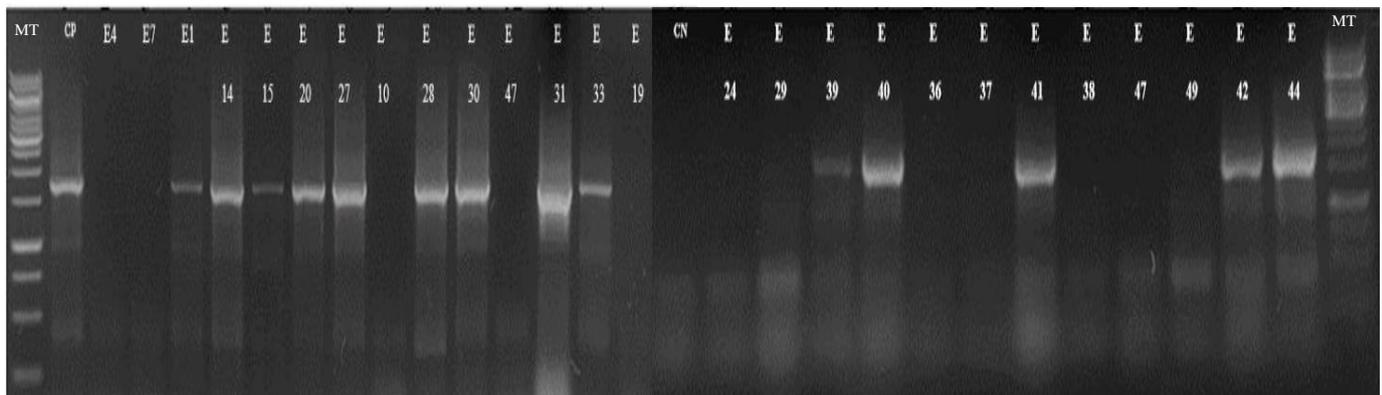


Figure 29 : Résultats de sous-typage H5 des cas critiques, enregistrés durant la première vague, analysés par RT-PCR et révélés par électrophorèse. MT= 1KB CP = Contrôle positif CN = Contrôle négatif

Nous avons tenu compte de la courbe et de la valeur du Ct pour l'interprétation du résultat de la RRT-PCR du gène HA-H5 de l'influenza aviaire pour les vingt-quatre élevages testés et nous avons considéré le résultat positif lorsque la courbe présente les trois phases d'amplification accompagnée d'un Ct inférieur au Ct seuil de 32 / 33.

L'interprétation des résultats du sous typage HA-H5, rapportée dans le tableau X, a permis la caractérisation de quinze (15) élevages positifs et douze (12) négatifs sur les vingt-sept (27) élevages testés de la première épizootie. Les cas de la deuxième épizootie (10 élevages) n'ont pas été testés par cette méthode.

Les résultats du sous typage H5 du gène HA par RRT-PCR ont permis la caractérisation de vingt-deux (22) élevages positifs et deux (02) élevages négatifs sur les 24 testés. Treize cas de la première épizootie (13 élevages) n'ont pas été testés par cette méthode.

L'analyse comparative des résultats du gène H5 obtenus par les deux méthodes a permis de distinguer ce qui suit :

- Six élevages sont caractérisés positifs et deux négatifs par les deux méthodes.
- Six élevages sont caractérisés négatifs par RT-PCR alors qu'ils sont positifs par RRT-PCR.
- Quatre élevages n'ont pas été testés par RRT-PCR car ont été caractérisés négatifs lors de deux séries de RT-PCR.
- Neuf élevages n'ont pas été testés par RRT-PCR car caractérisés positifs par RT-PCR.
- Dix élevages de la deuxième épizootie n'ont été caractérisés positifs que par la RRT-PCR.

Au total, **trente et un (31) élevages ont été caractérisés positifs au AI-H5.**

Tableau X : Interprétation des résultats du sous typage HA-H5.

	Code élevage	Date	AI (gène M)	Sous typage HA-H5	
				RT-PCR	RRT-PCR
1.	E 1	22/12/2020	+	+	+
2.	E 4	27/01/2021	+	-	-
3.	E 7	03/02/2021	+	-	-
4.	E 10	07/02/2021	+	-	+
5.	E 14	12/02/2021	+	+	+
6.	E 15	16/02/2021	+	+	+
7.	E 19	02/03/2021	+	-	+
8.	E 20	06/03/2021	+	+	+
9.	E 24	11/03/2021	+	-	+
10.	E 27	05/04/2021	+	+	+
11.	E 28	09/04/2021	+	+	+
12.	E 29	11/04/2021	+	-	+
13.	E 30	13/04/2021	+	+	ND
14.	E 31	13/04/2021	+	+	ND
15.	E 33	15/04/2021	+	+	ND
16.	E 35	19/04/2021	+	-	ND
17.	E 36	20/04/2021	+	-	+
18.	E 37	20/04/2021	+	-	ND
19.	E 38	21/04/2021	+	-	ND
20.	E 39	21/04/2021	+	+	ND
21.	E 40	21/04/2021	+	+	ND
22.	E 41	21/04/2021	+	+	ND
23.	E 42	22/04/2021	+	+	ND
24.	E 44	01/05/2021	+	+	ND
25.	E 47	15/05/2021	+	-	ND
26.	E 48	23/05/2021	+	+	ND
27.	E 49	24/05/2021	+	-	+
28.	E 85	29/09/2022	+	ND	+
29.	E 114	15/12/2022	+	ND	+
30.	E 115	24/12/2022	+	ND	+
31.	E 120	21/01/2023	+	ND	+
32.	E 121	21/01/2023	+	ND	+
33.	E 123	05/02/2023	+	ND	+
34.	E 148	15/05/2023	+	ND	+
35.	E 150	16/05/2023	+	ND	+
36.	E 165	19/06/2023	+	ND	+
37.	E 167	17/07/2023	+	ND	+

II.3.a. Distribution temporelle.

La distribution temporelle des élevages positifs H5 est rapportée dans la figure ci-dessous.

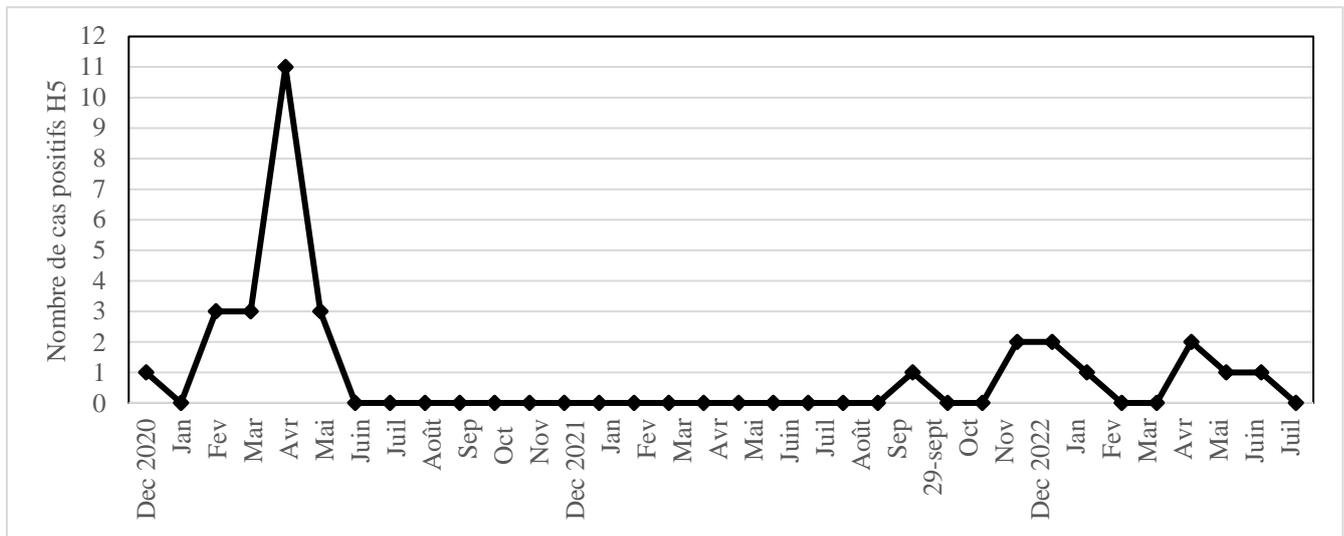


Figure 30 : La distribution temporelle des élevages positifs H5

La représentation graphique de la répartition temporelle des élevages positifs H5 met en exergue un premier pic correspondant à la première épizootie.

II.3.b. Distribution géographique.

La distribution géographique des élevages atteints du virus H5 hautement pathogène en Algérie durant les deux épizooties est rapportée dans la figure ci-dessous.



Figure 31 : Distribution géographique des élevages atteints du virus H5 hautement pathogène en Algérie durant les deux épizooties.

La représentation géographique des élevages atteints du virus H5 montre une distribution sur treize (13) wilayas où le premier cas H5 de la première épizootie provient de la wilaya de Mostaganem alors que celui de la deuxième épizootie provient de la wilaya de Médéa.

II.4. Sous-typage NA.

Les échantillons positifs AI-H5 obtenus par RT-PCR de la première épizootie (15 élevages) ont été testés pour le sous typage de NA-N1 et N8. Les échantillons des dix élevages de la deuxième épizootie, enregistrés après le cas AI-H5N1 déclaré par le ministère de l'agriculture à l'OIE en septembre 2022, n'ont été testés que pour le gène NA-N1.

- **Sous typage de NA-N1.**

Les résultats de la RT-PCR de sous typage de NA-N1 des cas confirmés H5 (25 élevages) ont montré :

- La présence de la bande de 1,4 kb, correspondante au gène NA-N1 dans huit échantillons de la deuxième épizootie (Cf. figure 32.a).
- L'absence de la bande de 1,4 kb, correspondante au gène NA-N1, dans les quinze (15) échantillons de la première épizootie et deux (02) échantillons de la deuxième épizootie (Cf. figure 32.a).

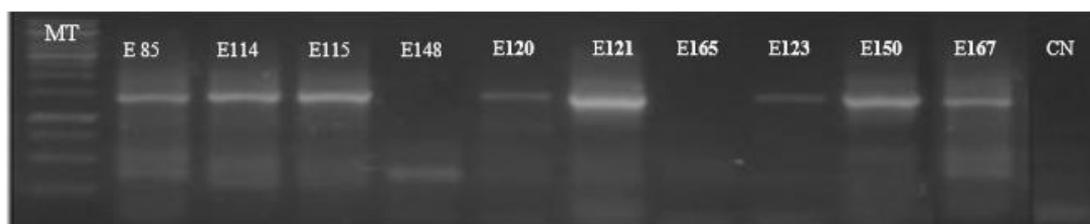


Figure 32.a: Résultats de sous-typage N1 des cas critiques ; enregistrés durant la deuxième vague ; analysés par RT-PCR. MT= 1KB CP = Contrôle positif CN = Contrôle négatif.

- **Sous typage de NA-N8.**

Les résultats de la RT-PCR de sous typage de NA-N8 des cas confirmés H5 de la première épizootie (15 élevages) ont montré :

- La présence de la bande de 1,4 kb, correspondante au gène NA-N8 dans treize échantillons (Cf. figure 32.b).
- L'absence de la bande de 1,4 kb, correspondante au gène NA-N8, dans deux échantillons (Cf. figure 32.b).

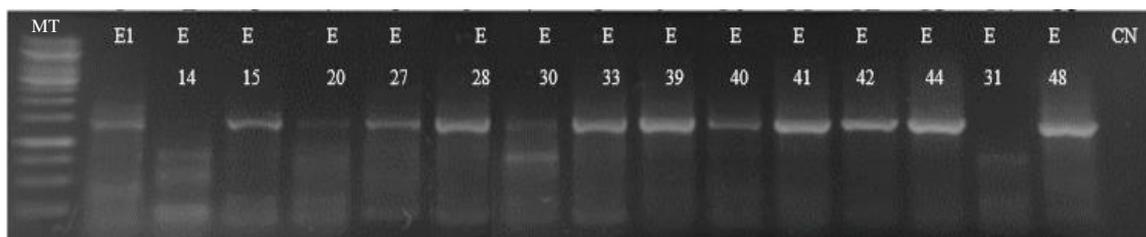


Figure 32.b : Résultats de sous-typage N8 des cas critiques ; enregistrés durant la première vague ; analysés par RT-PCR MT= 1KB CP = Contrôle positif CN = Contrôle négatif

L'interprétation des résultats du sous typage du gène NA N1, et N8, rapportée dans le tableau XI, a permis la caractérisation de **huit (08) élevages positifs H5N1, treize (13) élevages positifs H5N8 et dix (10) élevages H5Nx** dont :

- Deux (02) élevages négatifs pour les deux sous types (N1 et N8),
- Deux (02) élevages négatifs N1 et non déterminé (ND) pour le N8 ;
- Six élevages non déterminé (ND) pour les deux sous type.

Tableau XI : Interprétation des résultats du sous typage du gène NA N1, et N8.

	Elevages	Date	Sous typage HA-H5		Sous typage NA	
			RT-PCR	RRT-PCR	RT-PCR N1	RT-PCR N8
1.	E 1	22/12/2020	+	+	-	+
2.	E 14	12/02/2021	+	+	-	-
3.	E 15	16/02/2021	+	+	-	+
4.	E 20	06/03/2021	+	+	-	+
5.	E 27	05/04/2021	+	+	-	+
6.	E 28	09/04/2021	+	+	-	+
7.	E 30	13/04/2021	+	ND	-	+
8.	E 31	13/04/2021	+	ND	-	-
9.	E 33	15/04/2021	+	ND	-	+
10.	E 39	21/04/2021	+	ND	-	+
11.	E 40	21/04/2021	+	ND	-	+
12.	E 41	21/04/2021	+	ND	-	+
13.	E 42	22/04/2021	+	ND	-	+
14.	E 44	01/05/2021	+	ND	-	+
15.	E 48	23/05/2021	+	ND	-	+
16.	E 85	29/09/2022	ND	+	+	ND
17.	E 114	15/12/2022	ND	+	+	ND
18.	E 115	24/12/2022	ND	+	+	ND
19.	E 120	21/01/2023	ND	+	+	ND
20.	E 121	21/01/2023	ND	+	+	ND
21.	E 123	05/02/2023	ND	+	+	ND
22.	E 148	15/05/2023	ND	+	-	ND
23.	E 150	16/05/2023	ND	+	+	ND
24.	E 165	19/06/2023	ND	+	-	ND
25.	E 167	17/07/2023	ND	+	+	ND

III. DISCUSSION

A la nécropsie, une atteinte systémique des organes a été observé durant les deux épizooties caractérisant un syndrome congestivo-hémorragique justifiant la mortalité accusée, causée par un choc septicémique (virémie) provoquant un arrêt cardiaque et cérébral. Une atteinte systémique ciblant le tractus respiratoire, digestif et reproductif est caractéristique de l'AIV-H5 hautement pathogène (Sa e Silva et al., 2013, Pantin-Jackwood et al., 2016). Des lésions similaires associées à l'influenzae aviaire (H5N8 et H5N1) ont été signalés au Nigeria en 2021 et dans plusieurs pays d'Europe (Cf. tableau XII).

Tableau XII: Lésions enregistrées en Algérie et celles signalées au Nigeria, en Angleterre, en Serbie, en Hollande, au Kosovo, en France et en Italie

Congestions	H5N8 et H5N1				H5N8		H5N1	
	Algérie (2020- 2021 et 2022- 2023)	Nigeria (2021)	UK (2020- 2021)	Serbie (2016- 2017 et 2021- 2022)	Hollande (2014 et 2016)	Kosovo (2021- 2022)	France (2015- 2016)	Italie (2021- 2022)
Phanères des pieds	x	x	x		x		x	
Trachée	x	x				x		x
Intestins	x	x	x	x		x		x
Proventricule	x	x				x	x	
Rate	x	x	x	x			x	x
Poumons	x	x	x	x				x
Pancréas	x		x	x (H5N8-)		x		
Amygdales caecales	x	x	x					
Reins		x	x	x			x	
Foie	x		x	x				
Cœur	x		x	x				
Cerveau				x				
Ovaires	x			x	x			
Orchite	x							
Autres atteintes								
Cyanose de la crête et des bourbillons	x	x	x (H5N1-)	x	x	x	x	
Ascite			x					
Aérosacculite	x	x	x	x			x	
Conjonctivite	x		x		x			x
Diarrhée	x				x			
Péricardite	x	x	x				x	

Le présent constat est en adéquation avec la littérature qui ne signale pas de lésions pathognomoniques liées à l'AIV-H5 hautement pathogène. Cependant, les atteintes les plus récurrentes, en tenant compte des épizooties mentionnées, sont la cyanose de la crête et des bourbillons, les hémorragies au niveau des intestins, de la rate (rate marbrée), des poumons et les aérosacculites (inflammation des sac aériens).

A la PCR, l'influenzae aviaire a été confirmé dans soixante-dix-sept (77) sur les cent soixante-sept (167) élevages suspectés, soit une incidence de 46,1%.

Parmi les élevages à faible mortalité (98 élevages) présentant de légères lésions, les huit (08) positifs AI, ont été enregistrés durant l'accalmie contrairement aux élevages positifs AI à mortalité modérée et élevée. On pense que les affections enregistrées durant l'accalmie ne sont pas dû à un AI hautement pathogène sur la base des dégâts engendrés par ce dernier durant les autres périodes.

Pour ce qui est de la distribution géographique des cas critiques confirmés AI, les treize wilayas touchées sont réparties dans le nord et les hauts plateaux ou 46% des cas étaient enregistrés à Djelfa. En effet, cette wilaya est connue pour sa densité élevée d'élevages avicoles (principalement la dinde), ce qui facilite la transmission du virus entre les fermes avicoles. Cette situation est aggravée par le fait que certaines abritent plusieurs types de productions à des âges différents avec le non-respect de la distanciation entre les bâtiments. Ce type d'organisation existe partout en Algérie et permet au virus de gagner plus de terrain.

La différence significative révélée entre les Ct des cas modérés et ceux des cas critiques de la première épizootie est synonyme d'une importante charge virale circulante entre les fermes. Cette capacité de réplication massive et de transmission efficace est une propriété déjà décrite chez les souches hautement pathogènes de AI (Kwon et al, 2023). Le nombre restreint des cas critiques durant la deuxième épizootie n'a pas permis de déceler une telle différence.

Le résultat négatif du gène HA obtenu par RT-PCR mais positif par RRT-PCR, pourrait s'expliquer par la dégradation de l'extrait d'ARN consécutive à une série de congélation et décongélation, d'une part ou par le fait que le gène HA n'est pas bien conservé dans sa totalité dans l'échantillon, d'autre part. En effet, les amorces utilisées pour le sous-typage du H5 par RT-PCR sont des amorces qui ciblent les deux extrémités du gène HA (sa totalité) contrairement à celles utilisées en RRT-PCR, où un amplicon de 229 pb est généré situé entre 1456 et 1685.

Les élevages positifs par RT-PCR de la première épizootie (neufs élevages) n'ont pas été testés par RRT-PCR car la présence du gène dans son intégralité a déjà été confirmée alors que les dix élevages positifs de la deuxième épizootie n'ont pas été testés par RT-PCR car la RRT-PCR est plus spécifique.

Le résultat négatif du gène NA obtenu lors du sous-typage par PCR conventionnelle avec des amorces ciblant le gène entier, pourrait s'expliquer par les mêmes arguments que ceux cités pour le sous-typage par RT-PCR du gène HA-H5. En effet, quoique la dégradation de l'extrait d'ARN peut être responsable de ces résultats négatifs, l'hypothèse la plus probable serait que ces cas peuvent appartenir à d'autres sous-types, particulièrement le H9N2.

• **Tendances saisonnières mondiale de l’AIV-H5 hautement pathogène**

La tendance saisonnière du virus AI hautement pathogène communiqué par WAHIS basé sur les épizooties mondiales notifiées à cette dernière (Cf. figure 33), nous montre que le pic est généralement atteint durant le premier trimestre de l’année. Cette dynamique n’était pas la même observée en Algérie durant la première épizootie car le pic était enregistré au mois d’Avril, cependant, la deuxième épizootie n’a pas connu une augmentation significative en raison du nombre limité de cas enregistrés (Cf. figure 34).

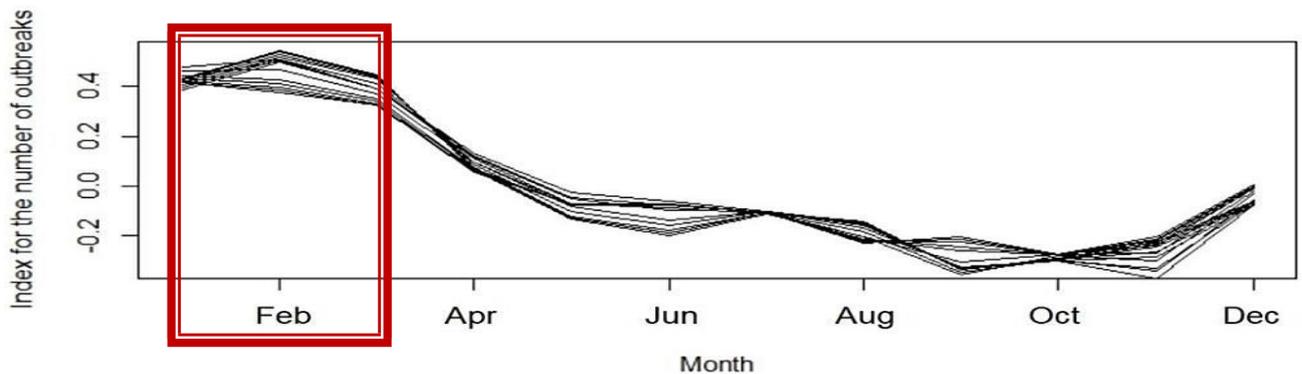


Figure 33 : Tendances saisonnières de l’incidence au niveau mondial de l’IAHP chez la volaille (WAHIS-OMSA).

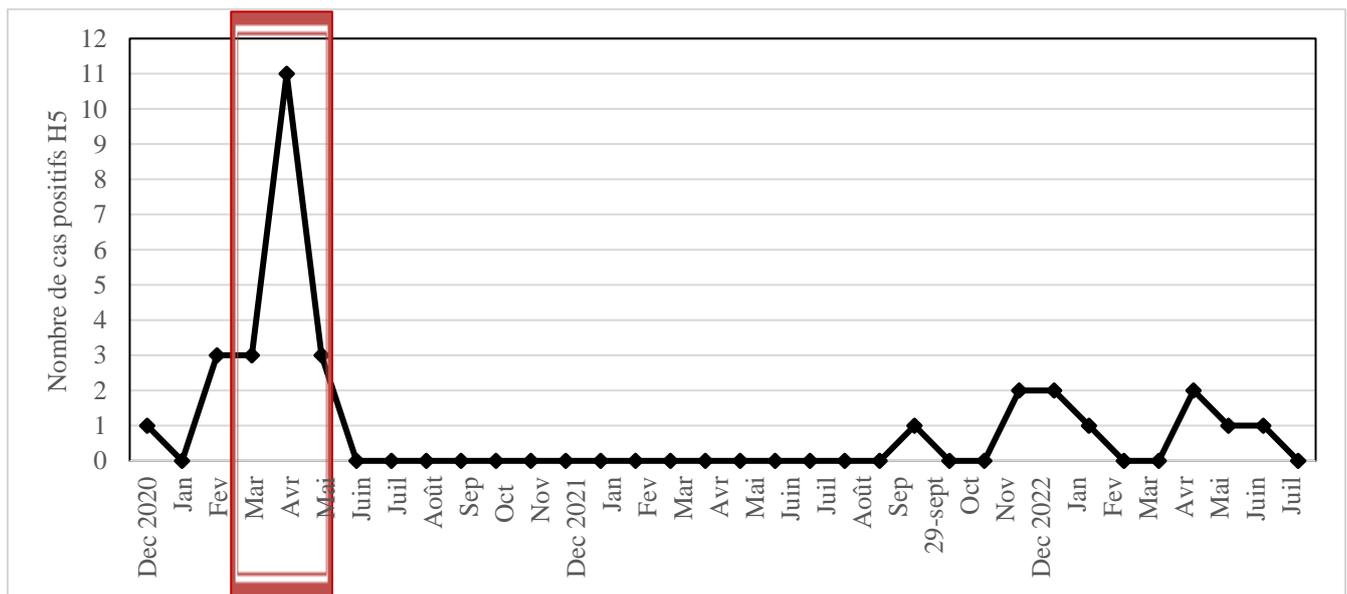


Figure 34 : La distribution temporelle des élevages positifs H5.

L’accalmie constatée entre les deux épizooties pourrait s’expliquer par la probable éradication du virus responsable de la première vague au vu des dégâts engendrés en 2020-2021, il est peu plausible que le virus circulait sans causer d’infections.

• **Incidence de l’AIV-H5 hautement pathogène en Afrique**

Selon les déclarations des pays africains concernant les cas de l’influenza aviaire chez la volaille au OMSA-WAHIS (Influenza aviaire - OMSA), du 25 décembre 2020 jusqu’au 24 aout 2023, le H5N1 et le H5N8 étaient les principaux sous-types circulants au Nigeria et au Sud d’Afrique (Cf. figure 35).

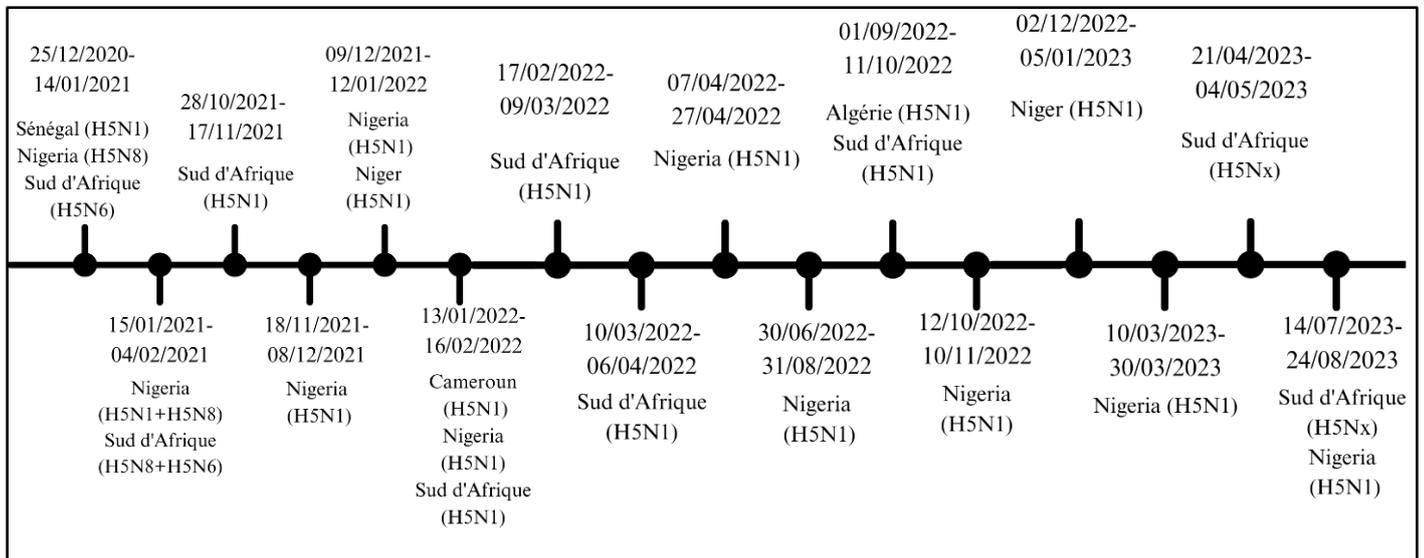


Figure 35 : Déclarations du H5Nx des pays africains à l’OMSA-WAHIS (Influenza aviaire - OMSA).

PARTIE 2 :

Pour répondre à l'objectif 2, relatif à la caractérisation moléculaire et l'étude phylogénétique des souches AIV circulantes, nous avons sélectionnés les échantillons positifs H5N1 et H5N8 pour le séquençage des gènes HA et NA par la méthode de Sanger (Sanger et al, 1977). Le choix des gènes HA et NA a été fait sur la base d'une synthèse bibliographique qui a montré que les variations génétiques chez le groupe des Influenzae sont portées par ces deux déterminants antigéniques.

Notre démarche expérimentale a comporté trois étapes :

- La première portant sur la préparation des ADN purifiés, à savoir :
 - L'obtention des produits PCR support des gènes ciblés (RT-PCR et PCR semi nichées).
 - Purification des ADN (produits PCR ou gel d'agarose après électrophorèse).
 - Préparation des ADN conformément au protocole de EUROFINS GENOMICS pour le séquençage.
- La deuxième, portant sur le séquençage de nos échantillons par EUROFINS GENOMICS.
- La troisième, portant sur l'analyse des séquences pour la détermination des pathotypes circulants et l'étude phylogénique.

I- MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. RT-PCR des gènes HA et NA.

Une RT-PCR (trois répétitions), décrite précédemment (page 28), a été lancée pour tous les échantillons positifs H5N1 et H5N8 afin d'obtenir une quantité (concentration) d'ADN suffisante et de cibler la totalité des gènes HA et NA qui ont été révélés par la suite par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

I.2. PCR semi-nichée des gènes HA et NA.

Pour rattraper les échantillons obtenus négatifs à la série de RT-PCR des gènes HA et NA, une PCR semi-nichée (trois répétitions) a été lancée en utilisant les amorces (Cf. tableau XIII) à une concentration finale de 0.4µM chacune. La réaction a été réalisée dans un volume final de 25µl avec le profil thermique suivant : 1 cycle de 94°C pendant 2min suivi par 35 cycles de 94°C pendant 15sec, 50°C pendant 30sec et une 72°C pendant 2min avec une élongation finale à 72°C pendant 3min.

Les deux fragments correspondant au gène HA et les deux fragments correspondant au gène NA sont révélés sur un gel d'agarose à 1,2% après électrophorèse.

Tableau XIII : Amorces utilisées pour le séquençage.

Cibles	Amorce	Séquence 5'--- 3'	Taille de l'amplicon (pb)	Référence
Gène HA	H5N1-HA-4Fv2	AGCAGGGGTTCAATCTGTCAAAA	1155	(Höper et al. 2008)
	H5-1162-Rw	GAGTGGATTCTTTGTCTG		(OMS- information for the molecular detection of influenza viruses, 2021)
	H5-1063-Fw	TTTATAGAGGGAGGATGG	716	(OMS- information for the molecular detection of influenza viruses, 2021)
	H5N1-HA-4RV2	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTAACTA		(Höper et al. 2008)
Gène NA	H5N1 -na_6Fv2	AGCAAAAAGCAGGAGTTTAAAATGA	648	(Höper et al. 2008)
	N1av-648-Rv	GCCATTTACACATGCACATTCAG		(OMS- information for the molecular detection of influenza viruses, 2021)
	AN1B	TTGCTTGGTCAGCAAGTGCA	895	(Zhang et Evans, 1991)
	H5N1-na_6Rv2	TAGAAACAAGGAGTTTTTTGAACAAAC		(Höper et al. 2008)
	H5N8-N8-F	TAGCGACCATTGGCTCCATC	835	La présente étude
	H5N8-N8-856R	GCATCCACTTTACCATCA		
	H5N8-N8-735F	GTAATGACTGACGGTCCAT	665	
	H5N8-N8-R	CTCCATCGTGCCATGACCAA		

I.3. Purification de l'ADN et contrôle de la qualité de l'ADN purifié.

La purification des produits PCR a été réalisée au moyen du kit de PCR CLEAN UP AND GEL EXTRACTION (MACHEREY-NAGEL) lorsque le profil obtenu à l'électrophorèse est de bonne qualité (bandes claires) alors que pour les échantillons présentant plusieurs bandes (effet smire), la purification a été réalisée sur des coupes de gel après séparation par électrophorèse avec le même Kit (Cf. annexe C).

L'ADN purifié est séparé par électrophorèse pour vérifier la qualité de la purification et pour avoir une estimation de la concentration d'ADN. Les bandes ont été comparées aux bandes du marqueur de taille qui sont d'une quantité prédéfinie. Pour les gènes excédant 1000 pb, il est recommandé d'envoyer une concentration d'ADN de 50 ng/μl.

I.4. Préparation des échantillons pour le séquençage

Le séquençage chez EUROFINs GENOMICS a été réalisé sur des échantillons ayant nécessité une préparation avant leur expédition. Nous avons opté pour le "service LightRun" qui requiert un traitement préalable de l'ADN purifié.

- Pour chaque échantillon, deux tubes sont préparés :
 - Le premier contenant 5 μl d'ADN purifié additionné de 5μl de l'amorce Forward (à raison d'une concentration finale de 5pmol/μl).
 - Le second contenant 5 μl d'ADN purifié additionné de 5μl de l'amorce Reverse (à raison d'une concentration finale de 5pmol/μl).
- Chaque tube est libellé avec une étiquette formulant un code-barre permettant l'identification des résultats à leur réception.
- Une boîte contenant les tubes ainsi traités et identifiés sont déposés dans un Dropbox de EUROFINs GENOMICS.

I.5. Annotation des séquences.

A la réception des résultats, chaque échantillon avait deux séquences d'ADN représentant la séquence Forward et la séquence Reverse.

Le traitement des séquences été réalisée par le logiciel SnapGene (version 7.2) selon la démarche suivante :

- Le gène a été assemblé à partir des deux séquences Forward et Reverse qui étaient produites de façon à être chevauchantes.
- Une fois les séquences complètes de chaque échantillon sont prêtes, un alignement avec les séquences présentes sur le site NCBI-Blast est réalisé.
- Sélection d'une séquence qui ressort dans chaque résultat pour l'utiliser comme séquence de référence.
- L'alignement multiple est ensuite réalisé entre nos séquences et la séquence de référence sur le logiciel SnapGene par Clustal-Omega.
- La correction des bases est établie en suivant le chromatogramme et la séquence de référence.
- La traduction des séquences en séquence d'acides aminés nous permettra de corriger les codons Stop qui peuvent se créer et détecter le codon d'initiation.
- Chaque séquence a été enregistrée sur le site NCBI à travers le portail de soumission pour permettre l'acquisition des numéros d'accèsion liées au GenBank.

I.6. Phylogénie

Les arbres phylogénétiques ont été produits selon la démarche suivante :

- Le consensus de chaque gène résultant de l'alignement multiple a été introduit sur le site NCBI-BLAST.
- Une sélection de quinze à vingt séquences a été réalisée sur les séquences obtenues sur le site (entre groupe interne et externe).
- Un fichier FASTA a été construit incluant les séquences téléchargées avec les nôtres, et il a été introduit sur le site http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi.
- L'alignement a été réalisé par MUSCLE.
- Un nombre de nucléotides est ensuite déterminé par GBlocks (curation).
- Le fichier téléchargé après curation a été introduit sur MEGA 11 (Tamura et al, 2021) pour générer l'arbre.
- L'arbre évolutif a été déduit à l'aide de la méthode Neighbour-Joining (Saitou et Nei, 1987). Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode du Maximum Composite Likelihood (Tamura et al, 2004) et sont exprimées en unités du nombre de substitutions de bases par site. Les positions des codons incluses étaient 1^{er} + 2^{ème} + 3^{ème} + Non codant. Toutes les positions ambiguës ont été supprimées pour chaque paire de séquences (option de suppression par paire).

I.7. Détermination des pathotypes

La caractérisation de l'enchaînement des acides aminés basique au niveau du site du clivage propre à nos échantillons a été effectuée avec le logiciel SnapGene.

II. RESULTATS :

Les échantillons positifs H5N1 (huit élevages) et H5N8 (treize élevages) sélectionnés pour le séquençage des gènes HA et NA ont été repris par une RT-PCR et une PCR semi-nichée pour l'obtention d'une quantité d'ADN suffisante et de la totalité des gènes.

II.1. RT-PCR des gènes HA.

Le gène HA-H5, représenté par la bande de 1.7 kb, chez les treize échantillons H5N8 positifs et les huit échantillons H5N1 positifs est rapporté dans les figures 36 (a et b).

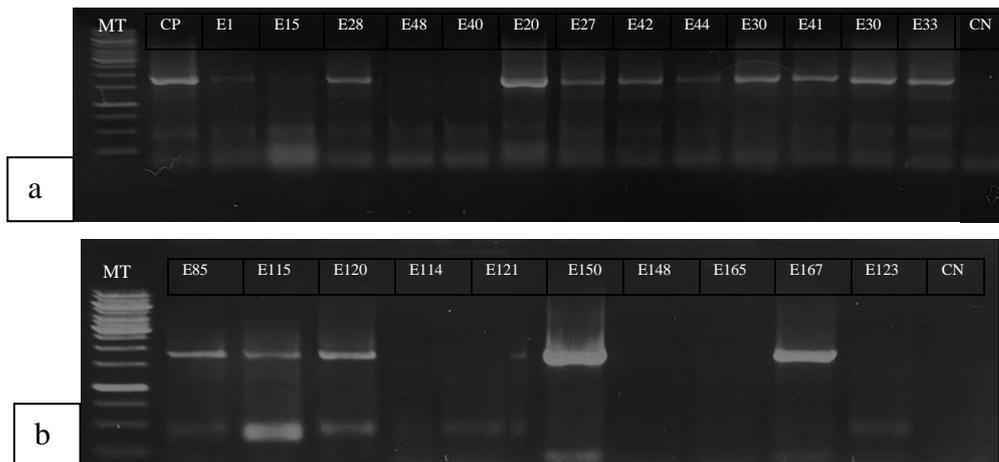


Figure 36 : Résultats de la RT-PCR du gène H5 [a : (H5N8) des cas enregistrés durant la première vague et b : (H5N1) des cas enregistrés durant la deuxième vague] ; révélés par électrophorèse. MT= 1KB, CN = Contrôle négatif.

II.2. RT-PCR des gènes NA

Les gènes NA-N1 et N8, représentés par la bande de 1.4 kb pour chaque gène, chez les treize échantillons H5N8 positifs et les huit échantillons H5N1 positifs, sont rapportés dans les figures 37 (a et b).

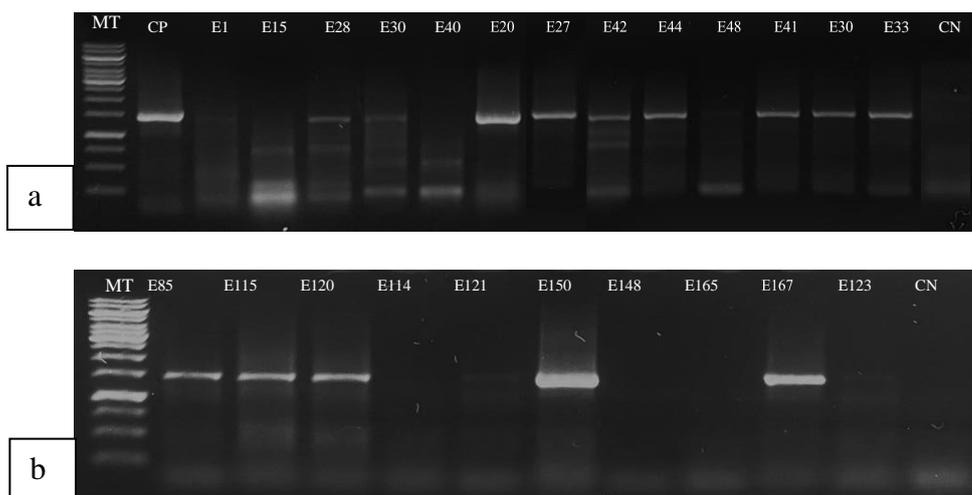


Figure 37 : Résultats de la RT-PCR du gène NA [a : NA-N8 (H5N8) des cas enregistrés durant la première vague et b : NA-N1 (H5N1) des cas enregistrés durant la deuxième vague] ; révélés par électrophorèse. MT= 1KB, CN = Contrôle négatif.

L'interprétation des résultats de la RT-PCR ciblant le gène HA-H5, NA-N1 et N8 est rapportée dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Interprétation des résultats de la RT-PCR ciblant le gène HA-H5, NA-N1 et N8.

	Elevages	Date	RT-PCR HA-H5	RT-PCR NA-N1 et N8	
				N1	N8
1.	E 1	22/12/2020	-	ND	-
2.	E 15	16/02/2021	-	ND	-
3.	E 20	06/03/2021	+	ND	+
4.	E 27	05/04/2021	+	ND	+
5.	E 28	09/04/2021	+	ND	+
6.	E 30	13/04/2021	+	ND	+
7.	E 33	15/04/2021	+	ND	+
8.	E 39	21/04/2021	+	ND	+
9.	E 40	21/04/2021	-	ND	-
10.	E 41	21/04/2021	+	ND	+
11.	E 42	22/04/2021	+	ND	+
12.	E 44	01/05/2021	+	ND	+
13.	E 48	23/05/2021	-	ND	-
14.	E 85	29/09/2022	+	+	ND
15.	E 114	15/12/2022	-	-	ND
16.	E 115	24/12/2022	+	+	ND
17.	E 120	21/01/2023	+	+	ND
18.	E 121	21/01/2023	-	-	ND
19.	E 123	05/02/2023	-	-	ND
20.	E 148	15/05/2023	-	-	ND
21.	E 150	16/05/2023	+	+	ND
22.	E 165	19/06/2023	-	-	ND
23.	E 167	17/07/2023	+	+	ND

Les résultats de la RT-PCR du gène HA-H5 ont permis d'amplifier neuf des treize échantillons positifs HA-H5 appartenant au sous-type H5N8 de la première épizootie et cinq autres des huit échantillons positifs HA-H5 appartenant au sous-type H5N1 de la deuxième épizootie, soit un total de quatorze (14) gènes HA-H5.

Les résultats de la RT-PCR du gène NA-N1 et N8 ont permis d'amplifier neuf échantillons des treize positifs NA-N8 de la première épizootie et cinq autres échantillons des huit positifs NA-N1 de la deuxième épizootie.

Pour rattraper les sept échantillons HA-H5 et NA obtenus négatifs à la RT-PCR (3 H5N1 et 4 H5N8), une PCR semi-nichée (trois répétitions) a été lancée.

II.3. PCR semi-nichée du gène HA.

Les bandes de 1.1 kb et 0.7 kb, correspondantes au gène HA-H5, révélées par électrophorèse pour les quatre échantillons négatifs à la RT-PCR restants appartenant au sous-type H5N8 de la première épizootie et trois échantillons négatifs à la RT-PCR appartenant au sous-type H5N1 de la deuxième épizootie sont représentées dans la figure ci-dessous.

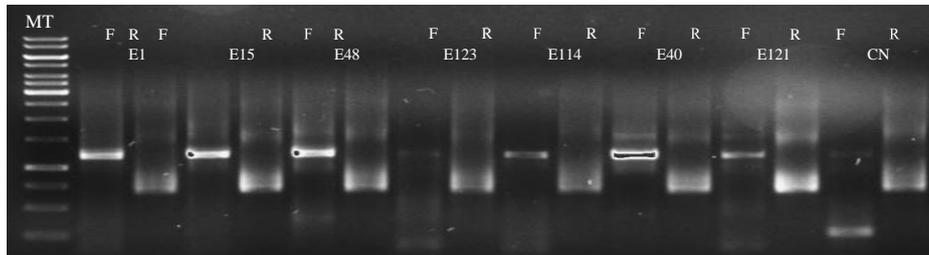


Figure 38 : Résultats de la PCR semi-nichée du gène H5 des deux sous-types révélés par électrophorèse. MT= 1KB, CN = Contrôle négatif.

II.4. PCR semi-nichée du gène NA

Les bandes de 0.8 kb et 0.7 kb, correspondantes au gène NA-N8, révélées par électrophorèse pour les quatre échantillons négatifs à la RT-PCR restants de la première épizootie ; sont représentées dans la figure ci-dessous.

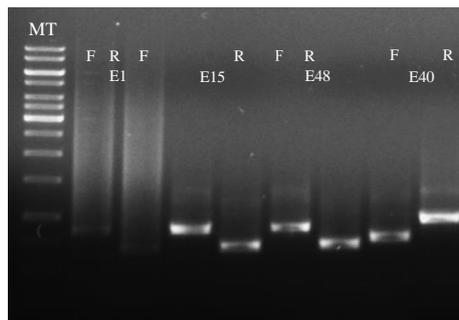


Figure 39 : Résultats de la PCR semi-nichée du gène N8 (H5N8) révélés par électrophorèse. MT= 1KB.

Les bandes de 0.6 kb et 0.9 kb, correspondantes au gène NA-N1, révélées par électrophorèse pour les trois échantillons négatifs à la RT-PCR restants de la deuxième épizootie ainsi que les deux échantillons E148 et E165, ressortis négatifs au sous typage N1 ; sont représentées dans la figure ci-dessous.

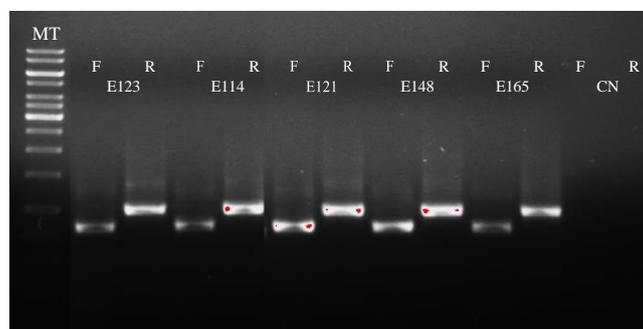


Figure 40 : Résultats de la PCR semi-nichée du gène N1 (H5N1) révélés par électrophorèse. MT= 1KB, CN = Contrôle négatif.

L'interprétation des résultats de la PCR semi nichée ciblant les gènes HA-H5, NA-N1 et N8 est rapportée dans le tableau XV.

Tableau XV : Interprétation des résultats de la PCR semi nichée ciblant les gènes HA-H5, NA-N1 et N8.

	Elevages	Date	PCR-semi nichée H5	PCR-semi nichée	
				PCR N1	PCR N8
1.	E 1	22/12/2020	+	ND	+
2.	E 15	16/02/2021	+	ND	+
3.	E 40	21/04/2021	+	ND	+
4.	E 48	23/05/2021	+	ND	+
5.	E 114	15/12/2022	+	+	ND
6.	E 121	21/01/2023	+	+	ND
7.	E 123	05/02/2023	-	+	ND
8.	E 148	15/05/2023	-	+	ND
9.	E 165	19/06/2023	-	+	ND

Les résultats de la PCR semi-nichée :

- Du gène HA-H5 ont permis d'amplifier les quatre échantillons positifs H5N8 de la première épizootie et deux échantillons des trois positifs H5N1 de la deuxième épizootie.
- Des gènes NA-N1 et N8 ont permis d'amplifier les cinq échantillons testés N1 et les quatre échantillons testés N8.

A noter que les résultats du sous typage N1 n'ont permis de caractériser que huit (08) élevages positifs H5N1 (Cf. page 38). Compte tenu que les élevages E148 et E165 sont caractérisés positifs au gène NA-N1 par PCR semi-nichée, il en ressort que la totalité des élevages H5 positifs (10 élevages) de la deuxième épizootie sont H5N1 positifs.

II.5. Sélection des produits PCR pour la purification de l'ADN :

L'analyse des profils électrophorétiques des produits PCR, réalisée sur la base de la qualité des bandes obtenues, a permis de sélectionner :

- Vingt et un (21) ADN issus de la RT-PCR et vingt-quatre (24) de la PCR semi-nichée pour la purification directe sur colonne.
- Sept (7) ADN issus de la RT-PCR pour la purification sur gel d'agarose.

II.5.a. Contrôle de la purification de l'ADN à partir des produits PCR :

Les profils électrophorétiques des quarante-cinq (21 + 24) ADN purifiés directement sur colonne sont représentés sur les figures 41.a (21) et 41.b (24), respectivement.

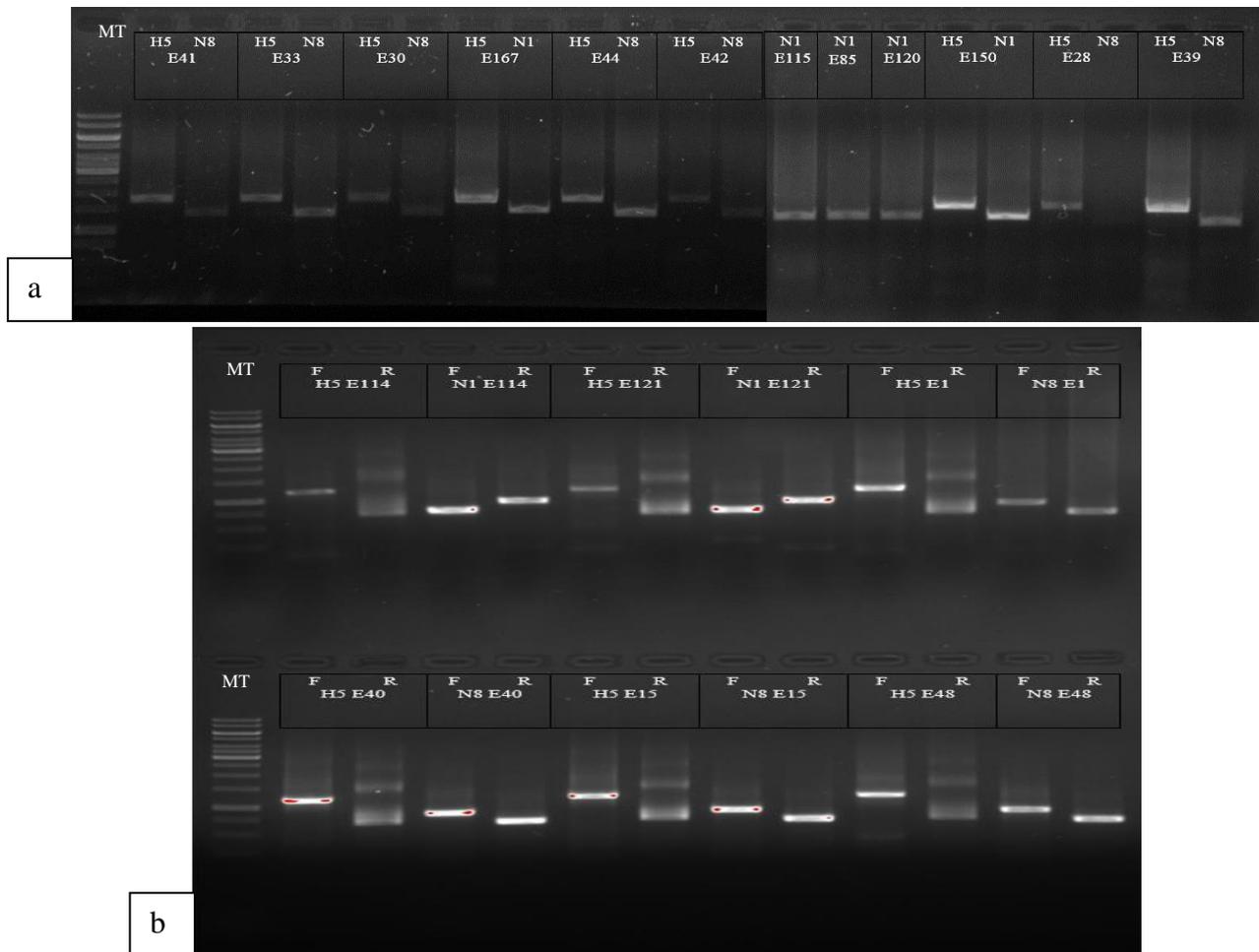


Figure 41 : Résultats de la purification des produits PCR obtenus par RT-PCR (a) et par PCR semi-nichée (b), révélés par électrophorèse.

II.5.b. Contrôle de la purification de l'ADN à partir du gel d'agarose après séparation par électrophorèse :

Les profils électrophorétiques des sept (7) ADN purifiés après séparation sur gel sont représentés sur la figure ci-dessous.



Figure 42 : Résultats de la purification des produits PCR obtenues par RT-PCR, révélés par électrophorèse.

II.6. Préparation des échantillons pour le séquençage

Sur un total de cinquante-deux (52) ADN purifiés (45 sur colonne et 7 sur gel), seuls deux ont été retirés sur la base de la qualité d'ADN correspondant aux gènes H5 et N8 de l'échantillon E28.

Les cinquante (50) ADN purifiés H5 et N8, correspondant aux douze (12) élevages H5N8 et aux sept (7) élevages H5N1, sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVI : Les ADN purifiées sélectionnés pour le séquençage.

	Code élevage	ADN purifiés
1.	E1	H5-F / H5-R
		N8-F / N8-R
2.	E15	H5-F / H5-R
		N8-F / N8-R
3.	E20	H5
		N8
4.	E27	H5
		N8
5.	E30	H5
		N8
6.	E33	H5
		N8
7.	E39	H5
		N8
8.	E40	H5-F / H5-R
		N8-F / N8-R
9.	E41	H5
		N8
10.	E42	H5
		N8
11.	E44	H5
		N8
12.	E48	H5-F / H5-R
		N8-F / N8-R
13.	E85	H5
		N1
14.	E114	H5-F / H5-R
		N1-F / N1-R
15.	E115	H5
		N1
16.	E120	H5
		N1
17.	E121	H5-F / H5-R
		N1-F / N1-R
18.	E150	H5
		N1
19.	E167	H5
		N1

II.7. Résultats du séquençage

Pour chaque gène, deux séquences brutes (non traitées) d'ADN chevauchantes (forward et reverse) associée à un chromatogramme, ont été reçues.

La séquence complète (contig) de chaque gène, assemblée au moyen du logiciel SnapGene (version 7.2) et enregistrée sur le site NCBI à travers le portail de soumission, a permis l'acquisition des numéros d'accèsion liées au GenBank rapportées dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVII : Informations liées aux séquences obtenues.

	Code élevage	Origine géographique	Espèce	Code tube	Gènes	N° d'accèsion GeneBank	Taille (pb)
H5N8	E1	Mostaganem (12/2020)	Poulet	H5 Y	H5	PP422233	1680
				N8 Y	N8	PP411896	1379
	E15	Tissemsilt (02/2021)	Poulet	H5 R	H5	PP422235	1304
				N8R	N8	ND	ND
	E20	Djelfa (04/2021)	Dinde	H5 K6	H5	PP422366	1695
				N8 K6	N8	PP411939	1258
	E27	Djelfa (03/2021)	Poulet	H5 K7	H5	PP422392	1695
				N8 K7	N8	PP422224	1267
	E30	Djelfa (04/2021)	Poulet	H5 KN13	H5	PP422393	1612
				N8 KN13	N8	PP422225	1053
	E33	Djelfa (04/2021)	Dinde	H5W15	H5	ND	ND
				N8 W15	N8	PP407304	1221
	E39	Djelfa (04/2021)	Poulet	H5 OS	H5	PP422394	1614
				N8 OS	N8	PP422228	1096
	E40	Bouira (04/2021)	Poulet	H5KN22	H5	ND	ND
				N8 KN22	N8	PP422226	1346
E41	Boumerdes (04/2021)	Poulet	H5C22	H5	ND	ND	
			N8C22	N8	ND	ND	
E42	Boumerdes (04/2021)	Poulet	H5 BK22	H5	PP422361	1686	
			N8 BK22	N8	PP422230	1206	
E44	Tiaret (05/2021)	Dinde	H5 K2.5	H5	PP422365	1498	
			N8 K2.5	N8	PP411909	1247	
E48	Blida (05/2021)	Poulet	H5 CS	H5	PP422362	1714	
			N8 CS	N8	PP422219	1335	
H5N1	E85	Médéa (09/2022)	Poulet	H5 K	H5	PP422959	1703
				N1 K	N1	PP422535	1396
	E114	Sétif (12/2022)	Poulet	H5 A	H5	PP422967	1729
				N1 A	N1	PP422536	1458
	E115	Bel abbés (12/2022)	Poulet	H5G	H5	ND	ND
				N1G	N1	ND	ND
	E120	Boumerdes (01/2023)	Poulet	H5 B	H5	PP422968	1695
				N1 B	N1	PP422958	1135
	E121	Tipaza (01/2023)	Poulet	H5 GOU	H5	PP422973	1313
				N1 GOU	N1	PP422956	1442
E150	Médéa (05/2023)	Dinde	H5BDJ	H5	PP422972	1417	
			N1BDJ	N1	ND	ND	
E167	Tiaret (07/2023)	Poulet	H5 KPC	H5	PP422971	1517	
			N1 KPC	N1	PP422537	1343	

II.8. Annotation des séquences.

II.8.a. Assemblage :

La séquence complète (contig) de chaque gène a été obtenue après assemblage des deux séquences brutes (non traitées) d'ADN chevauchantes (forward et reverse) au moyen du logiciel SnapGene.

Ont été construits les contigs suivants :

- Neuf séquences H5 (séquences incomplètes pour E33, E40 et E41) et dix séquences N8 (séquences incomplètes pour E15 et E41) issues des douze élevages H5N8.
- Six séquences H5 (séquence incomplète pour E115) et cinq séquences N1 (séquences incomplètes pour E115 et E150) issues des sept élevages H5N1.

II.8.b. Contrôle qualité des séquences :

Le contrôle qualité des séquences FASTA a été réalisé en se basant sur le chromatogramme, la séquence de référence et le reste des séquences alignées obtenues sur NCBI-BLAST, avec CLUSTAL OMEGA sur SnapGene (version 7.2.1) pour chaque gène.

Après traitement, les séquences obtenues des gènes :

- HA-H5 (Cf. figure 43.a et 43.b) et NA-N8 (Cf. figure 1- Annexe D) du sous type H5N8.
- HA-H5 (Cf. figure 2- Annexe D) et NA-N1 (Cf. figure 3- Annexe D) du sous-type H5N1.

Le traitement des séquences brutes fait ressortir ce qui suit :

- Seules les séquences PP422362 et PP422967 des gènes H5 des sous types H5N8 et H5N1 respectivement et les séquences PP422536 et PP422956 du gène NA-N1 sont conservées.
- Aucune des dix séquences NA-N8 n'est complète. A noter que la plus longue est la séquence PP411896 pour laquelle manquent les dernières quarante-deux bases équivalentes à quatorze acides aminés.

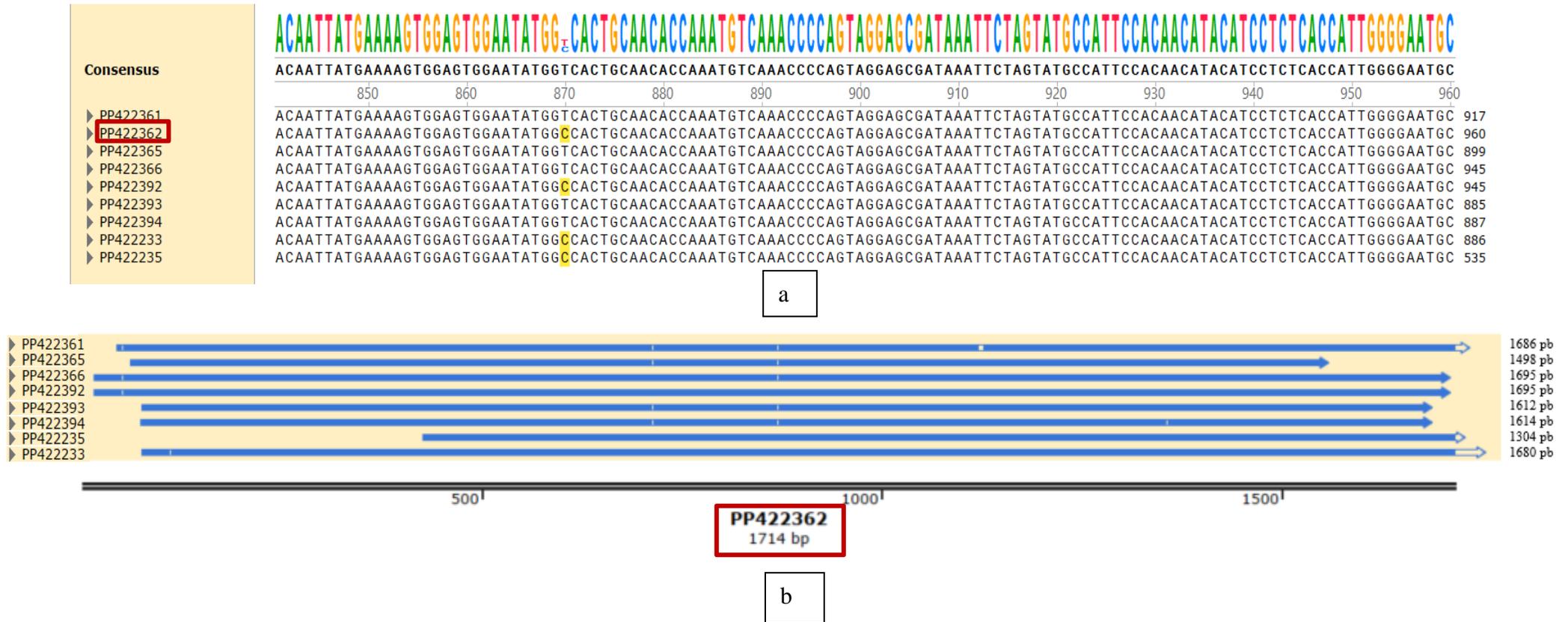


Figure 43 : Alignement des séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N8, a) séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N8, b) résumé graphique de l'alignement du gène H5 (H5N8).

II.8.c. Alignement multiple.

L'alignement multiple réalisé sur SnapGene a permis l'obtention des paramètres relatifs aux pourcentages d'identité (a), de similarité (b) et de GAP (c), des séquences nucléotidiques par l'algorithme DNAFULL et peptidiques par l'algorithme BLOSUM62, entre (i) les séquences conservées PP422362 et PP422967 des gènes H5 des deux sous types H5N8 et H5N1, respectivement, rapporté dans le tableau XVIII ; (ii) les séquences de chaque gène séparément, rapportés dans les tableaux XIX à XXII et (iii) les séquences du gène H5N1 avec celle de la souche vaccinale (A/duck/China/E319-2/2003), rapportés dans le tableau XXIII.

Le traitement des alignements est rapporté par point ci-dessous.

i. Séquences conservées :

Les résultats des paramètres recherchés entre les séquences PP422362 et PP422967 des gènes H5 des deux sous types H5N8 et H5N1 sont rapportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVIII : Résultats d'alignement des deux séquences conservées HA-H5 des sous-types H5N8 et H5N1.

		PP422967 (H5N1)			
		ADN		AA	
PP422362 (H5N8)	a	98.01	34 bases différentes/1711 pb alignées	98.77	7 AA différents dont 2 similaires/ 567 AA alignés
	b	/		99.12	
	c	0.00		0.00	

Le traitement des résultats de l'alignement des séquences conservées fait ressortir une différence de seulement 34 bases sur les 1711 paires de bases alignées et 7 acides aminés sur les 567 acides aminés alignés.

ii. Séquences des gènes étudiés :

Les résultats des paramètres recherchés entre les séquences de chaque gène séparément, à savoir :

- **Gène H5 (H5N8) :**

Les résultats des paramètres recherchés entre les neufs (9) séquences d'ADN obtenues et celles d'acides aminés correspondants au gène H5 (H5N8) sont rapportés dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Résultats de la matrice de similitude HA-H5 (H5N8).

H5 (H5N8)		%	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Séquences ADN	1. PP422233	a		99.78	100	100	100	100	99.47	100	100
		b		99.78	100	100	100	100	99.47	100	100
		c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.0	0.00
	2. PP422235	a	99.85		99.78	99.78	99.77	99.77	99.11	99.75	99.788
		b	/		99.78	99.78	99.77	99.7	99.11	99.75	99.78
		c	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00
	3. PP422366	a	99.58	99.54		100	100	100	99.48	100	99.32
		b	/	/		100	100	100	99.48	100	99.32
		c	0.24	0.31		0.00	0.00	0.00	0.35	0.0	0.51
4. PP422392	a	99.64	99.61	99.94		100	100	99.48	100	99.32	
	b	/	/	/		100	100	99.48	100	99.32	
	c	0.24	0.31	0.00		0.00	0.00	0.35	0.00	0.51	
5. PP422393	a	99.81	99.84	99.93	99.88		100	99.46	99.23	100	
	b	/	/	/	/		100	99.46	99.23	100	
	c	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.36	0.77	0.00	
6. PP422394	a	99.75	99.76	99.88	99.81	99.94		99.46	99.23	100	
	b	/	/	/	/	/		99.46	99.23	100	
	c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.36	0.77	0.00	
7. PP422361	a	99.41	99.23	99.29	99.23	99.63	99.57		99.42	99.31	
	b	/	/	/	/	/	/		99.42	99.31	
	c	0.42	0.46	0.60	0.60	0.37	0.37		0.39	0.35	
8. PP422365	a	99.80	99.82	99.93	99.87	100	99.93	99.60		100	
	b	/	/	/	/	/	/	/		100	
	c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40		0.00	
9. PP422362	a	99.88	99.85	99.59	99.65	99.88	99.81	99.47	99.87		
	b	/	/	/	/	/	/	/	/		
	c	0.06	0.00	0.23	0.23	0.00	0.00	0.35	0.00		

Séquences acides aminés

a : % identité, b : % similarité, c : % GAP.

La séquence nucléotidique la plus proche de la séquence PP422233 (Mostaganem, 12/2020) correspondante au premier cas de H5N8 est la séquence PP422362 (Blida, 05/2021) avec une identité génétique de 99.88%. Les deux séquences les plus proches génétiquement entre toutes les séquences H5 (H5N8) étudiées avec une identité génétique de 99.94% sont les séquences PP422366 (Djelfa, 04/2021) et PP422392 (Djelfa, 03/2021)

ainsi que PP422394 (Djelfa, 04/2021) et PP422393 (Djelfa, 04/2021) avec une même origine géographique. Cependant, les séquences les plus éloignées génétiquement entre toutes les séquences H5 (H5N8) étudiées, n'ont pas la même origine géographique mais sont de la même espèce (poulet), à savoir la séquence PP422361 (Boumerdes, 04/2021) et PP422392 (Djelfa, 03/2021) ainsi que PP422361 (Boumerdes, 04/2021) et PP422235 (Tissemsilt, 02/2021) avec une identité génétique de 99.23% avec un GAP de 0.60% et 0.46%, respectivement.

A l'exception des séquences d'acides aminés PP422235 (Tissemsilt, 02/2021) et PP422361 (Boumerdes, 04/2021), toutes les autres séquences PP422392 (Djelfa, 03/2021), PP422366 (Djelfa, 04/2021), PP422393 (Djelfa, 04/2021), PP422394 (Djelfa, 04/2021), PP422365 (Tiaret, 05/2021) et PP422362 (Blida, 05/2021) sont identiques à la séquence PP422233 (Mostaganem, 12/2020), correspondante au premier cas de H5N8. Les deux couples de séquences PP422361 (Boumerdes, 04/2021) et PP422392 (Djelfa, 03/2021) ainsi que PP422361 (Boumerdes, 04/2021) et PP422235 (Tissemsilt, 02/2021) sont les plus éloignées génétiquement avec le même nombre de GAP (soit 2) mais une différence d'acides aminés observée de trois (3) pour le premier sur 576 alignés et de quatre (4) pour le deuxième sur les 447 alignés. Le taux de GAP élevé (0.77%) observé entre les séquences d'acides aminés PP422365 (Tiaret, 05/2021) et les deux séquences PP422393 (Djelfa, 04/2021) et PP422394 (Djelfa, 04/2021) pourrait trouver une explication dans la différence de taille (114 pb et 116 pb, respectivement).

- **Gène NA-N8 :**

Les résultats des paramètres recherchés entre les dix (10) séquences d'ADN obtenues et celles d'acides aminés correspondants au gène NA-N8 sont rapportés dans le tableau XX.

Tableau XX : Résultats de la matrice de similitude des séquences NA-N8 (H5N8).

NA-N8		%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Séquences acides aminés	
1.	PP411896	a		99.51	99.76	99.76	99.10	99.05	99.43	99.10	99.73	99.75		
		b		100	100	100	99.32	99.05	100	99.55	100	100		
		c		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00
2.	PP407304	a	99.67		99.75	99.75	98.53	98.77	99.71	99.51	100	100		
		b	/		100	100	99.26	99.26	100	100	100	100		
		c	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00
3.	PP411909	a	99.76	99.92		100	98.80	98.80	99.71	99.76	100	100		
		b	/	/		100	99.28	99.04	100	100	100	100		
		c	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00
4.	PP411939	a	99.76	99.92	100		98.80	98.80	99.71	99.76	100	100		
		b	/	/	/		99.28	99.04	100	100	100	100		
		c	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00
5.	PP422219	a	99.47	99.43	99.52	99.52		98.57	98.57	98.28	98.63	98.76		
		b	/	/	/	/		98.81	99.43	98.92	99.18	99.25		
		c	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.000	0.00	0.000		
6.	PP422224	a	99.37	99.59	99.52	99.52	99.29		98.86	98.57	98.90	98.76		
		b	/	/	/	/	/		99.43	99.05	99.18	99.00		
		c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.000	0.00	0.00		
7.	PP422225	a	99.62	99.91	99.91	99.91	99.43	99.62		99.71	99.71	99.71		
		b	/	/	/	/	/	/		100	100	100		
		c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	
8.	PP422226	a	99.47	99.84	99.92	99.84	99.25	99.37	99.91		100	99.75		
		b	/	/	/	/	/	/	/		100	100		
		c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	
9.	PP422228	a	99.73	100	100	100	99.45	99.64	99.91	100		100		
		b	/	/	/	/	/	/	/	/		100		
		c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	
10.	PP422230	a	99.67	99.83	99.92	99.92	99.42	99.42	99.91	99.83	100			
		b	/	/	/	/	/	/	/	/	/			
		c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		

a : % identité, b : % similarité, c : % GAP.

La séquence nucléotidique la plus proche de la séquence PP411896 (Mostaganem, 12/2020) correspondante au premier cas de H5N8 est la séquence PP411909 (Tiaret, 05/2021) avec une identité génétique de 99.76%.

Les séquences PP411909 (Tiaret, 05/2021) et PP411939 (Djelfa, 04/2021) sont identiques génétiquement et les séquences PP422228 (Djelfa, 04/2021), PP422230 (Boumerdes, 04/2021), PP407304 (Djelfa, 04/2021) PP411909 (Tiaret, 05/2021) et PP411939 (Djelfa, 04/2021) sont aussi identiques génétiquement. Cependant, les séquences les plus éloignées génétiquement entre toutes les séquences N8 (H5N8) étudiées, n'ont pas la même origine géographique mais sont de la même espèce (poulet), à savoir les séquences PP422219 (Blida, 05/2021) et PP422226 (Bouira, 04/2021) avec une identité génétique de 99.25%.

Les séquences d'acides aminés les plus proches de la séquence PP411896 (Mostaganem, 12/2020) correspondante au premier cas de H5N8 sont PP411909 (Tiaret, 05/2021) et PP411939 (Djelfa, 04/2021) avec une identité peptidique de 99.76%. La séquence d'acides aminés PP422228 (Djelfa, 04/2021) est identique aux séquences PP422230 (Boumerdes, 04/2021), PP407304 (Djelfa, 04/2021), PP411909 (Tiaret, 05/2021), PP411939 (Djelfa, 04/2021), PP422226 (Bouira, 04/2021) et PP422225 (Djelfa, 04/2021) ainsi que le couple de séquences PP411909 (Tiaret, 05/2021) et PP411939 (Djelfa, 04/2021) sont également identiques. Parmi toutes les séquences N8 (H5N8) étudiées, les deux séquences d'acides aminés les plus éloignées avec une identité peptidique de 98.28% sont PP422226 (Bouira, 04/2021) et PP422219 (Blida, 05/2021) qui sont également les plus éloignées génétiquement avec une différence de huit (8) acides aminés et 0 GAP.

- **Gène H5 (H5N1) :**

Les résultats des paramètres recherchés entre les six (6) séquences d'ADN obtenues et celles d'acides aminés correspondants au gène H5 (H5N1) sont rapportés dans le tableau XXI.

Tableau XXI : Résultats de la matrice de similitude HA-H5 (H5N1).

		H5 (H5N1)	%	1	2	3	4	5	6		
Séquences ADN	1.	PP422959	a		97.80	98.98	98.88	98.78	99.05	Séquences acides aminés	
			b		98.14	99.15	99.11	99.39	99.43		
			c		0.68	0.34	0.00	0.00	0.00		
	2.	PP422967	a	99.24		99.14	99.78	99.59	98.86		
			b	/		99.31	99.78	100	99.05		
			c	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00		
	3.	PP422968	a	99.59	99.53		99.55	99.39	99.62		
			b	/	/		99.55	99.80	99.81		
			c	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00		
	4.	PP422973	a	99.54	99.92	99.92		99.74	99.26		
			b	/	/	/		99.74	99.26		
			c	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00		
	5.	PP422972	a	99.15	99.58	99.51	99.82		99.39		
			b	/	/	/	/		99.59		
			c	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00		
	6.	PP422971	a	99.41	99.41	99.74	99.98	99.65			
			b	/	/	/	/	/			
			c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			

a : % identité, b : % similarité, c : % GAP.

La séquence nucléotidique la plus proche de la séquence PP422959 (Médéa, 09/2022) correspondante au premier cas de H5N1 est la séquence PP422968 (Boumerdes, 01/2023) avec une identité génétique de 99.59%. Les deux séquences les plus proches génétiquement entre toutes les séquences H5 (H5N1) étudiées avec une identité génétique de 99.98 % sont les séquences PP422973 et PP422971 avec une origine géographique distante (Tipaza vs Tiaret) et un décalage temporel de l'infection (01/2023 vs 07/2023), respectivement. Cependant, les deux séquences les plus éloignées génétiquement entre toutes les séquences H5 (H5N1) étudiées, ont la même origine géographique mais l'espèce est différente (poulet vs dinde), à savoir la séquence PP422959 (Médéa, 09/2022) et celle PP422972 (Médéa, 05/2023) avec une identité génétique de 99.15 %.

La séquence d'acides aminés la plus proche de la séquence PP422959 (Médéa ; 09/2022) correspondante au premier cas de H5N1 est la séquence PP422971 (Tiaret ; 07/2023) avec une identité peptidique de 99.05 % et sans GAP alors que la séquence PP422968 (Boumerdes ; 01/2023) est la plus proche génétiquement avec deux (2) GAP détectés sur la séquence d'acides aminés. Les deux séquences PP422967 (Sétif, 12/2022) et PP422973 (Tipaza, 01/2023), les plus proches entre toutes les séquences H5 (H5N1) étudiées avec une identité peptidique de 99.78%, différent d'un seul acide aminé sur les 447 alignés alors que les séquences les plus proches génétiquement (PP422971 ; Tiaret ; 07/2023 et PP422973, Tipaza, 01/2023) diffèrent de trois (3) acides aminés sur les 407 alignés. Parmi toutes les séquences H5 (H5N1) étudiées, les deux séquences PP422959 (Médéa, 09/2022, poulet) et PP422972 (Médéa, 05/2023, dinde) sont les plus éloignées génétiquement et la différence d'acides aminés observée n'est que de six (6) acides aminés et 0 GAP alors que les séquences d'acides aminés les plus éloignées PP422959 (Médéa, 09/2022, poulet) et PP422967 (Sétif, 12/2022 ; poulet) expriment une différence de 14 acides aminés sur les 591 alignés et 4 GAP.

- **Gène NA-N1 :**

Les résultats des paramètres recherchés entre les cinq (5) séquences d'ADN obtenues et celles d'acides aminés correspondants au gène NA-N1 sont rapportés dans le tableau XXII.

Tableau XXII : Résultats de la matrice de similitude NA-N1 (H5N1).

		NA-N1	%	1	2	3	4	5		
Séquences ADN	1.	PP422536	a		100	100	99.57	99.58	Séquences acides aminés	
			b		100	100	99.78	99.79		
			c		0.00	0.00	0.00	0.00		
	2.	PP422956	a	99.79		100	99.57	99.58		
			b	/		100	99.78	99.79		
			c	0.00		0.00	0.00	0.00		
	3.	PP422958	a	99.91	99.91		99.49	99.49		
			b	/	/		99.75	99.75		
			c	0.00	0.00		0.00	0.00		
	4.	PP422537	a	99.78	99.78	99.65		99.14		
			b	/	/	/		99.57		
			c	0.00	0.00	0.00		0.00		
	5.	PP422535	a	99.79	99.78	99.65	99.55			
			b	/	/	/	/			
			c	0.00	0.00	0.00	0.00			

a : % identité, b : % similarité, c : % GAP.

La séquence nucléotidique la plus proche de la séquence PP422535 (Médéa, 09/2022) correspondante au premier cas de H5N1 est la séquence PP422536 (Sétif, 12/2022) avec une identité génétique de 99.79 %. Cependant, les deux séquences les plus éloignées génétiquement entre toutes les séquences N1 (H5N1) étudiées proviennent de la même espèce (poulet), à savoir la séquence PP422535 (Médéa, 09/2022) et celle PP422537 (Tiaret, 07/2023) avec une identité génétique de 99.55 %. Les séquences les plus proches génétiquement entre toutes les séquences N1 (H5N1) étudiées avec une identité génétique de 99.91 % sont les séquences PP422536 (Sétif, 12/2022), PP422958 (Boumerdes, 01/2023) et PP422956 (Tipaza, 01/2023) avec une origine géographique distante.

Les séquences d'acides aminés les plus proches de la séquence PP422535 (Médéa, 09/2022) correspondante au premier cas de H5N1 sont les séquences PP422536 (Sétif, 12/2022) et PP422956 (Tipaza, 01/2023) avec une identité peptidique de 99.58 %. Parmi toutes les séquences N1 (H5N1) étudiées, les deux séquences d'acides aminés les plus éloignées avec une identité peptidique de 99.14% sont PP422535 (Médéa, 09/2022) et celle PP422537 (Tiaret, 07/2023) qui sont également les plus éloignées génétiquement avec une différence de quatre (4) acides aminés et 0 GAP. Les trois séquences des acides aminés PP422536 (Sétif, 12/2022), PP422958 (Boumerdes, 01/2023) et PP422956 (Tipaza, 01/2023) sont les plus proches entre toutes les séquences N1 (H5N1) étudiées avec la même identité peptidique (100%).

iii. Séquence de la souche vaccinale (Volvac B.E.S.T AI+ND® de Boehringer Ingelheim animal health).

Les séquences du gène H5 (H5N1) des souches circulantes en Algérie ont été alignées avec la séquence de la souche vaccinale (A/duck/China/E319-2/2003 ; numéro d'accèsion de GeneBank **AY518362**) afin d'estimer leur homologie (Cf. tableau XXIII).

Tableau XXIII : Les résultats de la matrice de similitude de nos séquences avec celle de la souche vaccinale.

H5 (H5N1)	%	(A/duck/China/2003(H5N1)) (1776 pb/567 aa)			
		ADN		aa	
1. PP422959	a	90.89	155 bases différentes/1702 pb alignées	93.07	39 aa différents dont 19 similaires/ 563 aa alignés
	b	/		96.45	
	c	0.00		0.00	
2. PP422967	a	91.04	155 bases différentes/1729 pb alignées	92.95	40 aa différents dont 19 similaires/ 567 aa alignés
	b	/		96.30	
	c	0.00		0.00	
3. PP422968	a	91.21	149 bases différentes/1695 pb alignées	93.76	35 aa différents dont 18 similaires/ 561 aa alignés
	b	/		96.97	
	c	0.00		0.00	
4. PP422973	a	91.24	115 bases différentes/1313 pb alignées	94.15	25 aa différents dont 13 similaires/ 427 aa alignés
	b	/		97.19	
	c	0.00		0.00	
5. PP422972	a	90.33	137 bases différents/1417 pb alignées	92.80	34 aa différents dont 19 similaires/ 472 aa alignés
	b	/		96.82	
	c	0.00		0.00	
6. PP422971	a	90.51	144 bases différentes/1517 pb alignées	93.27	34 aa différents dont 17 similaires/ 505 aa alignés
	b	/		96.63	
	c	0.00		0.00	

a : % identité, b : % similarité, c : % GAP.

L'alignement a fait ressortir que nos séquences ont une homologie nucléotidique entre 90.33% et 91.24% et une homologie peptidique entre 92.80% et 94.15% avec la séquence codante pour la protéine H5 de la souche vaccinale.

II.9. Détermination des pathotypes

Le site de clivage HA0 des gènes HA-H5 des deux sous types est représenté sur la figure 43.a pour le sous-type H5N1 et la figure 43.b pour le sous-type H5N8.



Figure 44 : Séquences d'acides aminés au niveau du site de clivage du gène HA-H5 des sous-types H5N1 (a) et H5N8 (b).

Le motif retrouvé des acides aminés au niveau du site de clivage du gène HA-H5 des deux sous-types est $^{337}\text{PLREKRRKR/GLF}^{348}$. La présence d'une succession d'acides aminés basiques (R=arginine, K=lysine) nous confirme le caractère hautement pathogène des souches.

Le site de clivage sur la séquence correspondante à la souche vaccinale a été recherché et comparé avec le site présent sur nos séquences du gène H5 (sous type H5N1) (Cf. figure 44).

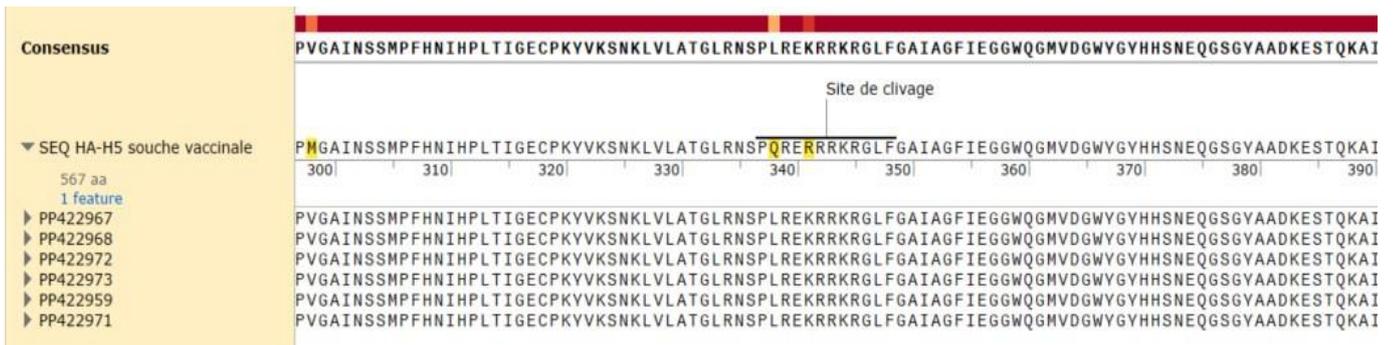


Figure 45 : Séquences d'acides aminés au niveau du site de clivage du gène HA-H5 des deux sous-types et de celui de la souche vaccinale.

Le site de clivage $^{337}\text{PQRERRRKR/GLF}^{348}$ retrouvé chez la souche vaccinale, également de nature multi-basique, confirme son pathotype hautement pathogène.

Le site caractérisé sur les souches H5N1 circulantes en Algérie diffère de celui de la souche vaccinale par deux acides aminés ($^{337}\text{PLREKRRKR/GLF}^{348}$ vs $^{337}\text{PQRERRRKR/GLF}^{348}$).

II.10. Phylogénie

Les arbres phylogénétiques ont été réalisées par la méthode Neighbour-Joining sur MEGA 11 pour chaque gène séparément.

II.10. a. Gène H5 (H5N8) :

Les séquences H5 (H5N8) ont été alignées, curées à 1127 pb et étudiées phylogénétiquement avec des séquences proches génétiquement (99.15%-99.31%) et d'autres plus distantes (98.94%-97.88%) (Cf. figure 46).

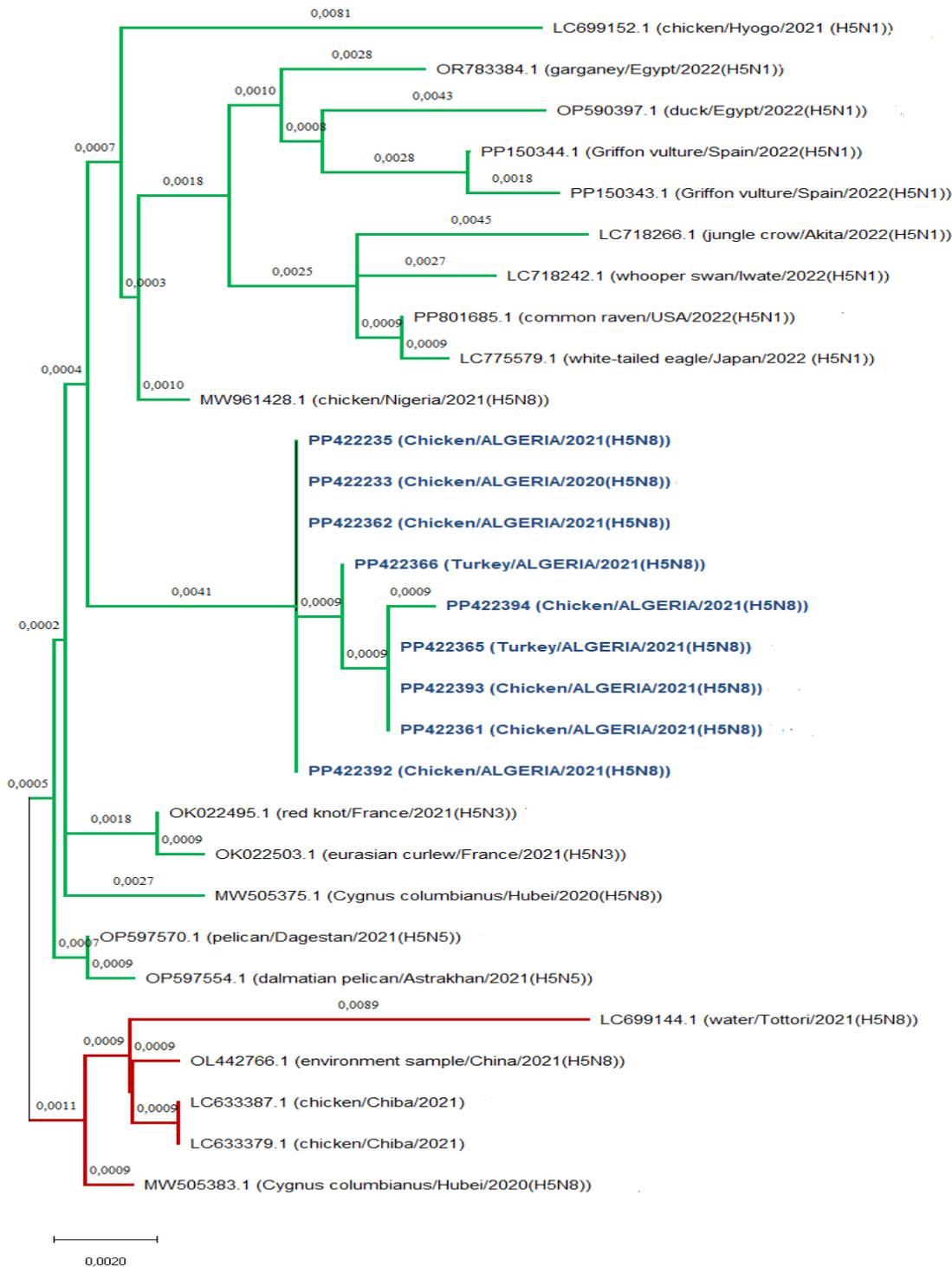


Figure 46 : Arbre phylogénétique des séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N8 étudiées.

L'analyse phylogénétique a montré que nos séquences H5 du sous-type H5N8 forment un groupe monophylétique partageant des similarités avec la séquence H5 de la souche H5N8 Nigériane isolée en 2021 (Chicken/Nigeria/2021(H5N8)) homologue à 99.21% ainsi que la séquence H5 de la souche H5N8 Chinoise isolée en 2020 (Cygnus Columbianus/Hubei/2020 (H5N8)) homologue à 99.20% et une différence de 13 bases (0 GAP) pour la première et 19 bases (1 GAP) pour la seconde sur les 1714 pb alignés de la séquence conservée PP422362. La distance patristique moyenne entre ces séquences et nos séquences est de 0.0024563 et de 0.0024245, respectivement alors que celle calculée entre nos séquences est de 0.001186139.

Nos séquences étaient aussi génétiquement apparentées à des séquences de souches :

- H5N8 isolées en Chine (2021 et 2022) (98.76%-98.68%), au Japon (2021) (97.88%).
- H5N1 isolées en 2022 en Egypte (98.41%-98.15%), en Espagne (98.06%-98.23%), au Japon (98.06%-98.68%) et aux USA (98.32%).
- H5N3 isolées en France (2021) (98.85%-98.76%).
- H5N5 isolées en Russie (2021) (98.94% et 98.85%).

Le consensus du gène H5 du sous-type H5N8 a été alignés avec des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasiennne et Nord-Américaine) (Cf. figure 47).

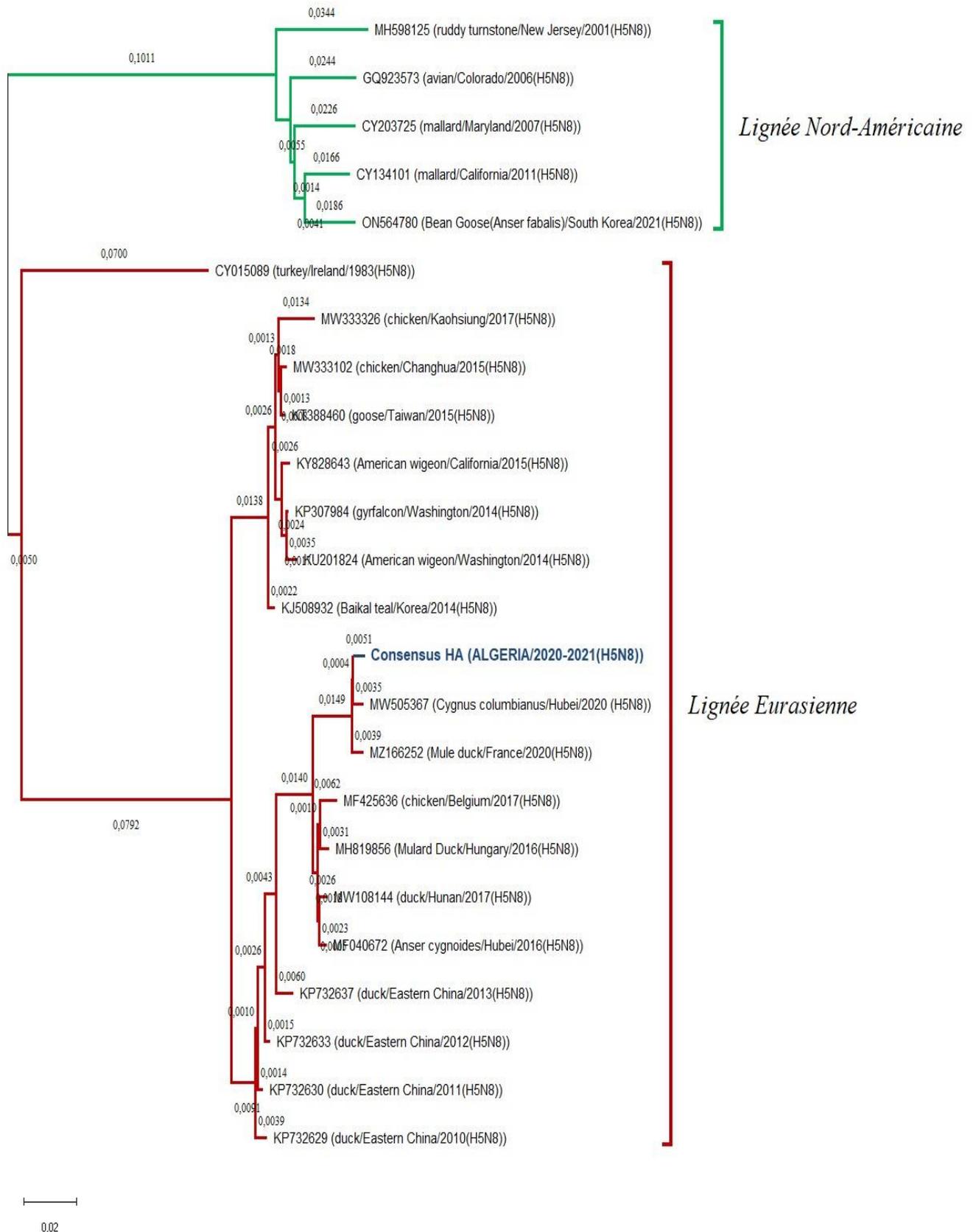


Figure 47 : Arbre phylogénétique du consensus du gène HA-H5 du sous-type H5N8, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasiennne et Nord-Américaine).

Les distances patristiques ont été calculées entre le consensus H5 (H5N8) et les séquences suivantes :

- La séquence du premier H5N8 isolé en Irlande en 1983 (turkey/Ireland/1/1983(H5N8)) est à une distance patristique de 0,20052
- La séquence la plus proche étant celle de la souche isolée en Chine en 2020 (Cygnus columbianus/China/2020(H5N8)) est à une distance patristique de 0,00861

Les distances patristiques moyennes entre le consensus du gène H5 du sous-type H5N8 algérien et les séquences représentatives de la lignée Eurasienne et la Nord-Américaine sont de 0.05306 et 0.1162 respectivement.

II.10.b. Gène NA-N8 :

Les séquences N8 ont été alignées, curées à 1053 pb et étudiées phylogénétiquement avec des séquences proches génétiquement (99.06%-99.24%) et d'autres plus distantes (98.86%-97.61%) (Cf.figure 48).

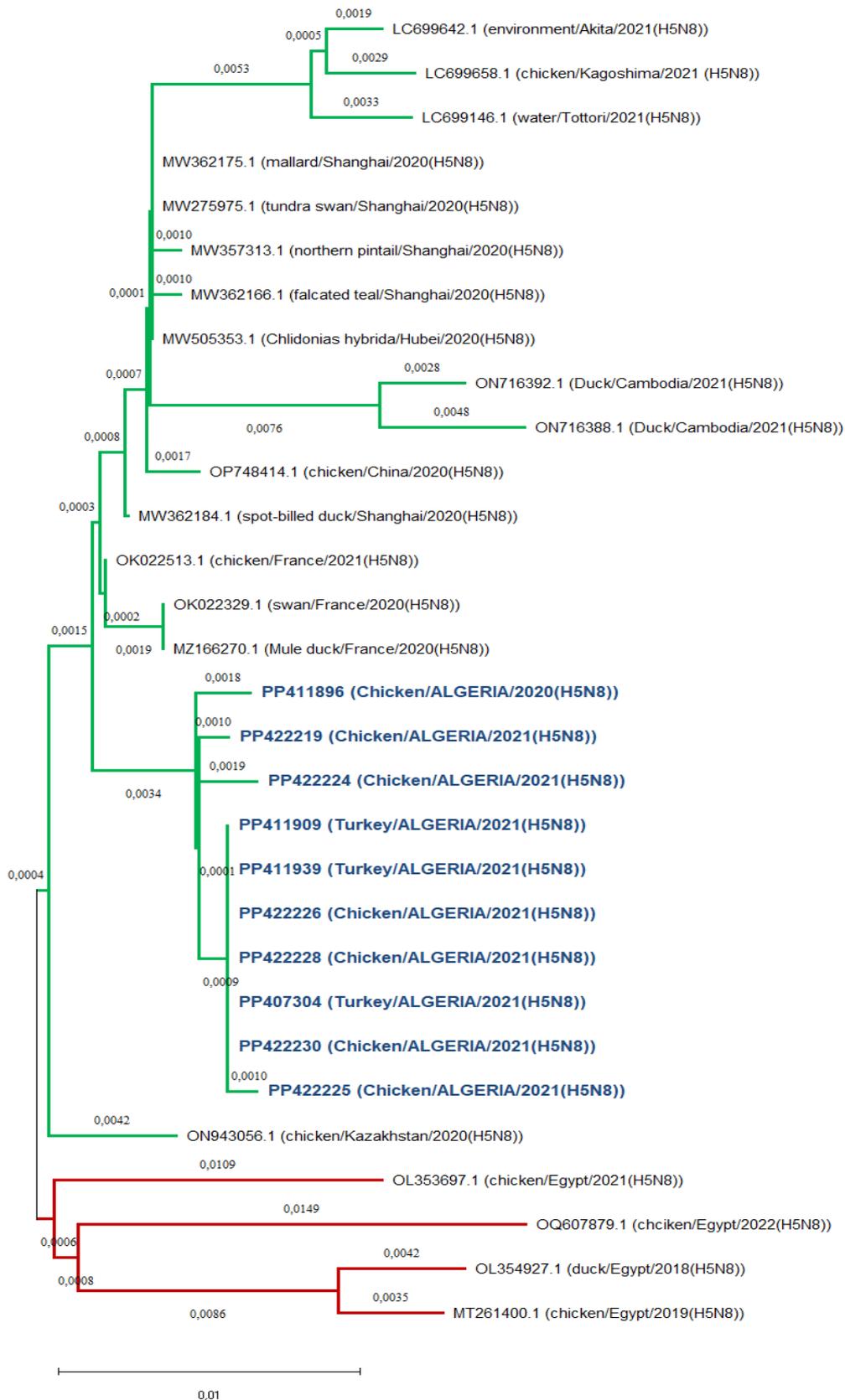


Figure 48 : Arbre phylogénétique des séquences du gène NA-N8 du sous-type H5N8 étudiées.

L'analyse phylogénétique a montré que nos séquences N8 du sous-type H5N8 forment un groupe monophylétique partageant des similarités avec la séquence N8 des souches H5N8 Françaises isolées en 2020 (Swan/France/2020(H5N8)) et (Mule duck/France/2020(H5N8)) homologues à 99.12% ainsi que de la souche H5N8 Kazakhstanaise isolée en 2020 (Chicken/Kazakhstan/2020 (H5N8)) homologue à 98.86% et une différence de 8 bases (0 GAP) pour les premières et 12 bases (0 GAP) pour la seconde sur les 1379 pb alignés de la séquence conservée PP411896. La distance patristique moyenne entre ces séquences et nos séquences est de 0.0031937762 et de 0.003264998, respectivement alors que celle calculée entre nos séquences est de 0.001590974.

Nos séquences étaient aussi génétiquement apparentées à des séquences N8 de souches H5N8 isolées en Chine en 2020 (homologie entre 99.24% et 99.09%), au Japon entre 2020 et 2021 (homologie entre 98.19% et 99.06%), au Cambodge en 2021 (homologie entre 98.32% et 98.39%) et en Egypte entre 2018 et 2022 (homologie entre 97.61% et 98.33%)

Le consensus du gène NA du sous-type H5N8 a été aligné avec des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasienne et Nord-Américaine) (Cf. figure 49).

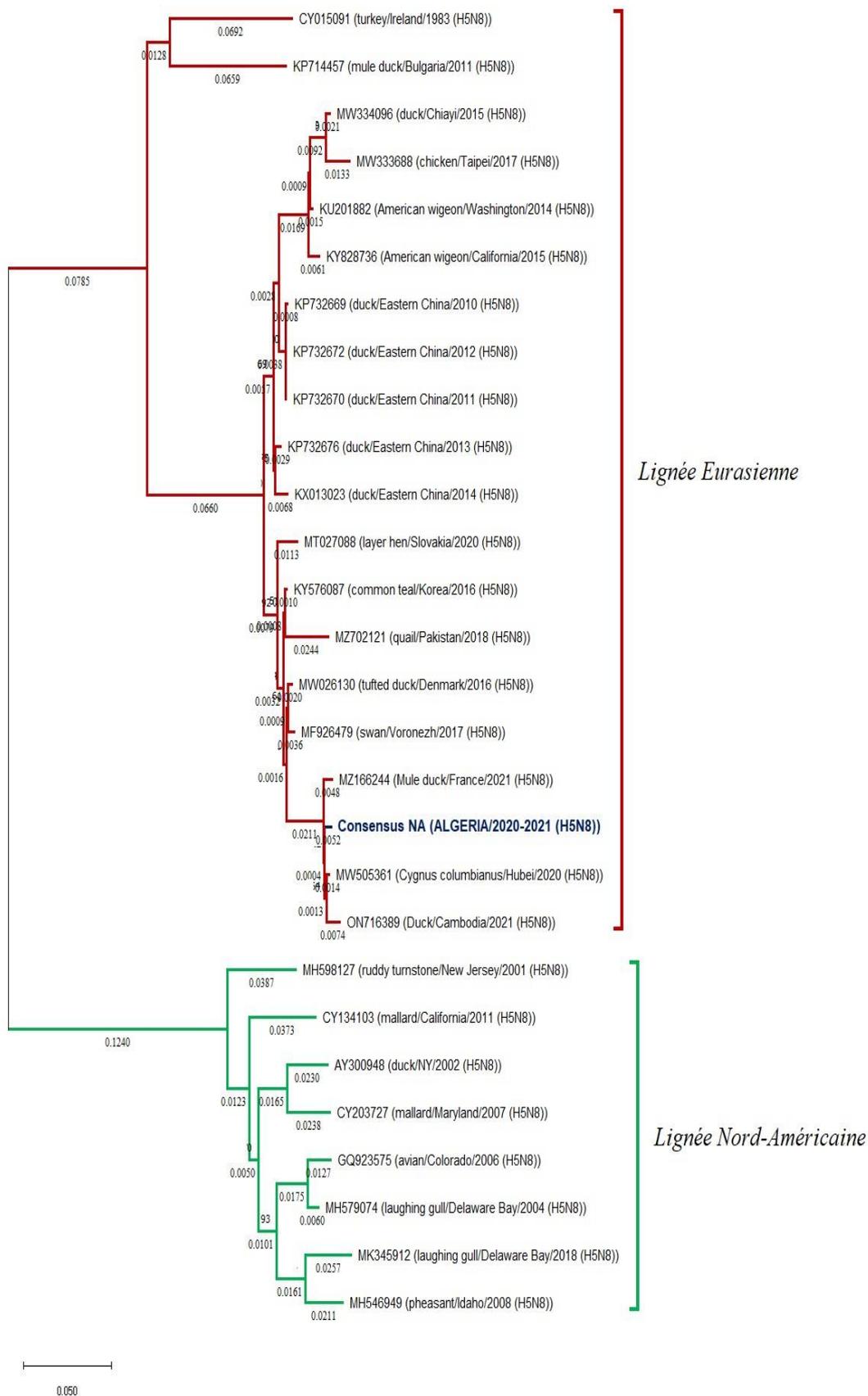


Figure 49 : Arbre phylogénétique du consensus du gène NA-N8 du sous-type H5N8, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasienne et Nord-Américaine).

Les distances patristiques ont été calculées entre le consensus N8 (H5N8) et les séquences suivantes :

- La séquence du premier H5N8 isolé en Irlande en 1983 (turkey/Ireland/1/1983(H5N8)) est à une distance patristique de 0,187431.
- La séquence la plus proche étant celle de la souche isolée en Chine en 2020 (Cygnus columbianus/China/2020(H5N8)) est à une distance patristique de 0,007920.

Les distances patristiques moyennes entre le consensus du gène N8 du sous-type H5N8 algérien et les séquences représentatives de la lignée Eurasienne et la Nord-Américaine sont de 0.04458 et 0.17688 respectivement.

II.10.c. Gène H5 (H5N1) :

Les séquences H5 (H5N1) ont été alignées, curées à 1124 pb et étudiées phylogénétiquement avec des séquences proches génétiquement (98,80 %-99,25%) et d'autres plus distantes (98,06%-98,12%) (Cf.figure 50).

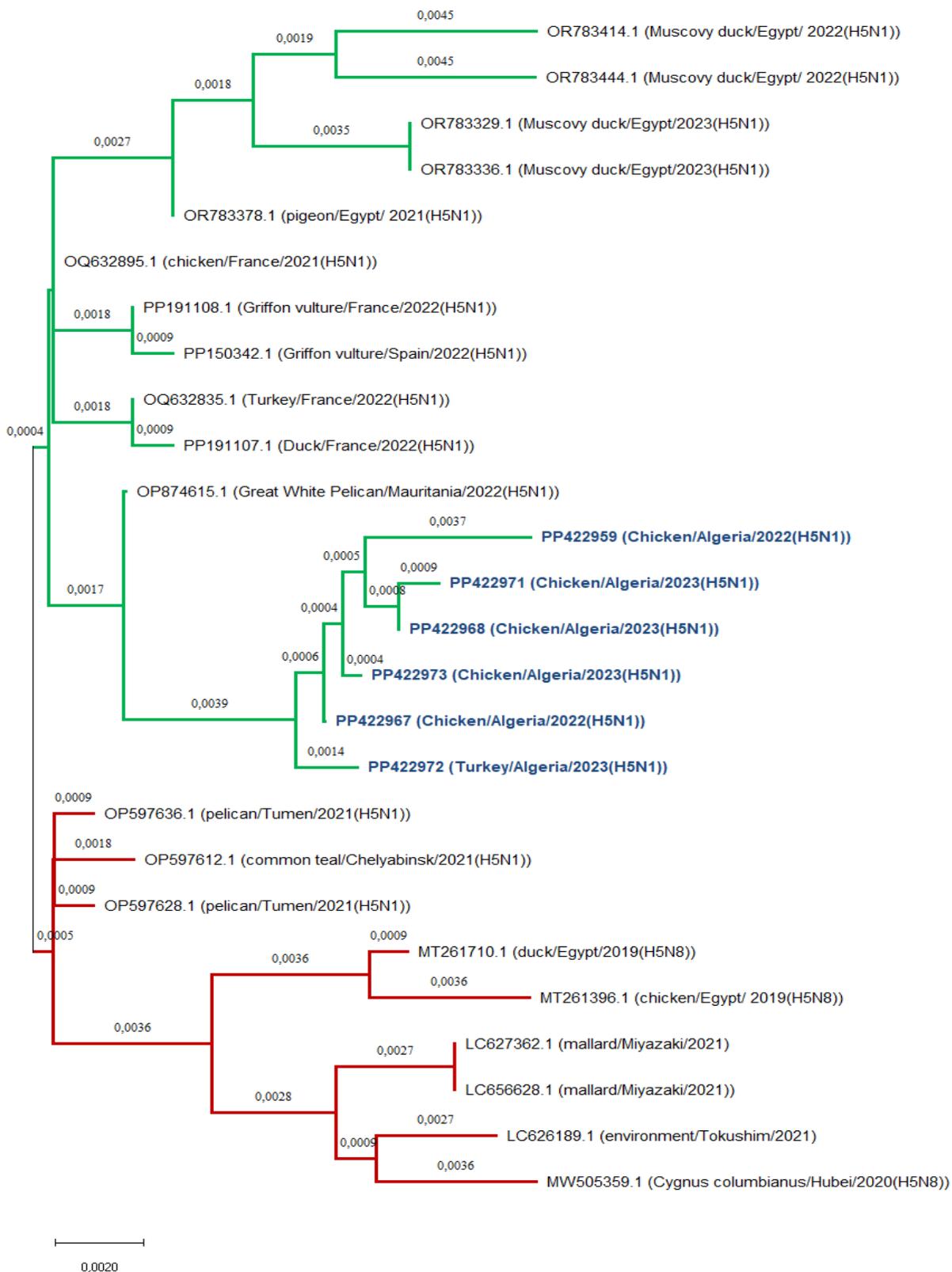


Figure 50 : Arbre phylogénétique des séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N1 étudiées.

L'analyse phylogénétique a montré que nos séquences H5 du sous-type H5N1 sont étroitement similaires à la séquence H5 de la souche H5N1 Mauritanienne isolée en 2022 (Great_White_Pelican/Mauritania/2022(H5N1)) homologue à 99.25% et une différence de 13 bases sur les 1729 pb alignés de la séquence conservée PP422967. La distance patristique moyenne entre cette séquence et nos séquences est de 0.004146 alors que celle calculée entre nos séquences est de 0.003285.

Nos séquences étaient aussi génétiquement apparentées à des séquences de souches H5N1 isolées en France entre 2021 et 2022 (homologie entre 98.94% et 99.06%), en Espagne en 2022 (homologie de 98.91%) et en Egypte entre 2021 et 2023 (homologie entre 98.06% et 98.80%).

Le consensus du gène H5 du sous-type H5N1 a été aligné avec des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasiennne et Nord-Américaine) (Cf. Figure 51).

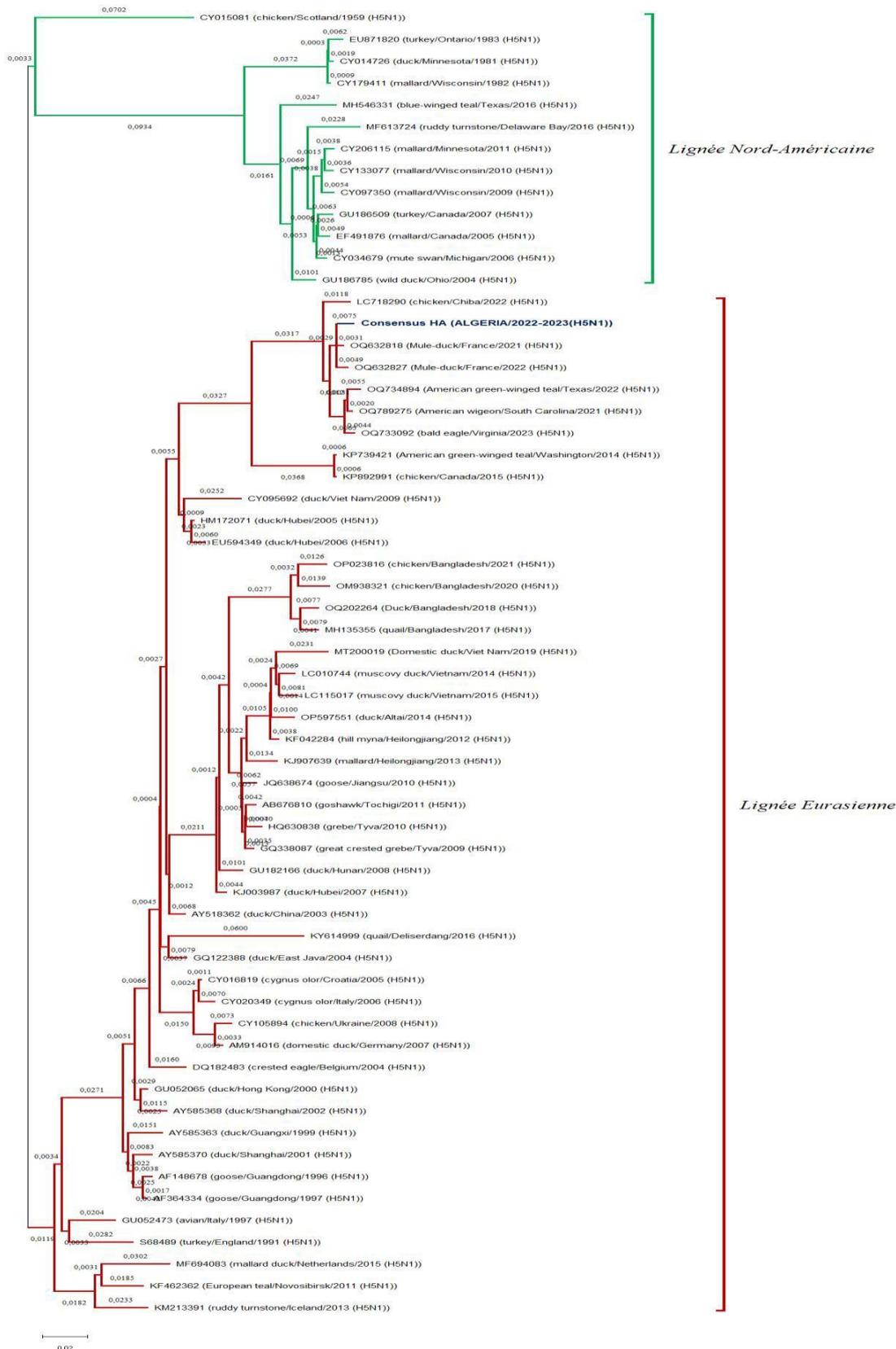


Figure 51 : Arbre phylogénétique du consensus du gène HA-H5 du sous-type H5N1, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée asiatique et Nord-Américaine).

Les distances patristiques ont été calculées entre le consensus H5 (H5N1) et les séquences suivantes :

- La séquence du premier H5N1 isolé en Ecosse en 1959 (chicken/Scotland/1959(H5N1)) est à une distance patristique de 0,21881
- La séquence du premier H5N1 isolé en Chine en 1996 (goose/Guangdong/1996(H5N1)) est à une distance patristique de 0,11560
- La séquence la plus proche étant celle de la souche isolée en France en 2021 (mule duck/France/2021 (H5N1)) est à une distance patristique de 0.01061
- La séquence correspondante a **la souche vaccinale** (duck/China/2003(H5N1)) est à une distance patristique de 0.09153.

Les distances patristiques moyennes entre le consensus du gène H5 du sous-type H5N1 algérien et les séquences représentatives de la lignée Eurasienne et la Nord-Américaine sont de 0.08617 et 0.14505 respectivement.

II.10. d. Gène NA-N1 :

Les séquences N1 ont été alignées, curées a 1135 pb et étudiées phylogénétiquement avec des séquences proches génétiquement (98.74%-98.34%) et d'autres plus distantes (98.15%-97.16%) (Cf.figure 52).

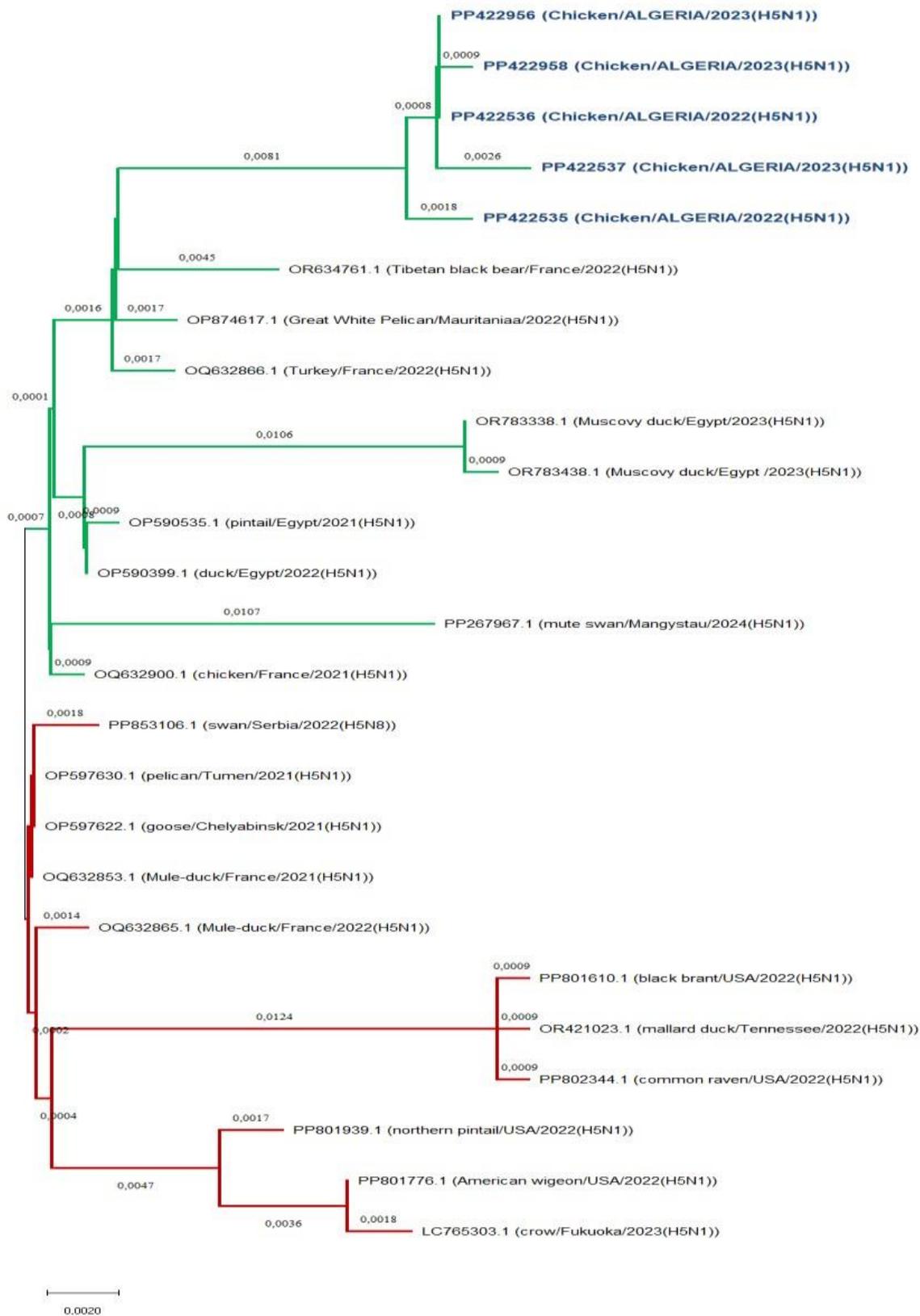


Figure 52 : Arbre phylogénétique des séquences du gène NA-N1 étudiées

L'analyse phylogénétique a montré que nos séquences N1 du sous-type H5N1 forment un groupe monophylétique partageant des similarités avec la séquence N1 de la souche H5N1 Mauritanienne isolée en 2022 (Great_White_Pelican/Mauritania/2022(H5N1)) homologue à 98.74% ainsi que la séquence N1 de la souche H5N1 Française isolée en 2022 (Tibetan black bear/France/2022(H5N1)) homologue à 98.59% et une différence de 13 bases (0 GAP) pour la première et 19 bases (1 GAP) pour la seconde sur les 1458 pb alignés de la séquence conservée PP422362. La distance patristique moyenne entre ces séquences et nos séquences est de 0.005693 et de 0.00642696, respectivement alors que celle calculée entre nos séquences est de 0.00249618.

Nos séquences étaient aussi génétiquement apparentées à des séquences N1 de souches H5N1 isolées en France entre 2021 et 2022 (homologie entre 98.45% et 98.59%), en Egypte entre 2021 et 2023 (homologie entre 98.34% et 97.37%) et en Russie en 2024 (homologie de 97.44%).

Le consensus du gène NA du sous-type H5N1 a été alignés avec des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasienne et Nord-Américaine) (Cf. figure 53).

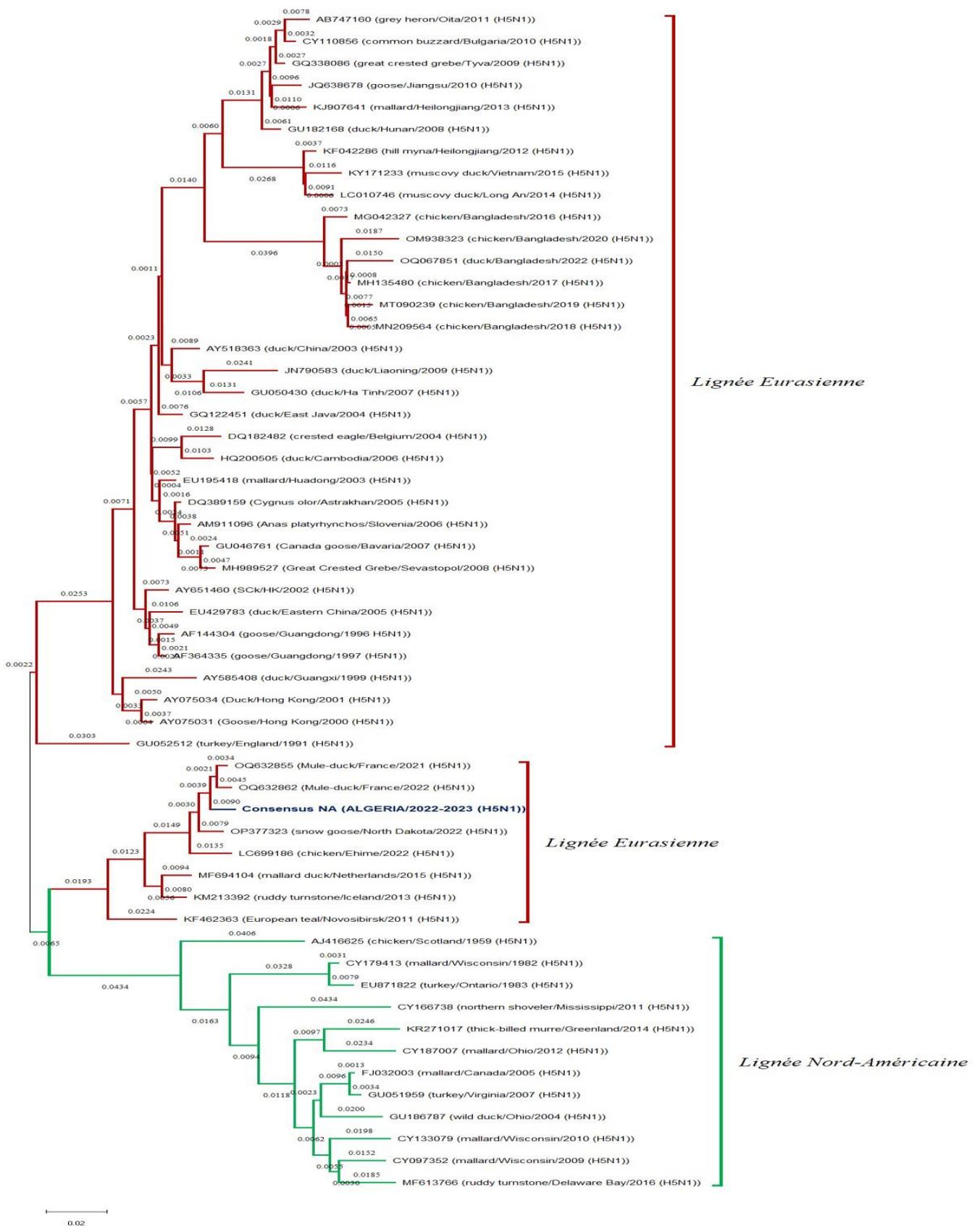


Figure 53 : Arbre phylogénétique du consensus du gène NA-N1 du sous-type H5N1, obtenu et des séquences représentatives des deux lignées H5 (lignée Eurasienne et Nord-Américaine).

Les distances patristiques ont été calculées entre le consensus N1 (H5N1) et les séquences suivantes :

- La séquence du premier H5N1 isolé en Ecosse en 1959 (chicken/Scotland/1959(H5N1)) est à une distance patristique de 0,14636
- La séquence du premier H5N1 isolé en Chine en 1996 (goose/Guangdong/1996(H5N1)) est à une distance patristique de 0,11647
- La séquence la plus proche étant celle de la souche isolée en France en 2021 (mule duck/France/2021 (H5N1)) est à une distance patristique de 0.01448
- La séquence correspondante a **la souche vaccinale** (duck/China/2003(H5N1)) est à une distance patristique de 0.12473

Les distances patristiques moyennes entre le consensus du gène N1 du sous-type H5N1 algérien et les séquences représentatives de la lignée Eurasienne et la Nord-Américaine sont de 0.08905 et 0.08356 respectivement.

Un test Z a été réalisé pour comparer entre les deux distances patristiques moyennes des deux lignées et aucune différence significative n'a été démontrée ($\alpha= 5\%$, $Z= 1.96$).

III. DISCUSSION

La double introduction du virus AIV-H5 durant la période 2020-2022 est confirmée par la caractérisation de deux sous types distincts, en l'occurrence le H5N8 (décembre 2020) et le H5N1 (septembre 2022).

Une similarité élevée sur le plan génétique et peptidique a été caractérisé par l'alignement des deux séquences conservées représentatives des souches H5N8 et H5N1 algériennes. En effet, la circulation du H5N8 entre 2021 et 2022 sans causer de dégâts et son réassortiment avec un HxN1 en Algérie est peu probable.

Une évolution génétique a été déterminée dans les séquences H5 des deux sous-type H5N8 et H5N1 (Cf. figure 54, a et b) à travers les divergences détectées entre le 1^{er} cas étudié et le reste des cas dont les gènes ont pu être séquencés. Cependant, les pourcentages des homologies nucléotidique ont varié indépendamment de la durée de circulation du virus, la distance ou l'hôte enregistré entre le 1^{er} cas et les cas qui ont suivis.

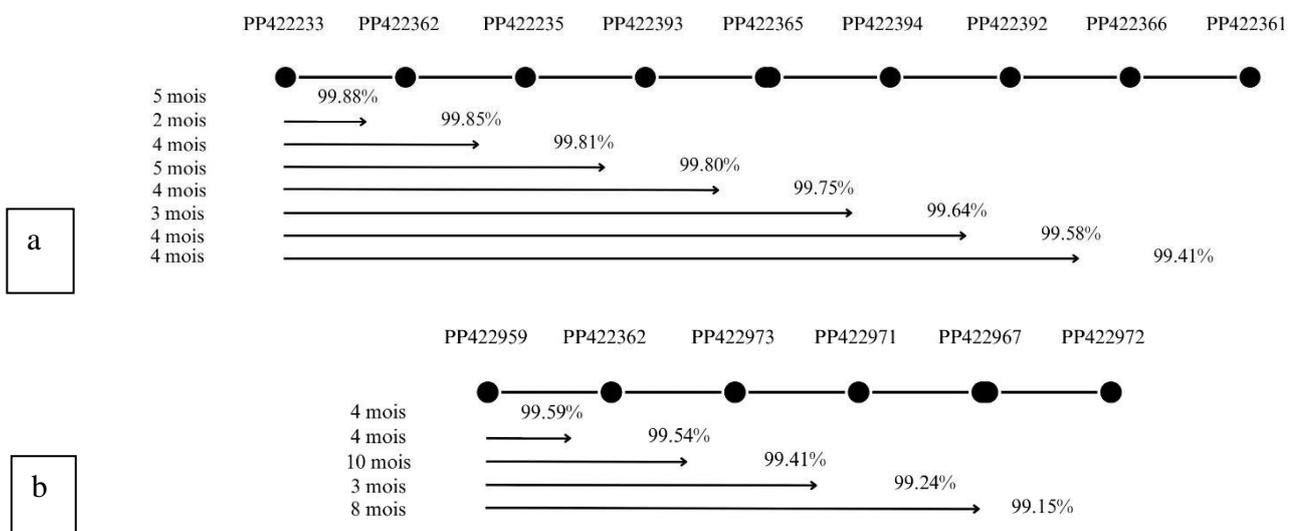


Figure 54 : Récapitulatif des homologies nucléotidiques enregistrées entre les séquences H5 du 1^{er} cas H5N8 (PP422233) et les huit séquences des cas restants (a) et H5N1 (PP422959) et les quatre séquences des cas restants (b).

Le caractère hautement pathogène de nos souches, précédemment établi sur la base de la mortalité et des lésions disséminées, se confirme par la mise en évidence d'un site multi-basique ³³⁷PLREKRRKR/GLF³⁴⁸ au niveau du site de clivage. Ce motif a été également caractérisé chez d'autres souches hautement pathogènes H5N1 et H5N8 en Mauritanie (Beyit et al, 2023), en Namibie (Molini et al, 2023), en Lesotho (Makalo et al, 2022), en Egypte (Mosaad et al, 2023), Yehia et al, 2018), au Pérou (Fernández-Díaz et al, 2023) et en Finlande (Tammiranta et al, 2023).

Les différences observées sur les sites de clivage des séquences HA-H5 de la présente étude avec ceux des cas ayant présentés des lésions similaires discutés dans la première partie (Cf, Tableau lésions) [Nigeria (**MF112620**, **MW961492**, **MW961484**, **MN759490**), Angleterre (Byrne et al, 2022), Serbie (**PP853096**), Hollande (**KR233690**) et en France (Gaide et al, 2022)], sont rapportées dans la figure ci-dessous.

Consensus	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ Nigeria-2016-H5N1	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PQRERRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ Nigeria-2016-H5N8	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ Nigeria-2021-H5N1	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ Angleterre-2020-H5N1	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ Angleterre-2020-H5N8	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ Serbie-2021-H5N1	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ Hollande-2014-H5N8	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▼ France-2015-H5N1	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - HQRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
H5N8										
▶ PP422233	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422235	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422361	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422362	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422365	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422366	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422392	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422393	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▼ PP422394	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
H5N1										
▶ PP422967	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422968	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422972	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422973	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422959	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									
▶ PP422971	GAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLRNS - PLREKRRKR GLF - GAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSSGYAADKESTQ									

Figure 55 : Les différences observées sur les sites de clivage de nos séquences HA-H5 avec ceux des cas ayant présentés des lésions similaires.

En effet, le même motif multi-basique a été retrouvé chez les cas isolés au Nigeria en 2016 et en 2021 sauf pour le H5N1 de 2016 dont la séquence a exprimé une glutamine à la position 338 au lieu de la leucine ainsi qu'une arginine à la position 341 au lieu de la lysine. Les séquences des cas isolés en Angleterre et en Serbie en 2020 et 2021 respectivement, partagent également le même CS. En ce qui concerne la séquence H5 hollandaise, elle exprime la même différence avec la séquence nigériane de 2016 à la position 341, cependant la séquence française de 2015 diffère également à cette position en exprimant une glutamine et à la position 340 en exprimant une histidine au lieu de l'acide glutamique porté par les souches algériennes.

L'homologie peptidique obtenue entre la souche (duck/China/2003(H5N1)) vaccinale et nos souches H5N1, comprise entre 92.80% et 94.15%, ne permet pas d'expliquer la situation des trois troupeaux vaccinés avec le Volvac B.E.S.T qui ont été infectés au cours de la deuxième épizootie. En effet, (i) pour le premier (E114), l'immunité n'a pu être induite par le vaccin car l'infection est survenue quatre jours après la vaccination ; (ii) pour le second (E165), l'immunité protectrice par le vaccin (testé sur poulets et canards) n'a pas été établie car le troupeau portait sur la dinde ; (iii) pour le dernier (E148), il était composé uniquement de poulets qui avaient été vaccinés et revaccinés avec le même vaccin six mois avant l'infection du troupeau. Ce manque de protection induite par le vaccin peut résulter de la diminution de l'immunité protectrice avec le temps. En effet, l'efficacité maximale de la protection du vaccin est supposée être de 2 à 3 semaines après la vaccination. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure une déficience dans la gestion de la vaccination et de l'immunisation des oiseaux.

L'introduction des virus AIV en Algérie est probablement due aux oiseaux sauvages qui prennent les flux migratoires décrits par Hamoudi et al, en 2020 et par Xie et al, en 2023 pour atteindre notre pays à partir de l'Europe, de l'Asie, de l'Amérique ainsi que de l'Afrique (Cf. figure 56). La transmission primaire des virus responsables des deux épizooties s'est probablement faite par voie aérienne ou fécale entre les oiseaux sauvages et les oiseaux d'élevages. Cette possibilité requiert un contact étroit entre les animaux ou la présence des oiseaux migrateurs aux alentours des fermes. La transmission indirecte via les

vêtements ou matériels souillés manipulés par les travailleurs transportant l'eau des réservoirs ou des retenues collinaires vers les élevages avicoles est également plausible.

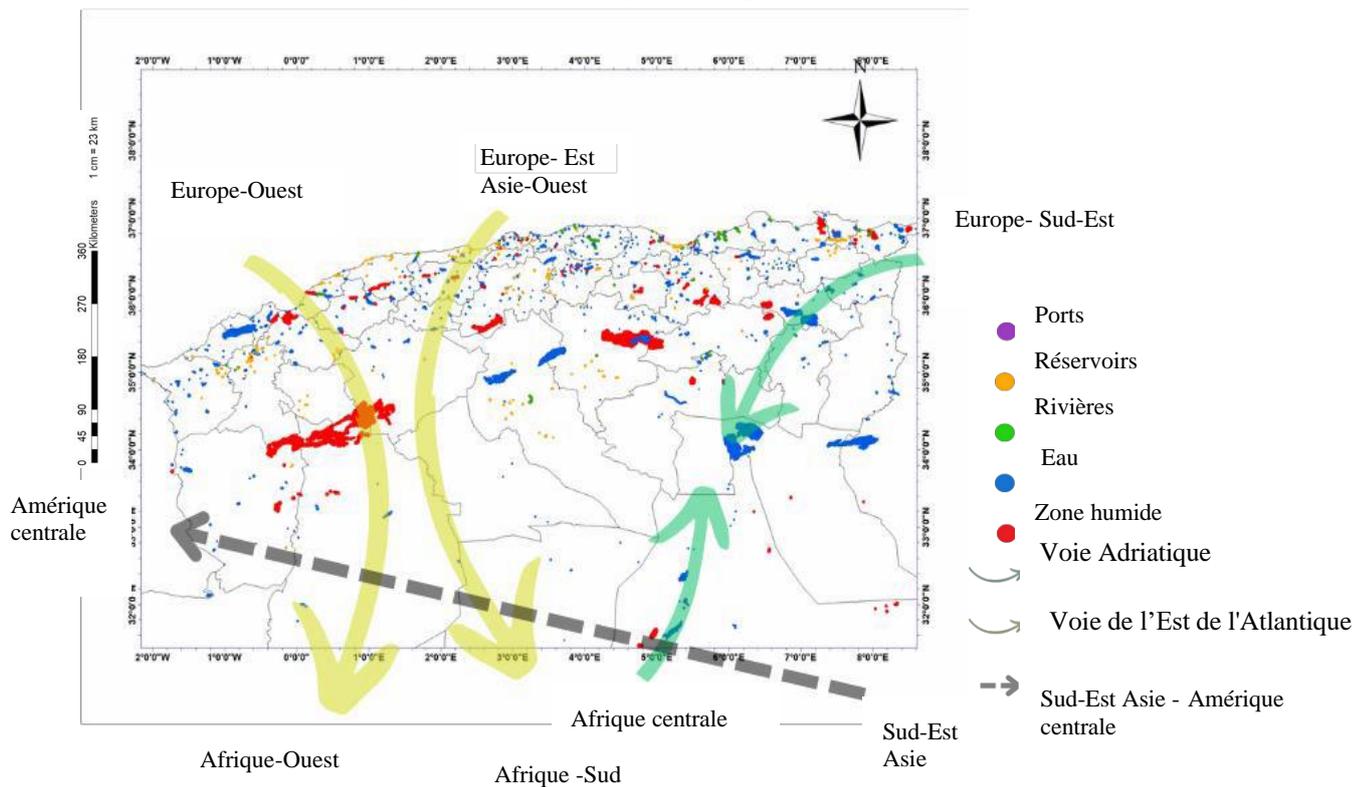


Figure 56 : Positionnement des couloirs migratoires des oiseaux sauvages par rapport aux zones humides du nord de l'Algérie. Carte originale réalisée avec ArcGIS for Desktop Basic, modifiée (Xie et al, 2023, Hamoudi et al, 2020).

Selon les notifications immédiates en Afrique-'OMSA, lors de la première épizootie (décembre 2020 à fin janvier 2021), le H5N8 circulait en Afrique du Sud ; des volailles infectées par le H5N1 ont été détectées au Nigeria et au Sénégal ; quatre sous-types (H5N1, H5N5, H5N6, H5N8) co-circulaient en Asie, alors qu'en Europe, les sous-types principaux étaient le H5N1 et le H5N8. Durant la deuxième épizootie (septembre 2022 à août 2023), le H5N1 était le sous-type le plus dominant chez les oiseaux domestiques en Europe, en Amérique, en Asie et en Afrique. D'autres sous-types comme le H5N2 ont été détectés au Japon et à Taïwan, et une souche H7 co-circulait avec le H5Nx en Afrique du Sud.

L'ensemble des arbres phylogénétiques a montré que les gènes HA et NA étudiés provenaient de la lignée Eurasienne. Le gène N1 semble toutefois proche des deux lignées. Le gène H5 du sous-type H5N8 était apparenté au cas décelé chez le poulet au Nigeria durant la même année, ce qui suggère que c'est très probablement la même souche. La séquence a aussi montré une homologie rapprochée avec une séquence chinoise de 2020, isolée d'un des 13 cygnes sauvages morts sur un lac dans le district de Hubei (Xiong et al, 2021). D'autres sous-types sont apparentés à la souche algérienne prouvant que des réassortiments se sont produits avant ou après l'introduction du H5N8. Le gène N8 du même sous-type était similaire à des séquences de souches isolées également d'un cygne en France et d'un élevage de poulets du Kazakhstan durant l'année 2020.

Les séquences HA et NA du sous-type H5N1 semble être étroitement apparentées à la souche Mauritanienne isolée d'un pélican retrouvé mort dans le parc national de Diawling avec d'autres oiseaux sauvages, en Février 2022 (Beyit et al, 2023). La déclaration du H5N1 en Mauritanie est antérieure à celle du H5N1 en Algérie, d'où l'hypothèse que la souche soit probablement la même. Le gène N1 a également été apparenté à une souche H5N1 isolée d'un ours tibétain noir en France en 2022, ce qui suggère qu'une affinité aux récepteurs des mammifères est donc probable pour la souche circulante en Algérie.

Par conséquent, les oiseaux sauvages responsables de l'introduction des deux souches peuvent avoir emprunter l'une des trois voies migratoires représentées dans la figure 55. Si on prend en considération la provenance des souches similaires à la souche H5N8 algérienne en 2020, la voie de l'Est de l'Atlantique est la plus probable car la Chine peut être considérée comme le point de départ de la souche, passant par le Kazakhstan (Asie de l'Ouest) et la France (Europe de l'Ouest) avant d'arriver en Algérie. En ce qui concerne, la souche H5N1 introduite en 2022, elle pouvait être transporter via 2 voies migratoires, car si on considère l'Égypte comme l'origine de la souche, on incriminera la voie qui passe par l'Asie du Sud-Est allant vers l'Amérique centrale. Dans le cas où on prend l'Europe de l'Ouest, en l'occurrence la France et l'Espagne, comme le point de départ de la souche, la voie Adriatique est la plus probable. Dans le cas où le N1 est d'origine nord-américaine, un réassortiment peut être possible avec un H5 égyptien ou français avant d'arriver en Algérie.

La dissémination des virus par transmission directe entre les élevages est peu plausible car les cas qui se sont présentés à la clinique étaient relativement distants. La diffusion des souches de virus de l'influenza aviaire en aval à leur introduction, pourrait résulter d'une contamination croisée entre les élevages touchés et les fermes voisines utilisant des fientes d'oiseaux comme engrais. De plus, le commerce d'oiseaux asymptomatiques ayant été en contact avec des oiseaux contaminés sur les marchés de volailles vivantes augmente le risque de propagation de l'influenza aviaire. La forte incidence du virus observée à Djelfa pourrait s'expliquer par la densité élevée de fermes avicoles (principalement des élevages de dindes) ne respectant pas les règles de distanciation entre les bâtiments. Ces derniers abritent des oiseaux de différents âges et de différents types de production dans la même exploitation. Ce manque de respect des règles de sécurité est courant dans tout le pays, ce qui constitue un facteur majeur favorisant la propagation du virus et la difficulté de contenir rapidement l'épidémie.

La propagation des virus de l'influenza aviaire parmi les poulets et les dindes élevés dans la même exploitation se produit principalement par transmission fécale ou respiratoire. Des souches hautement pathogènes ont été détectées dans les plumes contaminées de poulets, de canards et d'oies, qui peuvent être une source de dissémination du virus (Gaide et al, 2023, Azeem et al, 2023). L'excrétion continue du virus en grandes quantités est l'un des principaux facteurs de propagation du virus entre les troupeaux contaminés et non contaminés, permettant ainsi la contamination des surfaces et des équipements comme vecteurs intermédiaires de propagation virale. De plus, l'enterrement de cadavres d'oiseaux malades non décontaminés à proximité des exploitations est également une source de contamination. En conséquence, le transport mécanique du virus par les travailleurs des exploitations est l'un des principaux modes de transmission lorsqu'ils se déplacent entre les bâtiments affectés et non affectés.

CONCLUSION

Le présent travail est une contribution à la caractérisation des souches d'Influenza aviaire hautement pathogène (H5Nx) responsables de problèmes respiratoires associés à une importante mortalité chez la volaille en Algérie en vue d'une stratégie préventive.

Les résultats obtenus dans la première partie de l'étude ont permis de distinguer deux épizooties d'AIV-H5 :

- Une première épizootie H5N8 (décembre 2020- mai 2021), caractérisée par une mortalité très élevée (>70%), un syndrome congestivo-hémorragique présent dans la plupart des organes et un nombre important d'élevages (21) pour une période de six (6) mois.
- Une deuxième épizootie H5N1 (septembre 2022- juillet 2023), caractérisée par une mortalité élevée (>40%), un syndrome congestivo-hémorragique systémique mais également concentré au niveau des ovaires de la poule pondeuse, une vaccination contre le H5N1 hautement pathogène et un nombre moindre d'élevages (10) pour une période de dix (10) mois.

Quoique ces deux sous-types soient similaires sur l'aspect symptomatologique et nécropsique, la première épizootie dû au H5N8 a causé plus de dégâts sur le plan économique. En effet, plusieurs facteurs n'ont pas permis aux éleveurs et aux autorités de contrôler la situation, à savoir : (i) le tableau clinique intrigant, (ii) la mortalité élevée allant jusqu'à 100% en 72h, (iii) l'absence d'immunité vis-à-vis de l'IAHP et (iv) le type d'organisation des fermes avicoles et le non-respect des mesures de biosécurité. En ce qui concerne la deuxième épizootie dû au H5N1, l'immunité de groupe acquise durant la première vague et la vaccination contre le H5N1 ont certes contribué à limiter la dissémination du virus.

Dans la deuxième partie de l'étude, les séquences des quatre gènes appartenant au même sous-type ont montré une homologie élevée suggérant que les mutations qui se sont produites ont eu un faible impact sur le phénotype circulant. La provenance des deux souches H5N8 et H5N1 est très probablement Eurasiennne compte tenu des distances patristiques moyennes calculées entre chaque consensus et les séquences représentatives de chaque lignée. La voie de l'Ouest de l'Atlantique peut être la trajectoire la plus plausible que le H5N8 ait pris pour atterrir en Algérie alors que le H5N1, pouvait être originaire de l'Egypte si le virus a été transporté par la voie qui passe par l'Asie du Sud-Est allant vers l'Amérique centrale, ou de l'Europe de l'Ouest s'il a emprunté la voie adriatique. La dissémination du virus après son introduction, était probablement due à une transmission indirecte via le matériel souillé et le non-respect des mesures de biosécurité.

Par rapport au risque zoonotique qui n'a pas pu être vérifié dans cette étude, le danger est certes réel pour les travailleurs des fermes avicoles.

Des plans d'action bien établis et des gestes corrects doivent être appliqués dans les exploitations avicoles lors des épizooties afin de minimiser la transmission des pathogènes. En addition aux précautions prises sur place, une stratégie adéquate de vaccination et de contrôle doit être mise en place.

La présente étude a permis la caractérisation du virus AIV-H5 à travers deux sous-types H5N8 et H5N1 dans les élevages avicoles en Algérie. Pour prévenir la grippe aviaire qui reste récurrente dans le monde, nous proposons des mesures pouvant permettre de contrôler les probables prochaines épizooties :

- Créer un réseau d'épidémiologie-surveillance : Les praticiens vétérinaires spécialisés doivent transmettre des prélèvements au laboratoire de référence en cas de suspicion d'AI.
- Faire de la surveillance continue et constante au sein de la population des oiseaux migrateurs en prélevant des échantillons régulièrement.
- Elaboration d'un vaccin en adéquation avec la ou les souches circulantes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adnet, J., & Dina, J. (2021). Virus grippaux et Sars-CoV-2, sommes-nous prêts pour le futur ? *Actualités Pharmaceutiques*, V. 60(N. 608).
2. Alexander, D. J., & Capua, I. (2008). Avian influenza in poultry. *World's Poultry Science Journal*, V. 64(N. 4).
3. Alexander, D., & Brown, I. (2009). History of highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, V. 28(N. 1), P. 19-38.
4. Alloui, N. (2011). Situation actuelle et perspectives de modernisation.
5. Angot, J.-L. (2009). Surveillance et contrôle des risques d'importation des maladies infectieuses animales : le rôle de l'OIE et des services vétérinaires. *Bulletin de L Académie Nationale de Médecine*, V. 193(N. 8).
6. Azeem, S., Guo, B., Sato, Y., Gauger, P. C., Wolc, A., & Yoon, K. (2023). Utility of Feathers for Avian Influenza Virus Detection in Commercial Poultry. *Pathogens*, V. 12(N. 12).
7. Baird, T. T. (2017). Trypsin . *Reference Module in Life Sciences*.
8. Bandou, R., Hirose, R., Nakaya, T., Miyazaki, H., Watanabe, N., Yoshida, T., Daidoji, T., Itoh, Y., & Ikegaya, H. (2022). Higher Viral Stability and Ethanol Resistance of Avian Influenza A(H5N1) Virus on Human Skin. *Emerging Infectious Diseases*, V. 28(N. 3), 639–649.
9. Barberis, A., Boudaoud, A., Gorrill, A., Loupias, J., Ghram, A., Lachheb, J., Alloui, N., & Ducatez, M. F. (2020). Full-length genome sequences of the first H9N2 avian influenza viruses isolated in the Northeast of Algeria. *Virology Journal*, V. 17(N. 1).
10. Becker, W. B. (1966). The isolation and classification of Tern virus: Influenza Virus A/Tern/South Africa/1961. *Journal of Hygiene*, 64(3), 309–320.
11. Becker, W. B., & Uys, C. J. (1967). Experimental infection of chickens with influenza A/Tern/South Africa/1961 and Chicken/Scotland/1959 viruses. *Journal of Comparative Pathology*, V. 77(N. 2), P. 159-165.
12. Behailu , A. W. (2022). Biosecurity: Bioexclusion And Biocontainment Measures As Effective Poultry Health Management Strategy. *Preprints.org*.
13. Behillil, S., Enouf, V., & Ven Der Werf, S. (2019). Virus, épidémies et réseaux de surveillance de la grippe. *Actualités Pharmaceutiques*, V. 58(N. 589).
14. Beyit, A. D., Meki, I. K., Barry, Y., Haki, M. L., Abdellahi , E. G., Hamma, S. M., Abdelwahab, N., Doumbia, B., Hacen Ahmed Benane, Daf Sehla Daf, Zein, Lemrabott Ould Mekhalla, Bezeid El Mamy, Ould, M., Kumar, B., Ben, A., Datta, S., Cattoli, G., C. E. Lamien, & Dundon, W. G. (2023). Avian influenza H5N1 in a great white pelican (*Pelecanus onocrotalus*), Mauritania 2022. *Veterinary Research Communications*, V. 47.
15. Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S.-J., Park, H., & Volchkov, P. (2021). Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens*, V.10(N. 5), p. 630.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

16. Blot, M., Chavanet, P., & Piroth, L. (2019). La grippe : mise au point pour les cliniciens. *La Revue de Médecine Interne*, V. 40(N. 3).
17. Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26 Suppl 4.
18. Brown, I. H. (2010). Summary of Avian Influenza Activity in Europe, Asia, and Africa, 2006–2009. *Avian Diseases*, V. 54(N. s1).
19. Brown, J. D., Goekjian, G., Poulson, R., Valeika, S., & Stallknecht, D. E. (2009). Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology*, V. 136(N. 1-2).
20. Brugere-Picoux, J. (2005). Highly pathogenic avian influenza in poultry (fowl plague); implications for human health. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*, V. 189(N. 8).
21. Byrne, A., James, J., Mollett, B. C., Meyer, S. D., Lewis, T., Czepiel, M., Seekings, A. H., Mahmood, S., Thomas, S. S., Ross, C. S., Byrne, D. J., McMenamy, M., Bailie, V., Lemon, K., Hansen, R., Falchieri, M., Lewis, N. S., Reid, S. M., Brown, I. H., & Banyard, A. C. (2022). Investigating the genetic diversity of H5 avian influenza in the UK 2020-2022. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*.
22. Capua, I., & Alexander, D. J. (2013). Avian influenza and Newcastle disease : a field and laboratory manual. *Springer*.
23. CDC. (2020). *Influenza Planning and Response*. <https://www.cdc.gov/ncird/downloads/fs-flu-plan-response.pdf>
24. CDC. (2024). *What CDC Does About Bird Flu*. Avian Influenza (Bird Flu). <https://www.cdc.gov/bird-flu/about/what-cdc-does.html>
25. Centre national de veille zoonositaire en tunisie - 08/02/2021 Influenza Aviaire hautement Pathogène H5N8 en Algérie. (2021).
26. Chauhan, R. P., & Gordon, M. L. (2022). An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates. *Virus Genes*, V. 58.
27. Chou, K.-C., & Elrod, D. W. (1999). Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, V. 34(N. 1).
28. De Vlugt, C., Sikora, D., & Pelchat, M. (2018). Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching. *Viruses*, V. 10(N. 11).
29. Devi, A. B., & Sarala, R. (2021). Substantial effect of phytochemical constituents against the pandemic disease influenza—a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, V. 7(N. 1).
30. Di Ventura, B., & Kuhlman, B. (2016). Go in! Go out! Inducible control of nuclear localization. *Current Opinion in Chemical Biology*, V. 34.
31. Duan, C., Li, C., Ren, R., Bai, W., & Zhou, L. (2023). An overview of avian influenza surveillance strategies and modes. *Science in One Health*, 2.
32. Eriksson, P. (2019). Deciphering receptor interactions and their role in interspecies transmission. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 1609*. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

33. Fernández-Díaz, M., Villanueva-Pérez, D., Tataje-Lavanda, L., Montalvan-Avalos, A., Isasi-Rivas, G., Lulo-Vargas, M., & Fernández-Sánchez, M. (2023). Detection and Genomic Characterization of an Avian Influenza Virus Subtype H5N1 (Clade 2.3.4.4b) Strain Isolated from a Pelican in Peru. *Microbiology Resource Announcements*, *V. 12*(N. 6).
34. FLU (CDC). (2023, September). *The History of Influenza*. <https://www.flu.com/Articles/2022/The-History-of-Influenza>
35. Fusaro, A., Zecchin, B., Vrancken, B., Abolnik, C., Ademun, R., Alassane, A., Arafa, A., Awuni, J. A., Couacy-Hymann, E., Coulibaly, M. ' B., Gaidet, N., Go-Maró, E., Joannis, T., Jumbo, S. D., Minoungou, G., Meseko, C., Souley, M. M., Ndumu, D. B., Shittu, I., & Twabela, A. (2019). Disentangling the role of Africa in the global spread of H5 highly pathogenic avian influenza. *Nature Communications*, *V. 10*(N. 1).
36. Gaide, N., Filaire, F., Bertran, K., Crispo, M., Dirat, M., Secula, A., Foret-Lucas, C., Payré, B., Perlas, A., Cantero, G., Majó, N., Soubies, S. M., & Guerin, J. (2023). The feather epithelium contributes to the dissemination and ecology of clade 2.3.4.4b H5 high pathogenicity avian influenza viruses in ducks. *Emerging Microbes & Infections*, *V. 12*(N. 2).
37. Gaide, N., Lucas, M.-N., Delpont, M., Croville, G., Bouwman, K. M., Papanikolaou, A., van der Woude, R., Gagarinov, I. A., Boons, G.-J., De Vries, R. P., Volmer, R., Teillaud, A., Vergne, T., Bleuart, C., Le Loc'h, G., Delverdier, M., & Guérin, J.-L. (2022). Pathobiology of highly pathogenic H5 avian influenza viruses in naturally infected Galliformes and Anseriformes in France during winter 2015–2016. *Veterinary Research*, *V. 53*(N. 1).
38. Gopal, G., Muralidar, S., & Visaga Ambi, S. (2021). Targeting Cellular Signalling Pathways in Lung Diseases. In *Springer eBooks*.
39. *Grippe porcine - OMSA - Organisation mondiale de la santé animale*. (2021, September 22). OMSA - Organisation Mondiale de La Santé Animale. <https://www.woah.org/fr/maladie/grippe-porcine/>
40. Hamoudi, N., Alloui, N., Barberis, A., & Boudaoud, A. (2020). Identification of Migratory Bird Vectors of Avian Influenza Virus (AIV) in North-East of Algeria. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, *V. 6*(N. 1).
41. Harder, T. C., & Werner, O. (2017). *Avian Influenza* (EFSA & Wiley, Eds.). EFSA-Wiley.
42. Hilsch, M., Goldenbogen, B., Sieben, C., Höfer, Chris T., Rabe, Jürgen P., Klipp, E., Herrmann, A., & Chiantia, S. (2014). Influenza A Matrix Protein M1 Multimerizes upon Binding to Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, *V. 107*(N. 4).
43. Höper, D. W., Hoffmann, B., & Beer, M. (2009). Simple, Sensitive, and Swift Sequencing of Complete H5N1 Avian Influenza Virus Genomes. *Journal of Clinical Microbiology*, *V. 47*(N. 3), 674–679.
44. Hutten, S., & Kehlenbach, R. H. (2007). CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in Cell Biology*, *V. 17*(N. 4).
45. *Influenza aviaire - OMSA - Organisation mondiale de la santé animale*. OMSA - Organisation Mondiale de La Santé Animale. <https://www.woah.org/fr/maladie/influenza-aviaire/#ui-id-3>
46. Anses (2022). Influenza aviaire : 3 scénarios de vaccination pour les volailles. *Anses - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et Du Travail*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

47. International Committee on Taxonomy of Viruses. (2022). *Taxon Details / ICTV*. Ictv.global.
48. Jacotot, H. (1950). Peste aviaire et maladie de Newcastle, systématique et terminologie. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, V. 103(N. 5).
49. Jeevan, T., Darnell, D., Gradi, E. A., Benali, Y., Kara, R., Guetarni, D., Rubrum, A., Seiler, P., Crumpton, J. C., Webby, R. J., & Fawzi Derrar. (2019). A(H9N2) influenza viruses associated with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, V. 13(N. 6).
50. Kaci, A. (2022). La filière avicole en Algérie. Acquis, contraintes et en jeux.
51. Kang, M., Li, H., Tang, J., Wang, X., Wang, L., Baele, G., Lou, J., Lemey, P., & Su, S. (2024). Changing epidemiological patterns in human avian influenza virus infections. *The Lancet Microbe*, V. 5.
52. Kida, Y., Okuya, K., Saito, T., Yamagishi, J., Ohnuma, A., Hattori, T., Miyamoto, H., Manzoor, R., Yoshida, R., Nao, N., Kajihara, M., Watanabe, T., & Takada, A. (2021). Structural Requirements in the Hemagglutinin Cleavage Site-Coding RNA Region for the Generation of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, V. 10(N. 12).
53. Killian, M. L. (2020). Hemagglutination Assay for Influenza Virus. In E. Spackman (Ed.), *Animal Influenza Virus* (p. 8). Springer Protocols- Methods in Molecular Biology.
54. Kwon, J.-H., Bertran, K., Lee, D., Criado, M. F., Killmaster, L., Pantin-Jackwood, M. J., & Swayne, D. E. (2023). Diverse infectivity, transmissibility, and pathobiology of clade 2.3.4.4 H5Nx highly pathogenic avian influenza viruses in chickens. *Emerging Microbes & Infections*, V. 12(N. 1).
55. Lal Bhukya, P., Mhaske, S. T., & Sonkar, S. C. (2023). *Emerging Human Viral Diseases*, V. 1 Springer.
56. Landmann, M., Scheibner, D., Gischke, M., Abdelwhab, E. M., & Ulrich, R. (2024). Automated quantification of avian influenza virus antigen in different organs. *Scientific Reports*, V. 14(N. 1).
57. Larzul, D. (1989). La PCR : principes et applications. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, V. 4(N. 4).
58. Lee, D., Bahl, J., Ip, H. S., DeLiberto, T. J., Swayne, D. E., Torchetti, M., & Killian, M. (2016). Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses and Generation of Novel Reassortants, United States, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*, V. 22(N. 7).
59. Lipatov, A. S., Kwon, Y. K., Sarmiento, L. V., Lager, K. M., Spackman, E., Suarez, D. L., & Swayne, D. E. (2008). Domestic Pigs Have Low Susceptibility to H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *PLoS Pathogens*, V. 4 (N. 7).
60. Lounas, R., & Mesbah, A. (2009). Enquête sur les principales maladies aviaires en Algérie.
61. Lupiani, B., & Reddy, S. M. (2009). The history of avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, V. 32(N. 4).
62. MacLean, R. R., & Beaufrère, H. (2015). Gruiformes (Cranes, Limpkins, Rails, Gallinules, Coots, Bustards). *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*, V. 8.
63. Makalo, M. J. R., Dundon, W. G., Settypalli, T. B. K., Datta, S., Lamien, C. E., Cattoli, G., Moeketsi Phalatsi, Relebohile Juliet Lepheana, Mpaliseng Matlali, Mahloane, R. G., Marosi Molomo, & Mphaka, P. C. (2022). Highly pathogenic avian influenza (A/H5N1) virus outbreaks in Lesotho, May 2021. *Emerging Microbes & Infections*, V. 11(N. 1).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

64. McVey, D. S., Kennedy, M., Chengappa, M. M., & Wilkes, R. (2022). *Veterinary Microbiology*. John Wiley & Sons.
65. Miyake, Y., Hara, Y., Umeda, M., & Banerjee, I. (2023). Virus Infected Cells. In S. Vijayakrishnan, Y. Jiu, & J. Robin Harris (Eds.), *Sub-cellular biochemistry/Subcellular biochemistry* (p. 391). Springer Nature.
66. Molini, U., Yabe, J., Meki, I. K., Ahmed Ben Ali, H. O., Settypalli, T. B. K., Datta, S., Coetzee, L. M., Hamunyela, E., Khaiseb, S., Cattoli, G., Lamien, C. E., & Dundon, W. G. (2023). Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus outbreak among Cape cormorants (*Phalacrocorax capensis*) in Namibia, 2022. *Emerging Microbes & Infections*, *V.12*.
67. Mosaad, Z., El-Husseiny, M., Zanaty, A., Fathy, M. M., Hagag, N. M., Mady, W., Said, D., El-Sayed, M. M., Erfan, A. M., Rabie, N., Abdelhafez Samir, Samy, M., Abdel Satar Arafa, Selim, A., Abdelhakim, A. M. M., Lindahl, J. F., Eid, S., Åke Lundkvist, Shahein, M. A., & Naguib, M. M. (2023). Emergence of Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus (H5N1) of Clade 2.3.4.4b in Egypt, 2021–2022. *Pathogens*, *V. 12*(N. 1).
68. Mostafa, A., Abdelwhab, E., Mettenleiter, T., & Pleschka, S. (2018). Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses*, *V. 10*(N. 9).
69. Munier, S., Moisy, D., Marc, D., & Naffakh, N. (2010). Transmission inter-espèces, adaptation à l'homme et pathogénicité des virus influenza d'origine animale. *Pathologie Biologie*, *V. 58*(N. 2).
70. Nagy, A., Stará, M., Černíková, L., Hofmannová, L., & Sedlák, K. (2023). Genotype Diversity, Wild Bird-to-Poultry Transmissions, and Farm-to-Farm Carryover during the Spread of the Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 in the Czech Republic in 2021/2022. *Viruses*, *V. 15*(N. 2).
71. Nielsen, S. S., Álvarez, J., Bicout, D., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales, L., Gortázar, C., Herskin, M. S., Michel, V., Miguel Ángel Miranda, M. Á., Padalino, B., Roberts, H. C., Spooler, H., Ståhl, K., Velarde, A., Winckler, C., Bastino, E., & Alessio Bortolami. (2023). Vaccination of poultry against highly pathogenic avian influenza – part 1. Available vaccines and vaccination strategies. *EFSA Journal*, *V. 21*(N. 10).
72. *Notifications immédiates en Afrique - OMSA - Afrique*. OMSA - Afrique. <https://rr-africa.woah.org/fr/notifications-immediates-en-afrique/>
73. Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. (2024). *Empres-i*. [Empres-i.apps.fao.org. https://empres-i.apps.fao.org/epidemiology](https://empres-i.apps.fao.org/epidemiology)
74. Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. (2024). *Perspectives agricoles de l'ocde et de la FAO 2024-2033* © OCDE/FAO.
75. Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. (2024). Se préparer a l'influenza aviaire hautement pathogène. [Fao.org. https://www.fao.org/4/a0632f/a0632f00.htm](https://www.fao.org/4/a0632f/a0632f00.htm)
76. Organisation mondiale de la santé. (1987). Epidémiologie moléculaire des virus grippaux: mémorandum d'une réunion de l'OMS. *Bulletin of the World Health Organization*, *V. 65*(N. 4).
77. Organisation mondiale de la santé. (2021). Human infection with avian influenza A (H5N8) - Russian Federation. [Who.int. https://www.who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/item/2021-DON313](https://www.who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/item/2021-DON313)
78. Organisation mondiale de la santé. (2021). *WHO information for the molecular detection of influenza viruses*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

79. Organisation mondiale de la santé. (2023). *Grippe aviaire et autres gripes zoonotiques*. Wwww.who.int. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic))
80. Organisation mondiale de la santé. (2024). *cases deaths*. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/h5n1-human-case-cumulative-table/2024_feb_tableh5n1.pdf?sfvrsn=bccd8c23_1&download=true
81. Organisation mondiale de la santé animale. (2016). *Avian Influenza*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/HP_AI.pdf
82. Organisation mondiale de la santé animale. (2021). *Influenza aviaire-Manuel terrestre*. OMSA - Organisation Mondiale de La Santé Animale. <https://www.woah.org/fr/maladie/influenza-aviaire/>
83. Pantin-Jackwood, M. J., Costa-Hurtado, M., Shepherd, E., DeJesus, E., Smith, D., Spackman, E., Kapczynski, D. R., Suarez, D. L., Stallknecht, D. E., & Swayne, D. E. (2016). Pathogenicity and Transmission of H5 and H7 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Mallards. *Journal of Virology*, V. 90(N. 21).
84. Payne, S. (2023). Family Orthomyxoviridae. *Viruses*, 2 -ème édition.
85. Peiris, J., Yu, W., Leung, C., Cheung, C., Ng, W., Nicholls, J., Ng, T., Chan, K., Lai, S., Lim, W., Yuen, K., & Guan, Y. (2004). Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *The Lancet*, V. 363(N. 9409).
86. Perdue, M. L., & Seal, B. S. (2000). Impact of Avian Viruses. *Elsevier EBooks*.
87. Pielak, R. M., & Chou, J. J. (2011). Influenza M2 proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, V. 1808(N. 2).
88. Pleschka, S. (2013). Overview of Influenza Viruses. In J. A. Richt & R. J. Webby (Eds.), *Swine Influenza, Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 11–12). Springer Science+Business Media.
89. Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology by the Moroccan Society of Biology in Canada*, V. 2(N. 2).
90. Reperant, L. A., & Osterhaus, A. D. M. E. (2023). Influenza from a One Health Perspective: Infection by a Highly Versatile Virus. In *Zoonoses: Infections Affecting Humans and Animals*. Springer Nature.
91. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, V. 4(N. 4).
92. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V. 74(N. 12).
93. SCHÄFER, V. W. (1955). Etudes séro-immunologiques comparatives sur les virus grippe et grippe aviaire classique. *Virus de la grippe et de la peste classique de la volaille*.
94. Schnell, J. R., & Chou, J. J. (2008). Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature*, V. 451(N. 7178).
95. Scholtissek, C. (1994). Source for influenza pandemics. *European Journal of Epidemiology*, V. 10(N. 4).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

96. Shi, J., Zeng, X., Cui, P., Yan, C., & Chen, H. (2022). Alarming Situation of Emerging H5 and H7 Avian Influenza and Effective Control Strategies. *Emerging Microbes & Infections*, V. 12(N. 1).
97. Shtyrya, Y. A., Mochalova, L. V., & Bovin, N. V. (2009). Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. *Acta Naturae*, V. 1(N. 2).
98. Silva, M. Sá. e, Rissi, D. R., Pantin-Jackwood, M., & Swayne, D. E. (2013). High-Pathogenicity Avian Influenza Virus in the Reproductive Tract of Chickens. *Veterinary Pathology*, V. 50(N. 6).
99. Song, Z., Shi, Y., Yin, H., Chen, J., & Lu, H. (2021). *Avian Influenza in Human* (C. Qiu, Y. Shi, & P. Lu, Eds.; p. 21). Springer Singapore.
100. Spackman, E., Senne, D. A., Myers, T. J., Bulaga, L. L., Garber, L. P., Perdue, M. L., Lohman, K., Daum, L. T., & Suarez, D. L. (2002). Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, V. 40(N. 9).
101. Sreenivasan, C. C., Thomas, M. G., Antony, L., Wormstadt, T., Hildreth, M., Wang, D., Hause, B. M., Francis, D. J., Li, F., & Kaushik, R. S. (2019). Development and characterization of swine primary respiratory epithelial cells and their susceptibility to infection by four influenza virus types. *Virology*, V. 528.
102. Stubbs, T. M., & te Velthuis, A. J. (2014). The RNA-dependent RNA polymerase of the influenza A virus. *Future Virology*, V. 9(N. 9).
103. Susanti, R., Soejoedono, R. D., Mahardika, I. G. N. K., Wayan T I, W., & Suhartono, M. T. (2015). Identification of Pathogenicity of Avian Influenza Virus Subtype H5N1 from Waterfowls Base on Amino Acid Sequence of Cleavage Site Hemagglutinin Protein. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, V. 13(N. 2).
104. Tam, J. S. (2002). Influenza A (H5N1) in Hong Kong: an overview. *Vaccine*, V. 20.
105. Tammiranta, N., Isomursu, M., Fusaro, A., Nylund, M., Nokireki, T., Giussani, E., Zecchin, B., Calogero Terregino, & Gadd, T. (2023). Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infections in wild carnivores connected to mass mortalities of pheasants in Finland. *Infection, Genetics and Evolution*, V. 111.
106. Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, V. 101(N. 30).
107. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, V. 38(N. 7).
108. Thomas, N. J., Hunter, D. B., & Atkinson, C. T. (2007). *Infectious Diseases of Wild Birds*. Wiley EBooks.
109. Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Martinez, R., Maurer, K.-H., & Schwaneberg, U. (2015). Advances in protease engineering for laundry detergents. *New Biotechnology*, V. 32(N. 6).
110. WAHIS. (2022). Woah.org. <https://wahis.woah.org/#/in-review/4641?fromPage=event-dashboard-url>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

111. Wan, X. F. (2012). Lessons from Emergence of A/Goose/Guangdong/1996-Like H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses and Recent Influenza Surveillance Efforts in Southern China. *Zoonoses and Public Health*, V. 59.
112. Wood, G. W., Parsons, G., & Alexander, D. J. (1995). Replication of influenza A viruses of high and low pathogenicity for chickens at different sites in chickens and ducks following intranasal inoculation. *Avian Pathology*, V. 24(N. 3).
113. Xie, R., Edwards, K. M., Wille, M., Wei, X., Wong, S.-S., Zanin, M., El-Shesheny, R., Ducatez, M., Poon, L. L. M., Kayali, G., Webby, R. J., & Dhanasekaran, V. (2023). The episodic resurgence of highly pathogenic avian influenza H5 virus. *Nature*, V. 622(N. 7984).
114. Xiong, J., Zhou, H., Fan, L., Zhu, G., Li, Y., Chen, G., Zhang, J., Li, J., Zheng, H., Feng, W., Chen, J. M., Yang, G.-X., & Chen, Q. (2021). Emerging highly pathogenic avian influenza (H5N8) virus in migratory birds in Central China, 2020. *Emerging Microbes & Infections*, V. 10(N. 1).
115. Yashpal, S. M., Milton, P., Sandeep, G., & Ghosh, S. (2021). Role of Birds in Transmitting Zoonotic Pathogens. In *Springer eBooks* (p. 61, 16). Springer nature.
116. Yehia, N., Naguib, M. M., Li, R., Hagag, N., El-Husseiny, M., Mosaad, Z., Nour, A., Rabea, N., Hasan, W. M., Hassan, M. K., Harder, T., & Arafa, A.-S. A. (2018). Multiple introductions of reassorted highly pathogenic avian influenza viruses (H5N8) clade 2.3.4.4b causing outbreaks in wild birds and poultry in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, V. 58.
117. Zeng, J., Du, F., Xiao, L., Sun, H., Lu, L., Lei, W., Zheng, J., Wang, L., Shu, S., Li, Y., Zhang, Q., Tang, K., Sun, Q., Zhang, C., Long, H., Qiu, Z., Zhai, K., Li, Z., Zhang, G., & Sun, Y. (2024). Spatiotemporal genotype replacement of H5N8 avian influenza viruses contributed to H5N1 emergence in 2021/2022 panzootic. *Journal of Virology*.
118. Zhang, W., & Evans, David. H. (1991). Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, V. 33(N. 1-2).
119. Zhao, K., Gu, M., Zhong, L., Duan, Z., Zhang, Y., Zhu, Y., Zhao, G., Zhao, M., Chen, Z., Hu, S., Liu, W., Liu, X., Peng, D., & Liu, X. (2013). Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Veterinary Microbiology*, V. 163(N. 3-4)

ANNEXES

Nécropsie

- Ciseaux stérilisés de différentes tailles
- Bistouris
- Conteneurs d'échantillons stériles
- Pince stérile
- Ecouillons
- Tenue de sécurité jetable
- Lunette de protection
- Gants en latex

Préparation des prélèvements

- Bistouri et pince stérile
- Boîte de pétri
- Bec Bunsen
- Micropipette de 1000 µl
- Embouts de 1000 µl
- Cryotubes
- Solution PBS (Phosphate-buffered saline)
- Vortex
- Centrifugeuse

Extraction de l'acide nucléique

- Micropipettes de différents volumes
- Embouts de différents volumes
- Hotte à flux laminaire
- Microtubes de 1.5 ml
- Tubes collecteurs
- Les mini colonnes de centrifugation QIAamp
- Carrier ARN (stabilisateur d'ARN)
- AVL (Tampon de lyse)
- AVE (Tampon d'élution)
- AW1 et AW2 (solution de lavage)
- Ethanol
- Centrifugeuse
- Gants sans latex
- Blouse spéciale pour extraction

Protocole de la méthode manuelle (Qiagen RNA extraction)

La préparation des échantillons est réalisée après avoir vortexer et centrifuger tous les échantillons à tester.

- Dans un microtube de 1.5 ml, on prend 140 µL d'un échantillon dans une aliquote préparée précédemment de 560 µL de solution Carrier RNA-AVL.
- Incuber tous les échantillons à température ambiante (15-25 ° C) pendant 10 minutes.
- Ajouter 560 µl de 100% EtOH à l'échantillon. Puis vortexer pendant 15 secondes pour mélanger, puis centrifuger brièvement le tube pour éliminer les gouttes de l'intérieur du couvercle.
- Appliquer 630 µL de l'échantillon préparé sur la colonne de centrifugation QIAamp Mini placée dans un tube de prélèvement de 2,0 ml.
- Fermez le bouchon et centrifugez pendant 1 minute à 8 000rpm. Placer la colonne de centrifugation QIAamp dans un tube de collecte propre de 2,0 ml et jeter le tube contenant le filtrat.
- Appliquez soigneusement le reste de l'échantillon préparé dans la même colonne de centrifugation et répétez l'étape précédente.
- Ajouter 500 µL de tampon AW1 à la colonne de centrifugation. Fermez le bouchon et centrifugez pendant 1 minute à 8 000rpm. Transférer la colonne dans un tube de collecte propre de 2,0 mL. Jetez le flux et le tube de collecte.
- Ajouter 500 µL de tampon AW2. Fermez le bouchon et centrifugez pendant 3 minutes à 14 00rpm.
- Pour éliminer le risque de transfert possible du tampon AW2, placer la colonne dans un tube de collecte propre de 2,0 ml et centrifuger à pleine vitesse pendant 1 minute.
- Pour éluer l'ARN, transférer la colonne de centrifugation dans un tube propre de 1,5 mL et ajouter 140 µL de tampon AVE. Incuber à température ambiante pendant 1 minute.
- Centrifuger 1 minute à 8 000rpm. Jetez la colonne.
- L'ARN élué peut être conservé entre -20 ° C et -70 ° C pendant un an maximum.

Protocole de la méthode automatique (Qiagen RNA extraction)

La préparation des échantillons est réalisée après avoir vortexer et centrifuger tous les échantillons à tester.

- Dans un microtube spécial de l'automate, on dépose 140 µL du surnageant de l'échantillon et on le met dans sa place spécifique dans l'automate.
- On prépare les solutions Carrier RNA-AVL selon le nombre d'échantillon et on le dépose dans sa place spécifique dans l'automate.
- Une fois le programme lancé, l'automate fera l'extraction et on a plus qu'à recollecter l'extrait d'ARN.

RRT-PCR

- Micropipettes de différents volumes
- Embouts exempte d'ARNase de différents volumes
- Hotte à flux laminaire
- Gants
- Blouse spéciale PCR
- Microtubes de 0.1 ml/ 0.2ml
- EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix:
 - 5 µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase (on ajoute au tube de 1250 µl)
 - 0.1 units/µl of EconoTaq DNA Polymerase,
 - Tampon (pH 9.0),

- 400 μ M dATP,
- 400 μ M dGTP,
- 400 μ M dCTP,
- 400 μ M dATP,
- 3 mM $MgCl_2$
- Amorces Forward (F)
- Amorces Reverse (R)
- Sonde
- Eau ultra pure exempte d'ARNase /ADNase distillée

NB : pour la **RT-PCR** et la **PCR nichée**, le même matériels et réactifs sont utilisés à l'exception de la sonde.

Electrophorèse

- Micropipettes de 10 ml
- Embouts de 10 ml
- Agarose
- Gants
- Eau distillée stérile
- Tampon TAE (Tris, acétate, EDTA)
- Fluorochrome Syber-Green
- Bouteille stérile
- Micro-onde
- Papier parafilm
- Cuve, peigne et générateur de courant.
- Balance
- Trans illuminateur à UV
- Tampon de charge
- Marqueur de taille 1kb

Protocole

- Pour la préparation d'un gel d'agarose à 1.5%, sur la balance, on pèse 1.5g d'agarose dans la bouteille stérile et on ajoute par la suite 100ml du tampon TAE.
- On chauffe le mélange au micro-onde jusqu'à ébullition.
- On ajoute 3 μ L de Syber-Green à la solution et on le coule dans la cuve avec peigne en place.
- Après solidification du gel, on dépose la cuve dans le générateur et on imprègne le gel de TAE et on dépose dans chaque puit 5 μ L du produit PCR mélangé à 1 μ L de tampon de charge.
- Le marqueur de taille est déposé dans le premier puit à raison de 12 μ L.
- On allume le générateur et on laisse procéder pour au moins 45 min.
- Une fois le temps écoulé, on dépose le gel sur le trans illuminateur à UV et on visualise les bandes d'ADN.

Tableau I : Les résultats de la recherche du gène M au sein des élevages testés.

Code élevage	Date de prélèvement	Résultats AIV
E 1	22/12/2020	+
E 2	24/12/2020	+
E 3	29/12/2020	-
E 4	27/01/2021	+
E 5	27/01/2021	-
E 6	31/01/2021	-
E 7	03/02/2021	+
E 8	03/02/2021	-
E 9	04/02/2021	+
E 10	07/02/2021	+
E 11	10/02/2021	-
E 12	10/02/2021	-
E 13	10/02/2021	-
E 14	12/02/2021	+
E 15	16/02/2021	+
E 16	21/02/2021	-
E 17	25/02/2021	+
E 18	28/02/2021	+
E 19	02/03/2021	+
E 20	06/03/2021	+
E 21	08/03/2021	-
E 22	10/03/2021	-
E 23	10/03/2021	+
E 24	11/03/2021	+
E 25	14/03/2021	+
E 26	29/03/2021	-
E 27	05/04/2021	+
E 28	09/04/2021	+
E 29	11/04/2021	+
E 30	13/04/2021	+
E 31	13/04/2021	+
E 32	13/04/2021	-
E 33	15/04/2021	+
E 34	18/04/2021	-
E 35	19/04/2021	+
E 36	20/04/2021	+
E 37	20/04/2021	+
E 38	21/04/2021	+
E 39	21/04/2021	+
E 40	21/04/2021	+
E 41	21/04/2021	+
E 42	22/04/2021	+
E 43	27/04/2021	-
E 44	01/05/2021	+
E 45	02/05/2021	-
E 46	10/05/2021	-

E 47	15/05/2021	+
E 48	23/05/2021	+
E 49	24/05/2021	+
E 50	27/05/2021	-
E 51	19/07/2021	-
E 52	18/08/2021	-
E 53	22/08/2021	-
E 54	25/08/2021	-
E 55	25/08/2021	-
E 56	29/08/2021	+
E 57	29/08/2021	-
E 58	05/09/2021	-
E 59	07/09/2021	-
E 60	12/09/2022	+
E 61	04/10/2021	-
E 62	06/10/2021	-
E 63	26/12/2021	-
E 64	28/12/2021	+
E 65	23/01/2022	-
E 66	14/02/2022	-
E 67	06/03/2022	-
E 68	17/03/2022	-
E 69	22/03/2022	-
E 70	10/04/2022	-
E 71	15/05/2022	-
E 72	17/05/2022	-
E 73	22/05/2022	-
E 74	16/06/2022	-
E 75	19/06/2022	-
E 76	18/07/2022	-
E 77	15/08/2022	-
E 78	05/09/2022	+
E 79	12/09/2022	-
E 80	15/09/2022	-
E 81	22/09/2022	+
E 82	22/09/2022	+
E 83	27/09/2022	+
E 84	27/9/2022	+
E 85	29/09/2022	+
E 86	02/10/2022	-
E 87	02/10/2022	-
E 88	02/10/2022	-
E 89	09/10/2022	-
E 90	11/10/2022	-
E 91	13/10/2022	-
E 92	15/10/2022	-
E 93	18/10/2022	-
E 94	18/10/2022	+
E 95	18/10/2022	+

E 96	30/10/2022	+
E 97	07/11/2022	-
E 98	07/11/2022	+
E 99	07/11/2022	+
E 100	10/11/2022	-
E 101	10/11/2022	-
E 102	13/11/2022	-
E 103	13/11/2022	-
E 104	13/11/2022	-
E 105	13/11/2022	+
E 106	23/11/2022	-
E 107	24/11/2022	-
E 108	27/11/2022	-
E 109	29/11/2022	-
E 110	29/11/2022	+
E 111	06/12/2022	-
E 112	11/12/2022	+
E 113	15/12/2022	-
E 114	15/12/2022	+
E 115	24/12/2022	+
E 116	02/01/2023	-
E 117	04/01/2023	-
E 118	05/01/2023	+
E 119	05/01/2023	+
E 120	21/01/2023	+
E 121	21/01/2023	+
E 122	25/01/2023	-
E 123	05/02/2023	+
E 124	12/02/2023	-
E 125	12/02/2023	-
E 126	01/03/2023	-
E 127	01/03/2023	+
E 128	22/03/2023	+
E 129	23/03/2023	-
E 130	28/03/2023	-
E 131	28/03/2023	-
E 132	29/03/2023	-
E 133	06/04/2023	+
E 134	09/04/2023	-
E 135	10/04/2023	+
E 136	26/04/2023	-
E 137	27/04/2023	+
E 138	27/04/2023	+
E 139	30/04/2023	-
E 140	30/04/2023	-
E 141	30/04/2023	-
E 142	30/04/2023	-
E 143	30/04/2023	+
E 144	02/05/2023	-

E 145	09/05/2023	-
E 146	09/05/2023	+
E 147	09/05/2023	+
E 148	15/05/2023	+
E 149	16/05/2023	-
E 150	16/05/2023	+
E 151	17/05/2023	-
E 152	18/05/2023	-
E 153	18/05/2023	+
E 154	20/05/2023	-
E 155	21/05/2023	+
E 156	21/05/2023	+
E 157	25/05/2023	-
E 158	25/05/2023	+
E 159	01/06/2023	-
E 160	13/06/2023	-
E 161	13/06/2023	-
E 162	14/06/2023	-
E 163	18/06/2023	+
E 164	18/06/2023	+
E 165	19/06/2023	+
E 166	16/07/2023	-
E 167	17/07/2023	+

Tableau II : Les résultats de la RRT-PCR des élevages présentant une faible mortalité

Code élevage	Date de prélèvement	Résultats AIV
E 56	29/08/2021	+
E 64	28/12/2021	+
E 78	05/09/2022	+
E 60	12/09/2022	+
E 82	22/09/2022	+
E 81	22/09/2022	+
E 84	27/09/2022	+
E 83	27/09/2022	+
E 16	21/02/2021	-
E 53	22/08/2021	-
E 57	29/08/2021	-
E 62	06/10/2021	-
E 63	26/12/2021	-
E 69	22/03/2022	-
E 74	16/06/2022	-
E 75	19/06/2022	-
E 79	12/09/2022	-
E 89	09/10/2022	-
E 124	12/02/2023	-
E 134	09/04/2023	-
E 136	26/04/2023	-
E 139	30/04/2023	-
E 140	30/04/2023	-
E 141	30/04/2023	-
E 142	30/04/2023	-
E 145	09/05/2023	-
E 70	10/04/2022	-
E 66	14/02/2022	-
E 71	15/05/2022	-
E 106	23/11/2022	-
E 122	25/01/2023	-
E 144	02/05/2023	-
E 3	29/12/2020	-
E 6	31/01/2021	-
E 8	03/02/2021	-
E 11	10/02/2021	-
E 12	10/02/2021	-
E 13	10/02/2021	-
E 21	08/03/2021	-
E 22	10/03/2021	-

E 26	29/03/2021	-
E 32	13/04/2021	-
E 34	18/04/2021	-
E 43	27/04/2021	-
E 45	02/05/2021	-
E 46	10/05/2021	-
E 50	27/05/2021	-
E 51	19/07/2021	-
E 52	18/08/2021	-
E 54	25/08/2021	-
E 55	25/08/2021	-
E 58	05/09/2021	-
E 59	07/09/2021	-
E 61	04/10/2021	-
E 65	23/01/2022	-
E 67	06/03/2022	-
E 68	17/03/2022	-
E 72	17/05/2022	-
E 73	22/05/2022	-
E 76	18/07/2022	-
E 77	15/08/2022	-
E 80	15/09/2022	-
E 86	02/10/2022	-
E 87	02/10/2022	-
E 88	02/10/2022	-
E 90	11/10/2022	-
E 91	13/10/2022	-
E 92	15/10/2022	-
E 93	18/10/2022	-
E 97	07/11/2022	-
E 100	10/11/2022	-
E 101	10/11/2022	-
E 102	13/11/2022	-
E 103	13/11/2022	-
E 104	13/11/2022	-
E 107	24/11/2022	-
E 108	27/11/2022	-
E 109	29/11/2022	-
E 111	06/12/2022	-
E 113	15/12/2022	-
E 116	02/01/2023	-
E 117	04/01/2023	-
E 125	12/02/2023	-
E 126	01/03/2023	-

E 129	23/03/2023	-
E 130	28/03/2023	-
E 131	28/03/2023	-
E 132	29/03/2023	-
E 149	16/05/2023	-
E 151	17/05/2023	-
E 152	18/05/2023	-
E 154	20/05/2023	-
E 157	25/05/2023	-
E 159	01/06/2023	-
E 160	13/06/2023	-
E 161	13/06/2023	-
E 162	14/06/2023	-
E 166	16/07/2023	-

Tableau III: Les résultats de la RRT-PCR des élevages présentant une mortalité modérée

Code élevage	Date de prélèvement	Résultats AIV
E 2	24/12/2020	+
E 5	27/01/2021	+
E 9	04/02/2021	+
E 17	25/02/2021	+
E 18	28/02/2021	+
E 23	10/03/2021	+
E 25	14/03/2021	+
E 94	18/10/2022	+
E 95	18/10/2022	+
E 96	30/10/2022	+
E 98	07/11/2022	+
E 99	07/11/2022	+
E 105	13/11/2022	+
E 110	29/11/2022	+
E 112	11/12/2022	+
E 118	05/01/2023	+
E 119	05/01/2023	+
E 127	01/03/2023	+
E 128	22/03/2023	+
E 133	06/04/2023	+
E 135	10/04/2023	+
E 137	27/04/2023	+
E 138	27/04/2023	+
E 143	30/04/2023	+
E 146	09/05/2023	+
E 147	09/05/2023	+
E 153	18/05/2023	+
E 155	21/05/2023	+
E 156	21/05/2023	+
E 158	25/05/2023	+
E 163	18/06/2023	+
E 164	18/06/2023	+

Tableau IV : Les résultats de la RRT-PCR des élevages présentant une mortalité élevée (cas critiques)

Code élevage	Date de prélèvement	Résultats AIV
E 1	22/12/2020	+
E 4	27/01/2021	+
E 7	03/02/2021	+
E 10	07/02/2021	+
E 14	12/02/2021	+
E 15	16/02/2021	+
E 19	02/03/2021	+
E 20	06/03/2021	+
E 24	11/03/2021	+
E 27	05/04/2021	+
E 28	09/04/2021	+
E 29	11/04/2021	+
E 30	13/04/2021	+
E 31	13/04/2021	+
E 33	15/04/2021	+
E 35	19/04/2021	+
E 36	20/04/2021	+
E 37	20/04/2021	+
E 38	21/04/2021	+
E 39	21/04/2021	+
E 40	21/04/2021	+
E 41	21/04/2021	+
E 42	22/04/2021	+
E 44	01/05/2021	+
E 47	15/05/2021	+
E 48	23/05/2021	+
E 49	24/05/2021	+
E 85	29/09/2022	+
E 114	15/12/2022	+
E 115	24/12/2022	+
E 120	21/01/2023	+
E 121	21/01/2023	+
E 123	05/02/2023	+
E 148	15/05/2023	+
E 150	16/05/2023	+
E 165	19/06/2023	+
E 167	17/07/2023	+

Tableau V : les Ct des cas critiques positif H5 par RRT-PCR

Wilayas	Première épizootie		Deuxième épizootie			
	N° de cas	Ct moyen des trachées*	N° de cas	Ct moyen des trachées*	Ct moyen des amygdales caecales	Ct moyen des cerveaux
DJELFA	6	20,42	1	25.00	/	/
BOUMERDES	0	/	1	21.41	18.84	/
BLIDA	1	17.96	0	NE	NE	NE
MEDEA	1	21.47	2	25.46	23.96	/
SETIF	0	/	2	19.58	19.92	21.49
TIARET	0	/	2	25.78	30.24	18.20
TIPAZA	1	18.82	1	27.01	22.06	/
TISSEMSILT	1	17.15	0	NE	NE	NE
TIZI-OUZOU	0	/	0	NE	NE	NE
MOSTAGANEM	1	19.02	0	NE	NE	NE
BOUIRA	0	/	0	NE	NE	NE
ALGER	0	/	0	NE	NE	NE
BEL ABBES	0	NE	1	17.93	17.70	11.42

/ : Non testé ou non prélevé

NE: Non enregistré

*écouvillon trachéal inclus

Purification de l'ADN à partir des produits PCR :

- Pour chaque 1 volume de produit PCR, ajouter 2 volumes du tampon NTI
- Remplir la colonne NucleoSpin avec le mélange et centrifuger à 11 000 rpm pendant 30 sec
- Ajouter 700 µl du tampon NT3 et centrifuger à 11,000 x g/ 30 sec
- Centrifugation a 11,000 x g/ 1 min à sec
- Elution avec le tampon NE en ajoutant entre 15 et 30 µl
- Incubation a température ambiante pour 1 min
- Centrifugation a 11,000 x g/ 1 min

Purification de l'ADN à partir du gel d'agarose après séparation par électrophorèse :

- Pour chaque 100 mg/gel, ajouter 200 µl du tampon NTI
- Incubation à 50°C / 5 à 10 min avec un vortex chaque 3 min
- Remplir la colonne NucleoSpin avec le mélange et centrifuger à 11,000 x g/ 30 sec
- Ajouter 700 µl du tampon NT3 et centrifuger à 11,000 x g/ 30 sec
- Centrifugation a 11,000 x g/ 1 min à sec
- Elution avec le tampon NE en ajoutant entre 15 et 30 µl
- Incubation a température ambiante pour 1 min
- Centrifugation a 11,000 x g/ 1 min

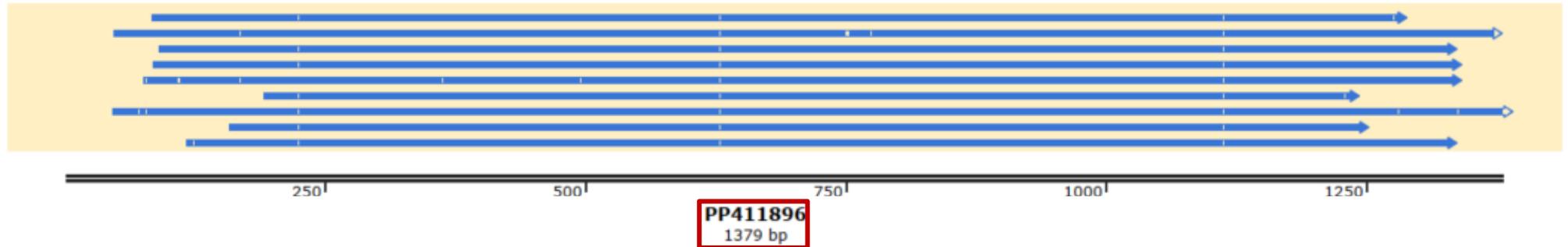


Figure 1: Alignement des séquences du gène NA-N8

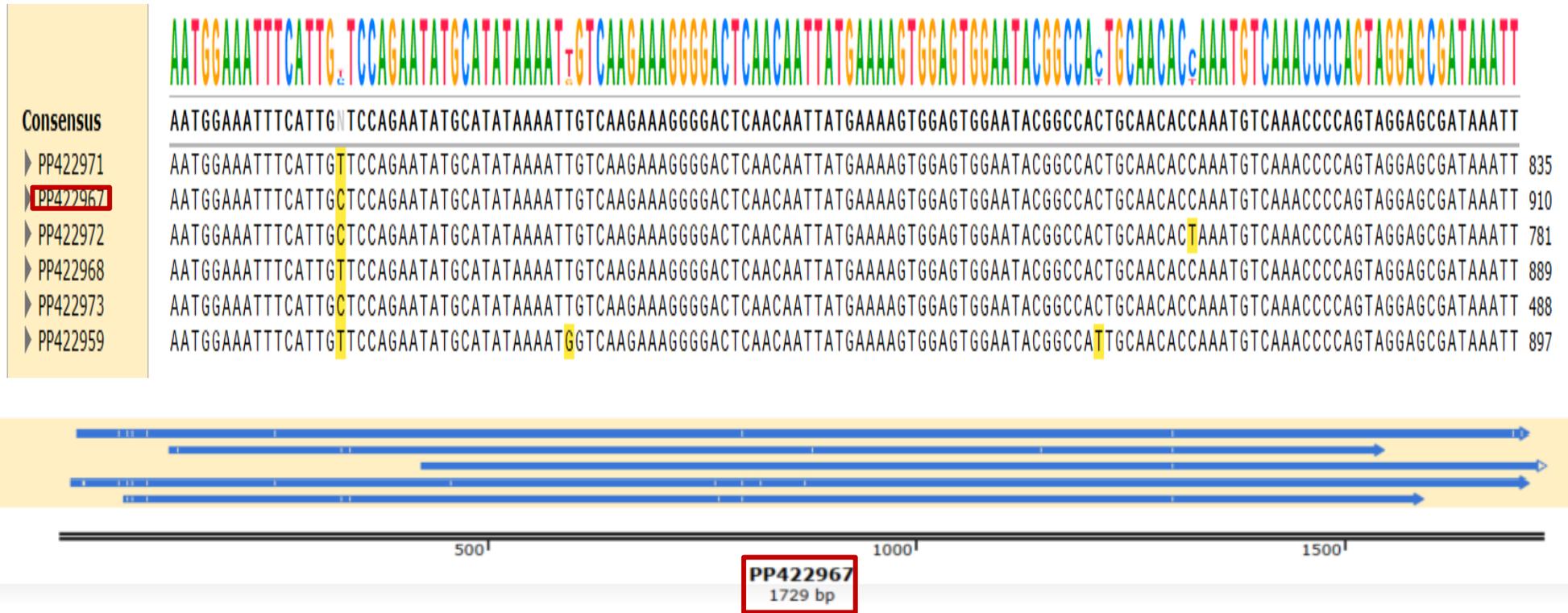


Figure 2 : Alignement des séquences du gène HA-H5 du sous-type H5N1

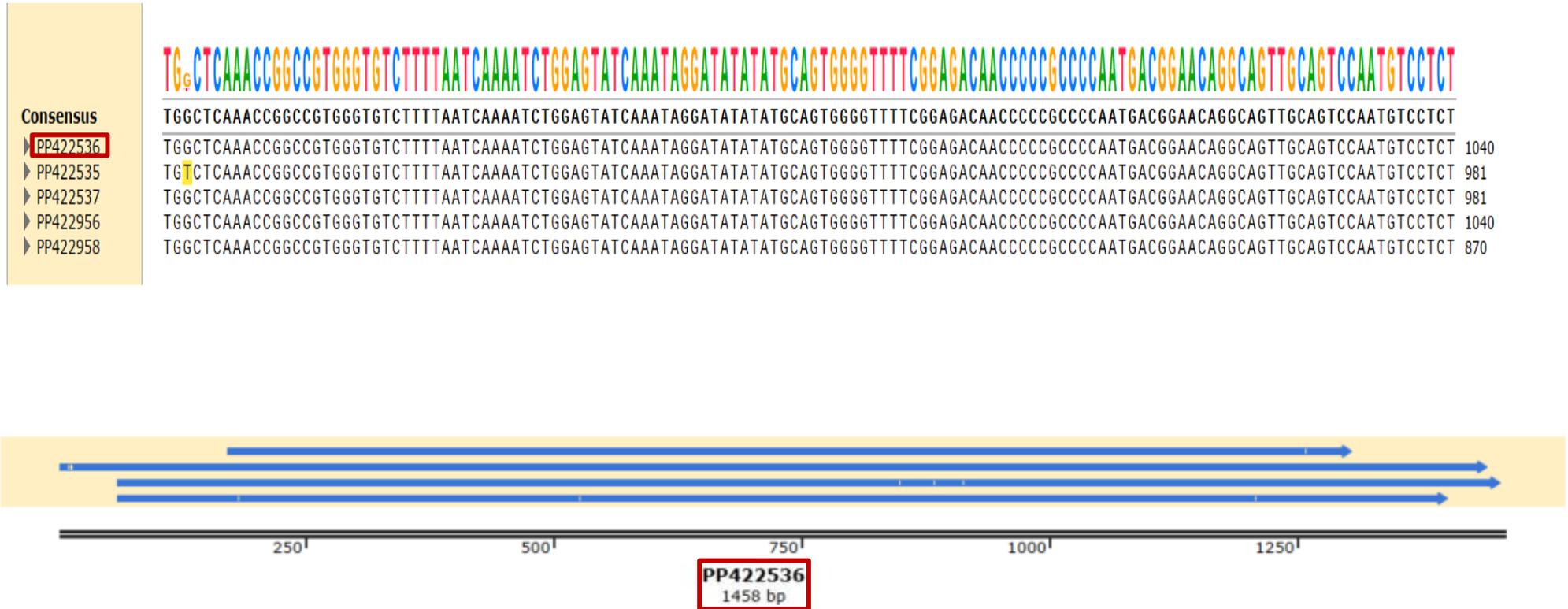


Figure 3 : Alignement des séquences du gène NA-N1