

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement

Structure de Recherche : Laboratoire de Biodiversité, Biologie et Génome

Discipline : Biologie

Spécialité : Virologie, Biologie moléculaire et Epidémiologie

Présentée et soutenue le 10/12/2022 par :

Fatiha EL MELLOULI

**Etude épidémiologique et moléculaire de l'Influenza Aviaire au Maroc :
Détection moléculaire chez les oiseaux sauvages, dynamique spatio-temporelle et histoire évolutive des virus H9N2**

JURY

Hocein BAZAIRI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Rabat	Président/Rapporteur
Siham FELLAHI	PES, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat	Rapporteuse/Examinatrice
Hamid LAKHIARI	PES, Université Hassan II, Faculté des sciences et techniques de Mohammedia, Mohammedia	Rapporteur/Examineur
Hassan JAZIRI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Rabat	Rapporteur/Examineur
Mohamed MOUAHID	PES, Expert, Clinique Vétérinaire MOUAHID, Témara	Examineur
Hamid RGUIBI IDRISSE	PES, Université Ibn Zohr, Ecole Supérieure de Technologie de Laayoune, Laayoune	Co-directeur de thèse
Abdelaziz BENHOUSSE	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Rabat	Directeur de thèse

Année Universitaire : 2021-2022

Dédicaces

A MES CHERS PARENTS

Nulle dédicace ne pourrait vous exprimer toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Vous avez remarquablement encouragé mes ambitions et vous avez veillé à mon succès et à mon bonheur. Que ce travail soit la preuve de mon éternelle reconnaissance et ma profonde gratitude.

A MON EPOUX Said

Ma profonde reconnaissance à mon cher mari pour ton soutien et ton encouragement.

A MES ENFANTS JAD ET CHADY

Qu'Allah tout puissant, vous procure un avenir florissant plein de bonheur, de santé, de réussite et de sérénité.

A MES SŒURS ET MES FRÈRES TOURIA, NAZIHA, ADIL, ABDELHAMID, TAOUFIK ET ABDERRAHIM.

En témoignage de tout l'amour qui nous unit, pour votre soutien moral et votre aide, vous trouvez dans ce travail l'expression de mon profond respect.

A Dr Nabil ABOUCHOAI B Directeur de la DIL/ ONSSA Rabat, auquel J'adresse mes vifs remerciements pour m'avoir offert l'occasion d'abord de poursuivre mes études doctorales et aussi pour le soutien logistique qu'il a mis à ma disposition et pour tout l'intérêt qu'il porte à mon sujet de recherche. Je vous exprime ma sincère gratitude.

A Dr. Alice FUSARO de l'Instituto Zooprofilattico Sperimentale del Venzie en Italie (IZS) le laboratoire de référence de l'OIE/EU pour l'Influenza Aviaire, pour votre accompagnement, votre disponibilité, vos précieux conseils scientifiques enrichissants et pour le soutien que vous avez accordé à mon sujet de thèse. Veuillez trouver ici mes respects les plus dévoués et ma profonde reconnaissance.

A Dr. Isabella Monne, Dr. Bianca ZECCIN et Francesca ELLERO et toute l'équipe de IZS de Venise qui m'ont aimablement accueilli pendant mon séjour dans leur laboratoire, merci pour les précieux conseils, pour le soutien scientifique et logistique et vos contributions pratiques dans la réalisation de ce travail, je tiens à exprimer ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

Je remercie en particulier Dr Hasnae ZEKHNINI et Dr Naima EL MOQRI, mes collègues et amies pour votre précieuse aide pour l'accomplissement de ce travail, votre présence, disponibilité et votre soutien moral, je vous exprime ma sincère reconnaissance.

Tous mes collègues et amis Dr Sami DARKAOUI et Dr. Abderrazak EL KHANTOUR de la DPIV/ONSSA, Dr. Mounir KHALI du SEVS/ONSSA, Mohamed Rida SALAM, Modou Mamoune MBAYE, Mohammed FILALI, Sara GHACHAT, Imane MAHARI Doctorants au Laboratoire Régional de Recherche et d'Analyse Vétérinaire de Casablanca /ONSSA, je vous remercie pour votre implication dans mon travail et votre précieuse aide au cours de mon parcours doctoral. Veuillez trouver ma profonde reconnaissance et ma haute considération et l'expression de mes sentiments respectueux,

Je tiens à remercier également toutes les équipes d'ornithologues, les agents du département des eaux et forêts et les services vétérinaires de l'ONSSA, pour leur disponibilité, leur générosité, et leur collaboration à la collecte des échantillons.

Enfin, que toutes les personnes ayant contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma vive reconnaissance.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.

A TOUS MES AMIS.

A TOUS LES MIENS.

En témoignage de mon affection et mon estime.

Fatiha EL MELLOULI

Remerciements

Je tiens à remercier mes collègues du Laboratoire de Biodiversité, Biologie et Génome du département de Biologie de l'université Mohammed V de Rabat, faculté des sciences, pour leur soutien.

*Je tiens à remercier et exprimer ma gratitude et ma profonde reconnaissance à :
Mr. Abdelaziz BENHOUSA, PES, Professeur à l'Université Mohammed V de Rabat, faculté des sciences, mon Directeur de thèse, pour son encadrement attentionné, ses conseils, ses critiques constructives et pour sa compétence scientifique et pédagogique qui constituent les éléments de base de la réussite de ce travail. Ses encouragements m'ont permis de surmonter toutes les difficultés tout au long de cette épreuve.*

***Mr. Hamid RGUIBI IDRISI**, PES, Professeur à l'Université Ibn Zohr, Ecole Supérieure de Technologie de Laayoune, mon codirecteur de thèse, pour le soutien parfait qui m'a permis de poursuivre mon travail dans de bonnes conditions.*

*Je tiens à remercier les professeurs membres de mon jury doctoral :
Mr. Hocein BAZAIRI, PES, Professeur à l'Université Mohammed V de Rabat, faculté des sciences, pour la présidence du jury doctoral et la relecture du manuscrit, pour son aide, disponibilité et soutien constant.*

***Madame Siham FELLAHI**, PES, Professeur à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, pour la relecture, l'examen de mon manuscrit et aussi pour ses encouragements constants.*

***Mr. Hamid LAKHIAI**, PES, Professeur à l'université Hassan II de Casablanca, Faculté des sciences et techniques de Mohammedia, pour la relecture et l'examen de mon manuscrit.*

***Mr. Hassan JAZIRI**, PES, Professeur à l'Université Mohammed V de Rabat, faculté des sciences, pour la relecture et l'examen de mon manuscrit.*

***Mr. Mohamed MOUAHID**, PES, Expert, de la Clinique Vétérinaire MOUAHID, d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit, pour son implication totale et sa contribution importante dans la réalisation de mon travail en fournissant le matériel biologique et pour le partage et les échanges des connaissances scientifiques.*

Résumé

L'Influenza aviaire (IA) est une maladie zoonotique importante pour la santé publique et animale, causée par l'Influenza virus A, qui affecte les volailles domestiques, les oiseaux sauvages et les mammifères, y compris l'homme. Les oiseaux aquatiques sont considérés comme le réservoir naturel de ce virus. En 2016, le Maroc a connu la première apparition du virus de l'influenza aviaire (VIA) H9N2 faiblement pathogène chez la volaille qui malgré la mise en place de stratégies de vaccination en masse pour contrôler la maladie, le virus est devenu endémique chez les volailles dans le pays. Cependant, aucun cas n'a été signalé chez les oiseaux sauvages.

La présente étude visait à détecter la présence du VIA chez les oiseaux sauvages au Maroc afin de tracer les sources possibles des virus affectant les volailles et à investiguer les origines, le potentiel zoonotique, ainsi que l'impact de la vaccination sur l'évolution moléculaire des virus H9N2 marocains.

Entre 2016 et 2019, 967 échantillons provenant de 480 oiseaux représentant 56 espèces différentes d'oiseaux sauvages, 20 familles et 8 ordres ; principalement des Charadriiformes, Anseriformes, Pelecaniformes et Passeriformes, ont été prélevés dans diverses zones humides et sites ornithologiques pertinents au Maroc. Ces échantillons de terrain étaient constitués de 374 écouvillons cloacaux, 321 écouvillons trachéaux, 54 échantillons de fèces frais et 218 pools d'organes, y compris la trachée, les poumons, le foie, la rate, le cœur, l'intestin et le cerveau. Les échantillons ont été examinés pour la présence du virus de l'IA à l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne transcriptase inverse en temps réel basée sur TaqMan (rRT-PCR) ciblant le gène de la matrice, suivie d'autres tests de sous-typage rRT-PCR ciblant les gènes H1 à H16. Le gène de la matrice IA a été détecté dans 18 des 967 échantillons (1,86 %); les échantillons positifs ont été détectés chez 17 oiseaux appartenant à 10 espèces d'oiseaux : deux chevaliers gambettes (*Tringa totanus*), un bécasseau minute (*Calidris minuta*), un tournepierre à collier (*Arenaria interpres*), une bécassine des marais (*Gallinago gallinago*), un chevalier aboyeur (*Tringa nebularia*), une échasse blanche (*Himantopus himantopus*), deux mouettes rieuses (*Chroicocephalus ridibundus*), un goéland Railleur (*Chroicocephalus genei*), six hérons garde-boeufs (*Bubulcus ibis*) et une foulque macroule (*Fulica atra*). Le VIA a été détecté dans 2 zones humides et 1 site ornithologique (Complexe Sidi Moussa-Oualidia, Lagune de Smir et Côte d'El Jadida) et la positivité la plus élevée a été révélée dans des échantillons fécaux frais (11,1%), indiquant la pertinence de cette matrice pour la surveillance des oiseaux sauvages. Nos résultats soulignent que les échassiers, les goélands et les hérons garde-boeufs sont les espèces les plus touchées et peuvent représenter un risque potentiel d'introduction d'IA dans le secteur avicole au Maroc. Un suivi régulier des oiseaux sauvages au Maroc, portant notamment sur les zones et les espèces identifiées dans cette étude comme à haut risque de circulation du virus, doit être mis en place pour anticiper et prévenir une éventuelle propagation du VIA.

28 virus H9N2 collectés de 2016 à 2021 dans des élevages avicoles marocains ont été isolés et leurs génomes entiers séquencés. Les analyses phylogénétiques et évolutives ont montré que les virus marocains H9N2 appartiennent à la lignée G1 et sont étroitement apparentés aux virus isolés en Afrique et au Moyen-Orient. Une grande similitude entre toutes les séquences d'hémagglutinine (HA) de 2016-2017 a été observée, tandis que les virus identifiés en 2018-2019 et 2020-2021 étaient séparés de leurs ancêtres de 2016-2017 par de longues branches. Des mutations de la protéine HA associées à une dérive antigénique et à un potentiel zoonotique accru ont également été trouvées. Les analyses phylogéographiques bayésiennes ont révélé que le Moyen-Orient était la région d'origine du virus marocain H9N2, avant de se propager aux autres pays africains. Notre étude est la première analyse complète de l'histoire évolutive des virus H9N2 dans le pays, soulignant leur potentiel zoonotique et soulignant l'importance de mettre en place des systèmes de surveillance efficaces.

Mots clés : Influenza aviaire, oiseaux sauvages, Maroc, RT-PCR en temps réel, H9N2, séquençage, phylogénie, évolution moléculaire.

Abstract

Avian influenza (AI) is a zoonotic disease significant to both public and animal health, caused by influenza virus A, and affects domestic poultry, wild birds, and mammals including humans. Aquatic birds are considered the natural reservoir of this virus. In 2016, Morocco experienced the first occurrence of low pathogenic H9N2 avian influenza virus (AIV) in poultry; despite the implementation of vaccination strategies to control the disease, the virus has become endemic in poultry in the country. However, no cases were reported in wild birds.

The present study aimed to monitor the presence of AIV in wild birds in Morocco in order to trace the possible sources of the viruses affecting poultry and to investigate the origins, zoonotic potential, as well as the impact of vaccination on the molecular evolution of Moroccan H9N2 viruses.

Between 2016 and 2019, 967 samples obtained from 480 birds representing 56 different wild bird species, 20 families, and 8 orders, mostly from Charadriiformes, Anseriformes, Pelecaniformes, and Passeriformes, were collected from various wetlands and relevant ornithologic sites in Morocco. These field samples consisted of 374 cloacal swabs, 321 tracheal swabs, 54 fecal samples, and 218 organ pools including the trachea, lung, liver, spleen, heart, intestine, and brain. The samples were examined for the presence of AIV using TaqMan-based real-time reverse transcriptase-PCR (rRT-PCR) targeting the matrix gene, followed by further subtyping rRT-PCR tests targeting the H1–H16 genes. The AI matrix gene was detected in 18 out of 967 samples (1.86%); positive samples were detected in 17 birds belonging to 10 bird species: two redshanks (*Tringa totanus*), one little stint (*Calidris minuta*), one ruddy turnstone (*Arenaria interpres*), one common snipe (*Gallinago gallinago*), one common greenshank (*Tringa nebularia*), one black-winged stilt (*Himantopus himantopus*), two blackheaded gulls (*Chroicocephalus ridibundus*), one slender-billed gull (*Chroicocephalus genei*), six cattle egrets (*Bubulcus ibis*), and one Eurasian coot (*Fulica atra*). AIV was detected in 2 wetlands and 1 ornithologic site (Sidi Moussa Oualidia Complex, Smir lagoon and El Jadida Coast) and the highest positivity was revealed in fresh fecal samples (11.1%), indicating the suitability of this matrix for wild bird surveillance. Our results highlight that waders, gulls, and cattle egrets are the most affected species and may represent a potential risk for AI introduction in the poultry sector in Morocco. Regular monitoring of wild birds in Morocco, focusing in particular in the areas and species identified in this study as a high risk of virus circulation, should be implemented to anticipate and prevent possible AIV spread.

28 H9N2 viruses collected from 2016 to 2021 in Moroccan poultry flocks were isolated and their whole genomes sequenced. Phylogenetic and evolutionary analyses showed that Moroccan H9N2 viruses belong to the G1-like lineage and are closely related to viruses isolated in Africa and the Middle East. A high similarity among all the 2016–2017 hemagglutinin (HA) sequences was observed, while the viruses identified in 2018–2019 and 2020–2021 were separated from their 2016–2017 ancestors by long branches. Mutations in the HA protein associated with antigenic drift and increased zoonotic potential were also found. The Bayesian phylogeographic analyses revealed the Middle East as being the region where the Moroccan H9N2 virus may have originated, before spreading to the other African countries. Our study is the first comprehensive analysis of the evolutionary history of the H9N2 viruses in the country, highlighting their zoonotic potential and pointing out the importance of implementing effective monitoring systems.

Key words: Avian influenza, wild birds, Morocco, Real time RT-PCR, H9N2, sequencing, phylogeny, molecular evolution.

Liste des productions scientifiques :

- **El Mellouli, F.**; Abouchoaib, N.; Zekhnini, H.; Khayli, M.; Fusaro, A.; Idrissi, H.R.; Benhoussa, A. Molecular Detection of Avian Influenza Virus in Wild Birds in Morocco, 2016–2019. *Avian Dis.* 2021, 66, 1–10.
- **El Mellouli F**, Mouahid M, Fusaro A, Zecchin B, Zekhnini H, El Khantour A, Giussani E, Palumbo E, Rguibi Idrissi H, Monne I, Benhoussa A. Spatiotemporal Dynamics, Evolutionary History and Zoonotic Potential of Moroccan H9N2 Avian Influenza Viruses from 2016 to 2021. *Viruses.* 2022 Mar 1;14(3):509.
- Salam, M. R., Ezaouine, A., Zekhnini, H., **El Mellouli, F.**, Chegiani, F., & Bennis, F. (2022). Detection of chicken and turkey in different beef matrix by species-specific multiplex PCR assay. *Scientific African*, 17, e01338.
- Pedarrieu, A., **El Mellouli, F.**, Khallouki, H., Zro, K., Sebbar, G., Sghaier, S., ... & Cetre-Sossah, C. (2021). External quality assessment of Rift Valley fever diagnosis in countries at risk of the disease: African, Indian Ocean and Middle-East regions. *Plos one*, 16(5), e0251263.
- Mbaye, M. M., Zekhnini, H., El Khalfi, B., Louanjli, N., Zakaria, M., **El Mellouli, F.**, & Soukri, A. (2021). Determination of Free DNA (cfDNA) by RT-qPCR in Individuals in Sperm Alterations. *Annual Research & Review in Biology*, 1-6.
- El Khantour, A., El Houadfi, M., Nassik, S., Tligui, N. S., **El Mellouli, F.**, Sikht, F. Z., ... & Fellahi, S. (2021). Protective efficacy evaluation of four inactivated commercial vaccines against low pathogenic avian influenza H9N2 virus under experimental conditions in broiler chickens. *Avian diseases*, 65(3), 351-357.
- El Khantour, A., Soulaymani, A., Salek, M., Maltouf, A. F., **El Mellouli, F.**, Ducatez, M. F., & Fellahi, S. (2020). Molecular characterization of the hemagglutinin gene of H9N2 avian influenza viruses isolated from broiler flocks in Morocco from 2016 to 2018. *Vet. Arh*, 90, 477-484.
- Pérez-Ramírez, E., Cano-Gómez, C., Llorente, F., Adzic, B., Al Ameer, M., Djadjovski, I., El Hage, J., **El Mellouli, F.**, Goletic, T., Hovsepyan, H. and Karayel-Hacioglu, I., (2020). External quality assessment of Rift Valley fever diagnosis in 17 veterinary laboratories of the Mediterranean and Black Sea regions. *Plos One*, 15(9), e0239478.

- El Moqri, N., Hassou, N., **El Mellouli, F.**, Zekhnini, H., Abouchoaib, N., & Etahiri, S. (2020). Hepatitis A Virus PCR Analysis and E. coli Detection in Oysters at Oualidia Lagoon and Their Correlation. Food and Nutrition Sciences, 11(7), 684-694.
- El Moqri, N., **El Mellouli, F.**, Hassou, N., Benhafid, M., Abouchoaib, N., & Etahiri, S. (2019). Norovirus detection at oualidia lagoon, a moroccan shellfish harvesting area, by reverse transcription PCR analysis. Food and environmental virology, 11(3), 268-273.
- Monaco, F., Cosseddu, G. M., Doumbia, B., Madani, H., **El Mellouli, F.**, Jiménez-Clavero, M. A., ... & Puech, L. (2015). First external quality assessment of molecular and serological detection of Rift Valley fever in the Western Mediterranean region. PLoS One, 10(11), e0142129.

Communications orales

- **El Mellouli F**, Mouahid M, Fusaro A, Zecchin B, Zekhnini H, El Khantour A, Giussani E, Palumbo E, Rguibi Idrissi H, Monne I, Benhoussa A. "Evolution spatio-temporelle, origines et potentiel zoonotique des virus de l'Influenza Aviaire H9N2 au Maroc". Conférence scientifique de l'Association des Vétérinaires Avicoles Libéraux, 21 Mai 2022, Marrakech.
- SALAM Mohamed Rida, EZAOUINE Abdelkrim, ZEKHNINI Hasnae, **EL MELLOULI Fatiha**, CHEGDANI Fatima, BENNIS Faiza. "Optimization of multiplex PCR for the detection of meat species in food products in the Moroccan reference laboratory" 3rd International Scientific Day of Taroudant (2022), Taroudant.
- MAHARI Imane, **EL MELOULI Fatiha**, LAKHIARI Hamid. "Détection, identification et analyse phylogénétique du gène RPO30 du virus de la variole ovine" quatrième édition des Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (2022), Marrakech.
- GHAICHAT Sara, LAKHIARI Hamid, **EL MELOULI Fatiha**, ZEKHENINI Hasnae. "Identification de l'hépatite A et norovirus GI et GII dans les fruits rouges et les mollusques bivalves par PCR en temps réel au Maroc" quatrième édition des Journées Pratiques Francophones des Sciences Analytiques (2022), Marrakech.
- FILALI Mohammed, **EL MELOULI Fatiha**, LAKHIARI Hamid. "Caractérisation et analyse de la variabilité génétique et antigénique du virus respiratoire syncytial bovin au Maroc" the third edition of the international congress of industry, environment and health (2022), Casablanca.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Organisation de l'appareil respiratoire des oiseaux (http://people.eku.edu/ritchisong/birdrespiration.html).	9
Figure 2: Structure de l'influenza virus de type A, d'après (Ardans 1999)	12
Figure 3: Schéma de l'organisation d'un gène du virus Influenza	13
Figure 4: Structure du trimère de l'HA (Byrd-Leotis et al. 2017).	14
Figure 5 : Structure cristallographique du tétramère de la neuraminidase	15
Figure 6: Structure du complexe ribonucléoprotéique.	17
Figure 7: Illustration du cycle de réplication du virus influenza	19
Figure 8: Espèces sensibles au virus de l'IA	22
Figure 9: Voies de migration des oiseaux sauvages au Moyen-Orient et en Afrique du Nord.	24
Figure 10: Saisonnalité de l'incidence mondiale de l'IAHP chez la volaille	27
Figure 11 : Réaction de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination	34
Figure 12: Image illustrant un reproducteur poulet de chair infecté naturellement par IAFP H9N2 et présentant un œdème périorbitaire sévère (Capua and Alexander 2013).	44
Figure 13: Image satellitaire de la lagune de Merjza Zerga issue de Google Maps	54
Figure 14: Image satellitaire de la lagune de Sidi Moussa issue de Google Maps	55
Figure 15: Image satellitaire de la lagune de Oualidia issue de Google Maps	56
Figure 16: Image satellitaire de la lagune de Khnifiss issue de Google Maps	57
Figure 17: Image satellitaire de la lagune de Smir issue de Google Maps	58
Figure 18: Image satellitaire et unités hydrologique du complexe des zones humides du Bas Loukkos (Benhoussa et al. 2011).	59
Figure 19: Image embouchure de l'Oued Moulouya	60
Figure 20: Image satellitaire des Oasis de Tafilalet issue de Google Maps	61
Figure 21: Image satellitaire de l'Archipel et dunes d'Essaouira issue de Google Maps	62
Figure 22: Image satellitaire de la baie de Dakhla issue de Google Maps	63
Figure 23: Image satellitaire du lac Sidi Boughaba issue de Google Maps	65
Figure 24: Image satellitaire du lac Afenourir issue de google Maps	66

Figure 25: Image satellitaire de daït Aoua issue de Google Maps	67
Figure 26: Localisation géographique des sites d'échantillonnage	71
Figure 27: Images illustrant l'opération de l'autopsie des oiseaux sauvages pour le prélèvement des échantillons (Organes, écouvillons trachéaux et cloacaux)	79
Figure 28 : Image illustrant les courbes d'amplifications pour le test PCR en temps réel pour le gène M indiquant des résultats positifs des échantillons testés et des contrôles positifs	93
Figure 29: Taux de positivité IA par nature des échantillons.....	94
Figure 30: Taux de positivité IA par espèce	95
Figure 31: Taux de positivité IA par famille	95
Figure 32: Taux de positivité IA par ordre	96
Figure 33: Taux de positivité IA par année	97
Figure 34: : Localisation géographique des élevages prélevés au Maroc entre 2016 et 2021	106
Figure 35: Localisation des élevages prélevés et élevages positifs à H9N2	114
Figure 36: Résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par RT-PCR conventionnelle pour la détection de la Neuraminidase (N2) du virus de IAFP H9N2 : 0 : Témoin négatif ; 1 : Témoin positif ; M : Poids moléculaire ; 3, 5 et 7 : Echantillons fortement positifs ; 2, 6 et 8 : Echantillons moyennement positifs ; 4 : Echantillon faiblement positif	115
Figure 37: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène HA (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	119
Figure 38: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène NA (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	120
Figure 39 : Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène MP (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	121

Figure 40 : Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène NP (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	122
Figure 41 : Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène PA (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	123
Figure 42: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène NS (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	124
Figure 43: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène PB1 (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	125
Figure 44: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène PB2 (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.....	126
Figure 45: Le réseau de jonction médiane HA montrant une relation génétique élevée entre tous les virus H9N2 marocains de 2016 et 2017 tandis que les virus de 2018-2019 et 2020-2021 sont séparés de leurs ancêtres de 2016-2017 par de longues branches.	127
Figure 46: Le réseau de jonction médiane HA montrant l'absence de relation génétique particulière entre les virus H9N2 marocains de 2016 à 2021 en fonction de l'origine géographique	128
Figure 47: Dynamique spatio-temporelle décrivant les origines géographiques des virus H9N2 marocains et le virus s'est propagé du Maroc à d'autres pays Africains. Les transitions appuyées sont indiquées par lignes continues (BF > 20)	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Synthèse des cas d'infections humaine par les virus de l'influenza aviaire au 24/11/2021. (D'après l'avis du haut conseil de la santé publique en date du 10 décembre 2021).	26
Tableau II : Liste des vaccins H9N2 commercialisés au Maroc (d'après la division de la pharmacie et des Intrants Vétérinaires (DPIV)/ONSSA)	49
Tableau III : Sites, espèces prélevées et dates de prélèvement des échantillons des oiseaux sauvages	72
Tableau IV : Séquences des amorces et sondes utilisées pour la RT-PCR en temps réel pour la détection des gènes M, H5, H7 et H9, H1-H4, H6, H8 et H10-H16	82
Tableau V : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection des gènes H1, H3, H4, H11, H12, H13, H14, H15, H16	84
Tableau VI : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection du gène H2	84
Tableau VII : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection du gène H6	85
Tableau VIII : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection du gène H10	85
Tableau IX : Liste des contrôles positifs d'extraction et d'amplification utilisées dans les rRT-PCRs	87
Tableau X : Nombre d'oiseaux prélevés par espèce, famille, ordre et oiseaux positifs, origine et date de prélèvement	90
Tableau XI : Tableau du mélange réactionnel pour la PCR conventionnelle pour la détection du gène N2	108
Tableau XII : Les séquences des amorces utilisées pour la détection du gène de la Neuraminidase N2	108
Tableau XIII : Mélange réactionnel pour la PCR conventionnelle pour le séquençage du génome complet	110
Tableau XIV : Informations et numéros d'accession GISAID relatifs aux isolats H9N2 marocains	116
Tableau XV : Sites sous sélection positive (p-value < 0.05) au niveau de la protéine Hémagglutinine des virus H9N2 marocains.	130

LISTE DES ABREVIATIONS

ABI : Applied Biosystem

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide Ribonucléique

ARNc : Acide Ribonucléique complémentaire

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNv : Acide Ribonucléique virale

ATP : Adénosine Triphosphate

BET : Bromure d'Ethidium

BF : FACTEURS BAYES

BSL3 : Biosafety Level 3

CISA-INIA : Centre de recherche en Santé Animale, Institut National de Recherche Agronomique (Espagne)

CITES : Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacé d'extinction

CSMO : Complexe Sidi Moussa Oualidia

Ct : Cycle threshold (Cycle seuil)

dN : nucléotide non synonyme

DPIV : Division de la pharmacie et des intrants vétérinaires

dS : nucléotide synonyme

EOPS : Exempt of Pathogen Specific

FEL : Méthode de vraisemblance à effet Fixe

FFP2 : Filtering Face Piece type 2

GR : Globule Rouge

GTR : General Time Reversible

HA : hémagglutinine

HAT : Titre d'hémagglutination

HPLC : Chromatographie liquide de haute performance

IA : Influenza Aviaire

IAFP : Influenza Aviaire Faiblement Pathogène

IAHP: Influenza Aviaire Hautement Pathogène

ICTV: International Committee of Taxonomy of viruses

IHA : Inhibition de l'hémagglutination

IZS : Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Italie)

J : jours

L : Leucine

LRARC : Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Casablanca

MCMC : Chaîne de Markov Monte Carlo

MCC: Maximum Clade Credibility

MDCK: Cellules Madin-Darby Canine Kidney

MEME : Modèle d'évolution à effet mixte

ML: Maximum Likelihood

NA : Neuraminidase

NEP : Nuclear export protein

NS : Protéine non structural

NS2 ou NEP : Protéine de transport nucléaire

NK: Naturel Killer cellule

NP: nucleocapside

OIE : Office International des Epizooties

ONSSA : Office National de Sécurité Sanitaire de produits Alimentaires

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PB : Protéine Basique

PBS : Solution saline tamponnée au phosphate

PCR : Polymerase Chain Reaction

PRRs : Pattern Recognition Receptors

PSM : Poste de sécurité microbiologique

Q: Glutamine

R: Arginine

RBS: Receptor Binding Site

rFPV : Poxvirus aviaire recombinant

rHVT : Vaccin recombinant contre le virus de l'herpès de la dinde

RLRs: RIG Like Receptors

rNDV : Vaccin recombinants contre le virus de la maladie de Newcastle

RNP : Ribonucléoprotéine

RpRd : Polymérase ARN-dépendante

RT-PCR : réaction de polymérisation en chaine après une transcriptase inverse

S : semaines

SIBE : Site d'Intérêt Biologique et écologique

SNP: single nucléotide polymorphisms

SPF: Pathogène Specific Free

SRAS : Virus du syndrome Respiratoire Aigu

TAE: Tris Acétate, EDTA

TLRs: Toll like Receptors

VIA : Virus à Influenza Aviaire

VIAFP : Virus de l'influenza Aviaire faiblement pathogène

VIAHP : Virus de l'influenza aviaire hautement pathogène

UHA : Unité Hémagglutinante

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	III
Résumé.....	IV
Abstract.....	V
Liste des productions scientifiques.....	VI
Communications orales	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XIII
Table des matières.....	XVI
INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	6
I. La maladie de l'Influenza aviaire.....	6
I.1. Aspects historiques	6
I.2.Taxonomie	7
I.3.Réglementation	8
I.4.Particularités anatomiques chez les oiseaux	9
I.4.1. Système respiratoire.....	9
I.4.2. Système immunitaire.....	10
Réponse immunitaire non spécifique	10
Réponse immunitaire spécifique	11
I.5.Structure virale et organisation génomique.....	11
I.5.1. Morphologie des particules virales.....	11
I.5.2. Organisation du génome	12
I.5.3.Protéines membranaires et matricielles	13
L'hémagglutinine (HA)	13
La neuraminidase (NA).....	14
Le canal ionique M2	15
La protéine de matrice M1	15
I.5.4.La nucléoprotéine NP.....	16
I.5.5.Les protéines non structurales	16
I.5.6.Les ribonucléoprotéines	16

I.6. Cycle de réplication virale	17
I.6.1.Attachement à la cellule hôte et endocytose	17
I.6.2.Libération des segments ribonucléiques	17
I.6.3.Migration des segments d'ARN vers le noyau	18
I.6.4.Transcription de l'ARN viral	18
I.6.5.Encapsidation et bourgeonnement	18
I.6.6.Libération des virions.....	18
I.7.Propriétés biologiques du virus	19
I.7.1.Variations antigéniques	19
Mutations ponctuelles	20
Réassortiment génétique.....	20
I.7.2.Facteurs de virulence	20
I.7.3.Propriétés physico-chimiques.....	21
I.8.Epidémiologie de l'influenza aviaire	21
I.8.1.Dynamique virale	22
Chez l'avifaune sauvage	22
Chez l'oiseau d'élevage	24
Chez les autres espèces animales	25
Données concernant l'espèce humaine	25
I.8.2.Variabilités saisonnières	27
I.8.3.Facteurs de propagation	27
I.8.4.Impact d'une épidémie de l'IA.....	27
I.8.5. Répartition géographique.....	28
I.8.5.1. Bilan mondial actuel	28
I.8.5.2. Situation au Maroc.....	28
I.9. Pathogénicité et physiopathologie	29
I.9.1. Incubation	29
I.9.2. Manifestations cliniques de l'IA.....	29
I.9.2.1. Symptomatologie chez la volaille domestique.	29
I.9.2.2. Tableau clinique chez l'avifaune sauvage	30
I.9.3. Anatomopathologie	30
I.9.4. Diagnostic différentiel.....	31
I.9.5. Diagnostic de laboratoire.....	31

I.9.5.1. Diagnostic direct	31
I.9.5.2. Diagnostic indirect	33
I.10. Prévention et lutte contre l'IA	35
I.10.1. Epidémiosurveillance de l'avifaune	35
I.10.2. Epidémiosurveillance des oiseaux d'ornement	35
I.10.3. Mesures de prévention dans les exploitations avicoles.	36
I.10.4. Prophylaxie médicale	37
II. Influenza aviaire faiblement pathogène sous type H9N2	40
II.1. Historique.....	40
II.2. Infection par les virus IAFP H9N2.....	40
II.2.1. Chez l'oiseau d'élevage.....	41
II.2.2. Chez l'oiseau sauvage	42
II.2.3. Chez l'Homme	42
II.3. Diagnostic.....	43
II.3.1. Tableau clinique de l'IAFP H9N2	43
II.3.1.1. Signes cliniques chez la volaille.....	43
II.4. Prophylaxie médicale	44
II.4.1. La vaccination.....	45
II.5. L'Influenza aviaire faiblement pathogène au Maroc.....	45
II.5.1. Facteurs de diffusion de l'influenza aviaire au sein des élevages marocains	47
II.5.1.1. Promiscuité des élevages et des basses-cours	47
II.5.1.2. Défauts des mesures sanitaires et hygiéniques (Biosécurité)	47
II.5.1.3. Les pratiques traditionnelles de commercialisation et d'abattage	48
II.5.2. Prophylaxie médicale.....	48
II.5.2.1. La vaccination	48
III. Aperçu sur les zones humides au Maroc	50
III.1. Biodiversité des zones humides.....	50
III.2. Enjeux associés à l'émergence de l'IA	51
III.3. Rôle de la faune sauvage dans la circulation de l'IA.....	53
III.4. Importance de la surveillance de l'avifaune sauvage.....	53
III.5. Sites d'études.....	53
III.5.1. Merja Zerga ou Lagune de Moulay Bouselham	53
III.5.2. La lagune de Sidi Moussa.....	55

III.5.3. La lagune de Oualidia.....	56
III.5.4. La lagune de Khnifiss.....	57
III.5.5. La lagune de Smir	58
III.5.6. Complexe des zones humides du Bas Loukkos.....	58
III.5.7. L'embouchure de la Moulouya	60
III.5.8. Les Oasis de Tafilalet.....	61
III.5.9. L'Archipel et Dunes d'Essaouira.....	62
III.5.10. La baie de Dakhla	63
III.5.11. Le lac Sidi Boughaba.....	64
III.5.12. Le lac Afenourir	65
III.5.13. Le lac Dayet Aoua.....	66
Chapitre II : Détection moléculaire du virus de l'Influenza aviaire chez les oiseaux sauvages au Maroc, 2016-2019.....	68
1. Introduction	68
2. Matériel et méthodes	70
2.1. Étude	70
2.2. Échantillonnage.....	77
2.2.1. Collecte d'échantillons.....	77
2.2.2. Préparation, traitement et conservation des échantillons.....	78
2.3. Extraction de l'ARN.....	80
2.4. RT-PCR en temps réel basée sur TaqMan	80
2.4.1. Principe de la méthode.....	81
2.4.2. Préparation du Mix	83
2.5. Isolement et identification virale sur œufs embryonnés SPF.....	87
2.5.1. Test rapide d'hémagglutination (HA) et titrage d'HA.....	88
2.6. Séquençage du génome complet.....	89
3. Résultats.....	89
3.1. RT-PCR en temps réel pour la détection des gènes M, H5, H7, H9, H1-H4, H6, H8 et H10-H16 :	89
3.1.1. Par nature d'échantillons.....	93
3.1.2. Par espèce d'oiseaux.....	94
3.1.3. Par famille d'oiseaux.....	95
3.1.4. Par ordre d'oiseaux.....	96

3.1.5. Par région	96
3.1.6. Par année	96
3.2. Isolement du virus et test d'hémagglutination rapide HA.....	97
3.3. Séquençage du génome complet.....	97
4. Discussion.....	98
5. Conclusion.....	103
Chapitre III. Dynamique spatio-temporelle, histoire évolutive, origines et potentiel zoonotique des virus de l'IAFP H9N2 au Maroc de la période 2016 à 2021.....	105
1. Introduction	105
2. Matériel et méthodes	106
2.1. Échantillonnage.....	106
2.2. Traitement des échantillons et extraction de l'ARN	107
2.3. Amplification par RT-PCR en temps réel	107
2.4. RT- PCR conventionnelle pour la détection du gène Neuraminidase N2	107
2.4.1. Analyse des produits de la PCR conventionnelle.....	108
2.5. Séquençage du génome complet (Next generation sequencing (NGS))	110
2.6. Analyse phylogénétique et évolution moléculaire	112
2.7. Analyse des pressions de sélection	113
3. Résultats.....	113
3.1. RT-PCR pour la détection de H9.....	113
3.2. Migration des produits de PCR sur gel d'agarose (Neuraminidase)	114
3.3. Caractérisation moléculaire du virus de l'influenza aviaire	115
3.3.1. Analyses phylogénétiques et évolutives.....	115
3.3.2. Analyse bayésienne :.....	128
3.3.3. Analyse moléculaire et sites sélectionnés positivement	129
4. Discussion.....	130
5. Conclusion.....	133
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	135
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	138
ANNEXE 1 : Détail de la préparation des réactifs et les étapes de l'extraction de l'ARN avec intérêt de chaque étape pour le kit Machery Nagel NucleoSpin RNA Virus	153
ANNEXE II : Protocole du laboratoire de référence de l'Influenza aviaire et de la maladie de New Castle pour la préparation des bibliothèques pour le séquençage sur la plateforme Illumina MiSeq	155

ANNEXE III: Productions scientifiques	166
---	-----

INTRODUCTION GENERALE

Les épidémies infectieuses ont longtemps accompagné l'histoire humaine et après avoir connu un bref répit grâce notamment à la progression de la vaccination et aux antibiotiques, nous assistons à l'émergence accélérée de nombreux foyers épidémiques qui sont souvent la conséquence d'une transmission zoonotique.

L'expansion géographique des activités humaines, avec pour corollaires la déforestation, l'urbanisation sauvage et la migration des populations, exerce une pression perturbant les écosystèmes. En réduisant l'habitat animal et en favorisant les rapprochements avec les nombreuses espèces animales, l'Homme accentue le risque d'exposition à de nouveaux réservoirs sachant que 75% des pathogènes émergents sont zoonotiques (Taylor et al. 2001). L'intensification des échanges commerciaux assure la propagation à l'échelle mondiale de nouvelles épidémies, faisant planer un risque de pandémie qui aurait un impact important sur tous les modèles sociétaux actuels avec des effets dévastateurs sur la santé publique et sur l'économie.

Ces pathogènes sont le plus souvent des virus qui sont hébergés par des espèces animales "hôtes" chez lesquelles ils présentent peu ou pas de symptômes. La promiscuité entre espèces initie leur adaptation aux tissus humains ce qui leur permet d'infecter l'organisme avant de se disséminer dans les populations, un cycle épidémique est alors enclenché. Cette propagation est facilitée pour les virus à ARN qui, grâce aux infidélités des ARN polymérases, présentent des taux de mutations et de recombinaisons très élevés pour un laps de temps de réplication très court. Ce mécanisme permet d'obtenir des variants qui s'adaptent à leur environnement et aux hôtes qu'ils infectent. Ils acquièrent la capacité de franchir la barrière d'espèce et de se propager alors efficacement dans une population. C'est notamment le cas pour le virus du syndrome respiratoire aigu (SRAS), le virus Ebola, le Covid-19 ou encore celui de l'influenza aviaire.

Encore appelée peste aviaire, l'influenza aviaire est une maladie virale qui a causé quatre pandémies majeures au cours du XX^{ème} siècle. Décrite depuis l'antiquité, elle a cependant été confondue avec d'autres maladies qui présentaient la même symptomatologie respiratoire. Si une première description a bien été documentée en Italie en 1878 (Perroncito 1878), ce n'est qu'en 1955 que des recherches ont montré l'existence d'antigènes communs avec les virus influenza

(Schäfer 1955).

Les virus de l'influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et au genre Influenza virus parmi lequel on distingue quatre types A, B, C et D. Les virus de la grippe aviaire présentent une grande diversité génétique mais sont tous du type A. Ils sont classés en sous-type en fonction de deux antigènes de surfaces l'hémagglutinine (18 sous-types) et la neuraminidase (Onze sous-types). Ces deux glycoprotéines déterminent l'affinité et la spécificité du virus vis-à-vis de l'hôte et en fonction de leur pathogénicité. Deux pathotypes sont distingués : -L'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) se caractérise par une manifestation sévère engendrant une mortalité extrêmement élevée dans les élevages infectés. Seuls les sous-types H5 et H7 sont réputés hautement pathogènes (IAHP) ; -L'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP), elle, se traduit par peu ou pas de symptômes cliniques.

L'avifaune sauvage et tout particulièrement les oiseaux aquatiques sont les hôtes naturels et les principaux réservoirs du virus de l'influenza aviaire. Plusieurs souches différentes peuvent circuler simultanément dans une même population d'oiseaux sauvages et ces infections sont le plus souvent asymptomatiques. Ils peuvent néanmoins, pendant les migrations, les propager vers des espèces domestiques particulièrement sensibles, tels que le poulet, la dinde et la caille.

La préservation des zones humides, qui sont autant d'escales sur les routes migratoires des oiseaux sauvages, est de ce fait cruciale pour éviter toute promiscuité avec les oiseaux de basse-cour. La convention relative aux zones humides d'importance internationale appelée convention de RAMSAR a pour but la conservation de ce patrimoine et se traduit par un engagement des états signataires pour la mise en œuvre d'une politique volontariste pour leur préservation. Ces lieux de transition entre milieu terrestre et milieu aquatique représentent des refuges pour le repos et l'alimentation des espèces migratrices. La dégradation de ces écosystèmes pourrait ainsi contraindre les oiseaux d'eau à s'installer dans l'environnement immédiat des volailles domestiques avec, pour conséquence directe, un risque accru d'introduction et de transmission du virus. La capacité élevée de mutation du virus de l'influenza aviaire permettrait éventuellement la conversion des souches faiblement pathogènes en souches hautement pathogènes (Horimoto et al. 1995). L'ampleur de la propagation de l'épizootie par l'avifaune et la diffusion aéroportée, qui touche une large aire géographique et tous les continents et présente un risque avéré de

contamination des mammifères y compris l'Homme, accroît l'inquiétude internationale (Neumann et al. 2010).

Pendant longtemps, cette maladie était considérée comme étant spécifique aux volailles et n'était donc pas répertoriée comme zoonose. Depuis, plusieurs cas suspects de transmission du virus à l'humain ont été recensés, qui résultent essentiellement d'un contact étroit entre l'Homme et les volailles infectées en provoquant des symptômes respiratoires dont l'issue est fatale. Une des préoccupations majeures est sa potentielle adaptation à l'Homme ce qui permettrait une transmission interhumaine avec, pour conséquence, une pandémie mondiale dévastatrice.

L'impact économique d'une épidémie d'influenza aviaire serait catastrophique. La découverte d'un foyer donne lieu à des mesures de biosécurité qui nécessitent l'abattage préventif des oiseaux infectés pour stopper la propagation virale ainsi que l'arrêt des exportations d'oiseaux vivants et des produits issus de volailles (viande, œufs, plumes). Par mesure de précaution pour la santé publique, la baisse de la consommation des produits avicoles, source de protéine d'origine animale de bonne qualité et bon marché, mais aussi moyen de subsistance de toute une frange de la société, aurait des répercussions sur l'économie sociale. Des secteurs comme le tourisme, le commerce, seraient paralysés si la situation nécessitait une mobilité humaine drastiquement réduite.

Le Maroc s'est confronté pour la première fois au virus de l'Influenza aviaire en Janvier 2016 suite à la déclaration de plusieurs foyers de la maladie dans les différents types d'élevages avicoles dans plusieurs régions du territoire marocain. Les investigations cliniques et de laboratoire ont confirmé que la souche virale circulante est le virus IAFP de sous-type H9N2 (EL houadfi et al., 2016). Suite à l'introduction du virus au Maroc, il s'est rapidement propagé dans le pays causant des pertes économiques importantes dans les différents secteurs de la production avicole, l'autorité compétente : l'Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA) a décidé d'autoriser l'utilisation des vaccins inactivés et de généraliser la vaccination à tous les types de production avicole. Cependant, malgré l'implémentation de stratégies de vaccination massive pour contrôler la maladie, les échecs de vaccination sont souvent observés sur le terrain. Par la suite, le virus est devenu endémique dans toutes les filières avicoles du pays. Par conséquent, la connaissance de l'histoire évolutive et de la circulation du virus H9N2 au Maroc est cruciale pour la santé publique et animale au pays. Une meilleure compréhension des origines épidémiologiques

et géographiques des virus H9N2 marocains pourrait aider à améliorer le contrôle et la gestion des futures épidémies.

La stratégie de lutte contre l'influenza aviaire passe par l'instauration de dispositifs de prévention et d'intervention. L'intérêt d'une veille sanitaire est de détecter précocement toute menace liée à l'émergence de l'influenza aviaire. Tout l'enjeu réside dans la détection rapide de foyers potentiels et l'adoption d'un plan d'urgence qui permet de ralentir la contagion et de contenir les flambées épidémiques. Cette vigilance se traduit par l'instauration d'une surveillance passive des élevages avicoles et une surveillance active régulière des oiseaux sauvages.

Cette thèse avait pour objectifs :

- D'investiguer la présence du virus de l'influenza aviaire chez les espèces d'oiseaux migrateurs qui fréquentent les zones humides et les sites ornithologiques marocains afin d'évaluer le risque de transmission du virus aux élevages avicoles. Les symptômes cliniques n'étant pas pathognomoniques, le recours aux techniques de laboratoire et notamment à la technique RT-PCR en temps réel s'est imposé pour détecter et différencier les virus influenza.
- Caractériser le génome complet des Virus IAFP H9N2 collectés dans des élevages avicoles marocains dans différentes régions au Maroc de 2016 à 2021 pour investiguer les origines épidémiologiques et géographiques, le potentiel zoonotique ainsi que l'impact de la vaccination sur l'évolution moléculaire des virus H9N2 marocains en explorant la dynamique spatio-temporelle et l'acquisition de mutations d'intérêt pour la santé humaine et animale.

Le présent manuscrit de thèse se présente sous forme de trois chapitres qui sont les suivants :

Le premier chapitre est réservé à une synthèse bibliographique qui se compose de trois parties. Dans la première partie, nous exposons les informations générales et les principales connaissances scientifiques sur le virus de l'Influenza aviaire. La deuxième partie a porté sur le virus IAFP H9N2 en particulier et sa situation dans le contexte marocain et la troisième partie présente l'importance des zones humides au Maroc et une description des zones qui ont servi de sites d'études dans notre travail.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude de la détection moléculaire par RT-PCR en temps réel du virus de l'Influenza aviaire chez les oiseaux sauvages collectés dans les zones humides marocaines sur une période allant de 2016 à 2019. Ces sites servent de zones d'hivernage et/ou d'escale pour les oiseaux migrateurs, ils se situent le long des voies de migration Est-Atlantique et continentale, qui relient l'Europe à l'Afrique du Sud en passant par les pays de la côte occidentale de l'Afrique notamment le Maroc. Ceci afin de tracer les sources possibles d'introduction des virus qui affectant les volailles domestiques et représentent un risque sérieux pour la santé publique.

Le troisième chapitre est dédié à l'étude de l'évolution spatio-temporelle, des origines épidémiologiques et géographiques et du potentiel zoonotique des virus de l'IAFP H9N2 au Maroc sur une période allant de 2016 à 2021. Il s'agit de la première étude complète qui donne un aperçu sur les origines historiques et les caractéristiques évolutives du VIA H9N2 marocain, basée sur l'analyse phylodynamique bayésienne et la caractérisation du génome complet. Ceci pour mieux contrôler et gérer les éventuelles futures épidémies.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui reprend les principaux résultats des chapitres précédents. Nous proposons, également des perspectives, que nous comptons développer dans nos travaux de recherches futures.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. La maladie de l'Influenza aviaire

I.1. Aspects historiques

L'influenza aviaire est une zoonose provoquée par un virus grippal du type A qui affecte les volailles domestiques, les oiseaux sauvages et les mammifères y compris l'homme. Il a été signalé pour la première fois en Italie en 1878 sans pour autant avoir été formellement identifié. Le concept qu'une entité infectieuse autre qu'une bactérie soit impliquée a été mis en évidence en 1892 par Ivanovski, et ce n'est qu'en 1898 que Beijerinck a entrouvert la porte du monde de la virologie en nommant "virus" les agents pathogènes ultrafiltrants (Lecoq 2001).

Les infections respiratoires de la volaille sont multifactorielles et une confusion entre grippe aviaire, maladie de Newcastle et choléra aviaire a longtemps perduré en raison de la difficulté à établir un diagnostic étiologique. Le virus de l'influenza aviaire n'a ainsi été isolé pour la première fois qu'en 1955, néanmoins, plusieurs épisodes zoonotiques ont été documentés. Durant le 20^{ème} siècle trois pandémies d'influenza ont été enregistrées : en 1918, 1957 et 1968. Leurs agents respectifs ont depuis été reconnus comme étant de trois différents sous-types du virus de l'influenza de type A : H1N1, H2N2 et H3N2 (Kilbourne 2006) .

Le virus de la grippe aviaire est responsable de mortalité et de morbidité importante dans les élevages de volailles. Des épizooties récentes touchant les volailles et les oiseaux sauvages sont signalées partout dans le monde. Ainsi, le H5N8 sévit dans plusieurs pays depuis le début de 2020 (Russie, Kazakhstan, Japon et en Europe de l'ouest). La souche H5N1 hautement pathogène a été signalée en 2021 au Sénégal (Lo et al. 2022), mais aussi dans plusieurs pays d'Europe tels que le Royaume-uni (Oliver et al. 2022) et les Pays-Bas (Valentina et al. 2022). Le Maroc a enregistré un premier foyer de H9N2 en 2016 qui s'est rapidement propagé dans les élevages avicoles. L'épidémie s'est traduite par des symptômes respiratoires sévères, une baisse importante de la production d'œufs (jusqu'à 80 %) et des taux de mortalité variant de 2 % à 15 % (El Houadfi et al. 2016).

Les recherches menées sur les souches du virus de l'influenza de type A qui, par ailleurs, ont une grande spécificité liée à l'espèce, montrent une variabilité antigénique importante résultant de

mutations ponctuelles par glissement, ou de réassortiments génétiques. Ces mécanismes à l'origine de l'émergence de nouveaux sous-types, et le potentiel qu'aurait le virus aviaire à se recombiner avec un virus grippal humain fait planer la menace d'une pandémie grippale chez l'homme (Webster 1998). Les cas d'infection humaine enregistrés lors des épisodes d'épizooties survenues en 1997 et en 2003 à Hong Kong et en Asie du sud-est (H5N1), en 2016 en Chine (H7N9) et en 2021 en Asie (H5N6) sont associés à des contacts directs ou indirects avec de la volaille contaminée, sans qu'une transmission interhumaine efficace ne soit pour le moment constatée.

I.2.Taxonomie

Les virus influenza appartiennent à la famille des *orthomyxoviridae* qui regroupe sept genres : Les influenza virus de type A, B, C et D, les Isavirus, les Quaranjavirus et les Thogovirus (ICTV. 2021). Les Influenza virus aviaires sont exclusivement de type A, ils ont été isolés chez les oiseaux sauvages et domestiques, les mammifères terrestres (Homme, Equidés...) et les mammifères marins (baleines, phoques).

Ils sont classés en sous-types en fonction de la nature des deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Les virus de la grippe aviaires regroupent 18 sous-types d'hémagglutinines (de H1 à H18) et 11 sous-types de neuraminidases (de N1 à N11) et la combinaison de ces deux protéines permet de définir la souche virale (Henry and Murphy 2018). Ainsi plus de 130 sous-types ont été identifiés, principalement chez les oiseaux sauvages.

La désignation des souches virales obéit à une nomenclature internationale qui décrit, uniquement pour les souches animales, d'abord le type viral, puis successivement l'hôte d'origine, le lieu d'isolement, le numéro de souche, les deux derniers chiffres de l'année d'isolement suivi par les caractéristiques antigéniques de l'HA et de la NA (Grog. 2004). Ainsi A/chicken/Morocco/01/2016 (H9N2) est un virus de type A, isolé de poulet de Chair au Maroc. Il a été référencé sous le numéro 01 en 2016 et il est de sous-type H9N2.

Des lignages phylogénétiques ou clades permettent de regrouper des séquences ayant des propriétés biologiques, immunologiques et pathologiques similaires et partageant un ancêtre commun. Selon l'évolution des mutations des séquences, un système international a défini une

division primaire en 10 clades (de 0 à 9) qui sont eux-mêmes subdivisés en ordres inférieurs. Ces sous- groupes génétiques sont notés 1,2,3 puis 1.1, 1.2, 1.3...etc,

I.3.Réglementation

L'organisation mondiale de la santé animale classe les différentes souches des virus de l'influenza aviaire par pathotype en fonction de leurs caractéristiques moléculaires et en se référant à la sévérité des manifestations cliniques et des taux de mortalité chez la volaille (OIE. 2021). Les catégories suivantes sont distinguées :

-L'influenza aviaire est dite hautement pathogène (IAHP) lorsque l'une des deux conditions suivantes est remplie :

- Virus H5 ou H7 causant chez huit poulets au minimum, sensibles et âgés de 4 à 8 semaines, plus de 75% de mortalité dans les 10 jours suivant l'inoculation intraveineuse d'un isolat du virus, ou si cette inoculation à 10 poulets du même âge a entraîné un indice de pathogénicité supérieur à 1,2.
- Virus H5 ou H7 ayant une séquence d'acides aminés au site de clivage de la protéine HA0 compatible avec une souche virulente.

-L'influenza aviaire faiblement pathogène mais qui est soumis à une déclaration (IAFPD) lorsqu'il s'agit d'un H5 ou H7 sans remplir les 2 conditions citées ci-haut.

- L'Influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) lorsque les souches H5 et H7 ne sont pas impliquées et qu'il est confirmé non virulent chez le poulet.

L'Influenza aviaire hautement pathogène, ou peste aviaire, est listée comme une maladie contagieuse soumise à une déclaration obligatoire, tel que stipulé par le dahir portant loi n°1-75-292 du 19 septembre 1977. Conformément à l'arrêté du ministre de l'agriculture, de la pêche maritime, du développement rural et des eaux et forêts n° 2466-17 du 26 septembre 2017, elle correspond à :

- Toute infection des volailles ou des oiseaux captifs causée par tout virus « Influenza » d'origine avicole ayant un indice de pathogénicité intraveineux supérieur à 1,2 chez le poulet âgé de 6 semaines ;
- Toute infection des volailles ou des oiseaux captifs causée par des virus grippaux de type A et de sous-type H5 ou H7 avec des séquences génomiques, codant pour de multiples acides aminés basiques sur le site de clivage de la molécule hémagglutinine similaires à celles observées pour d'autres virus IAHP.

I.4.Particularités anatomiques chez les oiseaux

Les oiseaux sont particulièrement sensibles aux agents pathogènes à cause des spécificités anatomiques de leur appareil respiratoire destinées à répondre à leur métabolisme élevé, mais aussi de leur système immunitaire qui se distingue par une présence faible des phagocytes dans leurs muqueuses respiratoires. De nombreux agents pathogènes sont impliqués dans les infections respiratoires de la volaille, aggravés par de multiples facteurs environnementaux. Les infections respiratoires causent ainsi d'importants dégâts dans les élevages en dépit des vaccinations et de l'antibiothérapie.

I.4.1. Système respiratoire.

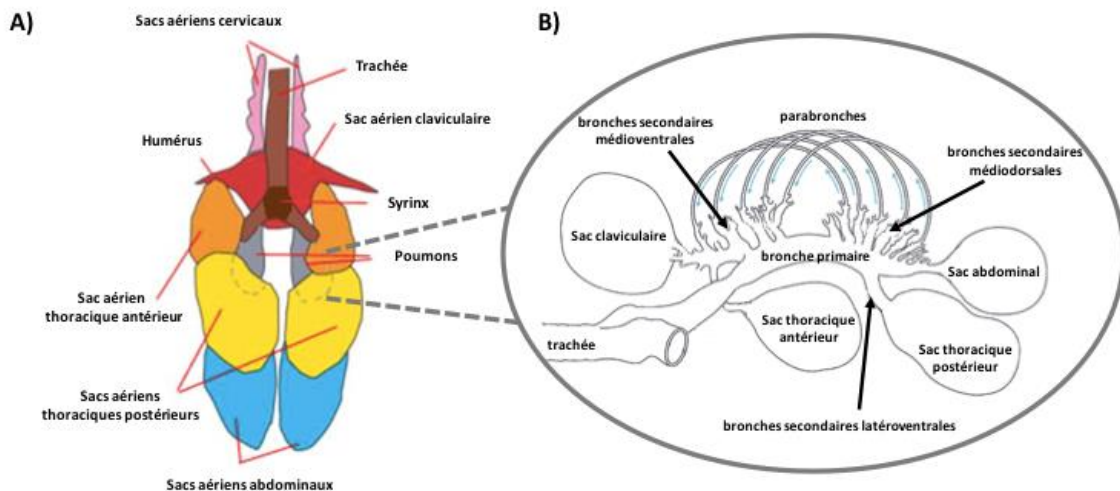


Figure 1: Organisation de l'appareil respiratoire des oiseaux
(<http://people.eku.edu/ritchisong/birdrespiration.html>).

Structuré pour assurer un apport constant d'oxygène dans le sang, l'appareil respiratoire des oiseaux est formé d'un arbre respiratoire supérieur et d'un appareil profond. Ce dernier comprend des sacs aériens et des bronches fixes. Les sacs aériens antérieurs et postérieurs jouent un rôle de soufflet par l'action du sternum et des muscles de la cage thoracique. Ils permettent de faire circuler l'air en un flux continu et unidirectionnel sans pour autant participer aux échanges gazeux, les poumons ayant la particularité d'être rigides et fixés à la paroi thoracique. Les sacs aériens étant très mal vascularisés, l'organisme se défend mal contre les infections qui transitent facilement dans l'organisme du fait du contact étroit entre l'appareil respiratoire et l'ensemble des viscères. Le système tubulaire des parabronches permet les échanges gazeux au travers d'une barrière de diffusion qui se distingue par une grande surface et une faible épaisseur ce qui les fragilise face à des agents pathogènes. Le mucus produit par l'épithélium cylindrique cilié pseudo-stratifié qui tapisse les voies respiratoires représente la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Il piège les différentes particules qui sont alors évacuées via la toux et les éternuements, ou alors avalées et digérées.

I.4.2. Système immunitaire.

Le système lymphoïde des oiseaux se distingue par l'absence de nœuds lymphatiques individualisés chez la plupart des oiseaux et la présence de la bourse de Fabricius (comparable à la moelle osseuse chez les mammifères), avec le thymus, qui permet la maturation des cellules impliquées dans les mécanismes d'immunité cellulaire et humorale.

Réponse immunitaire non spécifique

La première défense de l'organisme face à une agression externe consiste à capturer l'agent pathogène par le mucus produit par les glandes de l'épithélium cylindrique cilié pseudo-stratifié par les protéines solubles présentes dans le mucus. Les récepteurs cellulaires (Interféron de type I) et cellules dendritiques détectent l'infection et déploient des cellules NK (Natural Killer cells lymphocytes), des macrophages et des neutrophiles pour bloquer leur dissémination et orienter la réponse spécifique (White and Pagano 2008).

Réponse immunitaire spécifique

Elle permet la mise en place de la mémoire immunologique qui permet de reconnaître et de lutter rapidement contre une souche déjà rencontrée. La reconnaissance des signatures moléculaires conservés des pathogènes ou PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) par des récepteurs cellulaires spécifiques appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors), induit une réponse se traduisant par la production de cytokines (interférons, chimiokines et cytokine pro-inflammatoires). Ces PRRs incluent la famille des TLRs (Toll-Like Receptors), les RLRs (RIG-Like Receptors) et les NLRs (Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors) (Kumagai et al. 2008). Les RLRs et NLRs étant des PRRs cytoplasmiques. Ainsi les acides ribonucléiques viraux sont reconnus par les TLR3 et TLR7.

Dans le cas de l'influenza virus, dont la capacité de mutation est grande avec l'apparition fréquente de nouvelles souches, la réponse spécifique est tardive. Les TLRs reconnaissent les PAMP et une réponse inflammatoire ciblée est alors activée.

I.5. Structure virale et organisation génomique

I.5.1. Morphologie des particules virales

Les Influenza virus sont des virus enveloppés, à ARN monocaténaire de polarité négative. Ils sont pléomorphes et se présentent souvent, en microscopie électronique, sous une forme sphérique ou filamenteuse dont la taille varie de 80 à 120 nm de diamètre. Le génome est d'une taille de 10 à 15 kilobases divisé en huit segments antigéniques différents codant pour les protéines virales. Les trois protéines retrouvées à la surface de l'enveloppe virale sont l'hémagglutinine, la neuraminidase et la protéine transmembranaire (M2). Les deux premières constituent les principaux déterminants antigéniques, elles sont présentes sur l'enveloppe virale dans une proportion de quatre HA pour une NA (Palese 2007). Les glycoprotéines (HA) et (NA) forment des spicules insérés dans la membrane externe, composée d'une double couche lipidique qui dérive de la membrane plasmique de la cellule hôte infectée. Cette enveloppe virale entoure une capside protéique tubulaire de 9 nm de diamètre qui entoure le génome. La protéine de matrice M1 forme la couche interne de l'enveloppe virale, alors que le cœur de la particule virale est constitué par

des segments d'ARN associés à la nucléocapside (NP), les sous-unités de la polymérase (PA, PB1 et PB2) ainsi que les protéines non structurales NS1 et NS2 (ou NEP : nuclear export protein).

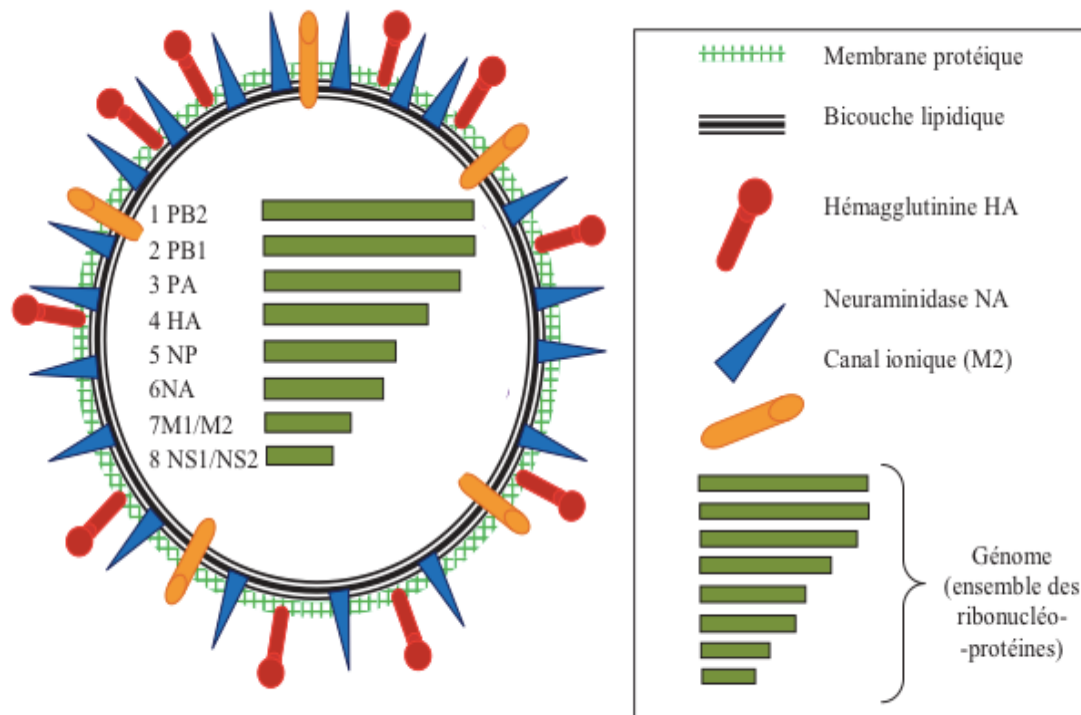


Figure 2: Structure de l'influenza virus de type A, d'après (Ardans 1999)

I.5.2. Organisation du génome

Le génome de l'influenza virus A se compose de huit fragments d'ARN monocaténaire à polarité négative, qui nécessite donc une transcription à la phase initiale de la réplication. Il est à symétrie hélicoïdale et se compose de 13 600 nucléotides au total.

Ces ARN comportent une région codante délimitée de part et d'autre de régions non codantes, dont les nucléotides sont conservés pour tous les segments de gène de l'ensemble des souches du virus de l'influenza A. Les segments génomiques codent pour 10 protéines majeures et plusieurs protéines auxiliaires (Fodor and Te Velthuis 2020).

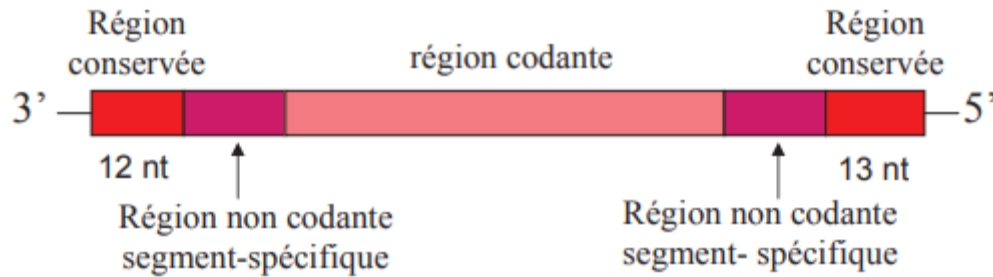


Figure 3: Schéma de l'organisation d'un gène du virus Influenza

I.5.3. Protéines membranaires et matricielles

L'hémagglutinine (HA)

Cette protéine tire son nom de sa capacité à agréger les érythrocytes et détermine le spectre d'hôte de l'influenza virus A. Elle constitue la cible majeure de la réponse immunitaire de l'organisme hôte (Forrest Heather et al. 2010). Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif HA0 et s'assemble sous forme d'homotrimères dont chaque monomère est composé de deux sous-unités réunies par un pont disulfure. Pour être fonctionnel et pouvoir infecter une cellule, ce précurseur est clivé par des protéases extracellulaires au niveau d'un peptide dit site de clivage en un dimère HA1 qui représente sa partie globulaire et porte les principaux déterminants antigéniques. Elle comporte le site de fixation (Receptor binding site, RBS) qui est impliquée dans l'attachement du virus aux récepteurs membranaires spécifique de la cellule hôte constitué d'acide sialique (Cheung and Poon 2007). HA2 est formée par la partie allongée de la protéine et présente un segment transmembranaire hydrophobe et une queue intracellulaire. Le domaine transmembranaire est responsable de l'ancrage de HA dans l'enveloppe virale. Il supporte le peptide de fusion dont le clivage est activé lors d'une modification de la conformation à pH acide et qui induit la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte, facilitant alors la libération du génome du virus (Whittaker 2001). Le site de clivage de l'hémagglutinine sera différent selon la pathogénicité de la souche virale. Pour les souches faiblement pathogène, l'arginine, cible des protéases type trypsine, sera présente au niveau du site de clivage de HA0 essentiellement au niveau des tissus respiratoires chez l'Homme et respiratoires et/ou digestifs chez l'oiseau. En revanche, les souches hautement pathogènes présentent un site de clivage allongé et enrichi en acides aminés basiques

avec une organisation qui permet son accessibilité à une large gamme de protéases présentes dans la plupart des cellules.

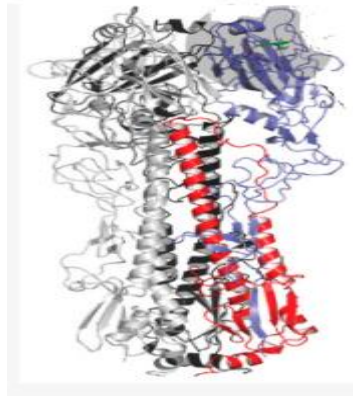


Figure 4: Structure du trimère de l'HA (Byrd-Leotis et al. 2017)

La neuraminidase (NA)

La protéine (NA) est également un déterminant antigénique qui se présente sous forme d'un homotétramère constitué d'une tige et d'une tête globulaire avec une composante transmembranaire qui l'ancrage dans la bicouche lipidique. C'est une glycoprotéine enzymatique qui a pour rôle de rompre les liaisons osidiques entre les molécules d'HA et celles des acides sialiques des membranes plasmiques de la cellule infectée par sa fonction enzymatique de sialidase. Elle est indispensable pour la libération des virions néoformés, qui possèdent à leur surface des acides sialiques issus de la membrane de la cellule hôte et permet d'éviter l'agglutination des virus libérés entre eux. Elle est également responsable de détacher et de faciliter le passage des molécules de HA piégés par le mucus bronchique très riche en acide sialique et dont le rôle est de protéger la muqueuse respiratoire de l'environnement extérieur (Landolt and Olsen 2007). La neurovirulence du virus de l'influenza aviaire peut être déterminée par la glycosylation de la neuraminidase.

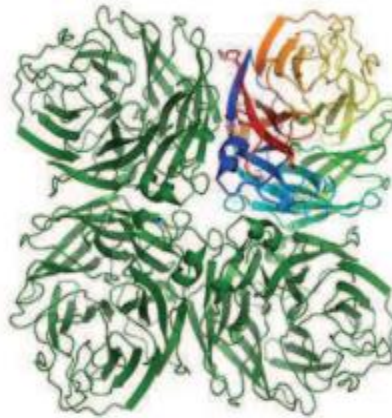


Figure 5 : Structure cristallographique du tétramère de la neuraminidase (Byrd-Leotis et al. 2017).

Le canal ionique M2

Cette protéine de matrice tétramérique non-glycosylée traverse à la fois la membrane et la couche de protéine M1. Peu abondante, elle forme un canal transmembranaire appelé canal à protons qui s'active à pH acide et permet le transport d'ions hydrogène à travers l'enveloppe virale et assure le transit du génome viral dans la cellule hôte. Elle est codée par le septième segment de l'ARN viral et se présente sous forme d'hélices α stabilisées par des ponts disulfures. Elle assure aussi les échanges entre le virion et le milieu extérieur ce qui permet la maturation biochimique des particules virales (Henkel and Weisz 1998; Wang et al. 2011).

La protéine de matrice M1

Codée également par le septième segment de l'ARN viral, c'est la protéine la plus abondante du virion. Elle forme une couche protéique matricielle qui tapisse la face interne de la membrane virale et assure la rigidité du virion (Hilsch et al. 2014). Elle assure l'interface entre les ribonucléoprotéines et l'enveloppe et joue un rôle essentiel dans différentes étapes du cycle viral, notamment lors de l'assemblage et le bourgeonnement en fin de cycle des virions nouvellement formés dans le milieu extracellulaire (Sha and Luo 1997).

I.5.4.La nucléoprotéine NP

C'est la protéine structurale majeure de l'influenza virus codée par le segment cinq du génome viral. Elle est riche en résidus arginines, glycines et sérines et spécifie le tropisme du virus par son interaction avec les différentes protéines de l'hôte (Lin et al. 2011). Elle assure l'encapsidation des ARN viraux sous forme de vRNP et joue un rôle essentiel dans la réplication et la transcription de l'ARN génomique viral (Turrell et al. 2013).

I.5.5.Les protéines non structurales

La protéine NS2 (également connue sous la dénomination de NEP pour protéine de transport nucléaire) est responsable du transport des ribonucléoprotéines, nouvellement synthétisées, du noyau vers le cytoplasme. En interagissant avec une ATPase, cette protéine régule l'accumulation d'ARNv génomique viral, d'ARNc antigénomique ainsi que d'ARNm viral synthétisé par l'ARN polymérase dépendante de l'ARN viral (Paterson and Fodor 2012).

La protéine non structurale NS1 est un facteur de virulence du virus Influenza. C'est une protéine multifonctionnelle produite dans la cellule infectée et qui permettrait de soustraire le virus à l'action antivirale de l'interféron (Kochs et al. 2007).

I.5.6.Les ribonucléoprotéines

La protéine basique 1 (PB1), la protéine basique 2 (PB2) et la protéine acide (PA) s'associent et forment un complexe polymérase ARN-dépendante (RpRd) qui fonctionne lorsque les segments d'ARN polymérase s'associent à de nombreuses copies de nucléoprotéines virales formant un complexe ribonucléoprotéique virale (vRNP) qui assure des fonctions capitales pour la transcription et la réplication des segments des ARN viraux dans le noyau des cellules infectées. Ainsi PA assure l'activité d'endonucléase et de protéase et PB1 porte l'activité polymérase et une activité d'endonucléase qui lui permet de procéder au clivage des coiffes 5' des ARNm cellulaires (Li et al. 2001). La protéine PB2 reconnaît les coiffes 5' des ARNm cellulaires avec lesquelles elle assure la liaison et qui sont utilisés comme amorce lors de la transcription de l'ARN viral (Carragher et al. 2008).

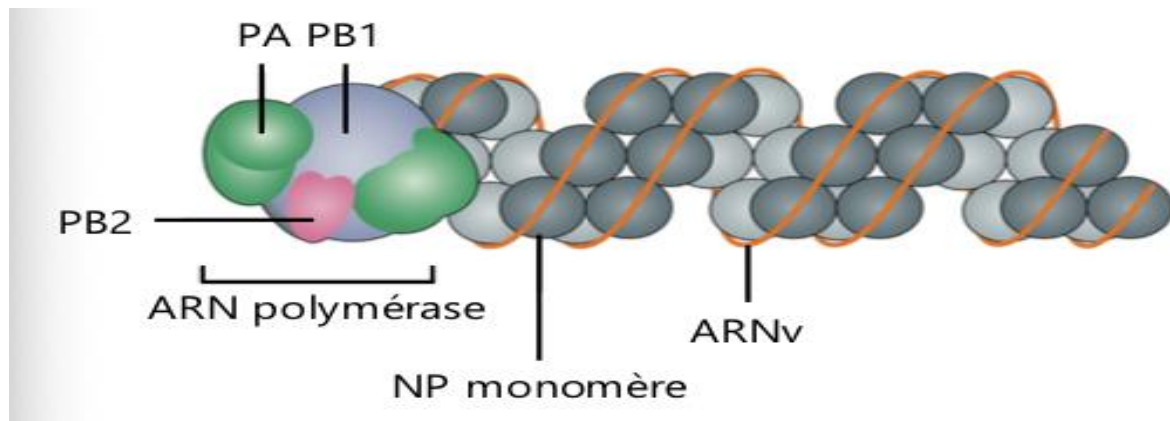


Figure 6: Structure du complexe ribonucléoprotéique.

Les gènes sont situés sur des segments différents et indépendants les uns des autres ce qui leur confère une grande variabilité, favorise les réassortiments génétiques et l'encapsidation sélective des vRNP dans les virions (Dadonaite et al. 2019).

I.6. Cycle de réplication virale

I.6.1. Attachement à la cellule hôte et endocytose

L'hémagglutinine virale reconnaît le récepteur exprimé à la surface de la cellule cible et qui correspond à l'acide sialique (acide N-acétylneuraminique ou acide N-glycolylneuraminique) auquel elle s'attache par sa partie globulaire HA1 en conformation $\alpha 2-6$ pour les virus humains et $\alpha 2-3$ pour les virus aviaires (de Graaf and Fouchier 2014). Les muqueuses respiratoires et gastro-intestinales des oiseaux sont très riches en récepteurs $\alpha 2-3$. Cependant la présence des protéases spécifiques permettant de cliver les HA virale, présentes essentiellement dans les tissus respiratoires, est un facteur déterminant pour la pathogénicité du virus (Perdue et al. 1997). Le virus est alors internalisé dans la cellule par endocytose.

I.6.2. Libération des segments ribonucléiques

Une baisse de pH à une valeur de 5 permet un changement de conformation de l'hémagglutinine. Grâce à la partie HA2, les membranes de l'endosome et celle de la particule virale fusionnent ce qui permet la libération des huit segments ribonucléoprotéiques dans le cytosol.

I.6.3.Migration des segments d'ARN vers le noyau

La protéine NP qui recouvre les ARN viraux permet leur migration et leur passage par les pores nucléaires de la cellule hôte vers le noyau où se déroule le cycle de réplication viral, contrairement à la majorité des virus à ARN qui, eux, se répliquent dans le cytoplasme (Walker and Fodor 2019).

I.6.4.Transcription de l'ARN viral

Le génome viral code pour la synthèse de 10 protéines destinées aux trois compartiments majeurs : l'enveloppe virale qui contient l'hémagglutinine, la neuraminidase et le canal ionique, la protéine matricielle M1 et la ribonucléocapside constituée de l'association entre la nucléoprotéine avec l'ARN génomique et le complexe polymérase (RNP).

Dans le noyau de la cellule hôte, les ARN viraux à polarité négative sont, d'une part, transcrits en ARN à polarité positive et, d'autre part, répliqués pour former de nouveaux segments génomiques viraux. Des ARN messagers formés par des complexes des protéines PB1 et PB2 et par la molécule acide PA, complétés d'une queue polyA, sont exportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines virales (Biquand and Demeret 2016).

Alors que les protéines virales NP, NS2, M1, PA et PB2 sont réintroduits dans le noyau, les protéines HA, NA et M2 de l'enveloppe sont conduits vers la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Pflug et al. 2017).

I.6.5.Encapsidation et bourgeonnement

Les protéines HA et NA s'insèrent dans la membrane de la cellule hôte et les protéines M1 et M2 vont former la matrice sur la face interne de la membrane cytoplasmique. Les protéines virales et les nucléocapsides viennent s'assembler au niveau de cette matrice. Le processus de bourgeonnement des nouveaux virions peut alors s'effectuer.

I.6.6.Libération des virions

La neuraminidase clive l'hémagglutinine par hydrolyse de la liaison acide sialique-galactose et permet le détachement des nouveaux virions. Ces particules virales vont alors infecter d'autres cellules de l'épithélium respiratoire.

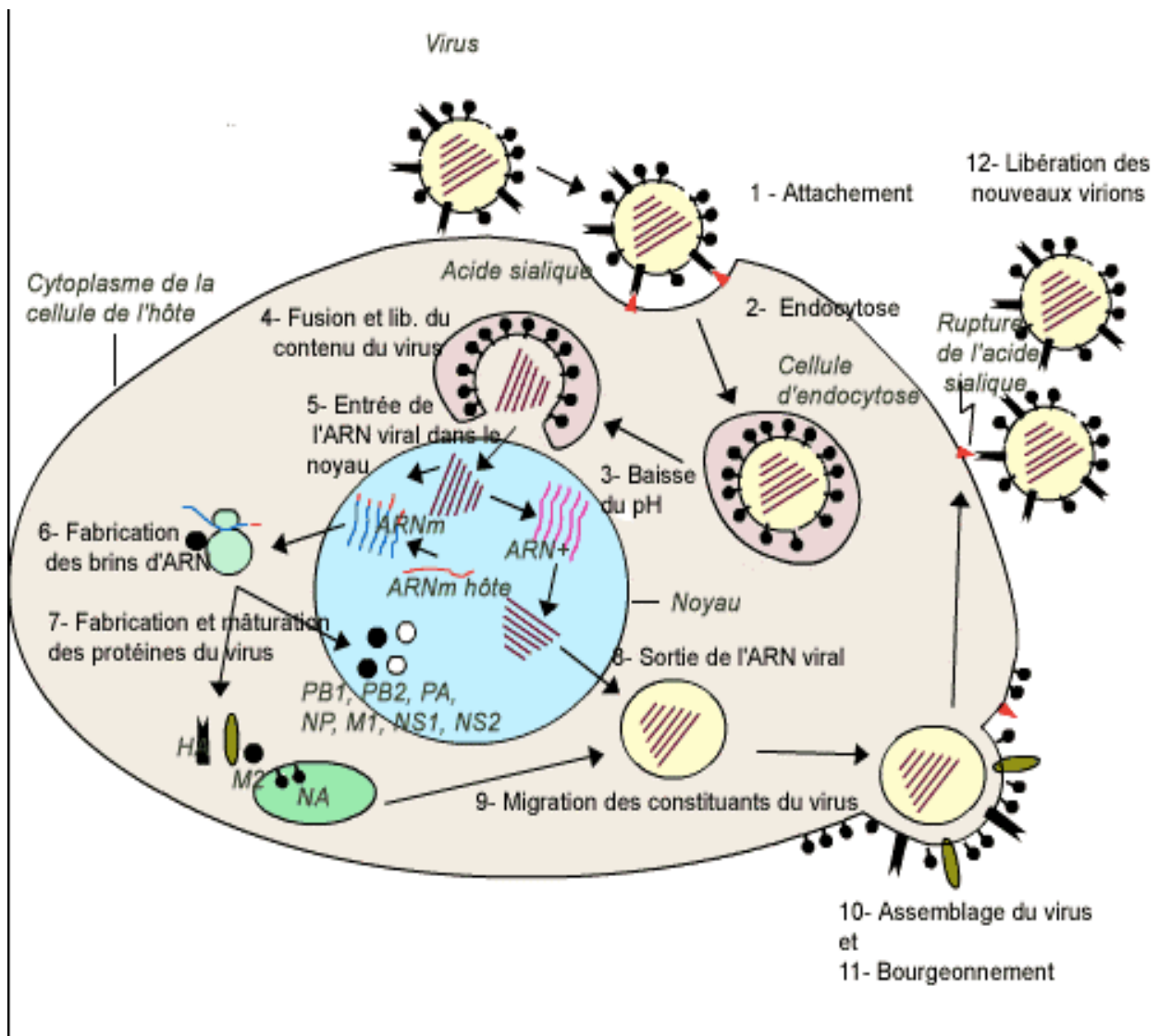


Figure 7: Illustration du cycle de réplication du virus influenza (Buisson et al. 2007).

I.7. Propriétés biologiques du virus

I.7.1. Variations antigéniques

Les virus de l'influenza aviaire sont génétiquement instables ce qui les dérobe à la vigilance du système immunitaire et induit des épidémies annuelles récurrentes, voire des pandémies. L'émergence de nouvelles souches est rendue possible par deux mécanismes : les mutations ponctuelles et les réassortiments génétiques.

Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles sont très fréquentes chez les virus à ARN du fait de la faible fidélité de l'activité de correction de la polymérase virale au moment de la synthèse des ARN. Ces erreurs de réplication ponctuelles des bases nucléotidiques des gènes viraux entraînent des modifications des protéines codées fréquentes mais mineures (1 pour 10^5 par cycle réplcatif) (Webster and Hulse 2004). Elles leur permettent d'échapper au système immunitaire de l'hôte par des mutations dans les gènes de l'hémagglutinine essentiellement et, secondairement, celles de la neuraminidase. Ces mutations favorisent l'évolution rapide du virus, qui reste toutefois très proche de son prédécesseur, et sont à l'origine des « glissements antigéniques » (ou dérive antigénique), rendant inefficace l'immunité acquise et expliquant les réinfections potentielles (Saegerman et al. 2004). Les anticorps de l'hôte conditionnent l'intensité de ces dérives et une évolution rapide du virus est observée lorsque l'immunité de la population est importante (Maciej 2008).

Réassortiment génétique

Le réassortiment génétique consiste en un échange de segments d'ARN lors d'une infection simultanée par des virus influenza de génotypes différents. Lors de la réplication, des segments génomiques provenant de ces différents virus sont incorporés de manière aléatoire, avec des échanges de gènes conduisant à la formation d'un nouveau variant totalement différents de celui qui circulait jusqu'alors. Cette cassure antigénique pourrait favoriser le franchissement de la barrière d'espèce et donc déclencher des pandémies. Ces événements de réassortiments génomiques sont plus fréquents chez certaines espèces, le porc en particulier, qui participe à l'émergence de nouveaux sous-type car pouvant héberger à la fois des virus humains et aviaires (Zhou et al. 2011).

I.7.2.Facteurs de virulence

Les influenza virus sont classés en hautement ou faiblement pathogène sur la base de la sévérité des symptômes cliniques induits chez le poulet. La sévérité de la pathologie chez l'homme ne peut être présagée sur cette base. La capacité de ces virus à infecter certains types de cellules dépend de déterminants essentiels et en premier lieu du clivage de l'hémagglutinine en deux sous-unités HA1 et HA2. Or les virus faiblement pathogènes contiennent un seul acide aminé au site de clivage, l'arginine, et les protéases assurant ce clivage sont secrétées par des types de cellules

définies et restreintes. Dans le cas des IAFP, elle est clivée par des enzymes de types trypsine qui sont présentes dans les voies respiratoires et le tractus intestinal. Les souches hautement pathogènes, H5 et H7, présentent quant à elles de multiples acides aminés au site de clivage et celui-ci est assuré par des protéases ubiquitaires de type furine ce qui permet à ces virus de se disséminer dans l'organisme infecté (Rott 1992; Kido et al. 1992).

Le pouvoir pathogène du virus de l'influenza A est lié également aux protéines du complexe polymérase. Ainsi la position des acides aminés de la protéine PB2 est également l'un des déterminants de la virulence de la souche impliquée (Shinya et al. 2004).

Les protéines virales NS1 et PB1-F2 ont été identifiées comme des éléments permettant au virus de se soustraire à la réponse antivirale de l'hôte et notamment l'interféron.

I.7.3. Propriétés physico-chimiques

Les influenza virus de type A sont des virus sensibles à la chaleur (30 minutes à 60°C), aux pH extrêmes, aux solvants lipidiques (hypochlorites, ethanol, aldehydes), aux détergents non ioniques et aux désinfectants usuels. Ils sont également sensibles aux rayonnements et à la dessiccation.

Par temps sec et froid, ces virus survivent longtemps dans le milieu extérieur. Leur pouvoir infectieux est maintenu sous certaines conditions de température et d'humidité. L'activité de l'hémagglutinine et de la neuraminidase est maintenue pendant plusieurs semaines à 4°C et ils sont capables de survivre 4 jours à 22°C et plus de 30 jours à des températures aussi basses que 0°C et plus de quarante jours en présence de matière organique tels que les fientes ou les litières humides (Webster et al. 1978).

I.8. Epidémiologie de l'influenza aviaire

L'influenza virus infecte aussi bien les oiseaux sauvages et domestiques, les volailles ainsi que les mammifères. L'infection des humains reste à ce stade assez rare.

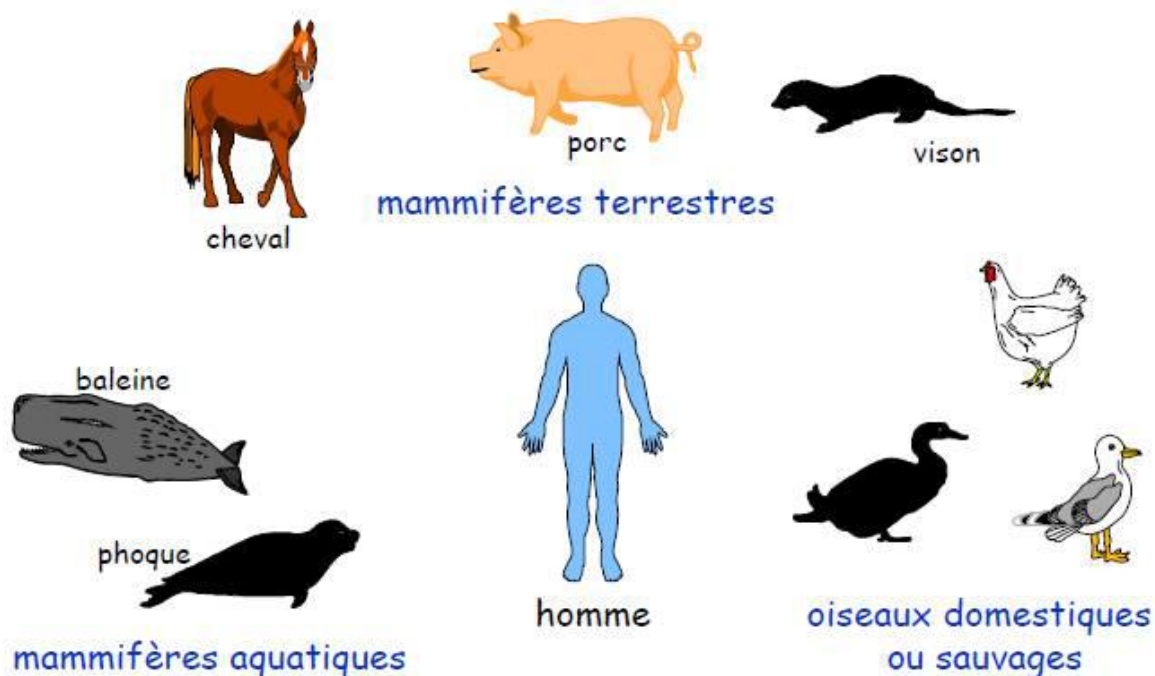


Figure 8: Espèces sensibles au virus de l'IA (Frymus et al. 2021).

L'avifaune sauvage occupe un rôle essentiel dans la propagation du virus de l'influenza aviaire. Le risque de disséminer une souche IA sur une grande échelle géographique lors des mouvements migratoires est d'autant plus renforcée que certaines de ces espèces (l'exemple des canards colverts) ont un taux de renouvellement élevé d'un tiers chaque année impliquant des individus immunologiquement naïfs.

I.8.1.Dynamique virale

Chez l'avifaune sauvage

Les oiseaux sauvages migrateurs, notamment les espèces aquatiques et plus particulièrement celles appartenant à l'ordre des Ansériformes (canards, oies et cygnes) et des Charadriiformes (mouettes,...) représentent le réservoir naturel des influenza virus (Yoon et al. 2014). Les souches faiblement pathogènes, à quelques rares exceptions près, seraient les seules qui circulent chez ces populations et, après introduction et adaptations chez la volaille domestique, mutent et se transforment souches hautement pathogènes (Gaidet and Caron 2016). Les anatidés ont un taux d'infection par les virus influenza plus élevé comparativement aux autres espèces. Ce taux est

corrélé positivement à la densité de cette population ce qui suggère une prédominance de la transmission directe dans une même niche écologique. Elle résulterait notamment de l'ingestion des eaux (étangs, lacs...) souillées par les matières fécales qui concentrent jusqu'à 10^7 de particules virales infectieuses par gramme (Alexander 1995). Selon la souche incriminée et l'espèce d'oiseau, la virulence de la souche de l'IA peut être inoffensive ou létale. Quand il est asymptomatique ou faiblement morbide, le virus est propagé sur de larges étendues.

Périodiquement, les oiseaux empruntent des couloirs de migrations pour rejoindre des sites de reproductions ou pour hiverner. En outre, les pays du Moyen Orient et du Nord Afrique sont situés le long de plusieurs voies de migration d'oiseaux sauvages. Les quatre voies de migration principales sont celles de l'Asie centrale, de l'Afrique de l'Est et de l'Asie de l'Ouest, de la mer Noire et de la Méditerranée et de l'Atlantique de l'Est, qui se croisent avec d'autres voies (par exemple la voie de migration Asie de l'Est-Australie) (Figure 9). Ainsi, des millions d'espèces d'oiseaux différentes survolent ces pays. Les escales des oiseaux migrants sont situées dans des zones humides au Maroc, en Égypte, en Jordanie / Israël, en Arabie saoudite, à Oman, aux Émirats arabes unis, en Irak et en Iran. De plus, les oiseaux sauvages comme les pigeons, les colombes, les ibis, les moineaux et les corbeaux sont fréquents et répandus dans ces pays, qui peuvent entrer en contact avec des oiseaux sauvages migrants et domestiques (Nagy et al. 2017).

Les zones humides représentent des passages obligés pour ces espèces migratrices et une connaissance approfondie de la dynamique de ces populations permettra de renforcer la surveillance pendant les périodes de haut risque afin de mettre en œuvre les mesures de biosécurité, avec suffisamment d'anticipation pour prévenir toute propagation de la maladie.

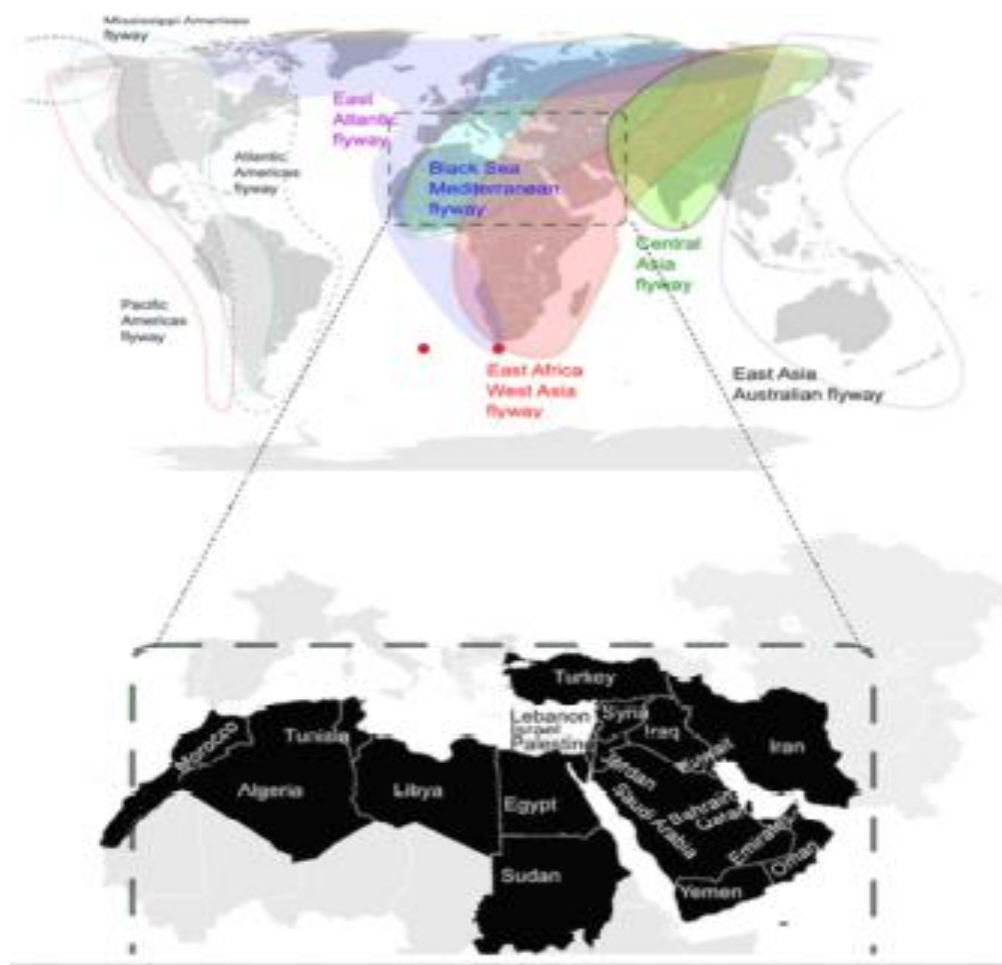


Figure 9: Voies de migration des oiseaux sauvages au Moyen-Orient et en Afrique du Nord.
(Nagy et al. 2017)

Chez l'oiseau d'élevage

La transmission des virus influenza dans les élevages se fait par contact direct avec des espèces d'oiseaux-relais qui assurent la liaison entre les espèces sauvages et la volaille domestique (Caron et al. 2015). La contamination entre les oiseaux s'effectue par aérosols ou, voie prépondérante, par des vecteurs contaminés par les fientes (aliments, bottes, eau d'abreuvement, matériel d'élevage...), par le fumier de volailles utilisé comme fertilisant ou par la voie aérienne. C'est d'autant plus vrai dans les élevages de volailles en plein air ainsi que dans les marchés aux volailles, favorisés par les activités humaines. Toutefois, la contamination des oiseaux

domestiques semble réduite et résulterait probablement de promiscuité avec des espèces d'oiseaux qui fréquentent autant les zones humides que la proximité des habitats humains et donc les élevages avicoles.

Chez les autres espèces animales

Plusieurs espèces de mammifères peuvent être infectées par le virus de l'influenza aviaire tels que des félins (tigre, léopard...), des chevaux, des mammifères marins (baleines et phoques), le porc ainsi que l'homme.

L'espèce porcine revêt une importance particulière car les réassortiments génétiques sont fréquents chez cette espèce et les souches circulantes chez le porc sont à potentiel zoonotique. Sa promiscuité avec l'homme expose fortement ce dernier aux nouveaux variants (Hervé et al. 2021).

Données concernant l'espèce humaine

Indépendamment de leur pathogénicité chez les volailles, certains de ces virus induisent des infections sévères, voire des mortalités chez l'homme. Chez celui-ci, le virus se transmet par voie aérienne par les microgouttelettes libérées par la toux et les éternuements des individus infectés. Il pénètre via le rhino-pharynx de l'organisme hôte et se réplique dans les cellules cylindriques ciliées de l'arbre respiratoire. Les premiers symptômes sont visibles 1 à 4 jours après la contamination (Freymuth et al. 2007).

Chez l'homme, la grippe est une maladie consécutive à une infection par des influenza virus du genre A, B ou C. Les infections à virus de grippe A sont généralement plus sévères cliniquement que celles à virus B, elles-mêmes plus sévères que celles dues aux virus C. Deux sous- types de virus de type A sont inféodés à l'homme et circulent actuellement chez cette espèce : A (H1N1) et A (H3N2) (Mosnier et al. 2018). Elle touche la population annuellement avec les épidémies saisonnières et peut aussi être occasionnellement responsable de pandémies.

**Tableau I : Synthèse des cas d'infections humaine par les virus de l'influenza aviaire au 24/11/2021.
(D'après l'avis du haut conseil de la santé publique en date du 10 décembre 2021).**

Virus Influenza aviaire	Année de première détection	Année de dernière détection	Nombre de cas confirmés	Nombre de décès confirmés	Transmission interhumaine décrite	Pays ayant déclarés des cas humains
A(H7N9) FP	2013	2017	1535	616	Oui	Chine, Canada*, Malaisie*, Taiwan*
HP	2017	2017	33			Chine, Taiwan*
A(H5N1) HP						
Lignée Gs/Gd/1/96	1997	2021	863	456	Oui	Azerbaïdjan, Bangladesh, Cambodge, Canada*, Chine, Djibouti, Egypte, Inde, Indonésie, Irak, Laos, Myanmar, Népal, Nigéria, Pakistan, Thaïlande, Turquie, Vietnam
A(H9N2) FP	1998	2021	94	2	Non	Bangladesh, Cambodge, Chine, Egypte, Inde, Oman, Pakistan, Sénégal
A(H7N7) HP	1959	2003	91	1	Oui	Australie, Etats-Unis, Pays-Bas
A(H5N6) HP	2014	2021	52	26	Non	Chine, Laos
A(H7N2) FP	2003	2017	7	0	Non	Etats-Unis, Royaume Uni
A(H5N8) HP	2021	2021	7	0	Non	Russie
A(H7N7) FP	1979	2013	5	0	Non	Etats-Unis, Italie, Royaume-Uni
A(H7N3) HP	2004	2012	4	0	Non	Canada, Mexique
A(H10N7) FP	2004	2012	4	0	Non	Australie, Egypte
A(H10N8) FP	2013	2014	3	2	Non	Chine
A(H7N3) FP	2006	2006	1	1	Non	Royaume-Uni
A(H5N1) FP	2013	2013	1	0	Non	Taiwan
A(H7N4)	2018	2018	1	0	Non	Chine
A(H10N3)	2021	2021	1	0	Non mais aucun contact avec des oiseaux n'a été rapporté pour ce cas	Chine

I.8.2. Variabilités saisonnières

Répertoriée dans la liste du Code Sanitaire pour les animaux terrestres de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA) (anciennement Office International des Epizooties (OIE)), l'influenza aviaire revêt un caractère saisonnier. En effet, dans l'hémisphère nord, les épidémies de l'influenza aviaire apparaissent en saison froide à des valeurs basses de température et de pression favorisant la transmission (Chong et al. 2020). En revanche dans les écosystèmes Afro-tropicaux, les virus de l'IA se maintiennent tout au long de l'année (Gaidet and Caron 2016).

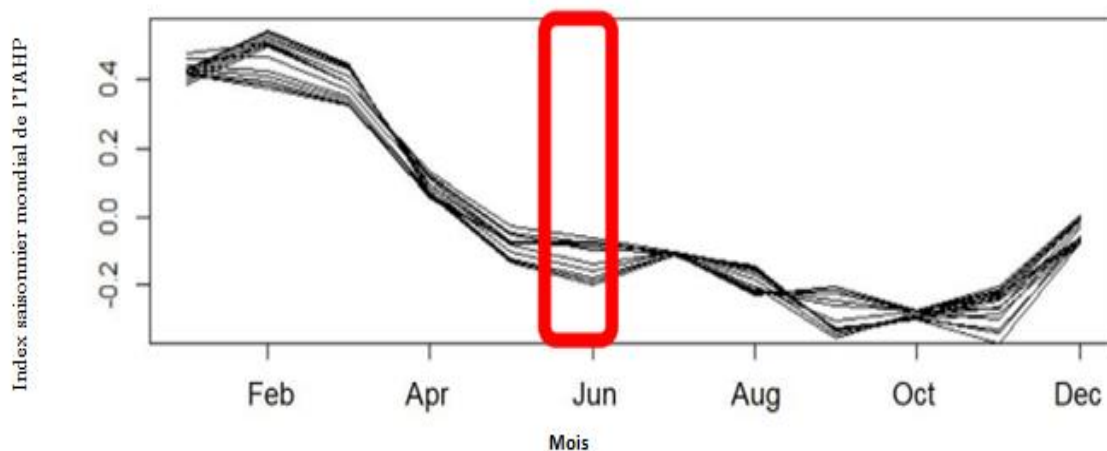


Figure 10: Saisonnalité de l'incidence mondiale de l'IAHP chez la volaille (Rapport (WAHIS, 13/06/2022))

I.8.3. Facteurs de propagation

De nombreux facteurs favorisent la transmission des virus de l'IA. Outre les voies migratoires des oiseaux sauvages, l'influenza virus peut être disséminée à grande échelle par la mondialisation du commerce. La nature résistante du virus, lorsque les températures sont basses, lui permet d'être transporté sur les élevages et les marchés aux oiseaux vivants.

I.8.4. Impact d'une épidémie de l'IA.

Outre les graves manifestations cliniques et les taux de mortalité importante qu'aurait une pandémie d'une souche hautement pathogène des virus de l'influenza aviaire, celle de 1918 est toujours dans la mémoire populaire. Cette maladie peut avoir un impact direct sur la subsistance

d'une large frange de la population mondiale. Ainsi des élevages avicoles entiers peuvent être décimés en peu de temps entraînant des pertes économiques considérables. Il en résulterait une insécurité alimentaire importante surtout dans les pays pauvres chez qui les viandes blanches couvrent une part importante des habitants en besoins protéiques. Les pertes d'emploi seront importantes du fait de la forte demande en main-d'œuvre de l'industrie avicole. Le commerce international serait aussi impacté par la tendance qu'auraient les responsables à protéger leurs pays en fermant les frontières, affectant par là également le secteur du tourisme qui reste le pivot des économies de nombre de pays en développement. Les oiseaux sauvages, et la biodiversité des écosystèmes, seraient également fortement touchés puisqu'ils sont considérés comme les principaux vecteurs de la maladie et, potentiellement, les victimes d'une possible politique d'éradication de foyers infectieux.

I.8.5. Répartition géographique

I.8.5.1. Bilan mondial actuel

Des foyers de l'influenza aviaire ont été reportés au cours de l'année 2021 dans plusieurs pays aussi bien chez la volaille qu'au sein des populations d'oiseaux sauvages. Les caractéristiques de ce virus évoluent très rapidement, les pandémies étant liées à un réappariement génétique, de nombreux sous-types de la forme hautement pathogène ont été confirmés dans diverses populations d'oiseaux sur des aires géographiques très vastes. L'influenza virus hautement pathogène a ainsi été responsable du décès ou de l'abattage de plus de 316 millions de tête de volaille entre 2005 et 2021 et plus de 50 pays ont été contaminés (WHO. 2022).

I.8.5.2. Situation au Maroc

L'influenza virus de souche H9N2 a été diagnostiqué au Maroc pour la première fois en Janvier 2016. Des symptômes respiratoires sévères ont été constatés dans onze élevages de volailles chez lesquels les investigations menées ont permis de détecter le H9N2 par RT-PCR en temps réel. L'analyse phylogénétique a montré une similarité génétique avec celui isolé au moyen orient (El Houadfi et al. 2016).

I.9. Pathogénicité et physiopathologie

I.9.1. Incubation

La période d'incubation est variable et dépend de la virulence de la souche et de la dose du virus. L'espèce touchée et la voie d'exposition sont importantes dans la période d'incubation (1 à 7 jours) et l'apparition des premiers signes cliniques, et peuvent s'étendre de trois jours à 14 jours. Le code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE recommande une période de 21 jours pour déterminer la date de primo-infection.

I.9.2. Manifestations cliniques de l'IA

En fonction de la virulence de la souche (IAHP ou IAFP), du statut immunitaire de l'hôte, de l'espèce, de l'âge, des facteurs environnementaux...la réponse est modulée et le tableau clinique est variable (Plague and Aviaire 2006).

I.9.2.1. Symptomatologie chez la volaille domestique.

L'influenza virus faiblement pathogène induit des symptômes généralement sous une forme modérée, voire subclinique avec des signes respiratoires bénins accompagnés d'une baisse de ponte surtout chez la dinde. La volaille domestique peut toutefois développer des signes respiratoires, parfois sévères, (jetage, larmolements, toux), diarrhée.... L'état général est affecté et se traduit par une apathie et un plumage ébouriffé, une sinusite... L'aggravation des troubles respiratoires peut donner un taux de mortalité de 40 à 70% (Fouchier and Munster 2009).

Sous sa forme hautement pathogène, l'infection se traduit d'emblée par une prostration et de l'apathie extrême, des mortalités subites pouvant atteindre les 100% avec peu ou pas de symptômes (24-48 heures). Des formes de la maladie moins fulminantes se traduisent chez le poulet et la dinde par la manifestation d'un tableau clinique non pathognomonique caractérisé par une dépression sévère, une déshydratation, des diarrhées liquides, un larmolement excessif, des symptômes respiratoires (râles, toux, jetage, sinusite, éternuements), de l'anorexie, des symptômes cutanés (œdème de la tête et du cou, cyanose de la peau, congestion voire nécrose de la crête et des caroncules, des barbillons et des pattes), un arrêt de ponte ou des œufs à coquilles molles ou sans coquilles chez la poule pondeuse. Des signes neurologiques peu fréquents (ataxie, opisthotonos, torticollis...) peuvent aussi être présents (Badstue and Smidt 1978).

I.9.2.2. Tableau clinique chez l'avifaune sauvage

Les souches faiblement pathogènes sont généralement asymptomatiques chez l'avifaune sauvage. Ils sont associés à un développement de signes cliniques peu sévères (plumes ébouriffées, éternuements, écoulement oculaire, dyspnée) (França and Brown 2014). Les oiseaux de l'ordre des Ansériformes (canards, oies, cygnes), des Charadriiformes et dans une moindre mesure des Passériformes sont souvent infectés mais sans aucune manifestation clinique.

Les souches hautement pathogènes affectent différemment les espèces d'oiseaux sauvages. La maladie peut varier d'une manifestation clinique fruste à des symptômes non spécifiques se traduisant par de la diarrhée, des symptômes respiratoires, neurologiques voire une mortalité qui, parfois, peut être élevée (Tian et al. 2015).

I.9.3. Anatomopathologie

Les lésions communément relevées sont extrêmement variables et dépendent de l'espèce contaminée et de la pathogénicité de la souche virale. Elles sont localisées à l'appareil respiratoire et génital et sont peu spécifiques lorsque la souche incriminée est faiblement pathogène. Cela se traduit essentiellement par des sinusites à divers stades : catarrhales, fibrineuses, sérofibrineuses, mucopurulentes et fibrinopurulentes. Des trachéites œdémateuses parfois hémorragiques avec des exsudats séreux à caséux sont également relevées avec des trachéites, aérosacculites catarrhales à fibrineuses (Bidoudan et al. 2021). Une congestion pulmonaire modérée à sévère peut se manifester et les cellules ciliées et caliciformes de l'épithélium respiratoire pseudostratifié peuvent subir une dystrophie avec hyperproduction de mucus. Parfois une pneumonie interstitielle avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique est observée avec des exsudats séreux dans les alvéoles pulmonaires. D'autres lésions peuvent également être présentes telles que des péritonites et des ovaires hémorragiques chez les poules pondeuses, des entérites, des pancréatites, des hépatites et des péricardites (Calnek et al. 1997).

Dans les cas d'une maladie aiguë, seule une congestion des muscles ainsi que les symptômes d'une déshydratation sont présents. Les lésions macroscopiques généralement présentes se résument à un œdème sous-cutané de la région de la tête et du cou avec un excès de mucus dans la trachée et des hémorragies dans la sous-muqueuse du proventricule et du gésier. Des amas d'érythrocytes occupent la lumière des parabronches et des capillaires aériens. Des pétéchies peuvent être

présentes sur le muscle cardiaque, les parois intestinales et le péritoine, accompagnés d'un épanchement séreux. La destruction partielle des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et de l'œdème périvasculaire et plus rarement des encéphalites nécrosantes modérées (Prokopyeva et al. 2019).

I.9.4. Diagnostic différentiel

Le tableau clinique peut évoquer, la maladie de Newcastle, la bronchite infectieuse, la laryngotrachéite infectieuse et les infections à paramyxovirus aviaires. Les maladies respiratoires impliquant une origine bactérienne peuvent aussi être soupçonnées (*Mycoplasma* spp, *Corysa* (*Haemophilus* *paragallinarum*), choléra aviaire ou pasteurellose). Les infections fongiques seront également écartées dans le cas d'une maladie respiratoire.

I.9.5. Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic d'une infection par le virus de l'influenza aviaire ne peut être réalisé sur la base d'un tableau clinique, les symptômes n'étant pas pathognomoniques. La mise en évidence passe nécessairement par des méthodes analytiques. Outre l'isolement viral sur culture, bien que certains virus soient difficiles voire impossibles à isoler, une panoplie de moyens diagnostiques sont disponibles. Les techniques de biologie moléculaire notamment augmentent la sensibilité de la détection en permettant de diagnostiquer tout virus dont une partie de séquence génétique est connue.

Les prélèvements consistent à collecter sur les oiseaux vivants des écouvillons cloacaux et oropharyngés, voire des fientes fraîches. Quand il s'agit d'individus morts, les échantillons intéresseront différents organes (trachée, poumons, sacs aériens, intestins, rate, reins, cerveau, foie, cœur).

I.9.5.1. Diagnostic direct

Il repose sur la mise en évidence du virus ou de ses antigènes.

a. Isolement et identification sur œufs embryonnés

C'est la technique de référence, elle permet l'identification antigénique complète du virus grippal par inoculation sur œufs de poule embryonnés. Des suspensions des échantillons, dans des

solutions antibiotiques, sont inoculées dans la cavité allantoïque d'au moins cinq œufs de poules embryonnés de neuf à onze jours. Les œufs sont incubés à 35-37°C entre deux et sept jours. Les embryons dont la létalité a été constatée au cours de cette période, ainsi que l'ensemble des œufs à la fin de cette période d'incubation sont testés. L'analyse de leur liquide chorio-allantoïdien permet de déceler à l'aide d'érythrocytes de poulet la présence d'une activité hémagglutinante. Il faut alors différencier le virus avec celui de la maladie de Newcastle par un test d'inhibition de l'hémagglutination du supernatant. La présence du virus de la grippe A peut être confirmée par un test d'immunodiffusion, soit par la recherche d'antigènes spécifiques ou par la réaction de polymérisation en chaîne après une amplification en chaîne après transcription inverse en temps réel (RT-PCR rt) sur les fluides allantoïques (OIE. 2021). En raison des risques de biosécurité, cette technique d'isolement sur œufs embryonnés nécessite de disposer d'un laboratoire de confinement de niveau trois ou supérieur.

b. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La RT-PCR est une variante de la PCR et se caractérise par la synthèse de l'ADN complémentaire à partir d'un échantillon d'ARN, sous l'action catalytique des transcriptases inverses, qui sont des enzymes ADN polymérases ARN dépendantes. Elle consiste à détecter l'ARN du virus grippal à partir de surnageant d'écouvillons trachéaux/oropharyngés, d'écouvillons cloacaux et de broyats d'organes, par amplification génique après transcription inverse et nécessite de disposer d'une paire d'amorces oligonucléotidiques basées sur des séquences connues du gène de protéine (HA, N ou M). Un diagnostic de certitude peut ainsi être posé par l'identification de la souche virale.

La RT-PCR en temps réel permet de suivre en continu le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR nouvellement synthétisés. Cette méthode a largement remplacé l'isolement dans les embryons pour le diagnostic initial et tend à devenir la technique diagnostique de référence. Sa sensibilité est >95% et sa spécificité est dépendante de la pertinence des amorces utilisées.

Le séquençage permet de décrypter l'intégralité du matériel génétique du virus et de repérer les mutations. Cependant cette technique est longue, assez coûteuse et ne peut être généralisée à tous les prélèvements.

Le criblage vise la recherche de mutations spécifiques déjà identifiés du virus pour identifier la signature génétique des variants. C'est une méthode rapide qui nécessite moins d'équipements que le séquençage qui, lui, analyse le génome complet du virus et permet de détecter de nouvelles mutations.

c. Recherche des antigènes viraux par immunodosages

Ces techniques se basent sur la détection des protéines virales présentes dans les prélèvements dont deux sont d'utilisation courantes car moins contraignantes :

L'immunofluorescence directe : Elle consiste à mettre en évidence les antigènes viraux à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques liés à la fluorescéine.

L'immunochromatographie sur membrane : Cette technique permet de détecter l'antigène recherché qui se lie avec les anticorps spécifiques marqués qui migrent par capillarité sur une membrane de nitrocellulose sous l'effet d'un tampon, et sont arrêtés par des anticorps de capture fixés sur la membrane. Le test est validé par un contrôle interne.

I.9.5.2. Diagnostic indirect

Les anticorps neutralisants spécifiques n'apparaissent que tardivement, une dizaine de jours après la contamination. Ces méthodes de détection des anticorps anti influenza aviaries présentent donc un intérêt lors d'enquêtes épidémiologiques. Différentes méthodes sont disponibles :

a. Réaction d'inhibition de l'hémagglutination : Cette technique vise à détecter les anticorps dirigés contre des antigènes d'enveloppe du virus (hémagglutinine ou neuraminidase). Elle est donc spécifique au type, sous-type et variants. Elle se base sur l'évaluation quantitative des anticorps spécifiques pouvant inhiber la réaction d'hémagglutination. Celle-ci résulte de l'attachement des molécules des antigènes de surface des particules virales par leur site de liaison aux récepteurs des hématies représentés par les acides sialiques. Cependant, et bien que les sérums aviaries n'en présentent pas souvent, des glycoprotéines similaires aux récepteurs du virus peuvent induire des résultats faussement positifs et il convient donc d'éliminer les inhibiteurs non spécifiques (Suarez and Schultz-Cherry 2000).

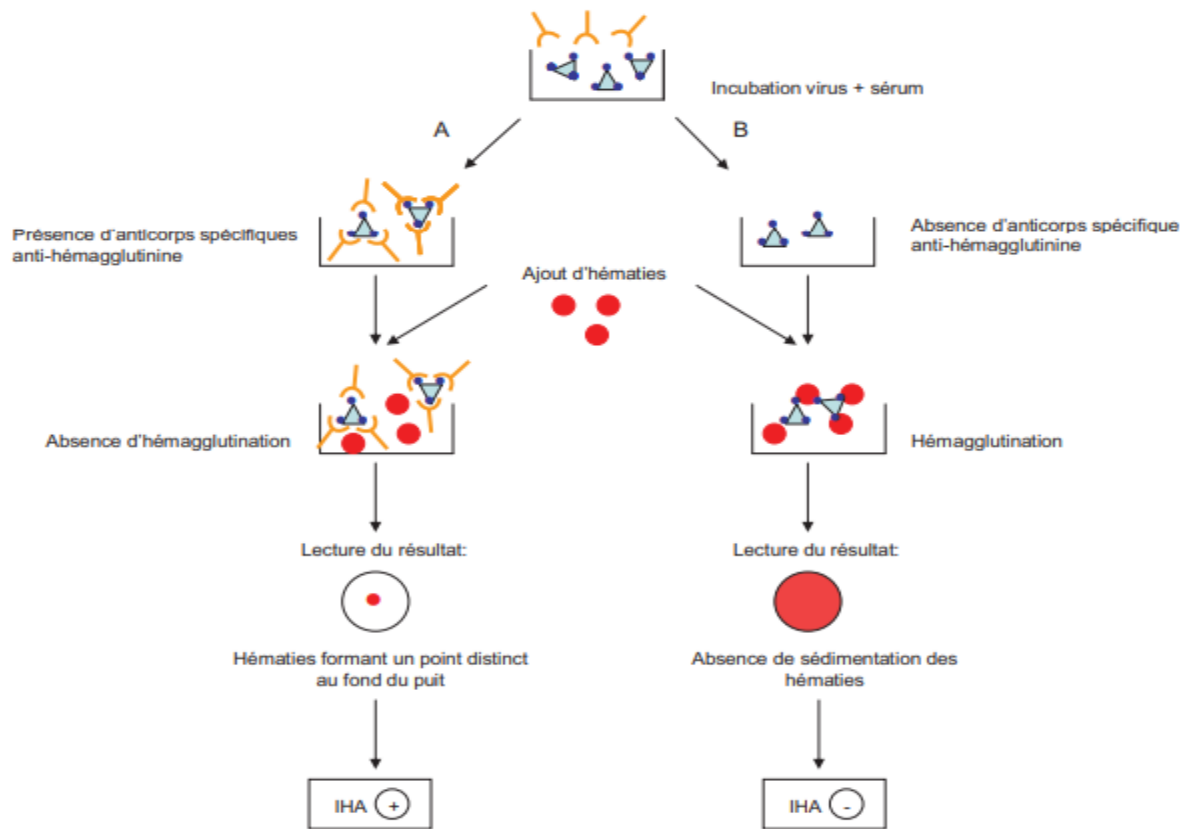


Figure 11 : Réaction d'inhibition de l'hémagglutination (Cross 2002)

b. Immunodiffusion sur gélose bien qu'ils ne soient pas spécifiques puisqu'ils permettent de détecter des anticorps communs à tous les virus influenza, leur utilité réside dans le fait qu'ils soient décelés dès le cinquième jour post infection.

c. Immunofluorescence : C'est une méthode qui permet un diagnostic rapide mais sa sensibilité n'est que de 60 à 70%. Elle consiste en un frottis sur lame de l'échantillon respiratoire et de l'anticorps monoclonal marqué à l'aide d'un fluorochrome ou, s'il n'est pas marqué, la révélation est faite par un anticorps anti-souris marqué.

d. Test immunoenzymatique ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) : les antigènes grippaux sont capturés à l'aide d'un anticorps monoclonal et révéler par la méthode

immuno-enzymatique qui consiste à visualiser la réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée qui résulte de l'action d'une enzyme fixée à un anticorps secondaire sur un substrat. Cette technique est plus sensible et permet de déterminer les concentrations sériques d'anticorps ainsi que la détection d'antigènes. La plupart des kits commerciaux disponibles permettent la détection des anticorps dirigés contre la nucléocapside virale.

e. Test de microneutralisation : Consiste à inhiber par des anticorps sériques neutralisants anti-HA les effets cytopathogènes provoqués par le virus sur des cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney) lignées cellulaires de rein de chien en culture. Les anticorps spécifiques anti-HA sont alors mis en évidence par technique ELISA au niveau des cellules infectées.

f. Réaction de fixation du complément : permet de montrer la présence d'anticorps totaux dirigés contre l'antigène interne du virus (la NP), ils sont d'apparition lente, cinq à sept jours suivant l'infection, et ne sont plus détectables 3 mois après.

I.10. Prévention et lutte contre l'IA

I.10.1. Epidémiosurveillance de l'avifaune

La stratégie de prévention contre l'influenza aviaire passe par l'instauration d'un programme de surveillance active chez les oiseaux sauvages permettant d'évaluer l'apparition des virus de l'IA, et de déterminer leur prévalence et leur caractérisation. Le but étant de garantir l'absence de circulation du virus et de détecter les formes subcliniques afin de pouvoir déclencher le plus rapidement possible des actions renforcées permettant de faire face à l'apparition d'un foyer potentiel.

Un dispositif de surveillance permanent consiste à surveiller les mortalités dans l'avifaune et à instaurer un suivi sérologique et virologique qui vise particulièrement les oiseaux migrateurs au niveau des aires de repos que représentent les zones humides.

I.10.2. Epidémiosurveillance des oiseaux d'ornement

Le commerce des oiseaux exotiques est régi par la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES : The Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Le renforcement de la

surveillance, au niveau des frontières, des conditions sanitaires lors de leurs importations et l'instauration de mesures de quarantaine adéquate avec un dépistage systématique de l'influenza aviaire permettrait de consolider ces mesures préventives.

I.10.3. Mesures de prévention dans les exploitations avicoles.

Les risques d'introduction du virus de l'influenza dans une exploitation résident dans le contact avec des individus contaminés, oiseaux aquatiques migrateurs, volailles domestiques ou oiseaux de compagnies. L'implantation des projets avicoles devrait donc idéalement se localiser dans une zone écartée des lieux de fréquentation de l'avifaune sauvage.

En fonction du statut sanitaire, des mesures de prévention peuvent être appliquées avec pour objectif d'assurer un haut niveau de protection vis-à-vis du risque d'introduction du virus dans les élevages.

Les fermes avicoles doivent aménager des installations sanitaires pour contrôler l'accès aux poulaillers et assurer un état sanitaire convenable des élevages et des équipements. L'état sanitaire des oiseaux doit être évalué avant introduction aux exploitations et les cadavres et produits d'origine animale doivent être éliminés d'une manière appropriée. Toute morbidité ou mortalité inhabituelle doit être notifiée sans délai aux services concernés.

Une suspicion entraîne la mise en œuvre rapide et précoce de mesures de biosécurité pour éviter la dissémination de l'agent pathogène. Il s'agira d'isoler l'exploitation suspecte et de recenser et séquestrer les animaux dans les bâtiments avec une désinfection systématique des véhicules et matériel d'élevage. Pour se protéger, les personnes exposées à un risque d'infection par les virus de l'influenza aviaire doivent appliquer les mesures de biosécurité en réduisant les contacts entre les professionnels et les oiseaux aux gestes indispensables. Outre les gestes d'hygiène habituelles telles que le lavage et la désinfection des mains et des bottes à la sortie des bâtiments, le port de masques de niveau de protection efficace (FFP2), de lunettes, de gants et de vêtements de protection à usage unique est également essentiel pour se protéger et contenir toute propagation du virus. Ces derniers seront retirés à la sortie des bâtiments contaminés et éliminés d'une manière adéquate.

La confirmation de l'infection déclenche les mesures de police sanitaire par l'adoption d'un arrêté gubernatorial pour lutter contre la propagation de la maladie. Il se traduit par les mesures édictées par l'Arrêté du ministre de l'agriculture, de la pêche maritime, du développement rural et des eaux et forêts n°2466-17 du 5 moharrem 1439 (26 septembre 2017) relatif aux mesures complémentaires et spéciales pour lutter contre l'influenza aviaire hautement pathogène (peste aviaire). Des zones réglementées seront alors délimitées et comprennent une zone de protection de trois kilomètres autour du foyer, épigénome de l'infection, et une zone de surveillance d'un rayon de dix kilomètres. Avec notamment une interdiction de rassemblement des volailles et oiseaux (marchés, compétitions des pigeons voyageurs, chasse aux faucons...)

I.10.4. Prophylaxie médicale

La vaccination est un moyen efficace pour protéger les populations contre certaines pathologies graves. Elle vise à assurer la protection individuelle contre une maladie, mais aussi à conférer une protection de groupe en diminuant la transmission au sein d'une population. Cependant dans le cas des virus influenza, les mutations fréquentes diminuent l'efficacité des vaccins. De plus, en préventif, elle favoriserait la circulation de la souche hautement pathogène, augmentant le risque zoonotique.

La vaccination de la volaille peut cependant être autorisée dans les zones à haut risque en complément des mesures sanitaires qui ne seraient pas suffisantes. C'est une action qui vise à assurer la protection des espèces sensibles en réduisant l'incidence et la gravité de la maladie. Les oiseaux hébergés par les zoos sont également concernés par cette vaccination.

La vaccination seule n'est pas la solution au contrôle de l'IAHP si l'éradication est le résultat souhaité. Sans l'application de systèmes de surveillance, de biosécurité stricte et de dépeuplement face à l'infection, l'IAHP deviendra endémique dans les populations de volailles vaccinées. La circulation à long terme du virus dans une population vaccinée peut entraîner à la fois des changements antigéniques et génétiques comme cela s'est produit avec les virus de l'Influenza aviaire H5Nx (lignée Gs/GD), H7N3, H7N9 et H9N2 au Mexique et dans divers pays du Moyen-Orient et d'Asie (Swayne and Sims 2020). Actuellement, les vaccins utilisés et l'utilisation de la vaccination ont été examinés et révisés (Swayne and Sims 2020). L'hémagglutinine est la protéine virale primaire du virus de l'Influenza aviaire provoquant une réponse immunitaire protectrice.

Elle qui est utilisée dans les vaccins de volailles officiellement approuvée et cette immunité est spécifique à chaque sous-type d'hémagglutinine.

À l'heure actuelle, la majorité des vaccins antigrippaux A utilisés chez les volailles sont des vaccins à virus entier inactivés préparés à partir de liquide allantoïdien infectieux d'œufs de poule embryonnés, inactivé par la bêta-propiolactone ou le formol et émulsifié avec des adjuvants d'huile minérale. En raison du potentiel de réassortiment conduisant à une virulence accrue, les vaccins antigrippaux vivants conventionnels contre tout sous-type ne sont pas recommandés. Cependant, la biotechnologie procure le potentiel de générer des vaccins vivants contre le virus de la grippe aviaire avec des segments de gènes modifiés qui réduisent le risque de réassortiment, limitent la réplication et abrogent les aspects négatifs des vaccins vivants contre le virus de la grippe A (Song et al. 2007). L'existence d'un grand nombre de sous-types d'hémagglutinine (c'est-à-dire H1–H16), ainsi que la variation connue de différentes souches au sein d'un même sous-type, posent de sérieux problèmes lors de la sélection des souches pour produire les vaccins inactivés de la grippe A. De plus, certains isolats ne se développent pas à un titre suffisamment élevé pour produire des vaccins suffisamment puissants sans avoir recours à une pré-concentration coûteuse.

Alors que certaines stratégies de vaccination utilisent des vaccins autogènes (vaccins homologues), c'est-à-dire des vaccins préparés à partir d'isolats spécifiquement impliqués dans une épizootie, d'autres s'appuient sur des vaccins préparés à partir de souches virales caractérisés et pleinement approuvés possédant le même sous-type d'hémagglutinine que le virus circulant sur le terrain et capable de produire des concentrations élevées d'antigène (vaccins hétérologues). Historiquement, les vaccins inactivés pour le contrôle de l'IAFP et l'IAHP ont utilisé des virus IAFP avec un sous-type d'hémagglutinine correspondant provenant d'épidémies comme souches virales. Mais avec le développement d'une résistance sur le terrain associée à une utilisation prolongée du vaccin, la majorité des souches virales utilisées dans les vaccins inactivés sont maintenant des virus dérivés de la génétique inverse avec une hémagglutinine et parfois une neuraminidase antigéniquement proches des virus circulant sur le terrain. L'utilisation de virus IAHP comme souches vaccinales inactivées est fortement déconseillée en raison de problèmes de biosécurité.

Depuis les années 1970 aux États-Unis, les vaccins inactivés contre la grippe A sont principalement utilisés chez la dinde contre l'IAFP dans le cadre des programmes de vaccination d'urgence, mais depuis les années 2000, la plupart des vaccins sont dirigés contre les virus H1 et H3 de la grippe porcine A utilisés dans le cadre d'un programme de vaccination préventive de routine chez les dindes reproductrices (Swayne et al. 2020).

La vaccination contre l'IAHP a été utilisée pour la première fois au Mexique lors des épidémies de H5N2 de 1994-1995 (Villarreal 2007) et au Pakistan (Naeem 2003) lors des épidémies de H7N3 de 1995. Commenant par les épidémies d'IAHP de la lignée H5N1 de l'oie/Guangdong (Gs/GD) à Hong Kong en 2002 (Sims et al. 2003), une politique de vaccination a été adoptée en utilisant des souches vaccinales IAFP H5N2 et remplacés par la suite par des souches de vaccin génétique inverse H5Nx, car le virus de terrain se propageait partout et hors de la Chine entre 2002 et 2010. 113 milliards de doses de vaccins ont été utilisées pour lutter contre l'IAHP, dont 95 % vaccins inactivés et 5% recombinants (Swayne et al. 2011; Swayne and Sims 2020). Alors que l'IAHP de la lignée H5Nx Gs/GD se répandait dans le monde entier, d'autres pays ont mis en place des programmes de vaccination d'urgence et/ou préventive pour le contrôle de l'IAHP. De même, la vaccination préventive contre L'IAHP H5N1 a été autorisée pour les volailles élevées en plein air et les oiseaux de zoo dans plusieurs pays de l'Union européenne pendant les années 2000.

Des vaccins vivants vectorisés recombinants avec des inserts de gènes d'hémagglutinine du virus H5 de la grippe A ont été approuvés et utilisés dans quelques pays depuis 1997, principalement chez les poulets, et comprennent le Poxvirus aviaire recombinant (rFPV), vaccins recombinants contre le virus de la maladie de Newcastle (rNDV) et les vaccins recombinants contre le virus de l'herpès de la dinde (rHVT). Depuis 2015, les vaccins à particule d'ARN H5 à base d'hémagglutinine non répliatifs, à baculovirus exprimé en H5 et à ADN H5 ont été approuvés pour l'utilisation chez la volaille mais avec une utilisation limitée (Swayne and Sims 2020).

II. Influenza aviaire faiblement pathogène sous type H9N2

II.1. Historique

Le VIA H9N2 a été initialement isolé chez la dinde dans le Wisconsin aux États-Unis d'Amérique en 1966 (A/turkey/Wisconsin/1/1966(H9N2)) (Homme and Easterday 1970). En Asie, les premiers cas des infections à H9N2 chez le canard ont été enregistrés à Hong Kong dans les années 1970 (Shortridge 1992). Dans les années 1990, la propagation du H9N2 s'est étendue avec plusieurs foyers affectant la volaille industrielle en Chine, Allemagne, Corée du Sud, Italie, Iran, Pakistan, États-Unis, Afrique du Sud et Irlande (Sun and Liu 2015; Butt et al. 2010; Lee et al. 2000). Ceci a conduit à une circulation virale persistante dans de nombreux pays d'Asie, du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord (Alexander 2007a), où le virus a atteint le statut endémique dans les populations de volailles (Nagy et al. 2017; Yang et al. 2019; Peacock et al. 2019). Aujourd'hui, le H9N2 est considéré comme le virus de l'Influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) le plus répandu et le plus dommageable chez les volailles dans le monde entier (Nagy et al. 2017), présentant une sérieuse menace pour les animaux et la santé publique (Peacock et al. 2019; Peiris et al. 1999).

Depuis le début des années 2000, l'émergence des virus H9N2 a été signalée dans plusieurs pays de l'Afrique du Nord, dont la Libye en 2006 (Kammon et al. 2015), l'Égypte en 2006 (El-Zoghby et al. 2012) et la Tunisie en 2009 (Tombari et al. 2011). De plus, suite au premier isolement du virus IAFP H9N2 au Maroc en janvier 2016 (El Houadfi et al. 2016), les virus H9N2 ont largement circulé en Afrique du Nord, s'étendant à l'Afrique de l'Ouest, ainsi qu'à l'Afrique de l'Est. Depuis 2017, les virus H9N2 sont détectés en Algérie (Jeevan et al. 2019) et dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne, dont le Burkina Faso (Zecchin et al. 2017), le Ghana (Awuni et al. 2019), l'Ouganda, le Kenya, le Sénégal (Kariithi et al. 2020), la République du Bénin et le Togo (Fusade-Boyer et al. 2021).

II.2. Infection par les virus IAFP H9N2

Les infections à H9N2 provoquent généralement une maladie clinique mineure chez les volailles, qui rend son identification sur le terrain plutôt difficile (Samy and Naguib 2018). Cependant, malgré leur faible pathogénicité, les virus H9N2 peuvent entraîner une pathogénicité et une

mortalité variables chez les volailles domestiques (Lee et al. 2000; Alexander 2007a; Naeem et al. 1999), en particulier lorsqu'ils sont associés à une immunosuppression ou à une co-infection avec d'autres virus ou bactéries (Sun and Liu 2015; Samy and Naguib 2018; Zhang et al. 2008; Umar et al. 2017), entraînant des pertes économiques importantes (Naeem et al. 1999; Lee et al. 2000; Alexander 2007a).

Le virus H9N2 a un potentiel zoonotique avec une transmission interspécifique entre la volaille et les mammifères, y compris les porcs et les humains (Butt et al. 2005; Matrosovich et al. 2001; Peiris et al. 2001; Gu et al. 2017) . Au moins 59 cas humains ont été rapporté à ce jour (Peacock et al. 2019). De plus, les virus H9N2 se sont avérés capables de fournir des parties ou même des ensembles complets de segments de gènes internes aux virus zoonotiques de l'Influenza aviaire, conduisant à l'émergence de virus réassortants mortels pour l'homme, comme dans le cas de la Chine en 2013 avec l'apparition des virus H7N9 et H10N8 et, un an plus tard, du sous-type H5N6 (Gu et al. 2014; Guan et al. 2000; Shen et al. 2016; Zhang et al. 2016; RahimiRad et al. 2016; Cui et al. 2014; Di Liu and Gao 2014; Shi et al. 2014) présentant des risques graves pour la santé publique. En plus, plusieurs études ont rapporté l'infection naturelle par H9N2 chez d'autres mammifères, comme les furets (Wan et al. 2008), les souris (Choi et al. 2004), les visons, les renards, les rats laveurs (Yong-Feng et al. 2017), les chats et les chiens (Zhang et al. 2013). Le plus souvent, les infections dues à des virus IAFP sont enzootiques et asymptomatiques chez les oiseaux « réservoirs » qui sont les oiseaux sauvages aquatiques. Chez ces hôtes naturels, l'infection dure deux à quatre semaines et l'excrétion virale se fait par voie fécale pendant toute cette durée (Gashaw 2020).

II.2.1. Chez l'oiseau d'élevage

Chez la volaille domestique, l'IAFP H9N2 se traduit par des signes respiratoires parfois sévères (Toux, jetage, râles et larmolement). Une baisse du taux de ponte et du taux d'éclosion chez la poule pondeuse peuvent être également observés. Chez certaines volailles, on constate également une apathie, un plumage ébouriffé, une baisse de la consommation alimentaire et parfois de la diarrhée. Si la maladie évolue vers la chronicité, on peut alors constater des surinfections bactériennes, un amaigrissement, une sinusite infra-orbitaire et une aggravation des troubles respiratoires avec un taux de mortalité allant de 40 à 70 % (Brugère-Picoux 2007). Les expressions

cliniques sévères sont principalement rencontrées lors de co-infections virales ou bactériennes ou lorsque les conditions environnementales sont dégradées.

II.2.2. Chez l'oiseau sauvage

Les oiseaux sauvages aquatiques migrateurs tels que le canard, les oies et les cygnes sont considérés comme des réservoirs de ce virus, qui hébergent d'ailleurs tous les sous-types connus jusqu'à l'heure actuelle (Olsen et al. 2006). En générale, ces espèces réservoirs sont asymptomatiques. Les virus se multiplient au niveau de leur tractus intestinal et ils les excrètent dans les fèces en fortes concentrations (Beby-Defaux et al. 2003).

II.2.3. Chez l'Homme

Les premières infections naturelles humaines du virus H9N2 en Chine ont été découvertes dans la province de Guangdong en 1998. Par la suite, plusieurs cas dans la région continentale du sud de la Chine ainsi qu'à Hong Kong ont été signalés occasionnellement. La majorité des cas identifiés concernaient de jeunes enfants et les patients avaient développé des maladies asymptomatiques. Aucune preuve de la transmission interhumaine du virus H9N2 n'a été mise en évidence, bien que les enquêtes sérologiques aient montré que l'étendue et le nombre d'infections humaines par le virus étaient significativement plus élevés que le nombre de cas confirmés (Xu et al. 2018).

L'émergence continue d'une infection par le virus de l'Influenza aviaire A chez l'homme constitue une menace persistante pour la santé humaine, comme en témoignent les cas de H5N1, H7N9 et les infections récentes au H9N2. La prévalence à long terme du virus de l'Influenza aviaire A H9N2 en Chine et dans les régions voisines favorise la transmission interspécifique de l'hôte aviaire à l'homme. L'émergence de plusieurs génotypes variants H9N2 dans cette région contribue à l'émergence de nouveaux virus H7N9 et H10N8 qui ont sont létaux pour l'homme.

Cette infection humaine croissante par le virus H9N2 en Chine souligne la nécessité d'une surveillance étroite des événements de transmission interspécifique. La majorité des cas ont été causés par la lignée Y280/G9, selon les séquences H9N2 humaines disponibles. La capacité d'infecter facilement de nouveaux hôtes sans adaptation préalable a été démontrée par la présence de mutations adaptatives au-delà de la liaison aux récepteurs humains.

De plus, la gamme d'hôtes élargie du virus H9N2 dans cette région a considérablement augmenté la propagation de la maladie chez les mammifères. Les études sérologiques durant ces années, ont

montré que l'homme est plus sensible à l'infection H9N2 qu'à l'infection par le virus pandémique H5 et le sous-type H7 de l'IA. Ainsi, la dernière option efficace pour se préparer à la pandémie H9N2 sera le contrôle à la source. Cette analyse approfondie a résumé les mises à jour les plus récentes sur les infections humaines H9N2 afin de fournir un éclairage sur les stratégies de prévention pour cette souche potentiellement pandémique (Song and Qin 2020).

Des rapports récents d'infection par le H9N2 chez l'homme en Afrique du Nord en Égypte ont été bien confirmés par des programmes d'investigations sérologiques, en particulier parmi les employés travaillant dans l'industrie avicole. L'analyse génétique a montré que la majorité des virus H9N2 circulant en Afrique du Nord appartenaient à la lignée G1. La présence de marqueurs génétiques mammifères et humains signalés dans plusieurs souches H9N2 suggère un risque zoonotique potentiel pour la santé publique (Kaboudi 2019).

II.3. Diagnostic

Seul un diagnostic de suspicion peut être porté sur la base des signes cliniques et des lésions à l'autopsie. Lors d'épizootie, l'Influenza aviaire doit être suspectée lors de toutes mortalités suspectes ainsi que lors de pathologies respiratoires ou digestives.

La symptomatologie engendrée par le virus ne peut être différenciée de celle causée par d'autres virus tel que celui de la maladie de Newcastle. Le diagnostic définitif ne peut être posé qu'après identification de l'agent causal suite au diagnostic de laboratoire (Swayne et al. 2013).

Suite à l'infection par le virus H9N2 faiblement pathogène, les lésions sont localisées au niveau du tractus respiratoire, digestif et au niveau de l'appareil reproducteur.

II.3.1. Tableau clinique de l'IAFP H9N2

II.3.1.1. Signes cliniques chez la volaille

La multiplication du virus IAFP H9N2 est limitée aux tractus respiratoire, digestif et urogénital. Le virus est responsable de troubles respiratoires qui se traduisent par des toux, râles, jetage et larmolement, une apathie, une baisse de l'appétit, parfois de la diarrhée et le taux de mortalité est en général faible sauf en cas de surinfections secondaires (Alexander 2007b).

La gravité des signes cliniques dépend de plusieurs facteurs tels que l'âge, l'espèce et l'état de santé de l'oiseau, les infections secondaires, les méthodes d'élevage et la souche virale provoquant l'infection. (Capua and Alexander 2013).



Figure 12: Image illustrant un reproducteur poulet de chair infecté naturellement par IAFP H9N2 et présentant un œdème périorbitaire sévère (Capua and Alexander 2013).

Bien que le H9N2 soit classé comme faiblement pathogène, il a provoqué dans les pays où il a été introduit un effet dévastateur dans différents types de productions industrielles avicoles. En effet il a été responsable de troubles respiratoires très sévères, accompagnés souvent des complications colibacillaires engendrant des taux de mortalité dépassant 60% chez le poulet de chair, en plus du retard de croissance, le triage et l'hétérogénéité, etc... Chez les poules pondeuses et les producteurs d'œufs, des chutes de ponte pourraient atteindre 70 à 75% en association avec une détérioration de la qualité des œufs et une chute de taux d'éclosabilité (El Houadfi et al. 2016)

II.4. Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale repose essentiellement sur la vaccination, Cette dernière est un moyen important et efficace pour contrôler l'IAFP surtout s'il est associé à d'autres programmes de contrôle de la maladie. La majorité des vaccins disponibles et commercialisés sont des vaccins inactivés (Swayne and Kapczynski 2008).

II.4.1. La vaccination

L'une des principales alternatives aux programmes d'abattage est la vaccination pour essayer de protéger les animaux non infectés. Des programmes de vaccination efficaces peuvent entraîner une réponse immunitaire robuste qui peut réduire les symptômes cliniques de la maladie, réduire la quantité de virus que les oiseaux excrètent en cas d'infection et augmenter la résistance de l'oiseau à l'infection. Tous ces facteurs peuvent contribuer à briser la chaîne de transmission du virus et par conséquent mettre fin à une épidémie (Swayne and Kapczynski 2008).

Cependant, l'échec vaccinal peut se produire, soit par une application inefficace ou une couverture insuffisante, soit par une mauvaise correspondance antigénique des vaccins aux souches de terrain, et par conséquent contribuer à la persistance de l'infection et de la maladie dans la zone à protéger (Swayne and Kapczynski 2008; Swayne et al. 2013). Un inconvénient de l'utilisation de la vaccination est que les animaux vaccinés ne peuvent pas être facilement différenciés des animaux naturellement infectés.

Les virus IAFP H9N2 sont devenus une sérieuse menace pour les volailles et ils sont devenus endémiques dans la plupart des pays. Différents vaccins tués (simples ou combinés) sont utilisés pour protéger les oiseaux contre l'IAFP (H9N2) dans différents pays. Depuis le début des années 1990, la vaccination contre le virus IAFP H9N2 a été largement utilisée en Asie et au Moyen-Orient utilisant des milliards de doses de vaccins inactivés (Swayne and Sims 2020).

II.5. L'Influenza aviaire faiblement pathogène au Maroc

Au Maroc, le virus IAFP H9N2 a été identifié pour la première fois en janvier 2016. Il s'est rapidement propagé à travers le pays, causant des pertes économiques importantes dans le secteur de la production avicole (El Houadfi et al. 2016). Une précédente étude a révélé que l'isolat marocain pourrait être apparenté à l'isolat du Moyen-Orient A/poulet/Dubaï/D2506.A/2015 (Boumart et al. 2019). Le virus a montré une forte pathogénicité dans les conditions du terrain avec aggravation de la maladie en cas de co-infection avec d'autres maladies (Boumart et al. 2019; Belkasmi et al. 2020). Malgré la mise en place rapide d'un programme de vaccination de masse des volailles suite à l'apparition de la maladie, le virus est devenu endémique dans toutes les filières avicoles du pays (El Khantour et al. 2020).

Dans le cadre de la veille sanitaire du cheptel avicole national assurée par l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (ONSSA), les investigations cliniques et/ou de laboratoire effectuées dans près de 800 élevages avicoles situés dans différentes régions du pays ont confirmé la présence, pour la première fois, du virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) du sous-type H9N2 au niveau de 30 unités avicoles. Ce sous-type qui existe dans plusieurs pays d'Afrique du nord (Lybie, Égypte et Tunisie), du Moyen Orient, d'Asie et quelques pays d'Europe, a engendré des mortalités importantes, une chute de l'immunité et une diminution des performances de la production chez la volaille (chute de ponte, perte en poids).

Le plan de lutte, mis en place par l'ONSSA contre le virus IAFP H9N2 suivant les recommandations de l'OIE/OMSA (Office International d'Épizootie = Organisation Mondiale de la Santé Animale), avait pour objectif de maîtriser la maladie à travers la mise en place des actions suivantes:

- **A court terme**

Limitier l'impact de la maladie afin de réduire les mortalités et les baisses de performances, moyennant :

- La généralisation de la vaccination préventive contre le virus H9N2 à tous les élevages avicoles (élevage de reproducteurs, de ponte, de dinde et de poulet de chair).
- Le renforcement des mesures de biosécurité et d'hygiène au niveau des élevages avicoles.
- L'instauration d'un système d'épidémio-surveillance pour suivre et évaluer l'efficacité du programme sanitaire mis en place.

- **A moyen terme**

Le plan vise à maîtriser les facteurs de risque qui sont à l'origine de la propagation de cette maladie dans plusieurs régions de pays, notamment :

- La réorganisation des modalités de commercialisation des volailles vivantes qui doivent être dirigées à terme vers les abattoirs agréés comme c'est le cas dans la majorité des pays développés pour y subir l'inspection sanitaire ;
- Le renforcement de l'encadrement sanitaire.

Il est probable que les conséquences directes des foyers d'IAFP H9N2, et en particulier les pertes de la capacité de production avicole et les répercussions socio-économiques engendrées, soient plus dévastatrices en absence de la vaccination. En outre, le risque de voir la maladie passer à l'état

endémique chez les volailles domestiques doit être considéré comme une menace sérieuse pour les économies nationales et la santé publique. Du fait du pouvoir zoonotique du virus IA H9N2, l'apparition de cas humains -même sporadiques- représente un nouveau défi énorme pour les systèmes et services de santé qui sont déjà fragiles et surchargés. Le scénario, dans ce contexte, d'une mutation/réarrangement du virus qui pourrait être à l'origine d'une pandémie humaine doit être envisagé. En conséquence, l'évolution rapide de la situation du H9N2 nécessite une adaptation de la stratégie de riposte au virus afin de répondre à la spécificité des enjeux marocains (El Houadfi et al. 2016).

II.5.1. Facteurs de diffusion de l'influenza aviaire au sein des élevages marocains

Un certain nombre de facteurs peuvent contribuer à la propagation de l'Influenza aviaire à l'intérieur d'un pays donné. Ces facteurs sont plus répandus lorsqu'il s'agit de pays en développement qui continuent d'utiliser des méthodes conventionnelles d'élevage, d'abattage et de commercialisation.

II.5.1.1. Promiscuité des élevages et des basses-cours

Au Maroc, alors que la loi 49-99 précise les distances minimales à respecter entre un élevage avicole et un autre, ou entre un élevage avicole et un couvoir ou entre deux couvoirs, près de 60% des élevages de poulet de chair et 70% de poules pondeuses étaient situées à moins de 1000 mètres des autres élevages avicoles. De plus, près de la moitié des élevages de poulet de chair se trouvent à moins de 100 mètres des habitations possédant une basse-cour. En raison de la facilité de propagation du virus dans l'air, la promiscuité peut encourager davantage la dissémination du virus vers les élevages et les régions voisines (Yacini 2007).

II.5.1.2. Défaits des mesures sanitaires et hygiéniques (Biosécurité)

L'absence de mesures sanitaires et d'hygiène augmenterait le risque de propagation du virus de l'influenza aviaire d'un élevage à un autre. Ainsi, l'absence de règles obligeant les visiteurs et les personnes étrangères à passer par des postes de désinfection et de protection obligatoires (nettoyage des chaussures, des vêtements et des douches...) rendrait l'élevage en question vulnérable à la contamination. Ces stations seraient exigées de tous les visiteurs étrangers qui transportent de l'aliment, de la litière, des déchets ou d'autres articles susceptibles d'être

contaminés. De plus, les défauts de nettoyage et de désinfection et le non-respect du vide sanitaire sont susceptibles de perpétuer la présence du virus dans les élevages (Yacini 2007).

II.5.1.3. Les pratiques traditionnelles de commercialisation et d'abattage

Au Maroc, près de la moitié des œufs destinés à la consommation humaine et au moins les 3/4 des volailles destinées à l'abattage transitent par les souks et les marchés de gros.

Les modes et circuits traditionnels de commercialisation et d'abattage (souks, marchés de gros, tueries...) des volailles peuvent jouer un rôle très important dans la propagation du virus à l'intérieur du pays, comme cela a été observé dans les plus récentes épidémies en Asie. Le caractère traditionnel de la vente de volailles et de viandes dans les points de vente dans plusieurs pays en développement laisse penser qu'il serait difficile de contrôler la propagation du virus en cas d'épidémie. En effet, au niveau des tueries traditionnelles, les déchets d'abattage représentés par les plumes, les têtes, les viscères ne subissent aucun traitement de décontamination.

II.5.2. Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale repose essentiellement sur la vaccination, Cette dernière est un moyen important et efficace pour contrôler l'IAFP surtout s'il est associé à d'autres programmes de contrôle de la maladie. La majorité des vaccins disponibles et commercialisés sont des vaccins inactivés (Swayne and Kapczynski 2008).

II.5.2.1. La vaccination

Pour le contrôle du virus, plusieurs mesures ont été prises par les autorités compétentes (ONSSA) en concertation avec la Fédération interprofessionnelle du secteur avicole et les experts du secteur, à savoir dans un premier temps, recenser les fermes atteintes et véhiculer leurs produits vers les abattoirs, ensuite autoriser en premier temps la vaccination chez les élevages de reproducteurs, de poules pondeuses et de la dinde chair. Cette mesure a permis de ralentir la dissémination du virus. Par la suite, les autorités ont pris une deuxième décision de généralisation de la vaccination au poulet de chair, une décision qui a énormément réconforté les vétérinaires, les éleveurs et tous les intervenants dans le secteur avicole (couvoirs, producteurs d'aliments...). Le contrôle de la maladie a été assuré vers le mois d'Avril 2016. L'ONSSA a autorisé l'utilisation de vaccins inactivés homologues et hétérologues pour lutter contre le virus H9N2. Le tableau II liste les vaccins anti H9N2 utilisés au Maroc depuis 2016.

Tableau II : Liste des vaccins H9N2 commercialisés au Maroc (d'après la division de la pharmacie et des Intrants Vétérinaires (DPIV)/ONSSA)

NOM COMMERCIAL DU VACCIN	DATE DE L'AMM*	PRINCIPE ACTIF	ESPECES CIBLES
ATLAVAC H9N2	17/12/2018	Virus inactivé de L'Influenza aviaire sous type H9N2, souche Maroc1/16	Poule (Poulets de chair, poulettes futures pondeuses et futures reproductrices).
ATLAVAC H9N2 +ND	23/12/2019	Virus inactivé de l'Influenza aviaire sous type H9N2, souche Maroc1/16 Virus inactivé de la maladie de Newcastle (souche La sota)	Poule (Poulets de chair, poulettes futures pondeuses et futures reproductrices).
CEVAC FLU H9 K	23/12/2019	Virus inactivé de l'influenza aviaire H9N2 souche H9N2 D1991/2	Poule (Poulets de chair, poulettes futures pondeuses et futures reproductrices).
CEVAC H9N2 MAROC	17/12/2018	Virus inactivé contre l'influenza aviaire H9N2, souche H9N2-D3398.	Poulet
CEVAC NEW FLU H9 K	10/07/2020	Virus inactivé contre l'influenza aviaire H9N2 souche H9N2 Virus inactivé de la maladie de Newcastle (souche La sota)	Poulet
PRO-VAC AIK	15/06/2017	Virus inactivé de l'influenza aviaire (souche A/CK/Kor/01310/2001(H9N2), CE20)	Volailles (Poules futures pondeuses et reproductrices)
PRO-VAC AINK	02/10/2018	Virus inactivé de l'influenza aviaire (souche A/CK/Kor/01310/2001(H9N2), CE20) Virus inactivé de la maladie de Newcastle, souche Ulster 2C	Volailles (poulet)
NOBILIS INFLUENZA H9N2	09/04/2019	Virus inactivé de l'Influenza aviaire Type A sous-type H9N2, Souche A/CK/UAE/415/99	Volailles (poules et dindes)
NOBILIS INFLUENZA H9N2+ND	15/06/2017	Virus inactivé de l'Influenza aviaire Type A sous-type H9N2, souche AG415 Virus inactivé de la Maladie de Newcastle (souche Clone30)	Volailles (Poulets)
GALLIMUNE 208 ND+FLU H9 M.E.	02/10/2018	Virus inactivé de la grippe aviaire soucheH9N2 Virus inactivé de la maladie de Newcastle, souche Ulster 2C	Poule (Poulets de chair, poulettes futures pondeuses et futures reproductrices).
GALLIMUNE FLU H9 M.E.	02/10/2018	Virus inactivé de la grippe aviaire soucheH9N2	Poule (Poulets de chair, poulettes futures Pondeuses et futures reproductrices).
ME FLUVAC H9 0,3%	05/01/2018	Virus inactivé de l'Influenza aviaire sous type (H9N2) souche Poulet/Egypte/114940V/ NLQP/2011	Volailles : poulets, canards et oies.
IZOVAC AVIFLU	-	Virus inactivé de l'influenza aviaire (souche A/Turkey/Italy/245/84(H9N2)	Poule (Poulets de chair, poulettes futures pondeuses et futures reproductrices).

*AMM : Autorisation de mise sur le marché

III. Aperçu sur les zones humides au Maroc

III.1. Biodiversité des zones humides

Les zones humides du Maroc sont réputées pour leur abondance et leur diversité bien plus que pour leur superficie ; en effet, les quelques 300 sites délimités dans le cadre de l'inventaire national des zones humides occuperaient près de 400 000 hectares, soit 0,6 % de la surface du territoire. Dans cet inventaire sont inclus environ 170 lacs de barrages, dont l'étendue totale avoisine les 120 000 ha. Alors que ces milieux artificiels ont connu une extension exponentielle depuis 1980, soit avec le début des crises de sécheresse, l'étendue cumulée des sites naturels (inventoriés à présent), reste d'environ 280 000 ha, représentant moins de la moitié de la superficie inondable au début du 20^{ème} siècle. L'abondance de ces milieux est liée à divers facteurs physiques, écologiques et historiques. La configuration des zones humides continentales est liée principalement à la présence de trois grandes chaînes de montagnes, culminant à 2 000 – 4 000 m d'altitude et relativement arrosées. Celles-ci définissent un réseau hydrographique dense, marqué par une forte diversité de régimes hydrologiques et thermiques. Des hauts plateaux, s'intercalant entre ces montagnes, supportent plusieurs formations lacustres, karstiques dans leur majorité. A basse altitude se développent de vastes plaines d'origine surtout alluviale (plaines du Sebou, du Loukkos, de la Moulouya, du Souss...), qui ont donné lieu à des dizaines de marécages et à des milliers de dayas. Les régions sahariennes, qui portent encore l'empreinte d'un réseau hydrographique dense, autrefois très arrosé mais actuellement sec, se démarquent par leurs nombreuses sebkhas et graras (dépressions humides à immersion temporaire). Il convient de signaler que cette diversité étonnante concerne paradoxalement des zones humides en majorité de petite taille (comparées à leurs équivalentes centre-européennes ou subsahariennes), très vulnérables face aux aléas climatiques et aux influences humaines (Dakki 2015).

À la richesse en eaux continentales s'ajoute une diversité de zones humides côtières, différenciées le long d'un littoral marin partagé entre l'Océan Atlantique (3000 km) et la Mer Méditerranée (500 km). Cette mosaïque se justifie à travers les paramètres physiques : outre la grande différence entre les écosystèmes méditerranéens et atlantiques, on note la présence de gradients Nord-Sud le long de la côte atlantique, que viennent interrompre les courants océaniques ascendants qui façonnent les régimes thermique et hydrologique des eaux côtières. Sur les deux façades marines se sont

développées ainsi des dizaines de plages de longueur et de granulométrie variables, alternant avec des escarpements ou des platiers rocheux. De nombreuses baies plus ou moins ouvertes (Al Hoceima, Qsar Sghir, Tanger, El Jadida, Agadir, Cintra...) marquent aussi ce littoral, mais l'une d'elles (Ad-Dakhla) se distingue par sa forme en sac dont la partie interne est relativement abritée de l'hydrodynamisme marin. Ces écosystèmes sont interrompus par plus de 300 estuaires, de forme et de conditions écologiques variables et par quelque six lagunes (Nador, Smir, Merja Zerga, Sidi Moussa, Walidia et Khnifiss) chacune se distinguant des autres. Quelques îlots se détachent de ce littoral, dont les plus remarquables sont ceux d'Essaouira sur l'Atlantique et ceux de Bades, de Leyla et des Chaffarines sur la Méditerranée. Ces milieux inondables sont fréquemment adossés à des dunes côtières vives ou plus ou moins stabilisées, qui s'organisent parfois en cordons longs de plusieurs dizaines de kilomètres (Sahel des Doukkala, Gharb, Sahel Loukkos-Assilah...). Les communautés vivantes des zones humides ont révélé des originalités variables en fonction des catégories. Les eaux intérieures présentent une forte proportion d'espèces endémiques de l'Afrique du Nord, du Maroc, voire d'un seul écosystème.

III.2. Enjeux associés à l'émergence de l'IA

Les oiseaux migrateurs peuvent être des vecteurs pour la dissémination de diverses maladies contagieuses. Ainsi, l'apparition de la grippe aviaire hautement pathogène en Asie, sa propagation vers nombre de pays de l'est de l'Europe et son extension à l'ensemble de la planète, ainsi que les possibles conséquences d'une pandémie humaine, rendent nécessaire l'adoption d'une stratégie visant à détecter et à circonscrire tout foyer d'influenza aviaire.

Le Maroc, par sa position à la croisée de plusieurs voies de migration de l'avifaune entre l'Europe et l'Afrique, est le pays d'Afrique du Nord le plus visité par les oiseaux. Des millions d'oiseaux migrateurs transitent par ses zones humides pour rejoindre, depuis leurs aires de reproduction, les quartiers d'hivernage en Afrique saharienne ou tropicale plus au sud. Les zones humides côtières, qui ont globalement une grande taille, accueillent la grande majorité de ces migrateurs.

.

Les zones humides sont des milieux hautement productifs et relativement instables qui hébergent des peuplements d'animaux et de végétaux très diversifiés et exceptionnels, permettant ainsi le

maintien d'une bonne diversité biologique. Ces milieux offrent également d'importantes potentialités halieutique, pastorales, agricoles et touristiques, qui leurs permettent de jouer un rôle prépondérant dans les stratégies de développement socio-économiques durables.

Adoptée en 1971 dans la ville iranienne du même nom, la convention de RAMSAR, ratifiée par le Maroc le 20 Octobre 1980, est un traité intergouvernemental qui a pour objectif la conservation et la gestion des zones humides et de leurs ressources. En 2020, le Maroc avait inscrit 38 sites sur la liste des zones humides d'importance internationale (Sites Ramsar), pour une superficie totale de 316 086 hectares. Les quatre premières zones humides d'importance internationale ont été inscrites en 1980, il s'agit de la lagune de Merja Zerga, la lagune de Khifiss, le lac Afenourir et la Merja de Sidi Boughaba, douze nouvelles ont été inscrites en 2019.

La majorité des sites Ramsar marocains, sont représentés par des milieux lagunaires ou estuariens (une dizaine de sites) (Merja Zerga, lagune de Khnifiss, lagune de Nador et lagune de Smir, Sidi Moussa Oualidia, les embochures des oueds de Moulouya, Loukos, Tahadart, Sous massa, D'raa...). Les sites marins et côtiers, les cours d'eau et les lacs continentaux sont représentés par une vingtaine de sites, répartis équitablement entre les trois catégories. Le reste des zones est constitué par des lacs de barrage (zones humides artificielles), des oasis des Sebkhass....

Ces zones humides constituent des lieux de prédilection pour l'hivernage, l'escale et la reproduction d'un important contingent d'oiseaux migrateurs. Elles assurent un environnement propice pour leur alimentation et leur reproduction. Malheureusement la plupart de ces sites montrent des signes de détériorations avancés, suite aux exploitations non raisonnées de leurs ressources naturelles. Cette dégradation entraîne souvent des pertes et/ou des transformations des habitats naturels, qui se traduit, non seulement, par une chute de la biodiversité et au déclin dramatique des populations naturelles, mais également par le déplacement de ces populations vers des zones occupées par l'Homme, favorisant ainsi la promiscuité avec la volaille et les animaux domestiques, particulièrement avec le porc qui semble représenter le maillon d'adaptation et de transmission, par excellence, des virus de l'influenza aviaire à l'Homme. Les stratégies d'aménagement des territoires devraient ainsi être élaborées en atténuant les conséquences négatives de l'extension de l'agriculture et tiendraient compte de la préservation des habitats naturels des différents peuplements d'oiseaux.

III.3. Rôle de la faune sauvage dans la circulation de l'IA

Bien qu'en constante évolution et se basant sur des analyses phylogénétiques, les virus de la grippe aviaire auraient pour hôte originel l'avifaune aquatique. Les oiseaux sauvages représentent un réservoir naturel des virus de l'influenza aviaire faiblement pathogènes qui semblent ne leur occasionner aucune manifestation morbide, les souches hautement pathogènes ne sont que rarement isolées chez ces espèces.

Les individus des espèces infestées excrètent le virus en grande quantité dans leurs matières fécales contaminant ainsi, les étendues d'eau (lacs, rivières...), et favorisant, à proximité des aires géographiques exploitées par l'homme, sa transmission aux volailles et autres mammifères domestiques (porcs, chevaux, humains,...). Le rétrécissement des zones humides naturelles suite aux activités anthropiques envahissantes, engendre une concentration des oiseaux sur des surfaces restreintes et augmente le risque de transmission et de propagation des virus.

III.4. Importance de la surveillance de l'avifaune sauvage

La mise en place de programme de surveillance des oiseaux sauvages, notamment le long des principales voies migratoires, permet de déterminer leur rôle potentiel dans la propagation des virus de l'influenza aviaire. Parmi les nombreuses espèces migratrices, les oiseaux d'eau semblent ceux qui hébergent le plus communément les virus de l'influenza aviaire et représentent donc une cible pertinente pour la surveillance active de ces virus. Celle-ci repose sur un programme de prélèvement des oiseaux migrateurs, en étroite collaboration entre les services vétérinaires, les agents du haut-commissariat aux Eaux et Forêts et les laboratoires vétérinaires qui réalisent les analyses pour la détection des différentes souches du virus, en particulier durant les périodes où des mortalités inexplicables sont observées.

III.5. Sites d'études

III.5.1. Merja Zerga ou Lagune de Moulay Bousselham

Le site Ramsar de Merja Zerga (ou lagune de Moulay Bousselham), est une réserve biologique située sur la côte nord-atlantique marocaine, près du village balnéaire de Moulay Bousselham, à environ 75 Km au nord de la ville de Kénitra et 35 Km au sud de la ville de Larache. Sa position

géographique est 34° 31' N, 6° 10' W. La lagune de Merja Zerga a une forme elliptique qui s'étend sur 9 Km de long et 5 Km de large avec des profondeurs allant de 0,5 à 1,5 m observée au niveau des chenaux (Benhoussa et al. 1999). Elle est d'origine essentiellement tectonique et occupe une dépression d'environ 5000 ha située à la limite nord de la plaine du Gharb et près de la marge sud-ouest de la chaîne montagneuse du Rif. Elle constitue la plus importante zone humide marocaine pour la migration, l'hivernage et la reproduction des oiseaux. En période d'hivernage; le site héberge en moyenne entre 100 et 180 000 oiseaux d'eau, dont près de 60 000 ansériformes (19 espèces) et plus de 100 000 Limicoles (25 espèces régulières). Trois espèces d'anatidés (*Tadorna tadorna*, *Anas penelope* et *Anas clypeata*) et 8 de Limicoles (*Recurvirostra avosetta*, *Charadrius hiaticula*, *Charadrius alexandrinus*, *Pluvialis squatarola*, *Calidris minuta*, *Calidris alpina*, *Limosa limosa* et *Numenius tenuirostris*) répondent au critère 6 de sélection de la Convention de Ramsar (abrite, habituellement, un effectif dépassant le 1% de l'effectif régional).



Figure 13: Image satellitaire de la lagune de Merjza Zerga issue de Google Maps

En période migratoire, c'est un site-clé d'escale pour les oiseaux d'eau du Paléarctique occidental qui utilisent la voie de migration Est-atlantique (Benhoussa et al. 1999).

III.5.2. La lagune de Sidi Moussa

La lagune de Sidi Moussa est située sur la côte atlantique marocaine, à approximativement 37 Km au sud de la ville d'El Jadida. Elle se caractérise par une forme allongée, sa superficie totale est estimée à 4,2 Km². La lagune se présente sous forme d'une bande rectiligne parallèle à la côte de 5.5 Km de long et de 0.5 Km de large. La profondeur maximale de la lagune est d'environ 2.5 m (Maanan 2003). Cette zone humide souffre de la surexploitation de ses ressources par les activités humaines telles que : la pêche artisanale, l'extraction des sels dans les salines en amont de la lagune et surtout la récolte des mollusques bivalves qui représente une activité principale pour la population dans cette zone (Rafik 1991).



Figure 14: Image satellitaire de la lagune de Sidi Moussa issue de Google Maps

III.5.3. La lagune de Oualidia



Figure 15: Image satellitaire de la lagune de Oualidia issue de Google Maps

La lagune de Oualidia est située sur la côte atlantique marocaine à 75 Km au sud de la ville d'El Jadida et à 65 Km au nord de la ville de Safi ($32^{\circ}52'0''\text{N}/8^{\circ}51'05''\text{W}$). Elle se caractérise par une forme allongée plus ou moins parallèle à la côte. Sa longueur est de 7 Km et sa largeur est de 0,5 Km et sa superficie totale est estimée 3.5 Km².

La lagune de Oualidia forme avec la lagune de Sidi Moussa le complexe humide Sidi Moussa-Oualidia qui a été identifié comme Site d'intérêt biologique et écologique (SIBE) et puis inscrit comme site Ramsar en 2005 (Hilmi et al. 2005). Ce complexe lagunaire accueille chaque hiver, en moyen, 15 335 individus d'oiseau d'eau, soit plus de 3% du peuplement hivernant au Maroc. Ce contingent compte parmi son effectif des espèces possédant un statut de conservation particulier notamment, la Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris*, Goéland d'audouin *Larus audouinii*, Spatule blanche *Platalea leucorodia*. Plusieurs autres espèces utilisent régulièrement le site comme lieu de reproduction, il s'agit de *Marmaronetta angustirostris*, *Nycticorax nycticorax*, *Rallus aquaticus*, *Netta rufina*, *Turnix sylvatica*, *Porzana pussilla*, *Fulica cristata*, *Recurvirostra avosetta*, *sterna nilotica*, *Burhinus oedicnemus*, *Asio capensis* et *Circus pygargus*.

III.5.4. La lagune de Khnifiss

La lagune de Khnifiss, appelée aussi baie de Khnifiss ou de Naïla, est la plus grande lagune atlantique marocaine (20 000 ha) avec une superficie de 65 km², située dans le Sud-Ouest du Maroc (28°03' Nord, 12°15' Ouest) à 120 km au sud-ouest de Tantan et à 70 km au nord-est de Tarfaya. C'est une zone humide saharienne inscrite sur la liste de la Convention de Ramsar en 1980. Elle a été classée comme Site d'Intérêt Biologique et Ecologique dans le Plan Directeur des Aires Protégées, puis identifiée comme Zone d'Importance pour la Conservation des Oiseaux (Lefrere 2012).



Figure 16: Image satellitaire de la lagune de Khnifiss issue de Google Maps

Durant la période d'hivernage la lagune de khnifiss abrite souvent plus de 20 000 oiseaux d'eau vérifiant ainsi le «critère 5» de la convention de Ramsar. Parmi les espèces hivernantes, plusieurs ayant un effectif qui dépassent le seuil 1% de leurs populations régionales, notamment le Grand Cormoran marocain *Phalacrocorax carbo maroccanus*, la Tadorne casarca *Tadorna ferruginea*, le Flamant rose *Phoenicopterus ruber*, la Spatule blanche *Platalea leucorodia*, le Grand Gravelot *Charadrius hiaticula*, le Gravelot à collier interrompu *Charadrius alexandrinus*, la Barge rousse *Limosa lapponica*, le Bécasseau maubèche *Calidris canutus*, le Bécasseau sanderling *Calidris alba* et le Bécasseau minute *Calidris minuta*, (critère 6 de la convention de Ramssar).

III.5.5. La lagune de Smir

La lagune du Smir est une zone humide méditerranéenne, située dans le nord-ouest du Maroc, près de la petite ville de M'diq, à 25 Km au sud de Gibraltar, sa position géographique est ($35^{\circ}43'N$ and $5^{\circ}20'W$). Elle couvre une surface de 3 Km² avec une profondeur maximale de 2,5 m et moyenne de 1,5 m. Le complexe humide de Smir a été classé comme Site d'intérêt biologique et écologique (SIBE) en 1996 et puis inscrit comme Zone Humide d'importance Internationale sur la liste de la Convention de Ramsar en 2019.



Figure 17: Image satellitaire de la lagune de Smir issue de Google Maps

III.5.6. Complexe des zones humides du Bas Loukkos

Le complexe de zones humides du bas Loukkos se situe dans le Nord-Ouest du Maroc ($35^{\circ} 07'N$ et $06^{\circ} 00'W$) à l'extrême ouest de la région pré-rifaine, à proximité de la ville de Larache ; il s'étend le long de la rivière du Loukkos, dans une plaine alluviale allongée du Sud-Est vers le Nord-Ouest, de 40 km de longueur et de 5 à 10 km de largeur moyenne. Couvrant une superficie d'environ 3600 ha, ce complexe est constitué par le cours de l'oued Loukkos, un ensemble de marais d'eau

douce (Boucharène - Aïn Chouk en particulier et marécage de Doukkala-Oulad Mesbah) envahis par une végétation aquatique haute (Dakki et al. 2011).

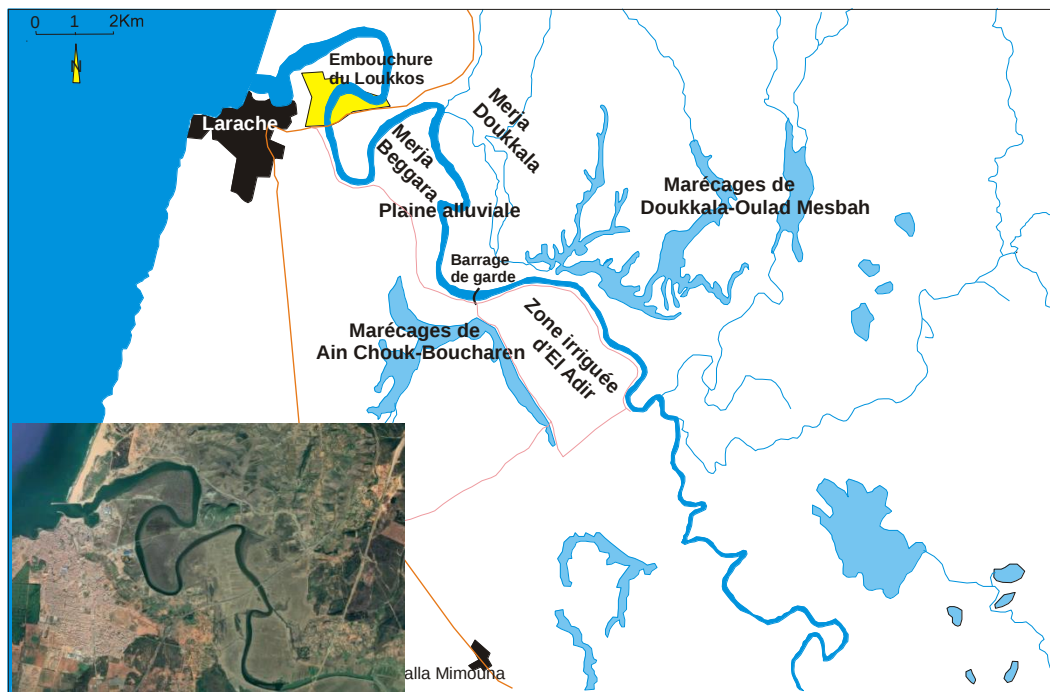


Figure 18: Image satellitaire et unités hydrologique du complexe des zones humides du Bas Loukkos (BENHOUSSA et al.)

Un important contingent d’oiseau d’eau fréquente régulièrement le site, il compte parmi son effectif, une dizaine d’espèces menacées ou vulnérables notamment, Butor étoilé *Botaurus stellaris*, Crabier chevelu *Ardeola ralloides*, Héron pourpré *Ardea purpurea*, Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris*, Nette rousse *Netta rufina*, Talève sultane *Porphyrio porphyrio*, Hibou du cap Asio *asio capensis*, Bruant des roseaux *Emberiza schoeniclus*...

En période d’hivernage, plusieurs espèces fréquentent le site avec un nombre d’individus, qui dépasse le 1% de l’effectif de leurs populations régionales (Critère 6 de la convention de Ramsar), il s’agit de Barge à queue noire *Limosa limosa* et Spatule blanche *Platalea leucorodia*, Foulque à crête *Fulica cristata*, Echasse blanche *Himantopus himantopus*). Ce complexe de zones humide constitue également un lieu de nidification de plusieurs espèces d’oiseau remarquables, notamment Butor étoilé *Botaurus stellaris*, Bruant des roseaux *Emberiza schoeniclus*, Foulque à crête *Fulica cristata*, Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris*, Blongios nain *Ixobrychus minutus*, Hibou du cap Asio *asio capensis*.....

III.5.7. L'embouchure de la Moulouya

L'embouchure de la Moulouya correspond à un complexe estuarien du plus long cours d'eau marocain, il fait près de 2000 hectares. Il prend naissance dans le Grand Atlas, traverse la chaîne rifaine et se termine en un large système estuarien sur la côte méditerranéenne, son bassin versant s'étale sur une superficie de l'ordre de 58 500 km². L'estuaire de la Moulouya se situe dans le Maroc Nord-Oriental (entre les latitudes 35°03'N et 35°08'N et entre les longitudes 02°19'NW et 02°26'W), il est cerné par les montagnes des Béni Snassene-Bni Bou Yahia et de Kebdana. Ses apports en eaux sont contrôlés par les deux barrages Mohammed V et Mechra' Hammadi, situés à l'ouest des Béni Snassene. La Moulouya conserve son cours permanent malgré qu'elle soit retenue en amont par ces deux barrages. Elle est longée par la plus grande tamarigaie de son genre dans le pays (*Tamarix canariensis*), et de part et d'autre de son embouchure se développe la plus grande sansouïre marocaine à *Arthrocnemum macrostachyum*. Cette zone a été choisie comme SIBE et elle a été inscrite sur la liste de la convention de Ramsar en 2003 (Dakki et al. 2003).



Figure 19: Image embouchure de l'Oued Moulouya

Le peuplement avien qui fréquente ce milieu paralique, compte parmi son effectif 2 espèces menacées ou considérées comme telles et 27 espèces rares à l'échelle du Maroc, (El Agbani et al. 2002). Le site abrite également des espèces d'intérêt mondial notamment le Rougequeue de Moussier *Phoenicurus moussieri*, (Espèce endémique nord-africaine), le Goéland d'Audouin

Larus audouinii (espèce semi-menacé), la Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris*, (taxon vulnérable). Notons également qu'une vingtaine d'espèces utilisent les différents habitats du site pour se reproduire (la Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris*, le Butor étoilé *Botaurus stellaris*, le Crabier chevelu *Ardeola ralloides*, le Héron pourpré *Ardea purpurea*, la Talève sultane *Porphyrio porphyrio*, le Râle d'eau *Rallus aquaticus*, la Locustelle lusciniöide *Locustella luscinioides*, le Bruant des roseaux *Emberiza schoeniclus*, l'Avocette élégante *Recurvirostra avosetta*, le Busard cendré *Circus pygargus*, la Sterne naine *Sterna albifrons*....

III.5.8. Les Oasis de Tafilalet



Figure 20: Image satellitaire des Oasis de Tafilalet issue de Google Maps

Les Oasis de Tafilalt, considérées parmi les plus grandes oasis du Maroc, se situent au sud du Haut Atlas oriental au nord et à l'est de l'Anti Atlas, entre les latitudes Nord 31°00' - 32°00' et les longitudes 04°05' - 05°00', correspondent à un complexe de zones humides présahariennes constitué de plusieurs unités hydrologiques réparties le long des vallées du Ziz et du Ghris.

Proposées depuis quelques années comme réserves de biosphère, elle fut récemment inscrite sur la Liste Ramsar des Zones Humides d'Importance Internationale. Les oasis de Tafilalt représentent

un écosystème très particulier, puisqu'elles se présentent comme couloir humide au sein d'un paysage aride.

III.5.9. L'Archipel et Dunes d'Essaouira

Le Site de l'Archipel et des Dunes d'Essaouira, d'une superficie de 4.000 ha, est un site côtier atlantique dont la partie insulaire (avec ou sans la partie dunaire) a été classée réserve de chasse en 1962, réserve biologique permanente en 1980, identifiée comme Site d'intérêt biologique et écologique (SIBE) en 1996 et puis classée comme Zone Humide d'importance Internationale sur la liste de la Convention de Ramsar en 2005.



Figure 21: Image satellitaire de l'Archipel et dunes d'Essaouira issue de Google Maps

Il abrite actuellement la plus importante et la plus dense colonie de Faucon d'Eléonore (environ 1.500 couples en 2018 et 2019), espèce considérée pourtant comme typiquement méditerranéenne et dont l'ensemble de la population migre vers Madagascar pour hiverner.

L'Archipel abrite plusieurs autres populations d'oiseaux dont le Grand leucophé *Larus cachinans*, dont la population nicheuse au niveau de l'archipel compte environ 4000 couples, le Grand

cormoran marocain *Phalacrocorax carbo* ssp. *maroccanus*, (espèce endémique du pays) qui niche régulièrement au niveau du site avec plus de 60 couples.

III.5.10. La baie de Dakhla

La baie de Dakhla est située au sud du Maroc sur la façade atlantique du Sahara. Sa position géographique est entre les points 23°35'N-16°00'W et 23°55'N-15°45'W. Elle constitue un environnement littoral particulier, c'est une baie relativement étroite, ouverte au sud sur l'Océan Atlantique, avec une longueur de 37 Km et une largeur comprise entre 10 et 12 km.

La baie a été classée comme Site d'intérêt biologique et écologique (SIBE) en 1995, identifiée comme site ornithologique important et puis inscrite sur la liste Ramsar en 2005.

Selon les critères de Ramsar, la baie de Dakhla est un site unique en Afrique du Nord, il sert à la fois comme escale pour la migration et l'hivernage et le nichage pour des milliers d'oiseaux aquatiques (Qninba et al. 2003).



Figure 22: Image satellitaire de la baie de Dakhla issue de Google Maps

La baie d'Ad-Dakhla est le deuxième meilleur site d'hivernage des oiseaux d'eau au Maroc, il accueille, en effet, chaque année un peuplement de Limicoles qui compte plus 20.000 individus (critère 5 de la convention de Ramsar), ce contingent est dominé par le Bécasseau variable *Calidris alpina*, la Barge rousse *Limosa lapponica* et le Bécasseau maubèche *Calidris canutus*. Le site est fréquenté également, durant cette période, par 20.000 Laridés en particulier Goéland brun *Larus fuscus* et Goéland d'Audouin *L. audouinii*. La baie constitue également un lieu de choix pour la nidification du Gravelot à collier interrompu *Charadrius alexandrinus*, du Grand Cormoran marocain *Phalacrocorax carbo maroccanus*, et du Courvite isabelle *Cursorius cursor* (Qninba et al. 2005).

III.5.11. Le lac Sidi Boughaba

Le site est situé sur la rive gauche de l'embouchure de l'oued Sebou, à 13 km au sud de la ville de Kénitra, il est à cheval entre la commune urbaine de Mehdia et la commune rurale de Sidi Taïbi. Il a une forme allongée (6 km sur 300-800 m). Merja sidi Boughaba est un site de passage et d'hivernage de la plupart des oiseaux migrateurs transitant par la voie atlantique marocaine, il offre aussi un des meilleurs sites de nidification d'oiseaux, notamment de la Sarcelle marbrée, et l'Erismature à tête blanche l'espèce qui fut à l'origine de son inscription sur la liste Ramsar. Les espèces observées, entre autres, sont des foulques à crête, des grèbes huppés, des flamants roses, des canards souchets et des busards des roseaux. Le site abritant au moins deux populations importantes pour le maintien de la biodiversité : Hibou du Cap *Asio capensis*, Bihoreau gris *Nycticorax nycticorax*. Le site abrite également durant la période d'hivernage deux espèces dont l'effectif dépasse le seuil de 1% de l'effectif de leurs populations régionales respectives, il s'agit de la Foulque à crête *Fulica cristata* et de la Sarcelle marbrée *Marmaronetta angustirostris*.



Figure 23: Image satellitaire du lac Sidi Boughaba issue de Google Maps

III.5.12. Le lac Afenourir

Le lac Afenourir est classé « Site Ramsar » depuis 1980. C'est un lac naturel de haute altitude (1 798 m) d'origine karstique, qui s'étend sur 800 ha dans le Moyen Atlas où il fait partie du territoire du parc National d'Ifrane. C'est un lac de faible profondeur dont le socle est envahi par une végétation émergée, alors que ses berges sont occupées par une pelouse de montagne.

Le peuplement ornithologique du site compte environ une trentaine d'espèces, il est caractérisé par une importante population nicheuse et hivernante du Tadorne casarca *Tadorna ferruginea* (une dizaine de couples reproducteurs en moyen) et de la Foulque à crête *Fulica cristata* (AEFCS, 1996 ; Dakki & El Hamzaoui, 1998 ; Chillasse et al., 2000).



Figure 24: Image satellitaire du lac Afenourir issue de google Maps

III.5.13. Le lac Dayet Aoua

C'est le lac le plus réputé du Maroc. Son accès est très facile ; situé à 15 kilomètres au nord d'Ifrane. C'est un lac de 140 ha, sa superficie est variable selon les saisons. Sa profondeur reste faible, de quatre à cinq mètres à l'amont (ouest) et une partie avale (à l'est) envasée, d'aspect marécageux, exondable en été. C'est l'un des rares zones humides montagneuses avec des habitats bien variés (eau peu profonde, prairie humide, marécage à émergents, vasières et forêt).



Figure 25: Image satellitaire de daït Aoua issue de Google Maps

Chapitre II : Détection moléculaire du virus de l'Influenza aviaire chez les oiseaux sauvages au Maroc, 2016-2019.

1. Introduction

L'influenza aviaire (IA) est une zoonose importante qui représente une source majeure de préoccupation mondiale pour la santé publique et animale (Sorrell et al. 2009) ; elle affecte la volaille domestique, les oiseaux sauvages et les mammifères, y compris les humains. L'IA est causée par le virus de la grippe de genre A, membre de la famille des Orthomyxoviridae (Lamb 2001). Son génome se compose de huit segments d'ARN simple brin de sens négatif (Perdue 2008). Les virus de la Grippe A sont sous-typés selon les caractéristiques des deux glycoprotéines de surface : Hémagglutinine (HA) et Neuraminidase (NA). Jusqu'à présent, 16 HA (H1–H16) et 9 sous-types NA (N1–N9) ont été identifiés chez les oiseaux (Fouchier et al. 2005), tous chez les espèces aviaires dans diverses combinaisons (Swayne DE 2013.), parmi lesquels le H5, H7 et H9 qui sont les plus dangereux puisqu'ils affectent la volaille et d'une façon accidentelle l'homme. En outre, deux nouveaux sous-types, H17N10 (Tong et al. 2012) et H18N11 (Tong et al. 2013), ont été découverts chez les chauves-souris. Sur la base de la pathogénicité du virus lors de l'infection des volailles, les virus de l'influenza aviaire (VIA) sont classés en deux groupes : virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène (VIAFP) et virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (VIAHP). La pathogénicité varie selon les espèces aviaires, en particulier parmi les différentes espèces des oiseaux sauvages (Munster and Fouchier 2009; Webster et al. 1992).

Les virus de la grippe sont connus pour être fréquents chez la volaille domestique, les mammifères, y compris les humains. Les oiseaux sauvages, principalement les oiseaux aquatiques migrateurs sont considérés comme le réservoir naturel de l'ensemble des 16 HA et 9 NA des virus de l'IA (Webster et al. 1992; Hansbro et al. 2010). De nombreuses études dans le monde ont souligné que les oiseaux sauvages appartenant à l'ordre des Anseriformes (canards, oies et cygnes) et l'ordre des Charadriiformes sont les oiseaux les plus impliqués dans la persistance du VIA (Blagodatski et al. 2021). Cependant, des études récentes ont révélé une prévalence importante du VIA chez les oiseaux terrestres, qui a mis en évidence leur rôle potentiel dans la transmission des VIA (Cerdá-Armijo et al. 2020; Khawaja et al. 2005; Caron et al. 2014).

Bien que le premier isolement documenté du VIA chez des oiseaux sauvages soit survenu en Afrique (A/Tern/S.A./61 [H5N3]) (Becker 1966), il existe des lacunes dans les connaissances sur

l'écologie du VIA dans les zones tropicales (Webster et al. 1992; Olsen et al. 2006). Ainsi, le rôle des milieux tropicaux dans le maintien du VIA chez les oiseaux sauvages est resté une thématique sous-étudiée (Gaidet et al. 2012), si nous excluons un nombre limité de rapports décrivant la circulation des VIA chez les oiseaux sauvages à travers l'Afrique (Gaidet et al. 2007b; Caron et al. 2011; Cumming et al. 2011). En effet, les études sur la surveillance IA se concentrent sur l'Europe, l'Asie et de nombreuses régions d'Amérique, tandis que le continent Africain est majoritairement sous-représenté (Blagodatski et al. 2021). À notre connaissance, seules deux études à grande échelle sur le VIA en Afrique ont été menées, en 2006 et 2017, avec seulement 12 et 23 sur 54 pays participant respectivement à la première et la deuxième surveillances (Gaidet et al. 2007a; WHO 2017).

Les pays de l'Afrique du Nord servent de zones de migration printanière pour les espèces d'oiseaux sauvages. Des centaines de milliers d'oiseaux Africains subsahariens hivernants migrent chaque année vers leurs aires de nidification. Dans les zones humides nord Africaines, de mars à mai, des dizaines de milliers d'oiseaux aquatiques migrateurs Eurasiens se rassemblent avec les oiseaux aquatiques afro-tropicaux qui résident en Afrique du Nord toute l'année (OIE. 2021). D'où, les zones humides nord-africaines peuvent fournir un environnement pour la persistance du VIA au printemps et pour la réémergence de nouveaux VIA à travers le réassortiment entre plusieurs souches de VIA de diverses origines géographiques (OIE. 2021).

Une seule enquête sur le VIA a été menée au Maroc en 2006 ; l'étude portait uniquement sur deux zones humides (Marais de Loukkos et Oualidia), et moins de 150 oiseaux migrateurs aquatiques sauvages ont été collectés dans la durée de 12 jours. Le VIA a été trouvé chez 4 canards sauvages sur 30, alors que les informations sur les sous-types détectés ne sont pas disponibles (Gaidet et al. 2007a).

En janvier 2016, le Maroc a été confronté à la première épidémie d'IA causée par un sous-type de l'IA H9N2 faiblement pathogène chez la volaille. Une fois introduit, le virus s'est rapidement propagé dans tout le pays, causant des effets dévastateurs chez la volaille (El Houadfi et al. 2016). Des vaccinations d'urgence ont été appliquées à tous les secteurs de la production avicole. Les autorités ont annoncé le contrôle du virus en avril 2016 (El Houadfi et al. 2016). Les voies explorées d'introduction de virus, comme le commerce illégal de volaille vers le Maroc, le contact entre les oiseaux sauvages migrateurs et la volaille, et l'importation des oiseaux tels que les

Falconidae (faucons) des pays du Moyen-Orient n'ont pas été concluantes. Cependant, aucune information sur les VIA circulant chez les oiseaux sauvages n'est disponible.

Par conséquent, cette étude visait à chercher la présence de VIA chez 56 espèces d'oiseaux sauvages aquatiques et terrestres collectés sur 17 zones humides et six autres sites au Maroc le long des voies de migration Atlantique et continentale, qui relie l'Europe à la côte occidentale de l'Afrique, du Maroc à l'Afrique du Sud, et couvrant la période de 2016 à 2019 en utilisant la transcriptase inverse-PCR en temps réel (rRT-PCR) afin d'évaluer le risque d'éventuelles introductions du virus de l'IA chez la volaille.

2. Matériel et méthodes

2.1. Étude

Du début novembre 2016 à mi-mai 2019, des échantillons d'oiseaux sauvages ont été prélevés dans 17 zones humides et sites ornithologiques pertinents au Maroc. D'autres échantillons d'oiseaux sauvages ont été prélevés dans différents emplacements pendant la surveillance de routine du VIA. Les sites d'échantillonnage comprenaient les zones humides à proximité des zones où des épidémies d'IA causées par le H9N2 avaient été signalées chez les volailles en 2016 (Figure 26).

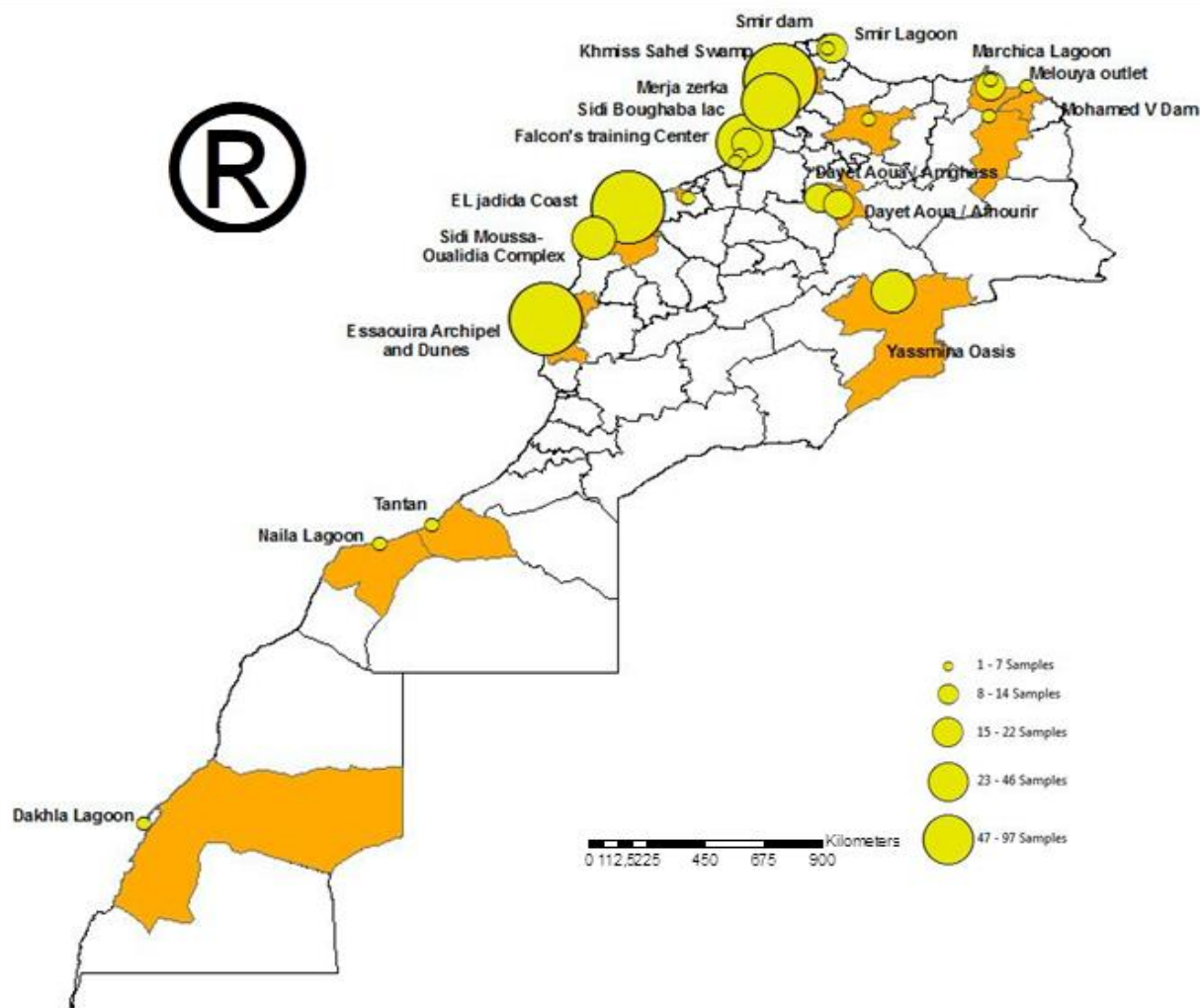


Figure 26: Localisation géographique des sites d'échantillonnage

Les espèces étudiées ont été choisies parmi les ordres d'oiseaux reconnus comme réservoirs majeurs d'AIV, notamment les oiseaux aquatiques migrateurs et les oiseaux terrestres dont les Ansériformes, Charadriiformes, Péléciformes et Passériformes (19 %, 25,4 %, 27,9 % et 14,2 %, respectivement (Tableau X p.92). Ces espèces ont été échantillonnées en fonction de leur abondance dans les zones humides et à l'accessibilité des sites (Tableau III).

Les activités d'échantillonnage sur le terrain ont été coordonnées par les services des eaux et forêts (Haut-Commissariat des Eaux et Forêts), les services vétérinaires relevant de l'Office National de la Sécurité Sanitaire des Aliments (ONSSA), les équipes locales d'ornithologues et les associations nationales de la chasse. Les échantillons ont été prélevés principalement pendant la saison froide (automne-printemps).

Tableau III : Sites, espèces prélevées et dates de prélèvement des échantillons des oiseaux sauvages

Site	Espèce	Nbre échantill ons	Date de prélèvements (2016-19)						Total Echanti llons/ Site
			Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars	Avril	
Khmiss sahel- Marais du Bas Loukoss	<i>Anas platyrhynchos</i>	52	(49) 12/11/2016	(2) 23/12/2016	11/01/2017				
	<i>Egretta garzetta</i>	1		21/12/2016					
	<i>Himantopus himantopus</i>	3		21/12/2016 28/12/2016	25/01/2017				
	<i>Bubulcus ibis</i>	1		28/12/2016					
	<i>Plegadis falcinellus</i>	2			05/01/2017				
	<i>Larus michahellis</i>	1			11/01/2017				
	<i>Tringa nebularia</i>	1			15/01/2017				
	<i>Actitis hypoleucos</i>	1			15/01/2017				
	<i>Nycticorax spp</i>	1			25/01/2017				
	<i>Thalasseus sandvicensis</i>	1			29/01/2017				
	<i>Pluvialis squatarola</i>	2				03/02/2017 08/02/2017			
	<i>Calidris minuta</i>	2				08/02/2017 13/02/2017			
	<i>Haematopus ostralegus</i>	2				08/02/2017 13/02/2017			
	<i>Numenius phaeopus</i>	1				15/02/2017			
	<i>Actitis macularius</i>	1				15/02/2017			
	<i>Numenius arquata</i>	1				22/02/2017			
	<i>Calidris pusilla</i>	1				22/02/2017			
	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	2					02/03/2017 12/03/2017		
	<i>Tringa totanus</i>	1					02/03/2017		
	<i>Spatula clypeata</i>	1					12/03/2017		
	<i>Fulica cristata</i>	1					13/03/2017		

	<i>Chroicocephalus philadelphia</i>	1		13/03/2017	80
Côte EL jadida	<i>Bubulcus ibis</i>	78	(26) 20/12/2017 (22) 26/12/2017	(30) 11/04/2018	78
Lac Afennourir	<i>Fulica atra</i>	8	(2) 23/12/2016 (2) 28/12/2016 (2) 29/12/2016	(2) 05/01/2017	8
Lagune Merja Zerga	<i>Spatula clypeata</i>	1	23/12/2016		
	<i>Anas crecca</i>	2	28/12/2016 29/12/2016		
	<i>Phalacrocorax carbo</i>	3	29/12/2016	05/01/2017 11/01/2017	
	<i>Egretta garzetta</i>	1		05/01/2017	
	<i>Larus michahellis</i>	1		05/01/2017	
	<i>Himantopus himantopus</i>	1		11/01/2017	
	<i>Vanellus vanellus</i>	1		11/01/2017	
	<i>Recurvirostra avosetta</i>	1		19/01/2017	
	<i>Pluvialis squatarola</i>	2		19/01/2017	01/02/2017
	<i>Calidris minuta</i>	1		25/01/2017	
	<i>Charadrius alexandrinus</i>	1		25/01/2017	
	<i>Tringa totanus</i>	1			01/02/2017
	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	1			16/02/2017
	<i>Plegadis falcinellus</i>	1			16/02/2017
	<i>Anas platyrhynchos</i>	1			22/02/2017
	<i>Ardea cinerea</i>	1			22/02/2017
		21		(2) 14/02/2019 (3) 14/01/2019 (3) 15/01/2019	(4) 20/02/2019 (8) 28/03/2019
	<i>Passer domesticus</i>				41
Lagune Sidi Boughaba	<i>Phalacrocorax carbo</i>	4	(2) 23/12/2016 (2) 28/12/2016		
	<i>Leucocarbo albiventer</i>	1	29/12/2016		

Dait Aoua / Amghass	<i>Spatula clypeata</i>	11	23/12/2016 28/12/2016 29/12/2016	05/01/2017 19/01/2017 25/01/2017	(2) 01/02/2017 10/02/2017 16/02/2017 22/02/2017		
	<i>Aythya ferina</i>	6		11/01/2017 19/01/2017 25/01/2017	01/02/2017 10/02/2017 16/02/2017		
	<i>Pica Pica</i>	24		(4) 05/01/2019	(7) 11/02/2019 (3) 27/02/2019	(4) 15/03/2019 (6) 25/03/2019	46
	<i>Aythya ferina</i>	2	29/12/2016		01/02/2017		
	<i>Spatula clypeata</i>	4		05/01/2017 12/01/2017	(2) 08/02/2017		
	<i>Podiceps nigricollis</i>	3		(2) 18/01/2017	08/02/2017		
	<i>Leucocarbo albiventer</i>	1			01/02/2017		
	<i>Anas platyrhynchos</i>	1			17/02/2017		11
	<i>Fulica atra</i>	1	21/12/2016				
	<i>Himantopus himantopus</i>	3	21/12/2016 28/12/2016	10/01/2017			
Complexe Sidi Moussa- Oualidia	<i>Calidris minuta</i>	4	(2) 28/12/2016	04/01/2017 18/01/2017			
	<i>Charadrius hiaticula</i>	1		04/01/2017			
	<i>Chroicocephalus genei</i>	1		10/01/2017			
	<i>Chroicocephalus cirrocephalus</i>	1		18/01/2017			
	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	3			08/02/2017	07/03/2017 23/03/2017	
	<i>Tringa totanus</i>	3			08/02/2017 28/02/2017	14/03/2017 23/03/2017	
	<i>Arenaria interpres</i>	3			28/02/2017	07/03/2017	
	<i>Gallinago gallinago</i>	1				14/03/2017	
	<i>Tringa nebularia</i>	1				29/03/2017	23
	<i>philomachus pugnax</i>	1					

Archipel et dunes d'Essawira	<i>Larus marinus</i>	55	(10) 04/01/2018 (5) 16/01/2018 (5) 20/01/2019	(8) 07/02/2018 (9) 20/02/2018 (3) 08/02/2019	(7) 12/03/2018 (6) 31/03/2018 (2) 10/03/2019	
	<i>Bubulcus ibis</i>	42	(4) 04/01/2018 (5) 16/01/2018 (4) 20/01/2019	(4) 07/02/2018 (3) 20/02/2018 (5) 08/02/2019	(4) 12/03/2018 (6) 31/03/2018 (7) 10/03/2019	97
Barrage Mohamed V	<i>Phalacrocorax carbo</i>	1	22/12/2016			
	<i>Anas crecca</i>	1		04/01/2017		
	<i>Aythya nyroca</i>	1		04/01/2017		
	<i>Spatula clypeata</i>	1		12/01/2017		4
Lagune AD-Dakhla	<i>Larus marinus</i>	1			01/02/2017	1
Lagune Smir	<i>Fulica atra</i>	4	(2) 10/01/2017 27/12/2016 23/01/2017			
	<i>Anas platyrhynchos</i>	4		04/01/2017 31/01/2017	08/02/2017 08/03/2017	
		4			08/02/2017 14/02/2017	
	<i>Plegadis falcinellus</i>				28/02/2017 08/03/2017	
	<i>Fulica Spp</i>	2			14/02/2017 28/02/2017	14
Barrage Smir	<i>Himantopus himantopus</i>	4	23/12/2016 27/12/2016	23/01/2017 31/01/2017		
	<i>Larus michahellis</i>	2	23/12/2016	04/01/2017		6
	<i>Spatula clypeata</i>	2	22/12/2016	04/01/2017		
Embouchure Melouya	<i>Fulica atra</i>	5	(2) 22/12/2016	(2) 04/01/2017 12/01/2017		7
Lagune Marchika	<i>Bubulcus ibis</i>	2	22/12/2016	03/01/2017		
	<i>Pluvialis apricaria</i>	4		03/01/2017 22/12/2016	(2) 12/01/2017	6
Lagune Naila (Khnifiss)	<i>Leucocarbo albiventer</i>	1	11/11/2016			1

Oasis yassmina		7					(2) 13/04/2019		
	<i>Passer domesticus</i>						(2) 17/04/2019		
							(2) 27/04/2019	10/05/2019	
	<i>Ficedula hypoleuca</i>	4					13/04/2019		
	<i>Luscinia megarhynchos</i>	2					13/04/2019		
		2					12/04/2019		
	<i>Phylloscopus collybita</i>						14/04/2019		
		2					13/04/2019		
	<i>Phylloscopus bonelli</i>						14/04/2019		
	<i>Lanius senator</i>	1					13/04/2019		
	<i>Sylvia communis</i>	1					13/04/2019		19
Sidi El Makhfi	<i>Mareca strepera</i>	1		25/01/2017					1
Côte Tantan	<i>Phoenicopterus roseus</i>	1	28/11/2016						1
Casablanca	<i>Falco spp</i>	6	25/11/2016						6
Kenitra	<i>Falco spp</i>	10		02/12/2016					10
Salé	<i>Falco spp</i>	6	23/11/2016						6
Rabat	<i>Buphagus erythrorhynchus</i>	4		01/12/2016					4
Saidia	<i>Other unidentified species</i>	10	03/11/2016						10
Total		73		102	100	90	66	48	1 480

2.2. Échantillonnage

2.2.1. Collecte d'échantillons

Des écouvillonnages cloacaux et trachéaux ont été prélevés sur 239 oiseaux vivants capturés dans des pièges par des ornithologues, tandis que les vétérinaires ont échantillonné un oiseau blessé et 22 faucons vivants importés des pays du Moyen-Orient (Qatar et Émirats Arabes Unis). Ces faucons importés sont relâchés dans la nature pour la chasse aux pigeons et sont maintenus dans des installations d'élevage et de formation de faucons en contact avec d'autres espèces aviaires, ce qui en fait une source potentielle de VIA pour la volaille. Cinquante-quatre échantillons de déjections fraîches ont été également collectés à des aires de repos pour une population résidente d'Hérons garde-bœufs, une colonie d'oiseaux en contact permanent avec les oiseaux migrateurs sauvages à proximité des élevages avicoles. Les échantillons de fèces ont été prélevés dans l'environnement avec un coton-tige stérile et placés dans un sachet individuel. Sur un total de 218 oiseaux morts, 202 avaient été abattus par les chasseurs et 16 ont été retrouvés morts et recueillis par les vétérinaires pendant les activités de surveillance de l'IA pendant la période de l'automne-hiver 2016-2017 ; parmi eux, 10 étaient des espèces d'oiseaux sauvages non identifiées.

Lors de la collecte, les carcasses d'oiseaux et les écouvillons trachéaux et cloacaux qui sont prélevés des oiseaux vivants, ainsi que les échantillons de matières fécales, ont été immédiatement envoyés au laboratoire ou stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 24 heures. Les échantillons ont été transportés à température réfrigérée et immédiatement traités dès leur réception au laboratoire. Les échantillons d'oiseaux morts incluaient des écouvillons trachéaux et cloacaux ainsi que des échantillons d'organes, y compris la trachée, le poumon, le cœur, le foie, la rate, le gésier, le proventricule, le pancréas, l'intestin, les reins et le cerveau suivant les recommandations de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE. 2021). Au total, 967 échantillons ont été examinés, dont 374 écouvillons cloacaux, 321 écouvillons trachéaux, 54 échantillons fécaux et 218 mélanges d'organes de 480 oiseaux de 56 espèces d'oiseaux sauvages différentes.

2.2.2. Préparation, traitement et conservation des échantillons

A la réception au laboratoire les échantillons sont stockés à une température entre 2 et 8 °C jusqu'à analyse dans les plus brefs délais (moins de 24h). Pour une longue conservation, les échantillons doivent être conservé <-65°C. Les échantillons peuvent être traités en mélange ou en individuel.

A-Préparation

1-Cadavres d'oiseaux

Examen post-mortem

Les cadavres sont traités à la salle d'autopsie pour effectuer les prélèvements nécessaires destinés aux examens virologiques dans des conditions de biosécurité rigoureuse avec les précautions recommandées.

L'oiseau est placé sur le dos, les pattes dirigées vers l'opérateur et l'autopsie est réalisée en procédant comme suit :

- Mouiller le plumage à l'aide d'une solution désinfectante, afin de limiter la dispersion des poussières et des plumes qui risquent d'être contaminées ;
- Effectuer un déboîtement des articulations coxo-fémorales, inciser la peau de l'abdomen et la rabattre. Les muscles abdominaux, les côtes et l'os coracoïde sont découpés à l'aide de ciseaux robustes et écartés afin d'exposer les organes internes et la cavité de la poitrine ;
- Retirer avec précaution les poumons, le cœur ainsi que la trachée de la cage thoracique ;
- Sectionner le tractus gastro-intestinal entre l'œsophage et le proventricule et près du cloaque, à proximité du rectum. Le proventricule, le gésier et l'intestin sont prélevés, ainsi que le pancréas, le foie, la rate et les reins et à la fin le cerveau est prélevé (Figure 27).



Figure 27: Images illustrant l'opération de l'autopsie des oiseaux sauvages pour le prélèvement des échantillons (Organes, écouvillons trachéaux et cloacaux)

2-Organes

Les tissus sont coupés en petits morceaux avec des pinces et ciseaux. La prise d'essai est de 150-200 mg du matériel biologique dans des tubes stériles contenant une solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Ils ont été analysés en mélange par oiseau.

3-Ecouvillons

A la réception des écouvillons une désinfection de la surface est réalisée, ensuite ils sont immergés dans des tubes eppendorffs contenant une quantité suffisante du PBS pour assurer une immersion complète et avoir suffisamment de matériel biologique pour les tests moléculaires et éventuellement l'isolement viral. Les écouvillons ont été analysés en individuel.

4-Matières fécales

On place l'échantillon (1g) dans un tube stérile et on ajoute 1 ml du PBS. Les matières fécales ont été analysées en individuel.

B-Traitement et conservation

Les écouvillons trachéaux et cloacaux, ainsi que les échantillons de fèces et les mélanges d'organes, ont été mis dans 1 ml du PBS, pH 7,4 +/- 0,2, contenant 10 000 UI/ml de pénicilline, 10 mg/ml de streptomycine, 0,25 mg/ml de gentamycine et 5 000 UI/ml de nystatine et incubés pendant 2 heures à une température entre 2 et 8 °C. Les échantillons d'organes et de matières fécales ont été rapidement transférés dans des tubes stériles contenant des billes d'acier inoxydable et homogénéisés à 3000 g pendant 3 min par l'homogénéisateur « Bead Blaster 24 Homogenizer »

(Benchmark Scientific, 2600, Sayreville, NJ). Les fluides d'écouvillonnage et les homogénats ont été ensuite clarifiés par centrifugation à 1500 g pendant 3 min pour éliminer les solides en suspension. Cette étape est optionnelle pour les écouvillons trachéaux mais elle est fortement recommandée pour les écouvillons cloacaux, les mélanges d'organes et les fèces. Les surnageants ont été conservés à -80°C jusqu'à analyse ultérieure.

2.3. Extraction de l'ARN

Les étapes de l'extraction sont identiques pour les différents types de matrice après suspension en PBS et clarification. Toutes les préparations et manipulations des réactifs se font sous Poste de Sécurité Microbiologique type II (PSM). L'ARN a été extrait directement des surnageants des échantillons, y compris les mélanges d'organes, à l'aide d'un Kit d'extraction manuelle à base de colonnes de silice pour les virus à ARN « NucleoSpin RNA Virus » (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). L'extraction a été réalisée selon les instructions du fabricant. Brièvement, 150 µl du la suspension d'échantillon a été incubée avec 600 µl de tampon de lyse RAV1 additionné d'ARN carrier à 70 °C pendant 5 min. Après incubation, 600 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés au lysat. Ensuite, la totalité du volume de l'échantillon a été transféré à la colonne de silice pour centrifugation. L'échantillon a ensuite été lavé et centrifugé selon les recommandations du fabricant. Enfin, l'ARN a été élué dans 50 µl d'eau sans nucléase fournie dans le kit et conservé à - 80 C. La préparation des réactifs et les étapes de l'extraction des ARN sont détaillées dans l'Annexe I.

2.4. RT-PCR en temps réel basée sur TaqMan

Une technique moléculaire utilisant La rRT-PCR en une étape a été utilisée pour détecter la présence du VIA. Initialement le dépistage a été effectué en ciblant le gène de la matrice (gène M) à l'aide des amorces et sondes décrites par Spackman et al. (Spackman et al. 2002). Ensuite, pour tous les échantillons positifs au VIA, le test a été effectué par rRT-PCR ciblant le H5, H7 et H9 ainsi que d'autres tests rRT-PCR pour détecter les Gènes H1–H4, H6, H8 et H10–H16 pour le sous-typage du VIA, à l'aide des amorces et des sondes décrites par Monne et al. (Monne et al. 2008) et Elizalde et al. (Elizalde et al. 2014) respectivement.

2.4.1. Principe de la méthode

C'est une méthode de détection qualitative du VIA par l'amplification d'une partie du gène cible selon la méthode de RT-PCR en temps réel. La détection du gène « cible » est mesurée par la fluorescence émise au cours de la réaction PCR dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié.

La méthode est basée sur l'amplification d'une partie du génome viral de VIA gène cible à l'aide des amorces spécifiques et d'une sonde d'hydrolyse TaqMan. Ces amorces et sonde ont été sélectionnées de manière à détecter un très large panel de VIA. La sonde est marquée en extrémité 5' avec un fluorochrome « reporter » et possède en extrémité 3' un fluorochrome « quencher »

Les séquences des amorces et sondes utilisées sont décrites ci-dessous en 5' → 3' et portent sur la zone la plus conservée du gène cible. Elles sont mentionnées dans le tableau IV.

Pour la qualité des oligonucléotides (amorces et sondes), il est recommandé d'utiliser une qualité de purification HPLC (Chromatographie liquide de haute performance) pour application dans les méthodes de RT-PCR en temps réel. Les oligonucléotides sont repris dans du tampon TE (Tris-EDTA) comme préconisé par le fabricant de façon à obtenir une concentration de 100 µM puis répartis sous petits volumes et stockés à < -16°C. Les sondes sont stockées à l'abri de la lumière.

Tableau IV : Séquences des amorces et sondes utilisées pour la RT-PCR en temps réel pour la détection des gènes M, H5, H7 et H9, H1-H4, H6, H8 et H10-H16

Amorce/Sonde	Séquence de l'amorce/sonde (5'-3')	Reference
AIV-F-M+25	AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG	(Spackman et al. 2002)
AIV-R-M-124	TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG	
AIV-Probe-M+64	FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1	
AIV-H5-F	TTATTCAACAGTGGCGAG	(Monne et al. 2008)
AIV-H5NE-R	CCAG(T)AAAGATAGACCAGC	
AIV- H5-P-LNA	FAM-CCCTAGCACTGGCAATCATG-TAMRA	
AIV-H7-F	TTTGGTTTAGCTTCGGG	
AIV-H7-degR	GAAGAMAAGGVYVATTG	
AIV-H7-P-LNA	VIC-CATCATGTTTCATACTTCTGGCCAT-TAMRA	
AIV-H9-F	ATGGGGTTTGCTGCC	
AIV-H9-R	TTATATACAAATGTTGCAYCTG.	
AIV-H9-P-LNA	FAM-TTCTGGGCCATGTCCAATGG-BHQ1	
AIV-H1-F	ATTTTGGCGATCTAYTCCAC	(Elizalde et al. 2014)
AIV-H1-R	TCTGCATTGCAATGAYCCAT	
AIV-H1-P-LNA	FAM-ACAtCcAGAACTgATTGC-BHQ1	
AIV-H2-F	TTCGAGAAAGTRAAGATTYTGCC	
AIV-H2-R	CCAGACCATGTTCTTGAAGAA	
AIV-H2-P-LNA	FAM-TGgAcRCAGCATACAACAActGG-BHQ1	
AIV-H3-F	TCCTTTGCCATATCATGCTT	
AIV-H3-R	ATGCAAATGTTGCAYCTAAT	
AIV-H3-Probe	FAM-TGGCAGGCCACATRATGAA-BHQ1	
AIV-H4-F	GGRAACCCTGTGATATGCMT	
AIV-H4-R	AGTTCTTGTGCAGTGACCA	
AIV-H4-P-LNA	FAM-CATcATgCTGKGCCAATGG-BHQ1	
AIV-H6-F	TATAGTACGGTATCGAGCAG	
AIV-H6-R	TGCATTGAACCATTTGARC	
AIV-H6-P-LNA	FAM-CATcCAAAGACCCAtTGC-BHQ1	
AIV-H8-F	TACAGTACAGTGGCGGCCAGT	
AIV-H8-R	CAGAACATGCATCTACAAGATCC	
AIV-H8-Probe	FAM-TGCTTGGCAATCCTGATTGCTGGA -BHQ1	
AIV-H10-F	AACACGGACACRGCTGA	
AIV-H10-R	ATTGTTCTGGTAWGTGGAAC	
AIV-H10-P-LNA	FAM-AGAAgAATgATCTATATgGRAcA-BHQ1	
AIV-H11-F	TCAATTTACAGCTGCATYGCAA	
AIV-H11-R	ATGCAAATGGTACATCTACATGAYCC	
AIV-H11-P-LNA	FAM-CAGcACTcATYATGGGDTTCAT-BHQ1	
AIV-H12-F	AGTGTTCCTCAAGCTTAGT	
AIV-H12-R	TACAACGAACATTTCCATTTTGACA	
AIV-H12-Probe	FAM-TACTGCTCATGATTATTGGGGGTTTCAT-BHQ1	
AIV-H13-F	CTGCAGACAAAGARTCAACACA	
AIV-H13-R	AGAAGYTTKGCATTGTATGACCA	
AIV-H13-P-LNA	FAM-AtCTATYcTRTcTcGcAaGCA-BHQ1	
AIV-H14-F	ATCCTGTGGATTTCTTTCTCCAT	
AIV-H14-R	ACAGATTTGGCATCGGATATTC	
AIV-H14-Probe	FAM-ATGCTTTGTCTTCGTGGCACTGATT-BHQ1	

AIV-H15-F	TCGGAAAGTGCCCCAGAT
AIV-H15-R	CCATCCATTTTCGATGAATCCT
AIV-H15-Probe	FAM-AAGCAATCAAGCTTGCCGCTG-BHQ1
AIV-H16-F	CAACAGCCACAAANCTATATGTC
AIV-H16-R	TDCCTATTCTGGTYCCAAT
AIV-H16-P-LNA	FAM-AgTTcATABcGTTTGCTCCA-BHQ1

2.4.2. Préparation du Mix

Le kit de RT-PCR en une étape AgPath-ID (Ambion, Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) a été utilisé avec un volume final de 20 µl contenant 3 µl d'ARN et 17 µl de RT-PCR Mix sous les conditions suivantes :

***Gène M :** Dix microlitres de tampon RT-PCR, 4,8 µl d'eau de qualité PCR, 0,4 µl de chaque amorce (20 µM), 0,6 µl de la sonde (10 µM) et 0,8 µl du mélange des deux enzymes (la Taq Polymérase et la Reverse transcriptase).

Les conditions d'amplification étaient les suivantes :

Une transcription inverse à 45 °C pendant 20 min puis une dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 min, suivies par 45 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 15 sec, hybridation et élongation à 60°C pendant 45 sec.

***Gène H5 :** Dix microlitres de tampon RT-PCR, 5,3 µl d'eau de qualité PCR, 0,3 µl de chaque amorce (20 µM), 0,3 µl de la sonde (10 µM) et 0,8 µl du mélange des deux enzymes (la Taq Polymérase et la Reverse transcriptase).

***Gène H7 :** Dix microlitres de tampon RT-PCR, 4,7 µl d'eau de qualité PCR, 0,3 µl d'amorce sens (20 µM), 0,9 µl d'amorce anti-sens (20 µM), 0,3 µl de la sonde (10 µM) et 0,8 µl du mélange des deux enzymes (la Taq Polymérase et la Reverse transcriptase).

*** Gène H9 :** Dix microlitres de tampon RT-PCR, 4,8 µl d'eau de qualité PCR, 0,5 µl de chaque amorce (20 µM), 0,4 µl de la sonde (10 µM) et 0,8 µl du mélange des deux enzymes (la Taq Polymérase et la Reverse transcriptase).

Les conditions d'amplification pour H5, H7 et H9 étaient les suivantes :

Une transcription à 45 °C pendant 20 min puis une dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 min, suivies par 45 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 30 sec, hybridation et élongation à 54 °C pendant 45 sec.

Les rRT-PCR pour détecter les gènes H1–H4, H6, H8 et H10–H16 pour le sous-typage du VIA ont été réalisées selon Elizalde et al. (28).

***Gènes H1, H3, H4, H11, H12, H13, H14, H15, H16:**

Tableau V : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection des gènes H1, H3, H4, H11, H12, H13, H14, H15, H16

Mastermix: Ambion-AgPath ID One Step RT-PCR Kit	Volume pour 1 reaction
H ₂ O-Rnase free	0,2 µl
RT-PCR Buffer 2x	10 µl
F (10 µM)	1 µl
R (10 µM)	1 µl
Sonde (5 µM)	4 µl
Mix enzymes 25 x	0,8 µl
Volume Mastermix	17 µl
Volume des échantillons et contrôles	3 µl

Programme de Cycle : #Cible : FAM *Acquisition des données de fluorescence pendant la phase d'hybridation	RT	20 min	45 °C	1 cycle
	Activation de Taq	10 min	95 °C	1 cycle
	Dénaturation	15 sec	95 °C	45 cycles
	*Hybridation	*45 sec	60 °C	

***Gène H2:**

Tableau VI : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection du gène H2

Mastermix: Ambion-AgPath ID One Step RT-PCR Kit	Volume pour 1 reaction
H ₂ O-Rnase free	0,2 µl
RT-PCR Buffer 2x	10 µl
AIV-H2-F1 (10µM)	1 µl
AIV-H2-R1 (10µM)	1 µl
AIV-H2-Sonde -S1 (1µM)	4 µl
Mix enzymes 25 x	0,8 µl
Volume Mastermix	17 µl
Volume des échantillons et contrôles	3 µl

Programme de Cycle : #Cible : FAM *Acquisition des données de fluorescence pendant la phase d'hybridation	RT	20 min	45 °C	1 cycle
	Activation de Taq	10 min	95 °C	1 cycle
	Dénaturation	15 sec	95 °C	45 cycles
	*Hybridation	*40 sec	55°C	
	Elongation	30 sec	68°C	

***Gène H6:**

Tableau VII : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection du gène H6

Mastermix: Ambion-AgPath ID One Step RT-PCR Kit	Volume pour 1 réaction
H ₂ O-Rnase free	1,8 µl
RT-PCR Buffer 2x	10 µl
F (5 µM)	1,2 µl
R (5 µM)	1,2 µl
Sonde (1 µM)	2 µl
Mix enzymes 25 x	0,8 µl
Volume Mastermix	17 µl
Volume des échantillons et contrôles	3 µl

Programme de Cycle : #Cible : FAM *Acquisition des données de fluorescence pendant la phase d'hybridation	RT	20 min	45 °C	1 cycle
	Activation de Taq	10 min	95 °C	1 cycle
	Dénaturation	15 sec	95 °C	45 cycles
	*Hybridation	45 sec	62°C	

Gène H10 :

Tableau VIII : Mélange réactionnel et profil thermique pour la PCR en temps réel pour la détection du gène H10

Mastermix: Ambion-AgPath ID One Step RT-PCR Kit	Volume pour 1 réaction
H ₂ O-Rnase free	0,2 µl
RT-PCR Buffer 2x	10 µl
AIV-H-F1 (10µM)	1 µl
AIV-H-R1 (10µM)	1 µl
AIV-H-Sonde -S1 (1µM)	4 µl
Mix enzymes 25 x	0,8 µl
Volume Mastermix	17 µl
Volume des échantillons et contrôles	3

Programme de Cycle : #Cible : FAM *Acquisition des données de fluorescence pendant la phase d'hybridation	RT	20 min	45 °C	1 cycle
	Activation de Taq	10 min	95 °C	1 cycle
	Dénaturation	15 sec	95°C	45 cycles
	*Hybridation	40 sec	56°C	
	Elongation	30sec	68°C	

Le canal ROX a été défini comme référence passive à la fin de chaque cycle.

Les tests rRT-PCR ont été réalisés avec les thermocycleurs de PCR en temps réel sur plaque à 96 puits ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, Californie) et Aria Mx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Les données étaient analysées automatiquement à l'aide des logiciels fournis avec le ABI 7500 Fast et Aria Mx et ont été ensuite vérifiées manuellement.

Pour assurer la validité des résultats, pour chaque série d'analyse, dans chaque plaque de 96 cupules, en plus des échantillons testés les contrôles suivants doivent être inclus systématiquement :

- Témoin négatif de la méthode complète (extraction+ amplification). Il s'agit du témoin négatif d'extraction qui a subi tout le processus de l'extraction à l'amplification.

- Témoin positif de la méthode complète (extraction + amplification). Afin de procéder à la validation de la méthode complète.

- Témoins négatifs d'amplification : eau ultrapure qui remplace le dépôt d'ARN sinon même mélanges réactionnels. Il convient de prévoir pour le contrôle des inter-contaminations :

- Un témoin négatif d'amplification en premier dépôt
- En fonction du taux de remplissage de la plaque, un ou plusieurs autres témoins négatifs H₂O à intercaler entre les échantillons à tester (Par exemple tous les 10 dépôts).

- Témoins positifs d'amplification : il s'agit d'un ARN positif d'un objet d'essai contenant le gène cible testé auparavant positif, il peut être un vaccin ou sentinelle du laboratoire.

Les contrôles positifs suivants ont été utilisés : Un isolat de terrain VIA (H9N2) (A/poulet/Maroc/01/2016 Numéro d'accession : KU947112.1) obtenu auprès du Département de virologie du Service National d'Expertise et de Contrôle à Rabat (DPIV/ONSSA). Les contrôles positifs pour l'extraction ont été fournis par le laboratoire de référence de l'Influenza Aviaire et la maladie de New Castle : Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS/Italie), tandis que le Centre de Recherche en Santé Animale, Institut National de Recherche Agronomique (CISA-INIA, Espagne) a proposé des ARN contrôles positifs de l'amplification, comme indiqué dans le tableau IX. De l'eau déionisée a été utilisée comme contrôle négatif d'extraction.

Tableau IX : Liste des contrôles positifs d'extraction et d'amplification utilisées dans les rRT-PCRs

ARN Control positif d'amplification	Control positif d'extraction
H1N1 RNA AIV ; A / Duck / Alb / 35 /76	H7N7
H2N3 RNA AIV ; A / Duck / Germ /1215/73	H9N2
H3N2 RNA AIV ; A / Turkey / Eng / 69	H5N1
H3N8 RNA AIV ; A / Psitt / It / 2873/00	H5N8
H4N6 RNA AIV ; A / Duck / Czech / 56	H7N3
H5N2 RNA AIV ; A / Turk / It /90302 /05	H7N1
H5N2 RNA AIV ; A / Ost / Den / 72420 / 96	H1N1
H6N8 RNA AIV ; A / OST / RSA / 946 / 98	H3N8
H7N1 RNA AIV ; A / TK / Italy / 2676 / 99	H6N8
H7N7 RNA AIV ; A / TKY / Eng / 647 / 77	H10N1
H8N4 RNA AIV ; A / Turk / Ont / 6118 / 68	/
H9N2 RNA AIV ; A / TKY / Wix /1 / 66	/
H10N9 RNA AIV ; A / RSA / EgGoos / 238/98	/
H11N6 RNA AIV; A / DK / Eng /56	/
H12N5 RNA AIV ; A / Duck / Alb / 60/ 76	/
H13N6 RNA AIV ; A / Gull / Maryland/704 / 77	/
H14N6 RNA AIV ; A / Mall / Gurj / 244 / 82	/
H15N9 RNA AIV ; A / Sheerwater / WA /2576 / 79	/
H16N3 RNA AIV ; A / Gull / DK /68110 / 02	/

2.5. Isolement et identification virale sur œufs embryonnés SPF

Pour tous les échantillons révélés positifs au VIA par rRT-PCR pour la détection du gène M, l'isolement du virus de l'Influenza aviaire a été tenté. Le travail a été réalisé en collaboration entre le Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Casablanca LRARC/ONSSA Casablanca-Settat et le Département de virologie du Service National d'Expertise et de Contrôle (DPV/ONSSA) à Rabat qui dispose d'une zone de confinement type 3 (BSL3) pour la manipulation des virus classe 3.

Le matériel biologique original de chaque échantillon positif (surnageant conservé à -80 °C pour analyses ultérieures) a été inoculé à des œufs embryonnés de poulets SPF (Pathogen specific Free) âgés de 9 à 11 jours fournis par la DPIV/ONSSA selon la méthode standard (OIE. 2021).

Les œufs ont été mirés et marqués afin de s'assurer de leur viabilité et de repérer la chambre à air en traçant un trait sur la coquille à l'aide d'un crayon, puis percés juste au-dessus de la chambre à air, à l'aide d'un perce-œufs. Cinq œufs sont inoculés par échantillon, ils sont identifiés par le numéro de l'échantillon, le numéro de passage (1^{er}, 2^{ème} ou 3^{ème}), le type d'échantillon et la date d'inoculation. Entre 100 et 200 µl de surnageant clarifié a été inoculé dans la cavité allantoïdienne de chacun des cinq œufs de poules (SPF). Les trous percés des œufs sont fermés à l'aide de la colle, puis les œufs sont incubés à 37 °C pendant 7 jours. Un mirage quotidien est effectué afin de contrôler leur viabilité, les mortalités des premières 24 heures sont considérées comme non spécifiques au virus. Au septième jour, les œufs restants sont mis à +4 °C pendant 4 heures, puis sont ouverts sous un Poste de sécurité microbiologique (PSM) pour récolter stérilement le liquide allantoïdien. Ce dernier est centrifugé à 3000 g pendant 10 min et le surnageant est récupéré dans des cryotubes en aliquots de 1 ml par vial puis conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

2.5.1. Test rapide d'hémagglutination (HA) et titrage d'HA

Après récolte du liquide allantoïdien, une goutte de ce dernier est mélangée à une goutte des hématies de poulet à 1% pour savoir si la suspension récoltée contient un agent hémagglutinant. Dès qu'une activité hémagglutinante est détectée, une identification de l'agent hémagglutinant recherché s'impose à l'aide d'un test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).

En principe les virus de l'Influenza aviaire ont la propriété d'agglutiner les globules rouges de poulet ; par absorption, il y a réalisation de "ponts" entre les hématies et le virus, donc formation d'un réseau. Ce test qualitatif et quantitatif permet de déterminer le titre d'hémagglutination (HAT) de la suspension virale et de calculer et préparer la solution des 4UHA qui sera utilisée pour le test de l'inhibition de l'hémagglutination.

Le titrage d'hémagglutination (HA) a été réalisé selon les recommandations de l'oie (OIE. 2021). Brièvement on distribue 25 µl du PBS dans chacun des puits d'une microplaque à 96 puits à fond en V, puis on dépose 25 µl de la suspension virale à titrer dans le premier puits (une rangée de 12 puits sert à tester un échantillon). On effectue ensuite des dilutions en série de 2 en 2 par transfert de 25 µl d'un puit à l'autre allant de 1/2 à 1/4096, les 25 µl résiduels après le dépôt dans le dernier

puits est jeté ; par la suite on ajoute un volume de 25 µl d'hématies de poulet à 1 % dans chaque puits ; la dernière rangée de la microplaque est consacrée au témoin globules rouges (GR) qui contient 25 µl PBS+ 25 µl GR par puits.

Mélanger en tapotant doucement la microplaque, puis laisser en incubation pendant 40 minutes à température ambiante. Les globules rouges à 1% sont prélevés des poulets EOPS donneurs de sang élevés à l'animalerie de la DPIV).

Le titre HA est déterminé en inclinant la plaque et en observant la présence ou l'absence d'une coulée en forme de larme des hématies. Le titre correspond à la dilution maximale présentant une hémagglutination complète (absence d'écoulement) ; celle-ci représente une unité HA.

Le liquide allantoïdien a été ensuite inoculé une deuxième et troisième fois à un nouveau groupe d'œufs embryonnés de poulets SPF. Des tests d'hémagglutination et rRT-PCR ont été réalisés sur les fluides allantoïdiens des deuxième et troisième passages.

2.6. Séquençage du génome complet

Parmi les échantillons positifs par rRT-PCR pour le gène M, nous avons sélectionné six échantillons (quatre échantillons fécaux et deux échantillons d'organes) avec les valeurs de Ct (Cycle seuil) les plus bas (Ct, 33) pour le séquençage complet du génome en utilisant le protocole précédemment décrit dans Fusaro et al. (Fusaro et al. 2019).

3. Résultats

3.1. RT-PCR en temps réel pour la détection des gènes M, H5, H7, H9, H1-H4, H6, H8 et H10-H16 :

Entre novembre 2016 et mai 2019, de 17 zones humides et six autres sites, nous avons récoltés 967 échantillons de 470 espèces d'oiseaux appartenant aux ordres suivants : Ansériformes (19%), Charadriiformes (25,4%), Péléciformes (27,9%), Passériformes (14,2%), Gruiformes (4,4%), Falconiformes (4,6%), Suliformes (2,3%), Phoenicopteriformes (0,2 %) et 10 autres espèces d'oiseaux non identifiées (Voir tableau X).

Les échantillons consistaient en 374 écouvillons cloacaux, 321 écouvillons trachéaux, 54 échantillons de matières fécales et 218 pools d'organes, dont la trachée, les poumons, le cœur, le foie, la rate, le pancréas, le proventricule, le gésier, l'intestin, les reins et le cerveau.

Tableau X : Nombre d'oiseaux prélevés par espèce, famille, ordre et oiseaux positifs, origine et date de prélèvement

Ordre	Famille	Espèces d'oiseaux	Nbre oiseaux prélevés	Nbre oiseaux positifs VIA par PCR (%)	date de prélèvement	Site de prélèvement échantillons positifs
Anseriformes (91 oiseaux)	Anatidae (6 espèces, 91 oiseaux)	Mallard (<i>Anas platyrhynchos</i>)	58			
		Northern shoveler (<i>Spatula clypeata</i>)	20			
		Eurasian teal (<i>Anas crecca</i>)	3			
		Gadwall (<i>Mareca strepera</i>)	1			
		Ferruginous duck (<i>Aythya nyroca</i>)	1			
		Common pochard (<i>Aythya ferina</i>)	8			
Charadriiformes (122 oiseaux)	Scolopacidae (11 espèces, 24 oiseaux)	Little stint (<i>Calidris minuta</i>)	7	1 (14.3)	18/01/17	CSMO*
		Redshank (<i>Tringa totanus</i>)	5	2 (40)	08/02/17 29/03/17	CSMO*
		Ruddy Turnstone (<i>Arenaria interpres</i>)	3	1 (33.3)	14/03/17	CSMO*
		Common greenshank (<i>Tringa nebularia</i>)	2	1 (50)	14/03/17	CSMO*
		Semipalmated sandpiper (<i>Calidris pusilla</i>)	1			
		Spotted sandpiper (<i>Actitis macularius</i>)	1			
		Common sandpiper (<i>Actitis hypoleucos</i>)	1			
		Eurasian curlew (<i>Numenius arquata</i>)	1			
		Eurasian whimbrel (<i>Numenius phaeopus</i>)	1			
		Common snipe (<i>Gallinago gallinago</i>)	1	1 (100)	07/03/17	CSMO*
	Laridae (7 espèces, 70 oiseaux)	Ruff (<i>Philomachus pugnax</i>)	1			
		Great black-backed gull (<i>Larus marinus</i>)	56			
		Black-headed gull (<i>Chroicocephalus ridibundus</i>)	6	2 (33.3)	08/02/17 07/03/17	CSMO*
		Yellow-legged gull (<i>Larus michahellis</i>)	4			
		Grey-headed gull (<i>Chroicocephalus cirrocephalus</i>)	1			
		Bonaparte's gull (<i>Chroicocephalus philadelphia</i>)	1			
		Sandwich tern (<i>Thalasseus sandvicensis</i>)	1			
		Slender-billed gull (<i>Chroicocephalus genei</i>)	1	1 (100)	10/01/17	CSMO*
	Charadriidae (5 espèces, 11 oiseaux)	Grey plover (<i>Pluvialis squatarola</i>)	4			
		European golden plover (<i>Pluvialis apricaria</i>)	4			
		Common ringed plover (<i>Charadrius hiaticula</i>)	1			
		Kentish plover (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	1			
		Northern lapwing (<i>Vanellus vanellus</i>)	1			
Recurvirostridae (2 espèces, 12 oiseaux)		Black-winged stilt (<i>Himantopus himantopus</i>)	11	1(9.1)	28/12/16	CSMO*
		Pied avocet (<i>Recurvirostra avosetta</i>)	1			
Podicipedidae		Black-necked grebe (<i>Podiceps nigricollis</i>)	3			

Gruiformes (21 oiseaux)	Haematopodidae	Eurasian oystercatcher (<i>Haematopus ostralegus</i>)	2			
	Rallidae (3 espèces, 21 oiseaux)	Eurasian coot (<i>Fulica atra</i>)	18	1 (5.6)	10/01/17	Lagune Smir
		(<i>Fulica Spp</i>)	2			
		Red-knobbed coot (<i>Fulica cristata</i>)	1			
Pelecaniformes (134 oiseaux)	Ardeidae (4 espèces, 127 oiseaux)	Cattle egret (<i>Bubulcus ibis</i>)	123	6 (4.9)	11/04/18	Côte d'El Jadida
		Little egret (<i>Egretta garzetta</i>)	2			
		Grey heron (<i>Ardea cinerea</i>)	1			
		Night herons (<i>Nycticorax spp</i>)	1			
Passeriformes (68 oiseaux)	Threskiornithidae	Glossy ibis (<i>Plegadis falcinellus</i>)	7			
	Passeridae	House sparrow (<i>Passer domesticus</i>)	28			
	Corvidae	Eurasian magpie (<i>Pica pica</i>)	24			
	Muscicapidae	Ficedula hypoleuca (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	4			
		Common nightingale (<i>Luscinia megarhynchos</i>)	2			
	Phylloscopidae	Common chiffchaff (<i>Phylloscopus collybita</i>)	2			
		Western Bonelli's warbler (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	2			
	Buphagidae	Red-billed oxpecker (<i>Buphagus erythrorhynchus</i>)	4			
	Sylviidae	Common whitethroat (<i>Sylvia communis</i>)	1			
	Laniidae	Woodchat shrike (<i>Lanius senator</i>)	1			
Falconiformes	Falconidae	Falcons (<i>Falco spp</i>)	22			
Suliformes	Phalacrocoracidae	Great cormorant (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	8			
		Imperial shag (<i>Leucocarbo albiventer</i>)	3			
Phoenicopteriformes	Phoenicopteridae	Greater flamingo (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	1			
Other unidentified bird species			10			
Total			480	17 (3.54)		

*CSMO : Complexe Sidi Moussa Oualidia

Pour identifier les oiseaux positifs pour l'IA, tous les échantillons, y compris le liquide allantoïdien du test de l'isolement du virus, ont été examinés par rRT-PCR ciblant la détection du gène M.

L'analyse des résultats bruts est réalisée en observant les courbes de fluorescence Ct (Cycle Threshold) mesurées par le thermocycleur PCR en temps réel et le logiciel associé. Elle se fait « detector » par « detector » en modifiant si nécessaire la ligne de base pour chaque detector. La coupure de fluorescence de seuil Ct a été attribué à la valeur de 35 pour tous les échantillons positifs au VIA, tandis que les échantillons ayant des valeurs de Ct supérieures à 40 ont été considérés négatifs. Les échantillons présentant un Ct supérieur à 35 et inférieur à 40 cycles sont considérés comme douteux et sont à refaire. La valeur du Ct est proportionnelle à la concentration de l'échantillon en ARN viral IA, plus l'échantillon est concentré plus le Ct est précoce.

Avant de procéder à l'analyse et l'interprétation des résultats pour les échantillons, il faut s'assurer tout d'abord de la validité du test. Le test n'est considéré valide que lorsque les résultats des contrôles sont conformes aux résultats attendus selon le mode opératoire.

- Les témoins négatifs d'amplification et le (s) témoin(s) négatif(s) de la méthode complète présente(nt) des valeurs de C_T indéterminées ou des courbes d'amplification non exponentielles pour le gène « cible ».

- Les témoins positifs d'amplification présentent des courbes d'amplification qui coupe la ligne seuil de détection de la fluorescence (Threshold) avec une phase exponentielle, phase linéaire et phase plateau (saturation du milieu) et présentant des valeurs de C_T (entre 30-33) pour le gène « cible » compatibles avec celles obtenues par le laboratoire en conditions de fidélité intermédiaire. Si les témoins sont testés en double, les deux valeurs doivent être identiques avec moins de 1 C_T de différence.

- La valeur de C_T pour le gène « cible » du témoin positif de la méthode complète spécifique est compatible avec celle obtenue par le laboratoire en conditions de fidélité intermédiaire, ce qui permet la validation des conditions d'extraction et d'amplification mais aussi des conditions de conservation des ARN.

Dans le cas d'un résultat invalide, une analyse de cause est réalisée pour prendre des mesures correctives nécessaires et une reprise de l'essai s'impose.

Dans notre étude, pour tous les tests RT-PCR en temps réel pour la détection du virus de l'influenza de type A (gène M), les gènes H5, H7 et H9 ainsi que pour les autres rRT-PCR pour détecter les

gènes H1–H4, H6, H8 et H10–H16 pour le sous-typage du VIA, les résultats des contrôles négatifs d'extraction et d'amplification ont été négatifs et les résultats des contrôles positifs d'extraction et d'amplification ont été conformes aux résultats attendus avec des valeurs de Ct allant de 30 à 33.

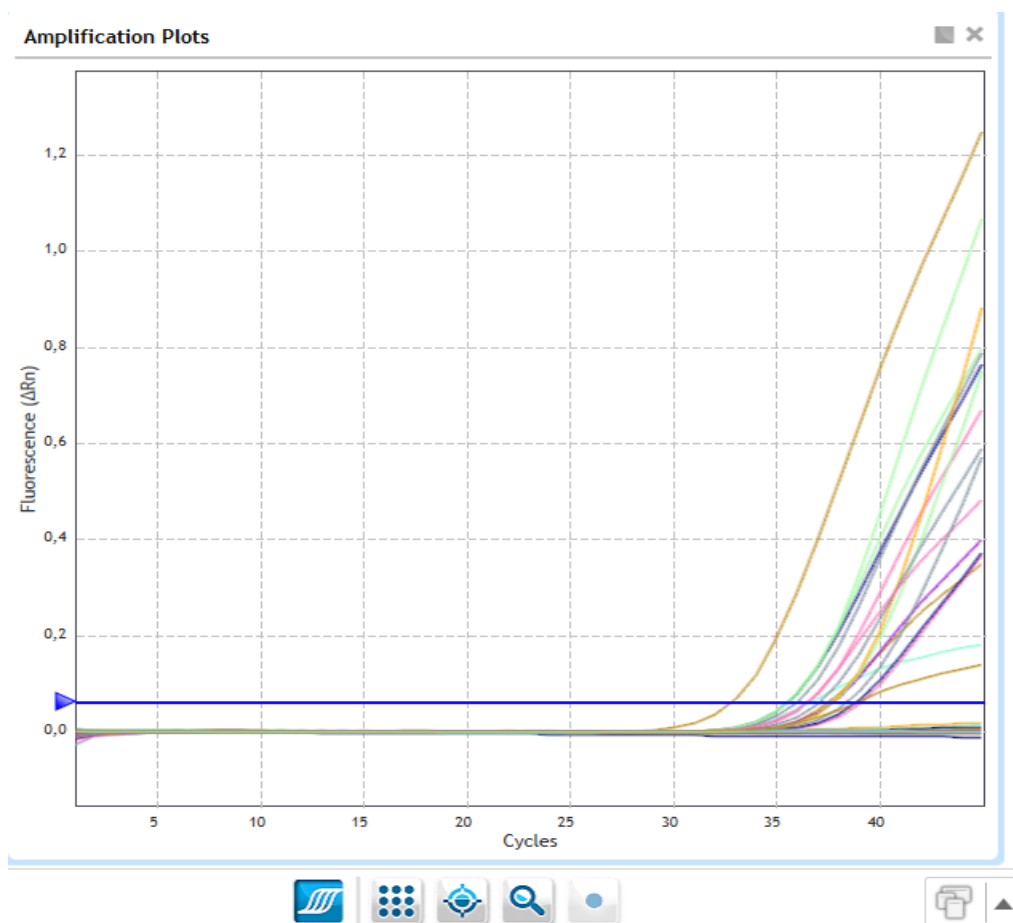


Figure 28 : Image illustrant les courbes d'amplifications pour le test PCR en temps réel pour la détection du gène M indiquant des résultats positifs des échantillons testés et des contrôles positifs

3.1.1. Par nature d'échantillons

Les tests rRT-PCR ont déterminé que 6 des 54 échantillons fécaux (11,1 %), 10 pools d'organes sur 218 (4,6 %) et 2 sur 374 écouvillons cloacaux (0,5 %) étaient positifs, tandis que tous les écouvillons trachéaux étaient négatifs (Voir tableau X, Figure 29).

Dans l'ensemble, le VIA a été détecté dans 1,86 % (18 échantillons sur 967) des échantillons testés. Les valeurs de Ct pour les échantillons positifs au gène M ont été évaluées entre 31,45 et 34,82, avec les valeurs Ct les plus basses enregistrées pour les échantillons fécaux frais (31,45–33,11), suivis des échantillons d'organes (32,76–33,60) et les écouvillons cloacaux (33,64 et 34,82).

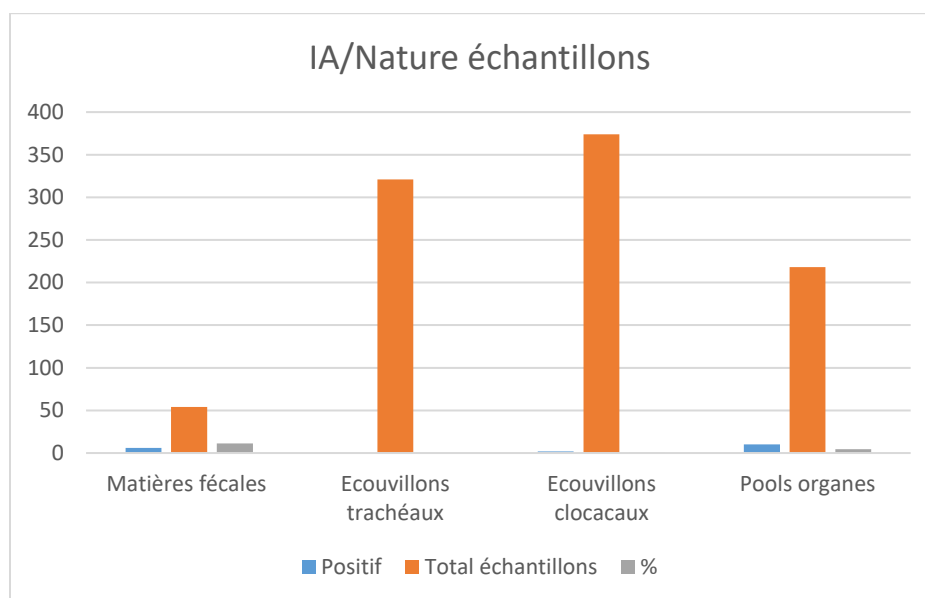


Figure 29: Taux de positivité IA par nature des échantillons

3.1.2. Par espèce d'oiseaux

Les échantillons positifs ont été prélevés chez 17 oiseaux sur 480 (3,54 %) appartenant à 10 espèces d'oiseaux, cinq familles et trois ordres, plus précisément six hérons garde-bœufs (*Bubulcus ibis*), deux chevaliers gambettes (*Tringa totanus*), deux mouettes rieuses (*Chroicocephalus ridibundus*), un bécasseau minute (*Calidris minuta*), un tournepipe à collier (*Arenaria interpres*), une bécassine des marais (*Gallinago gallinago*), un chevalier aboyeur (*Tringa nebularia*), un goéland railleur (*Chroicocephalus genei*), une échasse blanche (*Himantopus himantopus*) et une Foulque macroule (*Fulica atra*) (Voir Tableau X, Figure 30).

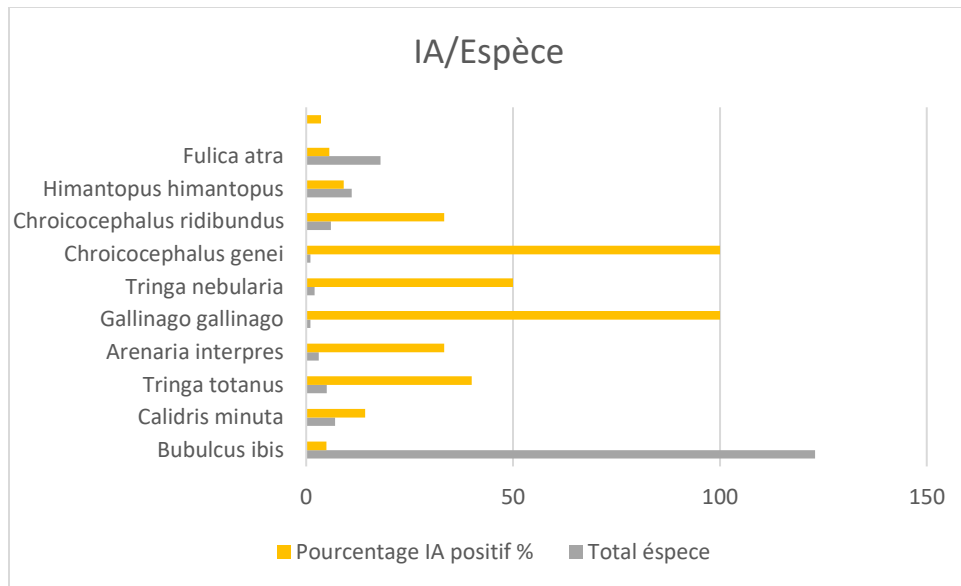


Figure 30: Taux de positivité IA par espèce

3.1.3. Par famille d'oiseaux

Le pourcentage d'IA positifs par famille d'oiseaux était le suivant : 6/24 (25 %) Scolopacidae (ordre : Charadriiformes), 1/12 (8,3 %) Recurvirostridae (ordre : Charadriiformes), 1/21 (4,8 %) Rallidés (ordre : Gruiformes), 6/127 (4,7%) Ardeidae (ordre : Pelecaniformes), et 3/70 (4,3%) Laridés (ordre : Charadriiformes), alors qu'aucun des 91 oiseaux de la famille des Anatidae ne s'est révélé infecté (Tableau X, Figure 31).

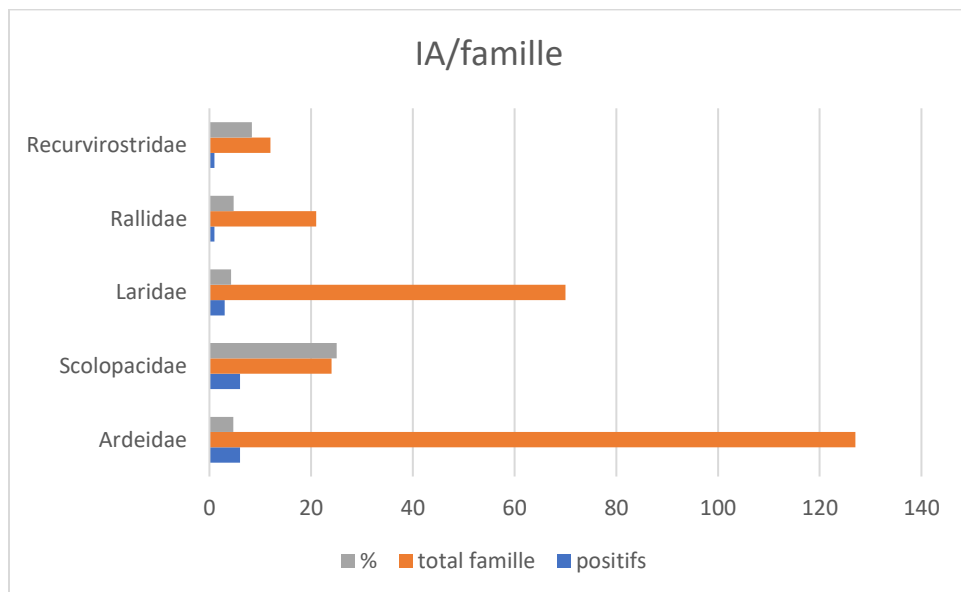


Figure 31: Taux de positivité IA par famille

3.1.4. Par ordre d'oiseaux

Le pourcentage le plus élevé d'oiseaux positifs pour l'IA a été enregistré dans les ordres de Charadriiformes (Les échassiers et les goélands ; 10/122, 8,2%), Gruiformes (1/21, 4,8 %), puis Pelecaniformes (6/134, 4,5 %) (Tableau X, Figure 32).

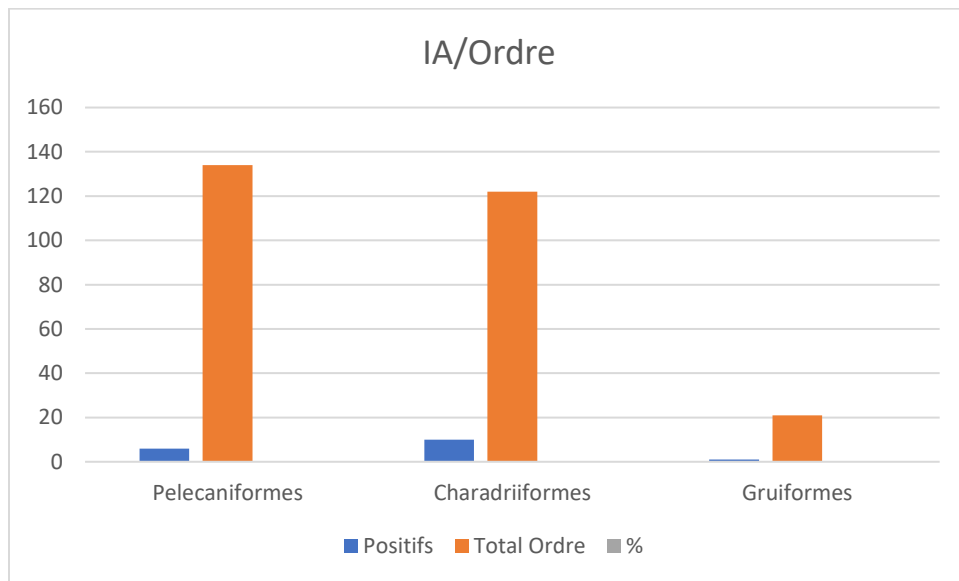


Figure 32: Taux de positivité IA par ordre

3.1.5. Par région

Parmi les régions, le pourcentage d'IA positif s'est avéré être le plus élevé dans la zone humide du complexe Sidi Moussa-Oualidia (10/23, 43,5 %) suivi par la côte d'El Jadida (6/78, 7.7%) puis la lagune de Smir (1/14, 7,1 %). Ces sites sont proches d'élevages avicoles industriels et sont situés sur la voie de migration de l'Atlantique (Figure 26). Toutes les autres zones échantillonnées étaient testées négatives (Tableau X).

3.1.6. Par année

Des pourcentages similaires d'IA positifs ont été enregistrés en 2017 et 2018 (10/162, 6,2 % et 6/101, 5,9 %, respectivement), tandis que le pourcentage le plus bas a été enregistré en 2016 (1/127, 0,8 %). Alors qu'aucun des 90 oiseaux échantillonnés en 2019 n'était positif.

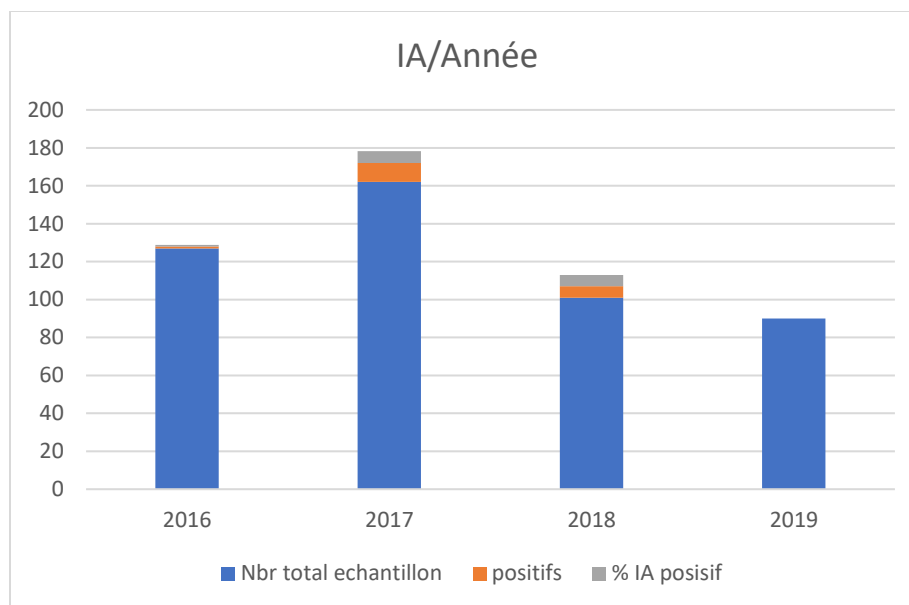


Figure 33: Taux de positivité IA par année

Tous les 18 échantillons positifs pour le gène M ont été testés à l'aide d'amorces spécifiques et sondes pour les sous-types H5, H7 et H9, et aucun n'a été trouvé positif. Puis des tests rRT-PCR spécifiques ciblant H1–H4, H6, H8 et les sous-types H10-H16 ont été effectués, mais tous les échantillons sont restés non typés.

3.2. Isolement du virus et test d'hémagglutination rapide HA

L'isolement sur les œufs embryonnés SPF a été réalisé pour les 18 échantillons positifs pour le gène M par RT-PCR en temps réel mais les résultats n'étaient pas concluants. Une analyse rRT-PCR pour la détection du gène M sur les liquides allantoïdiens du 2^{ème} et 3^{ème} passages a été effectuée avec résultats positifs.

3.3. Séquençage du génome complet

Une tentative de séquençage du génome complet a été effectuée pour 6 échantillons positifs par rRT-PCR pour le gène M, (quatre échantillons fécaux et deux échantillons d'organes) qui ont été sélectionnés comme candidats pour le séquençage du génome complet parce qu'ils présentaient des valeurs de Ct les plus précoces (Ct, 33) mais les résultats du séquençage étaient non concluants.

4. Discussion

Jusqu'à la fin de décembre 2015, aucun rapport officiel sur les sous-types d'IA chez les volailles industrielles n'avait été enregistré au Maroc. Cependant, la première épidémie de H9N2 dans le pays a été signalée en Janvier 2016 dans les filières avicoles (El Houadfi et al. 2016). En seulement quelques semaines, le virus s'est répandu dans tout le pays, infectant les élevages de poules pondeuses et de reproducteurs ; se manifestant par des symptômes respiratoires sévères, une diminution de la consommation d'aliments, une baisse importante de la production d'œufs (jusqu'à 80 %), et des taux de mortalité variant de 2 % à 15 % (El Houadfi et al. 2016). Suivant l'apparition de ces foyers, les autorités marocaines (ONSSA) ont prévu une campagne nationale de surveillance du VIA chez les oiseaux migrateurs pour prédire et prévenir le virus de se propager chez la volaille. Les pays voisins d'Afrique du Nord avaient notifié la première déclaration du virus H9N2 chez la volaille en 2005 en Lybie, suivi de l'Égypte en 2006, de la Tunisie en 2009 et de l'Algérie en 2017 (Al-Garib et al. 2007; Tombari et al. 2011; El-Zoghby et al. 2012; Jeevan et al. 2019). En novembre 2016, l'Algérie a signalé le premier cas d'Infection au VIA H7N1 chez des oiseaux migrateurs morts dans le parc naturel de Ghardaïa dans le sud Algérien (Barberis et al. 2020). En Tunisie, les VIA H9N2 sont apparus en 2009, générant plusieurs épidémies dans les élevages avicoles commerciaux (Tombari et al. 2011), mais le premier isolement du VIA H9N2 chez des oiseaux sauvages en Tunisie a été signalée en 2014 ; le virus a provoqué la première épidémie à forte mortalité chez les oiseaux aquatiques sauvages et les oiseaux sauvages en Tunisie en 2018 (LARBI et al. 2021). Cependant, aucune déclaration de mortalité massive chez les oiseaux sauvages n'a été enregistré au Maroc.

Dans la présente étude, nous rapportons la présence du VIA chez les oiseaux sauvages au Maroc. Sur la base des tests rRT-PCR, le VIA a été détecté dans 1,86% des échantillons testés de 17 espèces d'oiseaux, la majorité sont des échassiers, des goélands et des hérons garde-bœufs. La prévalence globale du VIA était de (3,54%), ce qui est inférieur à ce qui a été décrit dans les publications précédentes (Soliman et al. 2012; Cerda-Armijo et al. 2020). Dans une étude similaire menée chez des oiseaux sauvages entre 2003 et 2009 en différents endroits en Égypte, le VIA a été détecté chez 9,4 % des oiseaux (Soliman et al. 2012), alors qu'une prévalence beaucoup plus élevée du VIA (39 %) parmi les oiseaux aquatiques et terrestres a été détecté au Mexique entre 2010 et 2012 (Cerda-Armijo et al. 2020). La faible prévalence du VIA dans notre étude pourrait

être liée à l'espèce ciblée, au type d'échantillon, à la zone géographique ou à la période de temps choisie pour l'étude.

Le pourcentage le plus élevé d'IA positif a été trouvé dans l'ordre des Charadriiformes, principalement des échassiers et des goélands, et qui sont tous des oiseaux migrateurs, ce qui est en accord avec les études précédentes qui considèrent que les Charadriiformes comme des réservoirs du VIA dans les écosystèmes naturels (Webster et al. 1992; Stallknecht and Shane 1988). Au contraire, les oiseaux appartenant à la famille des Anatidés ont été tous trouvés négatifs pour l'IA, bien que l'on pense que les espèces de l'ordre des Ansériformes sont les hôtes naturels du VIA (Stallknecht and Shane 1988). Lors de la première grande surveillance du VIA chez les oiseaux aquatiques menée dans 12 pays africains en 2006, le VIA a été détecté chez quatre sur 30 canards eurasiens prélevés au Maroc (Gaidet et al. 2007a). Cependant, parfois, même dans cette famille, la prévalence du VIA peut être faible (0,29 %), comme indiqué dans une surveillance à long terme du VIA réalisée dans une petite zone humide espagnole pendant une période de 2012 à 2014 (Torrontegi et al. 2019). De plus, plusieurs études ont montré qu'en Europe, la prévalence du VIA chez les canards sauvages suit un schéma saisonnier, avec une variabilité importante entre les saisons : une forte prévalence dans l'été et l'automne et une faible prévalence en hiver et au printemps (Munster et al. 2007; Wallensten et al. 2007; Van Dijk et al. 2014). Cependant, dans notre étude, les oiseaux Anatidés n'étaient collectés que pendant la saison froide de l'automne à l'hiver ; l'absence du VIA dans la famille des Anatidés pourrait signifier que la période choisie pour l'enquête a coïncidé avec une période de faible prévalence. Notre étude, comme de nombreuses études de surveillance du VIA dans les zones humides, était prévue pour détecter la circulation du VIA chez les oiseaux sauvages pendant la migration et la période d'hivernage (Wallensten et al. 2007; Verhagen et al. 2012). Ainsi, une surveillance continue pendant tout un cycle annuel aurait pu permettre d'étudier le rôle potentiel des oiseaux sauvages dans le maintien du VIA dans les zones humides marocaines.

Le VIA a été détecté dans une colonie résidente d'hérons garde-bœufs avec un pourcentage de 4,9 %. Une telle découverte soutient le rôle potentiel de cette espèce d'oiseaux dans l'épidémiologie de l'IA et renforce donc l'hypothèse que les hérons garde-bœufs peuvent servir de « pont » dans la

transmission des VIA entre la volaille et les oiseaux sauvages (Khawaja et al. 2005; Caron et al. 2014).

Le VIA n'a pas été détecté dans l'ordre des Passeriformes, y compris les Passeridae (Famille des passereaux) et les Corvidae (Famille des corbeaux), ce qui pourrait être dû à la faible taille de l'échantillon pour les deux familles d'oiseaux dans notre étude (5,8 % et 5 %, respectivement). Des études antérieures ont rapporté l'isolement du H5N1 à partir de corbeaux en Inde (Das et al. 2014), au Bangladesh (Khan et al. 2014) et une infection naturelle par H9N2 chez des corbeaux au Pakistan (Khawaja et al. 2005). Cela suggère que des oiseaux sauvages terrestres comme les corbeaux peuvent être impliqués dans la transmission du VIA ; Alors que la plupart des recherches se sont concentrées sur les oiseaux aquatiques migrateurs sauvages, certaines enquêtes ont rapporté une prévalence significative du VIA parmi ces oiseaux terrestres. Par exemple, des études comparatives récentes sur la prévalence de VIA chez différents groupes d'oiseaux sauvages (oiseaux aquatiques et oiseaux terrestres ; résidents et migrateurs) dans l'est du Mexique a révélé une prévalence exceptionnellement élevée chez les oiseaux terrestres (49 %) en comparaison avec les oiseaux aquatiques (26 %) (Cerdeña-Armijo et al. 2020). Ainsi, focaliser les études sur les hérons garde-bœufs et les espèces d'oiseaux terrestres pour la détection du VIA pourrait mettre en évidence leur rôle dans la persistance et la propagation du VIA, comme suggéré précédemment (Caron et al. 2017).

La présente étude a montré un pourcentage variable d'IA positive entre les régions et entre les années, allant de 7,1 % à 43,5 % et de 0,8 % à 6,2 %, respectivement, ce qui est conforme aux publications précédentes (Busquets et al. 2010; Pérez-Ramírez et al. 2012; Pérez-Ramírez et al. 2010). Trois études menées dans une région au climat de type méditerranéen similaire au Maroc, comme l'Espagne, a révélé que la prévalence du VIA variait selon la zone géographique et l'année de l'étude : 1,70 %, 2,58 % et 5 % en Castille-La Manche, Catalogne et Pays basque (2007–2009); dans Castille-La Manche (2005–2007) et en Catalogne (2006–2009) respectivement (Pérez-Ramírez et al. 2010; Pérez-Ramírez et al. 2012; Busquets et al. 2010), avec des variations de prévalence significatives entre les années, fluctuant de 0,82 à 7,67 % (Busquets et al. 2010). De plus, en Égypte entre 2003 et 2009, les prévalences du VIA dans les régions étaient de 10 à 15 %, sauf au centre de l'Égypte qui était de 4 % (Soliman et al. 2012).

Dans notre étude, un pourcentage élevé d'IA positive (11,1%) a été détecté dans des échantillons fécaux, ce qui est en accord avec des études antérieures (Torrontegi et al. 2019; Ruiz et al. 2020; Ferenczi et al. 2016). Dans une enquête menée dans les zones humides du Chili (Ruiz et al. 2020), le virus a été détecté dans 4,28 % des déjections, montrant une fluctuation saisonnière, avec un pic de 30 % en été. En Espagne et en Australie, des valeurs de prévalence proches allant de 1,7% à 5,43% ont été rapportés (Torrontegi et al. 2019; Ferenczi et al. 2016). Ainsi, l'échantillonnage fécal peut être utilisé à grande échelle pour les enquêtes sur le virus IA parce que la collecte des échantillons de fèces offre une grande capacité d'échantillonnage, nécessite beaucoup moins de temps que les autres méthodes, et permet de protéger les oiseaux de la capture et la chasse (Pannwitz et al. 2009). Cependant, la probabilité d'isoler un virus de l'influenza aviaire viable à partir d'un échantillon fécal est généralement inférieur à celui qui serait obtenu à partir d'écouvillons trachéaux et cloacaux frais (Suarez 2000). Par ailleurs, l'isolement du virus IA à partir d'échantillons de terrain est parfois impossible en raison de la faible quantité de matériel génétique et/ou de l'incapacité de certains virus IA des oiseaux sauvages de s'adapter et développer des titres suffisamment élevés sur les œufs de poule SPF embryonnés (Runstadler et al. 2007).

Les valeurs tardives du Ct pour le test Rrt-PCR du gène M obtenues pour les échantillons positifs dans la présente étude peut refléter une faible quantité de matériel génétique du VIA dans les échantillons. En effet, certains facteurs pourraient diminuer la sensibilité de la rRT-PCR, comme la diversité des gènes HA dans les souches d'oiseaux sauvages (Suarez et al. 2007; Xing et al. 2008) et un faible nombre de copies virales dans l'échantillon qui est inférieur à la limite de détection de la rRT-PCR (Spackman et al. 2002). Les VIA ont une grande et exceptionnelle variabilité, même au sein du même sous-type HA (Suarez 2000), et la sensibilité de la rRT-PCR pour les échantillons d'oiseaux sauvages est plus faible que dans la volaille (Xing et al. 2008).

Outre une grande variabilité, en tant que virus à ARN, les VIA ont un fort taux de mutation. Le taux de fixation dans le gène HA est supérieur à celui du gène M, soit $5,7 \times 10^3$ substitutions/site par an (Fitch et al. 1997). Cela pourrait expliquer l'échec de la détection des sous-types.

Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode RT-PCR en temps réel en une seule étape pour le criblage des échantillons pour la recherche du gène M du virus de l'IA puis le typage des 16 sous-types (H1-H16). La Méthode RT-PCR en temps réel offre l'avantage d'être plus rapide que les autres méthodes de diagnostic. Elle très sensible est spécifique et donne des résultats satisfaisants.

Toutefois c'est une technique qui nécessite un niveau avancé de technicité et présente un facteur limitant relatif au prix des consommables nécessaires à sa réalisation.

Considérant que la période d'excrétion virale, et donc la fenêtre de diagnostic de la méthode PCR, est beaucoup plus courte que la période de persistance des anticorps, certaines enquêtes pour la surveillance du VIA ont été conçues pour évaluer la présence du virus chez les oiseaux sauvages en utilisant une combinaison de techniques moléculaires et de méthodes sérologiques afin d'augmenter la probabilité de détection du virus. Par exemple, Fadel et al. 2017 dans une étude menée en Égypte de 2010 à 2013, a trouvé une séroprévalence élevée chez les hérons garde-boeufs (90,9 %), suivis des corbeaux (88,6 %), des pigeons semi-captifs (44,8 %) et des poules d'eau (39,1 %). En revanche, les résultats de la rRT-PCR n'ont révélé que deux échantillons positifs chez les hérons garde-boeufs et les poules d'eau (Fadel and Afifi 2017).

Cependant, cette limitation potentielle doit être mise en balance avec les avantages offerts par la rRT-PCR, à savoir la rapidité et la facilité de collecte et de manipulation des échantillons, ce qui fait de cette méthode une approche idéale pour un dépistage approfondi. Bien que les prélèvements sanguins d'oiseaux sauvages ne puissent pas être facilement étendus pour le dépistage, les méthodes sérologiques sont principalement applicables aux études menées dans les élevages de volailles (Hassan et al. 2020).

En résumé, la présente étude a révélé la présence du VIA chez les oiseaux sauvages, principalement des échassiers, des goélands et des hérons garde-bœufs, dans trois zones étudiées qui sont des sites proches des zones de concentration des élevages avicoles industriels, ce qui signifie que les oiseaux sauvages pourraient représenter une source importante de VIA pour la volaille au Maroc. Le fait de concentrer les études sur ces sites pourrait aider à faire progresser notre compréhension de l'épidémiologie de l'IA chez les oiseaux sauvages au Maroc. Des taux de détection plus élevés du VIA chez les Charadriiformes, comme trouvé dans notre étude, sont en accord avec les résultats des études antérieures, alors que tous les oiseaux de la famille des Anatidae prélevés en hiver étaient négatifs, différemment de ce qui a été décrit dans d'autres rapports. Une surveillance continue pendant tout un cycle annuel pourrait aider à déterminer le rôle des oiseaux sauvages dans le maintien du VIA dans les zones humides marocaines. Notre étude a révélé que le héron garde-bœuf (genre *Bubulcus*) est sensible à l'infection par le VIA, comme décrit auparavant ; donc cibler les hérons garde bœufs et les espèces d'oiseaux terrestres

pourrait montrer leur implication dans la propagation et la persistance du VIA. La positivité la plus élevée et les valeurs de Ct les plus précoces étaient associées à des échantillons de fèces ; par conséquent, l'échantillonnage fécal pourrait être utilisé à grande échelle pour les enquêtes IA parce qu'ils offrent une grande capacité d'échantillonnage, moins de temps que d'autres techniques, et contribue à la préservation des oiseaux de la capture et de la chasse.

5. Conclusion

La présente étude avait pour objectif d'investiguer la présence du VIA chez les oiseaux sauvages au Maroc afin de tracer les sources possibles des virus affectant la volaille. Entre 2016 et 2019, 967 échantillons prélevés sur 480 oiseaux représentant 56 espèces d'oiseaux sauvages différentes, 20 familles et 8 ordres, principalement des Charadriiformes, Anseriformes, Pelecaniformes et Passeriformes, ont été collectés dans diverses zones humides et sites ornithologiques pertinents au Maroc. Ces échantillons de terrain étaient constitués de 374 écouvillons cloacaux, 321 écouvillons trachéaux, 54 échantillons fécaux et 218 pools d'organes, y compris la trachée, les poumons, le cœur, le foie, la rate, le pancréas, le proventricule, le gésier, l'intestin, les reins et le cerveau. Les échantillons ont été examinés pour la présence du VIA à l'aide de la technique PCR transcriptase inverse en temps réel basée sur TaqMan-PCR (rRT-PCR) ciblant le gène de la matrice (M), suivi d'autres tests de sous-typage rRT-PCR ciblant les gènes H1-H16. Le gène de la matrice IA a été détecté dans 18 des 967 échantillons (1,86 %) ; des échantillons positifs ont été détectés chez 17 oiseaux appartenant à 10 espèces d'oiseaux : deux chevaliers gambettes (*Tringa totanus*), un bécasseau minute (*Calidris minuta*), un tournepierrre à collier (*Arenaria interpres*), une bécassine des marais (*Gallinago gallinago*), un chevalier aboyeur (*Tringa nebularia*), une échasse blanche (*Himantopus himantopus*), deux mouettes rieuses (*Chroicocephalus ridibundus*), un goéland railleur (*Chroicocephalus genei*), six hérons garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) et une Foulque macroule (*Fulica atra*). Le VIA a été détecté dans deux zones humides et un site ornithologique (le complexe Sidi Moussa Oualidia, la lagune de Smir et la côte d'El Jadida) et la positivité la plus élevée a été révélée dans des échantillons fécaux frais (11,1%), indiquant la pertinence de cette matrice pour la surveillance des oiseaux sauvages. Nos résultats mettent en évidence que les échassiers, les goélands et les hérons garde-bœufs sont les espèces les plus touchées et peuvent représenter un risque potentiel d'introduction de l'IA dans le secteur de la volaille au Maroc. Ces résultats justifient la nécessité de continuer à maintenir une surveillance active régulière du VIA chez les

oiseaux sauvages en mettant en place une étude de l'interface entre les populations d'oiseaux sauvages des zones humides et les élevages avicoles et en axant notamment sur les zones et les espèces identifiées dans cette étude comme à haut risque de circulation virale, pour anticiper et prévenir les futures épidémies de l'AIV. De plus, la circulation massive chez les oiseaux sauvages des virus IAHP H5 en 2020-2021 sur le continent eurasiatique et leur propagation ultérieure en Afrique de l'Ouest et du Sud (FAO 2021), probablement par les oiseaux migrateurs, souligne en outre l'importance d'augmenter la surveillance de l'IA dans des zones comme le Maroc, qui sert de couloir de migration pour les oiseaux sauvages entre l'Europe et l'Afrique.

Chapitre III. Dynamique spatio-temporelle, histoire évolutive, origines et potentiel zoonotique des virus de l'IAFP H9N2 au Maroc de la période 2016 à 2021

1. Introduction

Le virus H9N2 continue de se propager chez les oiseaux sauvages et la volaille dans le monde entier. Depuis le début des années 2000, l'émergence des virus H9N2 a été signalée dans plusieurs pays d'Afrique du Nord. De plus, suite au premier isolement du virus H9N2 faiblement positif au Maroc au début de 2016 (El Houadfi et al. 2016), les virus H9N2 ont largement circulé en Afrique du Nord, s'étendant à l'Afrique de l'Ouest, ainsi qu'à l'Afrique de l'Est. Depuis 2017, les virus H9N2 sont détectés dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne. Tous les virus H9N2 détectés chez les volailles en Afrique appartiennent à la lignée G1 et sont apparentés à ceux isolés aux Emirats Arabes Unis.

Suite à l'introduction du virus H9N2 au Maroc en Janvier 2016, le virus s'est propagé rapidement dans le pays causant des pertes économiques importantes dans les différents secteurs de la production avicole. En dépit de la mise en place de stratégies de vaccination massive pour contrôler la maladie, le virus est devenu endémique dans toutes les filières avicoles du pays.

La Connaissance de l'histoire évolutive et de la circulation du virus H9N2 au Maroc est crucial pour la santé publique et animale au pays. Une meilleure compréhension des origines épidémiologiques et géographiques des virus H9N2 marocains pourrait aider à améliorer le contrôle et la gestion des futures épidémies.

Dans cette étude, nous avons isolé et caractérisé le génome complet des VIA H9N2 collectés dans des élevages avicoles dans différentes régions au Maroc de 2016 à 2021 ; nous avons investigué les origines, le potentiel zoonotique ainsi que l'impact de la vaccination sur l'évolution moléculaire des virus H9N2 marocains en explorant la dynamique spatio-temporelle et l'acquisition de mutations particulièrement préoccupantes pour la santé humaine et animale.

2. Matériel et méthodes

2.1. Échantillonnage

Entre Janvier 2016 et Mai 2021, nous avons collectés des échantillons dans 81 élevages avicoles situés dans sept régions différentes du Maroc (Figure 34), chez les poules pondeuses, les reproducteurs, les dindes et poulets de chair de différents âges. La plupart des troupeaux (72,84%, 59/81) ont été vaccinés contre le VIA H9N2. Des écouvillons oropharyngés et cloacaux et des échantillons d'organes ont été prélevés sur des poulets et dindes, conservés entre 2 et 8 °C, et envoyées au laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Casablanca (LRARC) de l'ONSSA dans les 24 h pour procéder aux analyses.

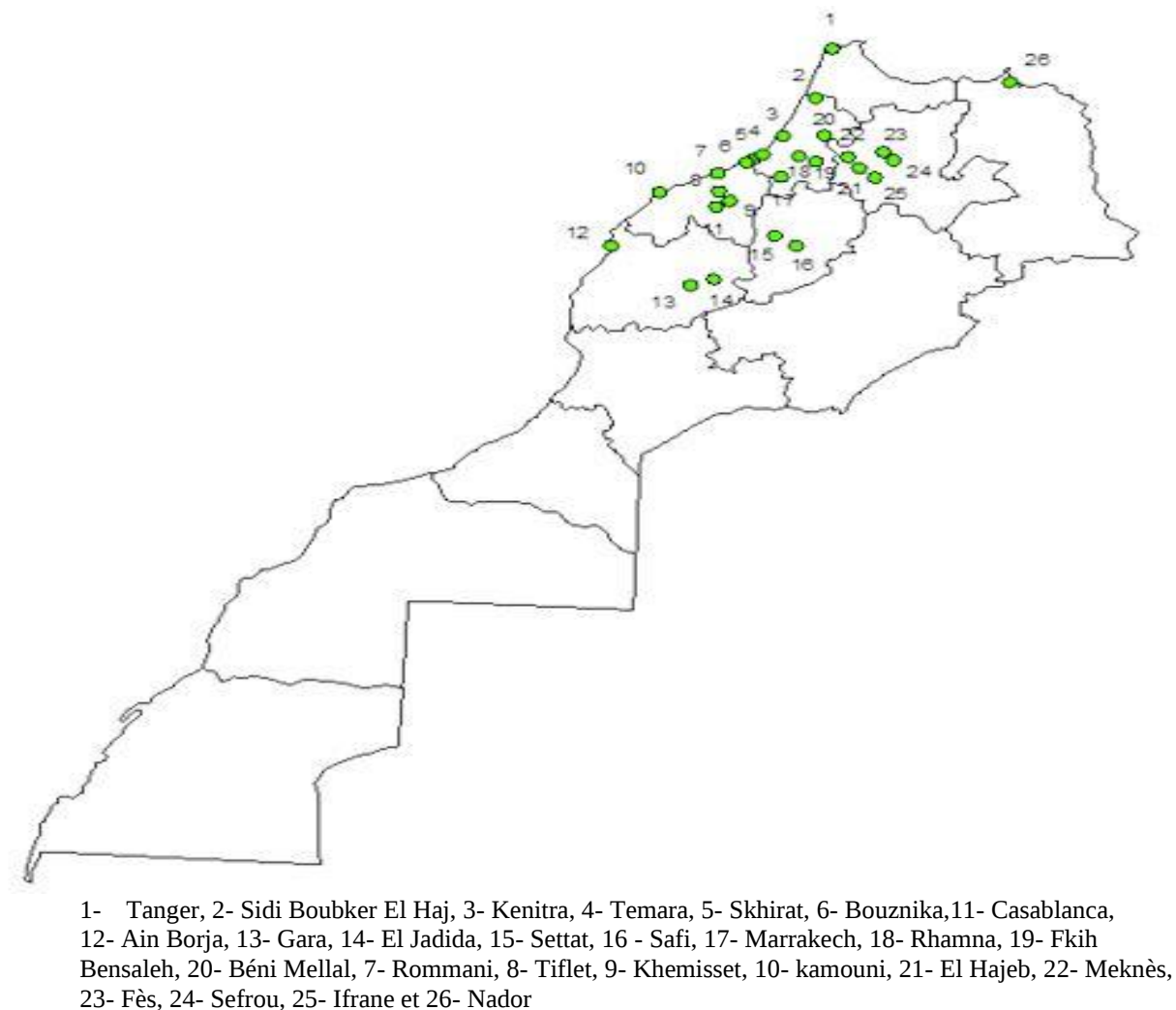


Figure 34: : Localisation géographique des élevages prélevés au Maroc entre 2016 et 2021

2.2. Traitement des échantillons et extraction de l'ARN

Les écouvillons, ainsi que les organes, ont été remis en suspension dans 1 ml de la solution saline tampon phosphate (pH 7,4 +/- 0,2, supplémentée de 10 000 UI/ mL de pénicilline, 10 mg/mL de streptomycine, 0,25 mg/mL de gentamycine et 5 000 UI/mL de nystatine), soigneusement homogénéisés en utilisant l'homogénéisateur Bead Blaster 24 (Benchmark Scientific, 2600, Sayreville, NJ, USA). Après centrifugation à 1500× g pendant 10 min à 4 °C, le surnageant a été récupéré pour faire l'extraction.

L'ARN total a été extrait à partir de 150 µl de l'échantillon avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. L'ARN a ensuite été élué dans 50 µL d'eau sans RNase. Les étapes de l'extraction sont détaillées dans l'annexe I.

2.3. Amplification par RT-PCR en temps réel

Tous les échantillons ont été testés en premier par RT-PCR en temps réel pour le gène de la matrice de l'Influenza aviaire comme décrit par Spackman, E. et al. (2002) (Spackman et al. 2002). Les échantillons positifs ont ensuite été testés pour la détection simultanée des gènes H5, H7 et H9 par RT-PCR selon Monne, I. et al. (2008) (Monne et al. 2008). Les tests ont été réalisés en utilisant le kit AgPath-IDTM One-Step RT-PCR (Ambion, Applied Biosystems, Grand Island, New York, États-Unis) suivant les recommandations du fabricant. La rRT-PCR a été réalisée sur les thermocycleurs Aria Mx (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie, États-Unis) et ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, Californie, États-Unis) machines de PCR en temps réel pour plaques à 96 puits. Les étapes, les volumes réactionnels et les profils thermiques pour les PCR en temps réel pour la détection des gènes M, H5, H7 et H9 ont été décrits dans le chapitre II point 2.4.

2.4. RT- PCR conventionnelle pour la détection du gène Neuraminidase N2

Tous les échantillons révélés positifs pour le gène H9 par RT-PCR en temps réel ont été testé par RT-PCR conventionnelle pour détecter le gène N2. Un couple d'amorces spécifique du sous-type N2 a été utilisée pour l'amplification par PCR d'un fragment du gène de Neuraminidase comme décrit par (Fereidouni et al. 2009) (Tableaux XI et XII). Le kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase-(Invitrogen) a été utilisé pour l'amplification en

suivant les instructions du fabricant. Le volume réactionnel final du mélange est de 50 μ L (5 μ L de l'ARN extrait + 45 μ L du Master Mix) et le profil thermique adopté consistait en une transcription inverse à 50 °C pendant 30 min suivie par une dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 min puis 30 cycles de 15 s à 94 °C, 15 s à 54 °C, 1 min à 68 °C et une extension finale à 68 °C pendant 5 min.

Tableau XI : Tableau du mélange réactionnel pour la PCR conventionnelle pour la détection du gène N2

Mastermix SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase-Invitrogen	Concentration finale	Volume pour 1 réaction
PCR Buffer 2x*	1 x	25 μ l
IAV-N-F (10 μ M)	0.2 μ M	1 μ l
IAV-N-R (10 μ M)	0.2 μ M	1 μ l
Mix enzymes	-	2 μ l
H ₂ O	-	16 μ l
Volume Master mix		45 μ l
Volume échantillon et control		5 μ l

Tableau XII : Les séquences des amorces utilisées pour la détection du gène de la Neuraminidase N2

Nom	Séquence	Taille du fragment (Pb)
AIV-N2-F	GCATGGTCCAGYTCAAGYTG	362
AIV-N2-R	CCYTTCCAGTTGTCTCTGCA	

2.4.1. Analyse des produits de la PCR conventionnelle

Après l'amplification par RT-PCR conventionnelle, une migration en gel a été réalisée pour révéler la présence d'amplicons de la taille attendue. Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à une concentration de 2% dans le tampon TAE en fonction de leurs tailles. Les tampons intercalaires Gel Red et Syber Safe ont été utilisés comme alternative au BET (Bromure d'Ethidium) qui est dangereux pour l'opérateur étant donné son pouvoir cancérogène et mutagène.

- Electrophorèse sur gel d'agarose
 - Préparation du gel de 2%
- Diluer le tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) concentré 50X à la concentration 1X
- Peser 2 g d'agarose en poudre et mélanger avec 100 ml du tampon TAE 1X. Faire chauffer au four à micro-ondes jusqu'à obtention d'une solution claire.
- Laisser refroidir jusqu'à environ 50-60°C puis ajouter 10 µl de Gel Red qui permet de révéler et de visualiser l'ADN grâce à ses propriétés. En effet, il s'intercale spécifiquement entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence lorsqu'il est excité sous les rayons Ultra-Violets.
- Positionner le peigne et les cales dans la cuve de l'électrophorèse de façon à ce que les puits soient du côté de la cathode (-) pour que l'ADN, chargé négativement, puisse migrer vers l'anode (+).
- Verser la solution d'agarose et laisser le gel polymériser.
- Après polymérisation du gel, recouvrir avec une quantité suffisante du tampon TAE 1X et retirer soigneusement le peigne.

➤ Préparation des échantillons avant le dépôt

Mélanger les échantillons de l'ADN avec le tampon de charge, qui contient un alourdisseur (saccharose) et un marqueur de migration (bleu de bromo-phénol).

2µl de solution de charge + 8µl d'ADN  10 µl du mélange à déposer dans chaque puits

- Déposer les mélanges dans les puits en évitant l'injection de bulles d'air.
- Mettre sous tension 90 mA et laisser migrer pendant 45 minutes jusqu'à 60 minutes.
- Laisser migrer jusqu'à ce que le marqueur arrive à la distance voulue, puis arrêter la migration en coupant le courant électrique.

Pour s'assurer de la validité des résultats deux contrôles positifs (Souche Marocaine H9N2 isolée en ovoculture fournie par le Service du contrôle et de l'expertise de la DPIV à Rabat et une souche H5N2 fournie par le Laboratoire de Référence de la maladie de l'Influenza Aviaire et la maladie de New Castle IZS de Padova en Italie) ont été introduits systématiquement dans chaque série d'épreuves. Egalement, 4 µL du marqueur de poids moléculaire (GelPilot® 100pb Plus Ladder 100 lanes, QIAGEN) ont été déposés pour bien apprécier la taille des amplicons.

➤ Révélation (Visualisation de l'ADN)

La lecture des résultats s'est faite à l'aide d'un appareil GelDoc UV Solo touch (Analytikajena, Germany) qui permet de visualiser les images du gel d'agarose à travers un écran tactile. L'appareil utilise un logiciel VisionWorks® pour l'analyse des images capturées.

La présence de l'ADN cible est traduite par l'apparition de bandes fluorescentes de taille attendue (362 pb) sur le gel après son exposition aux rayons ultraviolets émis par l'appareil. L'intensité de la fluorescence et l'épaisseur des bandes sont proportionnelles à la concentration de l'ADN chargé dans les puits.

2.5. Séquençage du génome complet (Next generation sequencing (NGS))

Le séquençage du génome complet a été réalisé dans le laboratoire de référence International de l'OIE et de l'Union Européenne pour la maladie de l'Influenza aviaire et la maladie de New Castle Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) delle Venezie en Italie.

Les génomes complets ont été amplifiés à l'aide du système RT-PCR en une étape SuperScript™ III avec Platinum™Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), comme décrit précédemment par Zhou B. et al. (2009) (Zhou et al. 2009).

La réaction de RT-PCR a été réalisée en deux étapes :

*Etape 1: préparation du Mix 1

Mélanger 14 µl d'ARN avec 1 µl de chaque amorce (à la concentration 10 µM);

***Primer MBTUni-12-DEG-new : 5'GCGTGATCAGCRAAAGCG-3'**

***Primer MBTUni-13 : 5'- ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG -3'**

Dénaturer pendant 2 minutes dans un thermocycleur préchauffé à 95°C et refroidir immédiatement sur de la glace pendant 2 minutes.

*Etape 2: préparation du Mix 2 : Ajouter 34 µl du Mix 2 au Mix 1

Tableau XIII : Mélange réactionnel pour la PCR conventionnelle pour le séquençage du génome complet

Réactifs	Concentration finale	µl x 1 réaction
2X Réaction Mix	1X	25 µl
MgSO4 5mM	0.8 mM	8 µl
Superscript III Reverse Transcriptase-Platinum Taq High Fidelity		1 µl
Volume MIX 2		34 µl
Volume MIX 1 (ARN+Amorces)		16 µl
VOLUME FINAL		50 µl

Le profil thermique était comme le suivant :

Amplification cycle:

	94°C	94°C		68°C	94°C		68°C	68°C	
55°C	2 min	30 sec	45°C	4 min	30 sec	57°C	4 min	5 min	4°C
60 min		30 sec	30 sec			30 sec			∞
	5 cycles				31 cycles				

Les produits de PCR ont été analysés sur un gel d'agarose à 1-1,5%. La taille prévue des produits PCR varie de 860 à 2430 bp pour les 8 segments.

Les amplicons ont été purifiés en utilisant Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) suivant les instructions du fournisseur et quantifiés avec Qubit™ Essai ADN HS sur le fluorimètre Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis).

Les bibliothèques de séquençage étaient préparées avec le kit de préparation d'échantillons d'ADN Illumina Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, USA) et par la suite les amplicons ont été séquencés sur la plateforme Illumina MiSeq (2 250 bp Paired-End ; Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) (Voir annexe II).

La qualité de lecture a été évaluée à l'aide de FastQC v0.11.2 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, consulté le 4 juin 2021) et les données brutes ont été filtrées en supprimant les lectures avec plus de 10% de bases indéterminées, les lectures avec plus de 100 bases avec un score Q inférieur à sept et des lectures appariées dupliquées. Les lectures restantes ont été coupées de Adaptateurs Illumina Nextera XT avec faux v0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>, consulté le 4 juin 2021) et ajusté avec la faucille v1.33. (<https://github.com/najoshi/> faucille, consulté le 4 juin 2021). Les lectures ont été recadrées à une longueur maximale de 250 bases par trimmomatic (Bolger et al. 2014). Les lectures de moins de 80 bases ou non appariées après les filtres précédents ont été écartées. Des lectures de haute qualité ont été alignées sur un génome de référence à l'aide de BWA v0.7.12 (Li and Durbin 2010). L'alignement a été traité à l'aide de Picard-tools v2.1.0 et GATK v3.5 (DePristo et al. 2011; McKenna et al. 2010) afin de corriger les erreurs potentielles, de réaligner les lectures autour des indels et de recalibrer la qualité de base.

LoFreq v2.1.2 (Wilm et al. 2012) a été utilisé pour identifier les polymorphismes mononucléotidiques (SNP). Les séquences Consensus ont été soumises à la base de données GISAID EpiFlu™ (<http://www.gisaid.org>, consulté le 6 janvier 2022) sous les numéros d'accès indiqués dans le tableau XIV.

2.6. Analyse phylogénétique et évolution moléculaire

Après alignement des séquences à l'aide de MAFFT v7 (Katoh and Standley 2013), IQTREE v1.6 a été utilisé pour effectuer analyses de ré-échantillonnage bootstrap ultrarapides (1000 répétitions) pour générer les arbres phylogénétiques du maximum vraisemblance (Maximum Likelihood) (Nguyen et al. 2014; Hoang et al. 2017). Les arbres ont été visualisés avec FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, consulté le 30 juin 2021).

Les analyses de réseaux phylogénétiques à l'aide de la méthode Median Joining mise en œuvre dans le programme NETWORK 10 (<https://www.fluxus-engineering.com/>, consulté le 4 juin 2021) ont été réalisées sur les séquences du gène HA des virus de la grippe H9N2 collectés au Maroc dans la période 2016-2021 (Bandelt et al. 1999). Cette méthode utilise une approche de parcimonie pour reconstruire les relations entre les séquences hautement similaires, et permet la création de « vecteurs », qui représentent des séquences non échantillonnées utilisées pour connecter les génotypes existants dans la manière la plus parcimonieuse.

Le taux d'évolution et le temps jusqu'à l'ancêtre récent le plus commun (tMRCA) ont été estimés pour tous les segments de gènes à l'aide de BEAST v1.10.4 (Suchard et al. 2018). Les analyses d'échantillonnage Chaîne de Markov Monte Carlo (MCMC) utilisant une analyse horloge moléculaire relaxée log-normale non corrélée, qui permet une variation de taux entre les lignées, et le modèle de substitution SRD06 (HKY85 + G4 avec deux partitions - 1ère + 2ème positions contre 3ème position -, fréquences de base, et l'hétérogénéité du taux G non liée sur toutes les positions des codons) ont été mises en œuvre (Shapiro et al. 2005).

Tree Annotator v1.10.4 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator/>, consulté le 11 août 2021) a été utilisé pour résumer les arbres Maximum Clade Credibility (MCC), qui ont été par la suite visualisés dans FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, consulté sur 11 août 2021).

2.7. Analyse des pressions de sélection

Les pressions de sélection spécifiques au site pour le segment du gène HA du virus H9N2 marocains ont été mesurés comme le rapport de substitutions par site du nucléotide non synonyme (dN) au nucléotide synonyme (dS). Plus précisément, le modèle d'évolution à effets mixtes (MEME) et les méthodes de vraisemblance à effets fixes (FEL) ont été utilisées pour déduire les sites soumis à des sélections positives épisodiques ou omniprésentes (Kosakovsky Pond and Frost 2005; Murrell et al. 2012). Les analyses ont été effectuées à l'aide du Datamonkey version en ligne du package Hy-Phy (Delport et al. 2010). Toutes les analyses ont utilisé le modèle GTR de substitution nucléotide et les arbres phylogénétiques ML (Maximum Likelihood)

3. Résultats

3.1. RT-PCR pour la détection de H9

Dans le cadre de l'activité de surveillance mise en place au Maroc entre 2016 et 2021, plusieurs cas d'IA sont apparus dans des élevages avicoles (Poulet de chair, poules pondeuses, reproducteurs (chair et ponte), dinde chair) dans différentes régions du Maroc. Le tableau clinique se caractérise par une dépression et une détresse respiratoires, notamment des écoulements nasaux, des éternuements, une toux et des râles, une baisse de l'appétit et une chute de la ponte chez la poule pondeuse. D'autres signes cliniques pouvaient être observés incluant une conjonctivite et un larmolement des yeux. Nous avons également observé une forte mortalité (30 à 40% en moyenne) et une diminution des apports alimentaires et hydriques. L'âge des poulets lorsque les symptômes ont été observés variait entre 15 et 79 jours.

Des échantillons de terrain prélevés dans 81 élevages avicoles, en provenance de 7 différentes régions du Maroc, ont été soumis aux tests de laboratoire pour la recherche du VIA. La plupart des troupeaux (72,84 %, 59/81) étaient vaccinés contre le VIA H9N2 avec des vaccins inactivés disponibles sur le marché.

L'examen post mortem des oiseaux morts a montré des lésions typiques telles que des trachées congestives avec les bouchons bronchiques.

Dans l'ensemble, 76 sur 81 (76/81) ont été testés positifs pour le VIA et spécifiquement pour le sous-type H9 par RT-PCR en temps réel (la figure 35 montre l'emplacement des élevages positifs parmi les élevages prélevés).

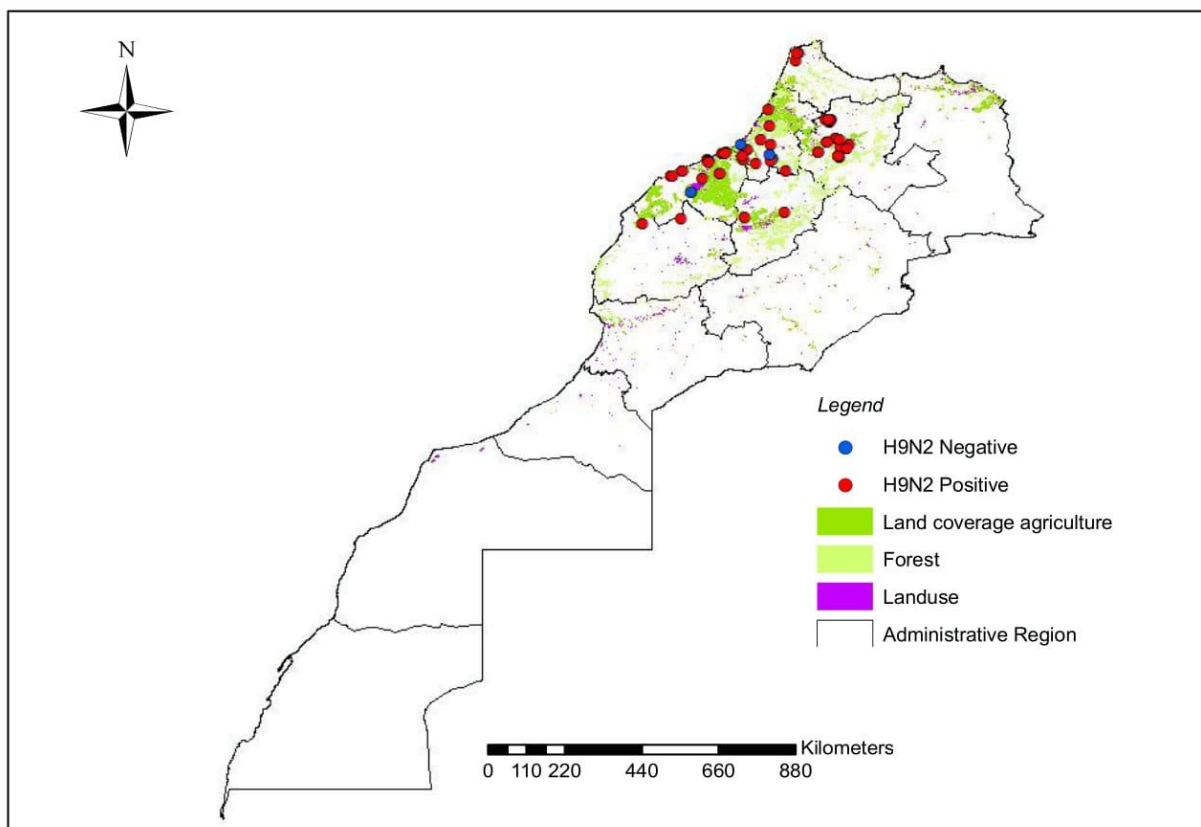


Figure 35: Localisation des élevages prélevés et élevages positifs à H9N2

3.2. Migration des produits de PCR sur gel d'agarose (Neuraminidase)

Pour s'assurer qu'il s'agit bien du virus IA sous type H9N2, les ARN extraits des échantillons qui ont été révélés positifs pour le H9 par RT-PCR en temps réel ont été soumis à un test RT-PCR conventionnelle pour la détection du gène Neuraminidase (N2).

Le résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par RT-PCR conventionnelle pour le gène codant pour la neuraminidase des sous-types H9N2 étudiés, montre la mise en évidence des bandes spécifiques du gène N2 de taille attendue de 362 pb (Figure 36).

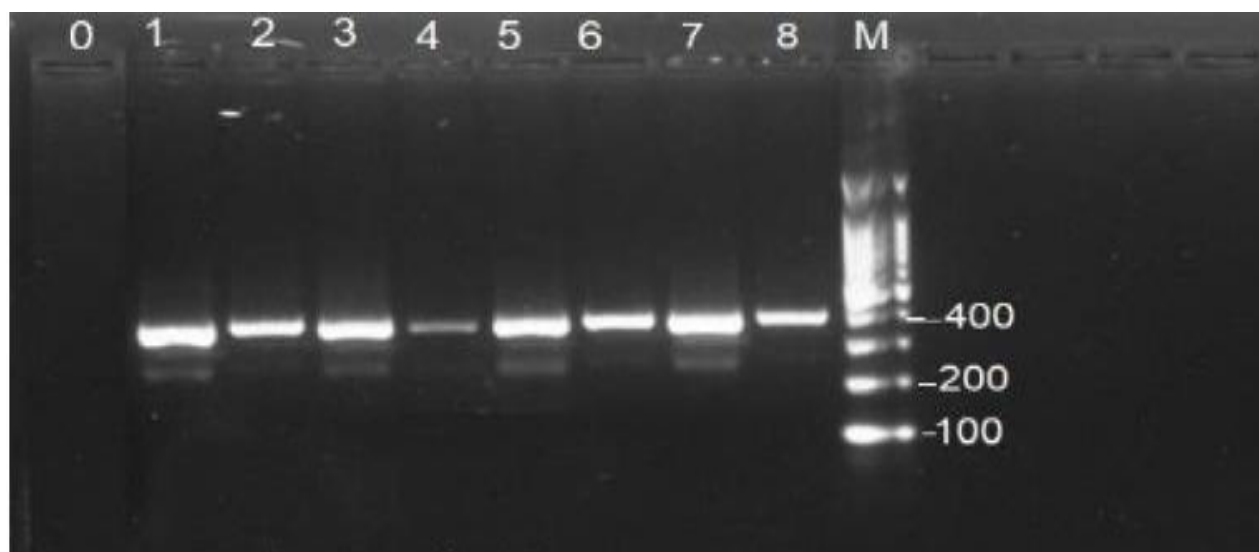


Figure 36: Résultat d'électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification par RT-PCR conventionnelle pour la détection de la Neuraminidase (N2) du virus de IAFP H9N2 : 0 : Témoin négatif ; 1 : Témoin positif ; M : Poids moléculaire ; 3, 5 et 7 : Echantillons fortement positifs ; 2, 6 et 8 : Echantillons moyennement positifs ; 4 : Echantillon faiblement positif

3.3. Caractérisation moléculaire du virus de l'influenza aviaire

3.3.1. Analyses phylogénétiques et évolutives

Au total, 28 échantillons positifs représentatifs ont été sélectionnés en fonction de l'année et la zone de collecte pour le séquençage du génome complet. Plus précisément, nous avons obtenu le génome complet de 22 virus et le génome partiel de 6 virus (Tableau XIV)

Les séquences complètes des 8 segments de gènes des isolats marocains ont été soumises à la base de données GISAID EpiFlu™. Les séquences nucléotidiques et les séquences d'acides aminés déduites de ces isolats H9N2 ont été alignées et comparées avec les séquences de souches de référence pertinentes de GISAID de différentes régions du monde y compris les séquences des zones voisines.

Tableau XIV : Informations et numéros d'accession GISAID relatifs aux isolats H9N2 marocains

Année	Nom de l'isolat	Sous-type	Type élevage	Age (J/S*)	Date de prélèvement	Région	Génome	Numéro accession GISAID
2016	A/chicken/Morocco/19RS1944-1/2016	H9N2	Reproducteurs	na	2016-01-25	Fès	Complet	EPI1950238- EPI1950245
	A/chicken/Morocco/19RS1944-2/2016	H9N2	Poulet de chair	na	2016-01-26	Kenitra	Complet	EPI1950325- EPI1950332
2019	A/pheasant/Morocco/19RS1944-13/2019	H9N2	na	na	2019-03-19	Ain Borja	Complet	EPI1950209-212, 214-216 and EPI1950384
	A/pheasant/Morocco/19RS1944-14/2019	H9N2	na	na	2019-03-19	Ain Borja	Complet	EPI1950217- EPI1950224
	A/chicken/Morocco/1_456_21RS1333-1/2019	H9N2	Poules pondeuses	26 S	2019-02-16	Skhirat Temara	Complet	EPI1950349- EPI1950356
	A/chicken/Morocco/2_924_21RS1333-2/2019	H9N2	Reproducteurs chair	33 S	2019-04-03	El Jadida	Complet	EPI1950230-233, 235-237 and EPI1950385
	A/chicken/Morocco/3_1004_21RS1333-3/2019	H9N2	Poulet de chair	15 J	2019-04-11	Fès	Complet	EPI1950246- EPI1950253
	A/chicken/Morocco/4_2573_21RS1333-4/2019	H9N2	Poulet de chair	34 J	2019-09-05	Sefrou	Complet	EPI1950277- EPI1950284
	A/chicken/Morocco/5_2781_21RS1333-5/2019	H9N2	Reproducteurs chair	29 S	2019-09-24	Fès	Complet	EPI1950254- EPI1950261
	A/chicken/Morocco/7_3046_21RS1333-7/2019	H9N2	Poulet de chair	24 J	2019-10-19	Ifrane	Complet	EPI1950262-265, 267-269 and EPI1950386
	A/chicken/Morocco/8_3465_21RS1333-8/2019	H9N2	Poules pondeuses	22 S	2019-11-29	Bouznika	Complet	EPI1950309- EPI1950316
	A/chicken/Morocco/21_4374_21RS1333-23/2020	H9N2	Reproducteurs chair	42 S	2020-02-25	Meknès	Partiel	EPI1950270- EPI1950276
2020	A/chicken/Morocco/9_4410_21RS1333-9/2020	H9N2	Reproducteurs	43 S	2020-02-26	EL Hajeb	Complet	EPI1950317-320, 322-324 and EPI1950387
	A/chicken/Morocco/10_4437_21RS1333-10/2020	H9N2	Poulet de chair	34 J	2020-02-29	Sefrou	Complet	EPI1950285- EPI1950292
	A/chicken/Morocco/11_4438_21RS1333-11/2020	H9N2	Poulet de chair	34 J	2020-02-29	Sefrou	Complet	EPI1950293- EPI1950300

	A/chicken/Morocco/12_4476_21RS1333-12/2020	H9N2	Poules pondeuses	33 S	2020-03-03	Bouznika	Complet	EPI1950301- EPI1950308
	A/chicken/Morocco/13_4562_21RS1333-13/2020	H9N2	Poulet de chair	34 J	2020-03-12	El Jadida	Partiel	EPI1950225- EPI1950229
	A/chicken/Morocco/14-1_4636_21RS1333-14/2020	H9N2	Poulet de chair	27 J	2020-03-20	Casablanca	Partiel	EPI1950194- EPI1950200
	A/chicken/Morocco/16-1_6595_21RS1333-17/2020	H9N2	Poulet de chair	39 J	2020-11-23	Rommani	Partiel	EPI1950365- EPI1950369
	A/chicken/Morocco/16-2_6595_21RS1333-18/2020	H9N2	Poulet de chair	39 J	2020-11-23	Rommani	Partiel	EPI1950370- EPI1950375
	A/chicken/Morocco/17_6650_21RS1333-19/2020	H9N2	Poulet de chair	41 J	2020-11-28	Bouznika	Complet	EPI1950186- EPI1950193
	A/chicken/Morocco/18_6657_21RS1333-20/2020	H9N2	Poulet de chair	37 J	2020-11-30	Skhirat Temara	Complet	EPI1950357- EPI1950364
	A/chicken/Morocco/19_6700_21RS1333-21/2020	H9N2	Poules pondeuses	44 S	2020-12-04	Casablanca	Partiel	EPI1950870- EPI1950875
2021	A/chicken/Morocco/22-1_72_21RS1333-24/2021	H9N2	Poulet de chair	21 J	2021-02-11	Tanger	Complet	EPI1950376- EPI1950383
	A/chicken/Morocco/24_520_21RS1333-28/2021	H9N2	Poulet de chair	40 J	2021-03-18	Casablanca	Complet	EPI1950201- EPI1950208
	A/chicken/Morocco/25-1_3155_21RS1333-29/2021	H9N2	Poulet de chair	40 J	2021-04-09	Sidi Boubker El Haj	Complet	EPI1950333- EPI1950340
	A/chicken/Morocco/25-2_3155_21RS1333-30/2021	H9N2	Poulet de chair	40 J	2021-04-09	Sidi Boubker El Haj	Complet	EPI1950341- EPI1950348
	A/chicken/Morocco/26-2_917_21RS1333-32/2021	H9N2	Poules pondeuses	19 S	2021-04-28	Béni Mellal	Complet	EPI1950178- EPI1950185

*J : Jours et S : Semaines

na : non applicable

Des arbres phylogénétiques ont été construites à partir des nucléotides et des séquences d'acides aminés déduites des 8 segments de gènes (HA, N, MP, NP, NS, PB1, PB2, PA) des isolats marocains et des souches de référence H9N2 non marocaines.

L'analyse phylogénétique du segment du gène de l'hémagglutinine (HA) a révélé que tous les virus H9N2 collectés dans le pays depuis 2016 appartiennent à la lignée G1 et se regroupent avec les virus H9N2 identifiés au Moyen-Orient (Emirats Arabes Unis et Oman), en Afrique du Nord (Algérie) et en Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Sénégal, Togo, Ghana, Bénin) entre 2015 et 2020. La figure 37 montre les relations phylogénétiques des isolats marocains avec des souches de référence sélectionnées basées sur les séquences du gène HA.

Les arbres phylogénétiques des autres segments de gènes confirment le même regroupement génétique (Voir figures 38 à 44). Les topologies arborescentes indiquent que les virus H9N2 du Maroc avaient évolué en plusieurs groupes génétiques dans le pays. Cependant, le manque de cohérence des groupes entre les différentes phylogénies suggère la survenue de multiples événements de réassortiment inter-sous-types.

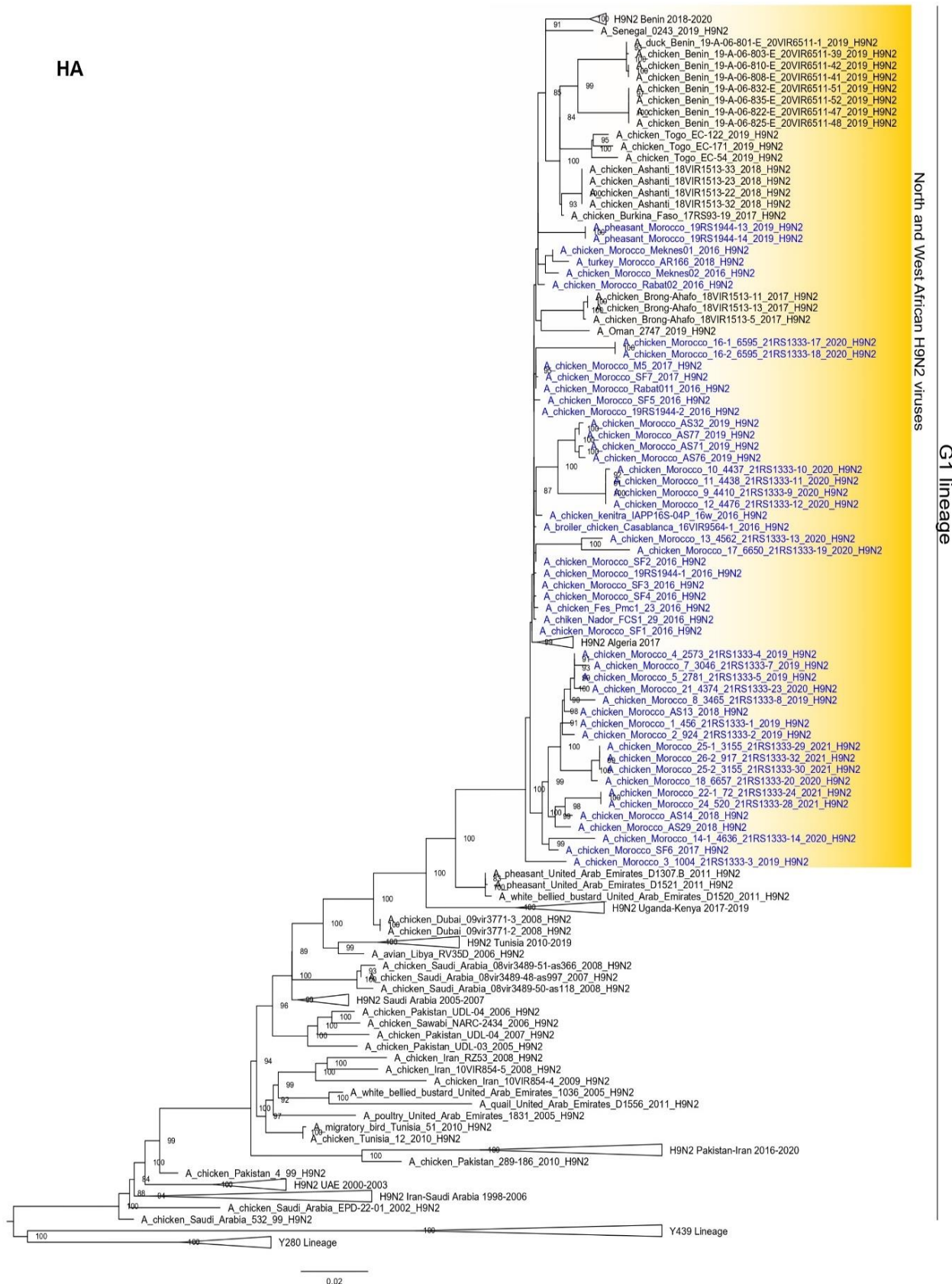


Figure 37: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène HA (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.



Figure 38: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène NA (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.



Figure 39 : Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène MP (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.



Figure 41 : Arbre phylogénétique du maximum Likhlehood du gène PA (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.



Figure 42: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène NS (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.



Figure 43: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène PB1 (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.



Figure 44: Arbre phylogénétique du maximum Likelihood du gène PB2 (IQ-TREE v.1.6.8). Les virus H9N2 du Maroc analysés dans cette étude sont marqués en bleu. Les valeurs de bootstrap ultra-rapides égal ou supérieur à 80 % sont indiqués à côté des nœuds.

L'évolution du virus en plusieurs groupes génétiques est également évidente à partir de l'analyse médiane du réseau de l'HA. Bien que toutes les séquences 2016-2017 (en jaune sur la figure 45) montrent une relation génétique élevée (de 1 à 16 différences de nucléotides) et se regroupent sur le centre du réseau, les virus collectés en 2018-2019 (en vert sur la figure 45) et 2020-2021 (en bleu sur la figure 45) séparés des virus pro-géniteurs 2016-2017 par de longues branches (de 15 à 54 différences de nucléotides) qui se propagent à partir du centre dans de multiples directions, formant des grappes séparées. Le nombre élevé de vecteurs médians, représentant l'ancêtre perdu des séquences, indiquent clairement une lacune pertinente dans les données.

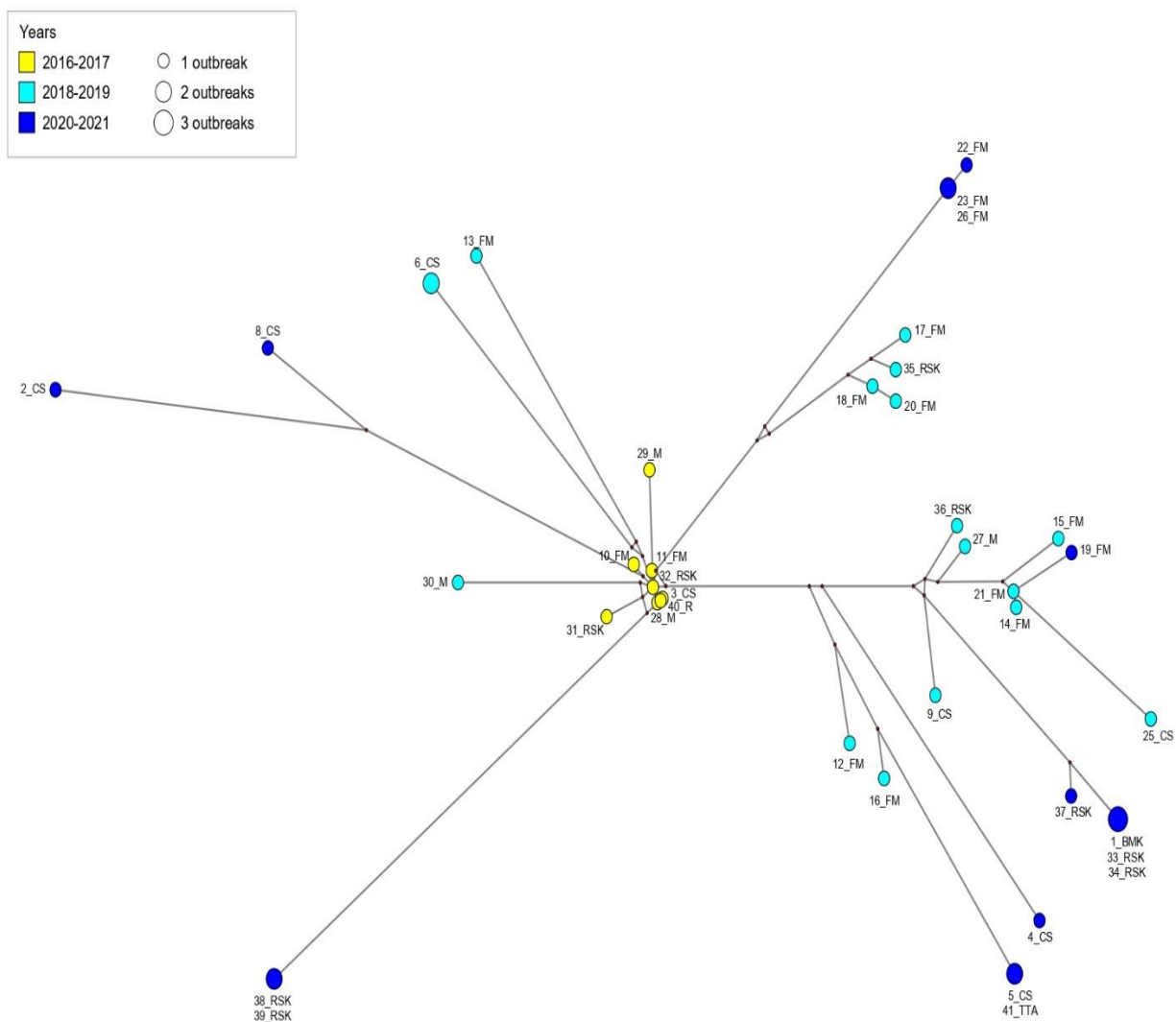


Figure 45: Le réseau de jonction médiane HA montrant une relation génétique élevée entre tous les virus H9N2 marocains de 2016 et 2017 tandis que les virus de 2018-2019 et 2020-2021 sont séparés de leurs ancêtres de 2016-2017 par de longues branches.

Par contre, aucun regroupement particulier n'a été observé selon à l'origine géographique, ce qui suggère une large dispersion du virus à l'intérieur du pays (Figure 46).

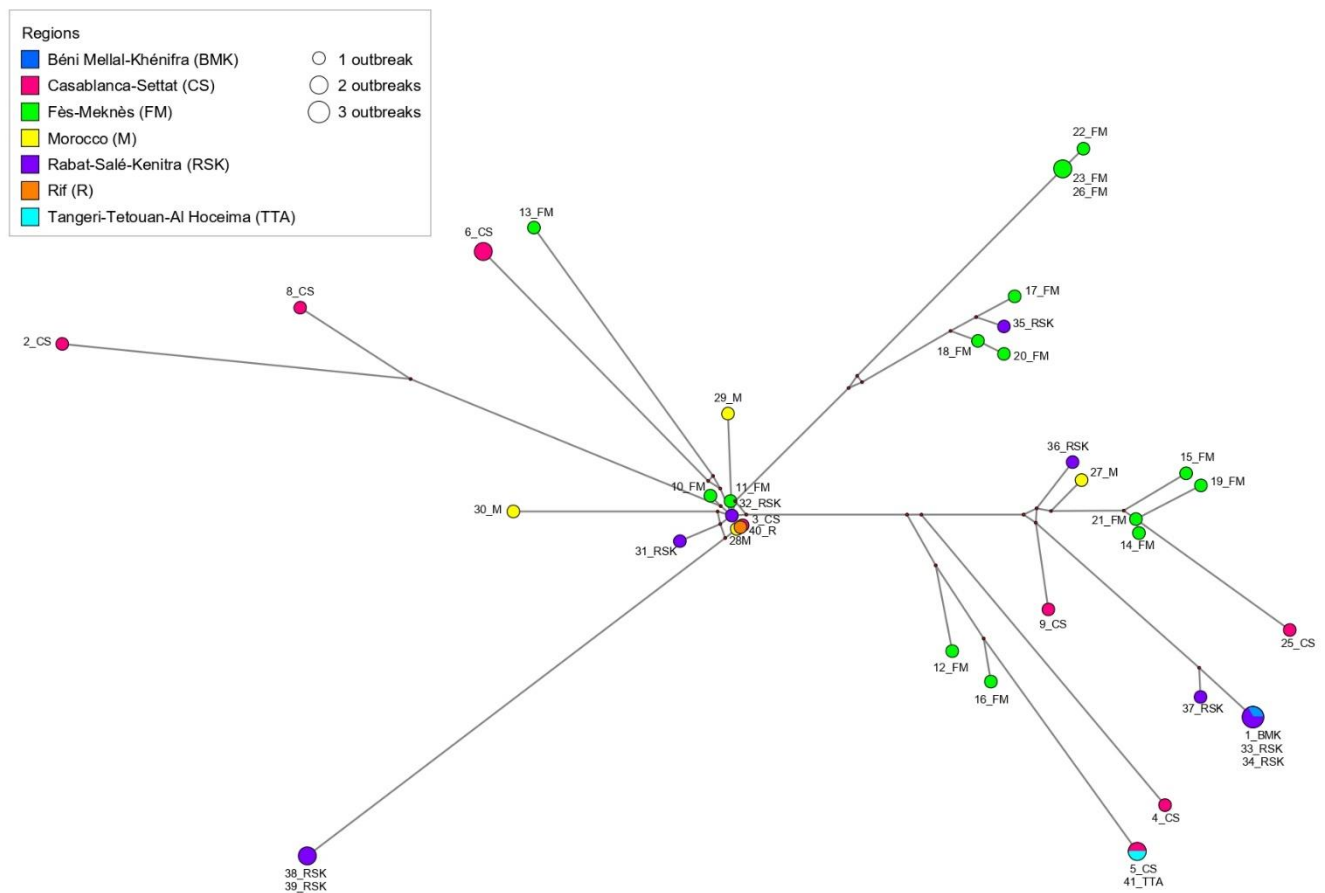


Figure 46: Le réseau de jonction médiane HA montrant l'absence de relation génétique particulière entre les virus H9N2 marocains de 2016 à 2021 en fonction de l'origine géographique

3.3.2. Analyse bayésienne :

Pour étudier le rôle du Maroc dans la propagation géographique des virus H9N2 de la lignée G1, nous avons effectué une analyse phylo-géographique bayésienne. Nos résultats ont montré que le virus H9N2 s'est propagé du Moyen-Orient au Maroc, puis du Maroc à l'Algérie et du Maroc à l'Afrique de l'Ouest. Toutes ces transitions ont été bien supportées et appuyées par des Facteurs Bayes supérieurs à 20 ($BF > 20$, Figure 47). Cette constatation suggère que le Maroc pourrait avoir joué un rôle central dans la propagation du virus H9N2 sur le continent Africain, même si cette interprétation pourrait avoir été biaisée par le nombre plus élevé de séquences du Maroc par rapport à celles des autres pays Africains.

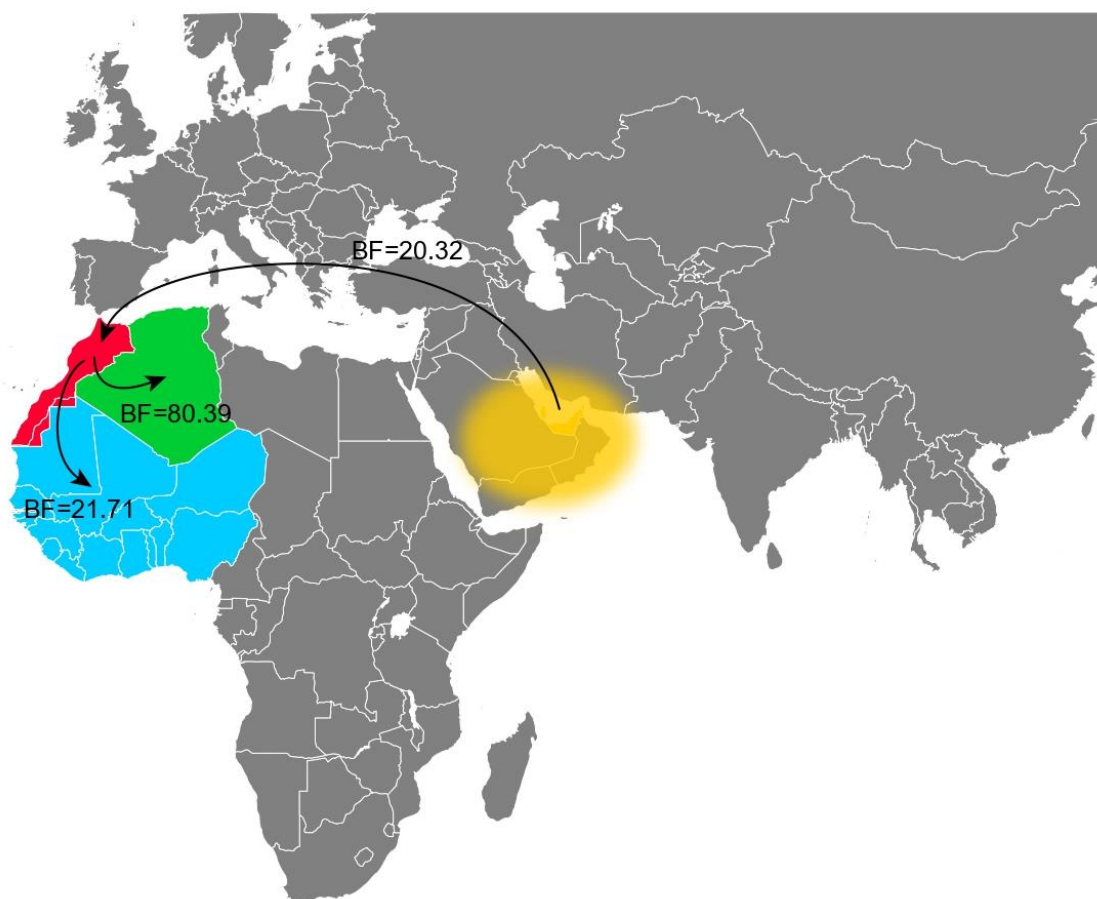


Figure 47: Dynamique spatio-temporelle décrivant les origines géographiques des virus H9N2 marocains et le virus s'est propagé du Maroc à d'autres pays Africains. Les transitions appuyées sont indiquées par lignes continues (BF > 20)

3.3.3. Analyse moléculaire et sites sélectionnés positivement

L'analyse moléculaire a révélé que les virus H9N2 du Maroc présentent les mêmes sites de clivage (RSSR/GLF) que les virus nord-africains H9N2 précédemment identifiés de la Lignée G1. De plus, la plupart des virus marocains possèdent l'acide aminé Leucine en position 226 et thréonine en position 155 (numérotation H3) du site de liaison au récepteur HA; ces mutations impliquent une liaison préférentielle à l'acide sialique lié en 2-6 de type récepteurs (SA 2–6) humains (Wan and Perez 2007; Peacock et al. 2017). Il convient de noter que le site 226 a été identifié comme sous sélection positive par les deux Méthodes MEME et FEL (valeur $p < 0,05$) (Tableau XV). Les virus marocains H9N2 montrent trois différents acides aminés dans cette position : Leucine (L), Glutamine (Q) et Arginine (R). Ces substitutions d'acides aminés peuvent affecter non seulement les propriétés de liaison au récepteur du virus, mais également influencer sa spécificité antigénique (Peacock et al. 2018). Bien que les acides aminés L et Q aient souvent été identifiés dans les virus appartenant à la lignée G1, R a rarement été

observé dans le virus H9N2 (un virus d'Algérie et un du Maroc). Des études antérieures ont démontré que cette mutation est associée au changement de la préférence de la liaison de l'HA du virus pandémique (H1N1) de 2009, du récepteur de type humain, l'acide sialique lié en 2,6, au récepteur de type aviaire, acide sialique lié en 2,3 (Suptawiwat et al. 2013; He et al. 2014).

En plus de 226, dans le gène HA, nous avons identifié trois autres sites (sites 190, 160 et 186) sous sélection positive : un (site 190) en utilisant les deux méthodes, tandis que les deux autres ont été reconnus uniquement par FEL. Il convient de noter que tous ces sites appartiennent au domaine de liaison aux récepteurs et/ou aux sites antigéniques (Peacock et al. 2018; Peacock et al. 2016; Kaverin et al. 2004).

Tableau XV : Sites sous sélection positive (p-value < 0.05) au niveau de la protéine Hémagglutinine des virus H9N2 marocains.

Méthode	Site (h9 numbering)	Site (h3 numbering)	p-value	Aminoacides		Références
MEME	180	190	0.03	A, T, V	RBS, antigenic site B	[67]
	216	226	0.03	L, Q, R	RBS, antigenic site D	[68]
FEL	180	190	0.02	A, T, V	RBS, antigenic site B	[67]
	216	226	0.02	L, Q, R	RBS, antigenic site D	[68]
	150	160	0.03	G, N, V	antigenic site B	[64]
	176	186	0.04	P, A	RBS	[69]

4. Discussion

Le virus de l'IAFP de sous-type H9N2 a été isolé pour la première fois aux Etats unis en 1966 à partir d'un élevage de dindes. Avant les années 90, le virus H9N2 a été isolé fréquemment du canard. En 1992, c'est la première fois que le virus a provoqué la maladie chez le poulet. Entre 1992 et 1999, plusieurs pays de l'Asie ont été touchés par ce virus (Chine, Corée, Népal, Bangladesh). A partir des années 2000, le virus d'IAFP de sous-type H9N2 s'est propagé en direction du Moyen Orient et l'Afrique du Nord (Iran, Jordanie, Emirats, Arabie Saoudite, Sultanat Oman, Tunisie, Egypte, Lybie), s'étendant à l'Afrique de l'Ouest, ainsi qu'à l'Afrique de l'Est.

Au Maroc, le premier foyer d'IAFP H9N2 a été décrit dans des élevages de poulets de chair en janvier 2016 (El Houadfi et al. 2016). Le virus a ensuite été isolé de poules pondeuses et de reproducteurs dans différentes régions du pays. Dans le cadre d'un programme de surveillance, les services vétérinaires nationaux ont mis en place un programme de vaccination de masse contre le H9N2 à l'aide de vaccins inactivés homologues dans tous les secteurs de la production avicole, d'abord pour les reproducteurs et

les poules pondeuses, et quelques jours plus tard pour la dinde et les troupeaux de poulets de chair. L'épidémie a été maîtrisée en 3 à 4 mois, après cet épisode, la vaccination a été autorisée pour tous les types de production de la volaille en utilisant des vaccins inactivés homologues et hétérologues. Au cours des 5 dernières années, 13 vaccins H9N2 provenant de différentes souches H9, c'est-à-dire originaires du Maroc, des Émirats Arabes Unis, de Corée, de Turquie, d'Italie et d'Égypte, étaient disponibles et commercialisés au Maroc (Voir tableau II). Malgré cette disponibilité des vaccins, une étude récente sur l'efficacité des quatre vaccins les plus utilisés au Maroc dans les élevages avicoles a confirmé la nécessité d'adapter en permanence les souches vaccinales au virus circulant sur le terrain (El Khantour et al. 2021). Dans les pays voisins d'Afrique du Nord, la vaccination contre le virus IA H9N2 a également été mise en œuvre dans les filières de production avicole en utilisant différents types de vaccins, comme les vaccins homologues inactivés et les vaccins vectorisés en Algérie. En Tunisie, la vaccination à l'aide de vaccins homologues inactivés pour les reproducteurs de poulets et de dindes et poules pondeuses a été pratiquée depuis 2015, mais à ce jour, aucune vaccination n'a été utilisée dans les élevages de poulets de chair. En Égypte, la vaccination est actuellement mise en œuvre à l'aide de vaccins à base de souches non locales, à efficacité variable. En revanche, la vaccination sur le terrain n'a jamais été signalée en Libye (Kaboudi 2019). Malgré ces approches de vaccination, le VIAFP H9N2 est devenu enzootique en Afrique du Nord et continue de causer des pertes économiques même chez les troupeaux vaccinés. Ainsi, les virus H9N2 circulants en Afrique du Nord doivent être étudiés d'avantage et plus en détail, et en même temps, une révision des vaccins employés et des activités de surveillance à l'échelle régionale devraient être mises en œuvre.

Sur la base de leurs caractéristiques génétiques, les VIA H9N2 sont divisés en trois grandes lignées : la lignée de type G1 représentée par (A/Quail/Hong Kong/G1/97), la lignée de type Coréen représentée par (A/Chicken/Korea/38349-p96323/96 et A/Duck/Hong Kong/Y439/97) et la lignée de type Y280 représentée par (A/Duck/Hong Kong/Y280/97, A/Chicken/Beijing/1/94 et A/Chicken/Hong Kong/G9/97) (Sun and Liu 2015; Lee et al. 2000; Li et al. 2017). Jusqu'à présent, la lignée de type G1 est la seule lignée qui a été trouvée en Afrique (Awuni et al. 2019). Tous les virus H9N2 détectés chez les volailles en Afrique sont apparentés à ceux isolés aux Emirats Arabes Unis.

Nos résultats indiquent que tous les virus H9N2 marocains de 2016 à 2021 appartiennent à la lignée G1 et sont liés aux virus du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord et de l'Ouest, comme décrit dans les rapports précédents (Amal et al. 2020; El Khantour et al. 2020). Les résultats obtenus à partir de l'analyse spatiale a démontré que le VIA H9N2 avait été introduit au Maroc à partir du Moyen Orient,

probablement par l'importation de faucons pour la chasse, et a circulé dans le pays au cours des six dernières années. L'étude a également montré que la lignée de type H9N2 G1 est le génotype H9 prédominant dans les élevages avicoles marocains. Du Maroc, le virus s'est propagé à L'Algérie et à l'Afrique de l'Ouest, suggérant le rôle clé du Maroc dans la propagation du virus H9N2 sur le continent Africain, comme indiqué dans des études antérieures (Awuni et al. 2019; Jeevan et al. 2019; Zecchin et al. 2017; Kariithi et al. 2020; Fusade-Boyer et al. 2021). Une telle propagation de virus pourrait être produite par le mouvement des professionnels de la volaille (Zecchin et al. 2017) et/ou le commerce des produits de la volaille, puisque que le marché d'exportation des poussins d'un jour et des œufs à couver du Maroc vers l'Afrique de l'Ouest était bien documenté (Hassan et al. 2017). Cependant, le manque de données épidémiologiques, ainsi que le nombre limité de séquences disponibles pour les autres pays Africains et le nombre important de souches marocaines par rapport aux autres pays d'Afrique, pourraient avoir affecté nos résultats et biaisé notre interprétation.

Les analyses évolutives et de réseau des virus H9N2 du Maroc indiquent une forte similarité entre toutes les séquences HA de 2016-2017, ce qui est conforme aux études précédentes (El Khantour et al. 2020; Amal et al. 2020). Par contre, de longues branches séparent les virus 2018-2019 et 2020-2021 de leurs ancêtres (2016-2017). Cela pourrait être expliqué par la mise en place de la vaccination à partir de 2016 ; La haute couverture vaccinale et l'utilisation de plusieurs types de vaccins peuvent avoir entraîné l'évolution du virus dans de multiples directions, avec la génération conséquente de plusieurs groupes génétiques séparés dans le pays. Cela a été confirmé par l'identification de plusieurs sites dans la protéine HA sous une sélection positive située dans le RBS ou les sites antigéniques, ce qui peut faciliter au virus de s'échapper au vaccin, compte tenu du fait que la plupart (71,05%, 54/76) des troupeaux positifs au H9N2 ont été vaccinés.

Comme observé précédemment dans les virus Africains H9N2 (Awuni et al. 2019; Zecchin et al. 2017; Fusade-Boyer et al. 2021; Arbi et al. 2020), la plupart des protéines HA H9N2 hébergeait des mutations adaptées aux mammifères, y compris le marqueur Hémagglutinine de type humain 216L (226 en numérotation H3), qui favorise la liaison préférentielle aux récepteurs de l'acide sialique liés en 2–6 des cellules épithéliales humaines (Delpont et al. 2010) et a aussi été décrit comme un mécanisme d'échappement immunitaire (Peacock et al. 2017). La preuve d'une sélection positive du marqueur 226L lors de passages en série du virus chez des poulets a été fournie par Jegede et al., 2018 (Jegede et al. 2018), suggérant que les virus H9N2 ont acquis l'adaptation aux mammifères en circulant chez la volaille.

Cependant, des études spécifiques de liaison aux récepteurs seront déterminantes pour évaluer le potentiel zoonotique des virus H9N2 marocains, puisque d'autres mutations dans les HA et des protéines internes s'avèrent nécessaires pour une adaptation réussie du virus de l'hôte aviaire à l'hôte humain.

Le présent travail est la première étude complète qui donne un aperçu des origines historiques et les caractéristiques évolutives du VIA H9N2 marocain, basée sur l'analyse phylodynamique bayésienne et la caractérisation du génome complet. Au cours des cinq dernières années, le virus H9N2 au Maroc a montré une diversification génétique rapide, probablement dirigée par une pression sélective exercée par les anticorps induits par la vaccination. Les mutations et les réassortiments observés pourraient étendre la gamme des espèces hôtes et pourrait conduire à l'émergence de nouvelles souches (Jin et al. 2018; Park et al. 2011). De plus, notre étude a démontré que les virus avec un marqueur, bien décrit dans la littérature, associé à un potentiel zoonotique (226L, numérotation H3) peuvent représenter un risque sérieux pour la santé publique au Maroc. Par conséquent, la circulation du virus IA H9N2 devrait être étudiée dans d'autres espèces, telles que les oiseaux sauvages et les mammifères, y compris les humains, pour mieux comprendre l'écologie du virus H9N2 au Maroc. D'autant plus qu'une étude moléculaire récente sur la présence du VIA chez les oiseaux sauvages séjournant dans le couloir des zones humides au Maroc lors de leur traversée hivernale, a montré un taux de positivité élevé du virus de la grippe chez différentes espèces d'oiseaux (El Mellouli et al. 2021).

Une surveillance systématique continue de l'évolution moléculaire du VIA H9N2 est fortement nécessaire pour anticiper l'émergence de nouvelles souches H9N2 échappant à la protection vaccinale ou présentant un potentiel pandémique humain accru.

5. Conclusion

La présente étude a été réalisée pour enquêter sur les origines, le potentiel zoonotique ainsi que déterminer l'impact de la vaccination sur l'évolution moléculaire des virus H9N2 marocains. Vingt-huit (28) virus H9N2 collectés de 2016 à 2021 dans des élevages avicoles marocains ont été isolés et leurs génomes entiers séquencés. Des analyses phylogénétiques et évolutives ont montré que Les virus H9N2 marocains appartiennent à la lignée G1 et sont étroitement apparentés aux virus isolés en Afrique et au Moyen-Orient. Une grande similitude entre toutes les séquences d'hémagglutinine 2016-2017 a été observée, indiquant que les virus ont peu évolué génétiquement durant cette période, tandis que les virus identifiés en 2018-2019 et 2020-2021 ont été séparés de leurs ancêtres 2016-2017 par de longues branches. Les mutations de la protéine HA associées à une dérive antigénique et à une augmentation du potentiel zoonotique ont également été trouvés. Les analyses phylo-géographiques bayésiennes ont révélé que le

Moyen-Orient comme étant la région d'où le virus H9N2 marocain a pu provenir, avant de se propager aux autres pays africains. Notre étude est la première analyse complète de l'histoire évolutive des virus H9N2 au Maroc, soulignant leur potentiel zoonotique et soulignant l'importance de mettre en place des systèmes de suivi efficaces. Des mesures de prévention et de contrôle des virus de l'influenza aviaire, telles que le contrôles aux frontières et des mouvements, la surveillance active, le renforcement de la biosécurité dans les élevages avicoles, le respect et l'application rigoureuse des protocoles de vaccination sont nécessaires pour prévenir la propagation du virus.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La présente thèse a pour objectifs l'investigation de la présence du virus de l'Influenza aviaire chez les oiseaux sauvages aquatiques et terrestres dans les zones humides et sites ornithologiques pertinents au Maroc couvrant une période allant de 2016 à 2019 et la connaissance des origines épidémiologiques et géographiques, le potentiel zoonotique ainsi que l'évolution moléculaire des virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) H9N2 au Maroc de 2016 à 2021.

Dans la première étude de cette thèse, des investigations cliniques, épidémiologiques et de laboratoire par la technique RT-PCR en temps réel, sur 967 échantillons d'organes, d'écouvillons trachéaux et cloacaux et de matières fécales, provenant de 480 oiseaux représentant 56 différentes espèces d'oiseaux sauvages, 20 familles et 8 ordres, principalement de Charadriiformes, Anseriformes, Pelecaniformes et Passeriformes qui ont été prélevés, entre Novembre 2016 et Mai 2019, dans 17 zones humides et 6 sites ornithologiques pertinents au Maroc, nous ont permis de révéler la présence du VIA chez les oiseaux sauvages, principalement des échassiers, des goélands et des hérons garde-bœufs, dans trois zones étudiées (la lagune de Smir, Complexe Sidi Moussa-Oualidia, Côte d'El Jadida), ces sites sont proches des zones de concentration des élevages avicoles industriels, ce qui signifie que les oiseaux sauvages pourraient représenter une source importante de VIA pour le secteur avicole au Maroc. Nos résultats ont souligné également des taux de détection plus élevés du VIA chez les Charadriiformes alors que tous les oiseaux de la famille des Anatidae prélevés en hiver étaient négatifs. Notre étude a montré aussi que le héron garde-bœuf (genre *Bubulcus*) est sensible à l'infection par le VIA et que les matières fécales représentent l'échantillon qui était associé à la positivité la plus élevée et aux valeurs de Ct les plus précoces.

Par conséquent, pour anticiper et prévenir les futures épidémies de l'AIV, il est nécessaire de :

- Continuer à maintenir une surveillance active régulière du VIA chez les oiseaux sauvages.
- Mettre en place une étude de l'interface entre les populations d'oiseaux sauvages des zones humides et les élevages avicoles.
- Axer et concentrer les études notamment sur les sites et les espèces identifiées dans cette étude comme à haut risque de circulation virale, ce qui pourrait aider à faire progresser notre compréhension de l'épidémiologie de l'IA chez les oiseaux sauvages au Maroc.
- Assurer une surveillance continue pendant tout un cycle annuel pour aider à déterminer le rôle des oiseaux sauvages dans le maintien du VIA dans les zones humides marocaines.

- Cibler les hérons garde bœufs et les espèces d'oiseaux terrestres pourrait montrer leur implication dans la propagation et la persistance du VIA.
- Favoriser le choix des matières fécales fraîches comme une matrice pertinente pour la surveillance chez les oiseaux sauvages puisque l'échantillonnage fécal pourrait être utilisé à grande échelle pour les enquêtes IA parce qu'il offre une grande capacité d'échantillonnage, moins de temps que d'autres techniques, et contribue à la protection des oiseaux de la capture et de la chasse.

Dans la deuxième étude de cette thèse, nous avons isolé et séquencer le génome complet de vingt-huit (28) virus H9N2 collectés entre Janvier 2016 et Mai 2021 dans 81 élevages avicoles (Poulet de chair, Poules pondeuses, Reproducteurs, Dinde) situés dans 7 différentes régions du Maroc. Ce travail est la première étude complète qui donne un aperçu sur les origines historiques et les caractéristiques évolutives du VIA H9N2 marocain, basée sur l'analyse phylodynamique bayésienne et la caractérisation du génome complet. Les analyses phylogénétiques et évolutives ont montré que les virus H9N2 marocains appartiennent à la lignée G1 et sont étroitement apparentés aux virus isolés en Afrique et au Moyen-Orient. Nos résultats ont montré également une grande similitude entre toutes les séquences d'hémagglutinine 2016-2017, indiquant une évolution génétique limitée des virus IA H9N2 marocains durant cette période, alors que les virus identifiés en 2018-2019 et 2020-2021 sont séparés de leurs ancêtres de 2016-2017 par de longues branches, soulignant une diversification génétique rapide du virus au cours des cinq dernières années, probablement dirigée par une pression sélective exercée par les anticorps induits par la vaccination. Notre étude a également mis en évidence la présence des mutations de la protéine hémagglutinine (HA) associées à une dérive antigénique et à une augmentation du potentiel zoonotique notamment le marqueur 226L, ce qui pourrait étendre la gamme des espèces hôtes et conduire à l'émergence de nouvelles souches et par conséquent représenter un risque sérieux pour la santé publique au Maroc. Les analyses phylo-géographiques bayésiennes ont également révélé que le Moyen-Orient est à l'origine de l'introduction du virus H9N2 marocain avant de se propager à partir du Maroc aux autres pays africains.

Notre étude nous a permis de connaître l'histoire évolutive des virus H9N2 au Maroc, soulignant leur potentiel zoonotique et indiquant l'importance de mettre en place des systèmes de suivi efficaces.

Par conséquent pour mieux contrôler et gérer les futures épidémies et prévenir la dissémination du virus, il est fortement nécessaire de :

- Mettre en place une surveillance systématique continue de l'évolution moléculaire du H9N2 au Maroc pour anticiper l'émergence de nouvelles souches H9N2 pouvant s'échapper à la protection vaccinale ou présentant un potentiel pandémique humain accru.
- Revoir les vaccins employés pour évaluer leur efficacité et adapter en permanence les souches vaccinales au virus circulant sur le terrain.
- Etudier les virus H9N2 circulants dans les pays de l'Afrique du Nord
- Mise en œuvre des activités régionales de surveillance.
- Etudier la circulation du virus H9N2 chez d'autres espèces notamment les oiseaux sauvages et les mammifères y compris l'homme pour mieux comprendre l'écologie du virus H9N2 au Maroc.
- Compléter et continuer l'évaluation du potentiel zoonotique des virus H9N2 marocains par d'autres études spécifiques pour investiguer la présence d'autres mutations nécessaires pour une adaptation réussie du virus de l'hôte aviaire à l'hôte humain.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Garib SO, Kammon A, Asheg A, Hamid M, Fathalla H, Lawala A Detection of antibodies to avian influenza H9N2 in broiler flocks clinically expressing a respiratory disease syndrome. In: 15th World Veterinary Poultry Congress 2007. pp 130-130
- Alexander DJ (1995) The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *Journal of Comparative Pathology* 112 (2):105-126. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80054-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80054-4)
- Alexander DJ (2007a) An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25 (30):5637-5644. doi:doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.051
- Alexander DJ (2007b) Summary of Avian Influenza Activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian Diseases* 51 (s1):161-166. doi:10.1637/7602-041306R.1
- Amal E-B, Saâdi N, Asma F, Moncef B, Ouafae FF (2020) Characterization and Phylogenetic Analysis of the Hemagglutinin Gene in H9 Influenza Viruses from Chickens in Morocco from 2017 to 2019. *Avian Diseases* 64 (3):310-314. doi:doi:10.1637/aviandiseases-D-20-00009
- Arbi M, Souiai O, Rego N, Larbi I, Naya H, Ghram A, Houimel M (2020) Historical origins and zoonotic potential of avian influenza virus H9N2 in Tunisia revealed by Bayesian analysis and molecular characterization. *Archives of Virology* 165 (7):1527-1540. doi:doi:10.1007/s00705-020-04624-4
- Ardans A (1999) Orthomyxoviridae. *Veterinary Microbiology*:396-402
- Awuni JA, Bianco A, Dogbey OJ, Fusaro A, Yingar DT, Salviato A, Ababio PT, Milani A, Bonfante F, Monne I (2019) Avian influenza H9N2 subtype in Ghana: virus characterization and evidence of co-infection. *Avian Pathology* 48 (5):470-476. doi:doi:10.1080/03079457.2019.1624687
- Badstue PB, Smidt B (1978) Egg-drop syndrome 76 in Danish poultry. *Nordisk veterinærmedicin* 30 (11):498-505
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16 (1):37-48. doi:doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Barberis A, Boudaoud A, Gorrill A, Loupias J, Ghram A, Lachheb J, Alloui N, Ducatez MF (2020) Full-length genome sequences of the first H9N2 avian influenza viruses isolated in the Northeast of Algeria. *Virol J* 17 (1):1-16
- Beby-Defaux A, Giraudeau G, Bouguermouh S, Agius G (2003) La grippe humaine : aspects virologiques, épidémiologie et diagnostic virologique. *Med Mal Infect* 33 (3):134-142. doi:[https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(03\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(03)00008-8)
- Becker W (1966) The isolation and classification of tern virus: influenza virus A/tern/South Africa/1961. *J Hygiene* 64 (3):309-320
- Belkasmi SF, Fellahi S, Touzani CD, Faraji FZ, Maaroufi I, Delverdier M, Guérin J-L, Fihri OF, El Houadfi M, Ducatez MF (2020) Co-infections of chickens with avian influenza virus H9N2 and Moroccan Italy 02 infectious bronchitis virus: effect on pathogenesis and protection conferred by different vaccination programmes. *Avian Pathology* 49 (1):21-28. doi:doi:10.1080/03079457.2019.1656328
- Benhoussa A, Dakki M, Qninba A (1999) Habitats d'un site Ramsar côtier du Maroc, la Merja Zerga: approches typologique et cartographique.
- BENHOUSSE A, QNINBA A, ACHAKAR M, HIMMI O Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR).
- Bidoudan Y, NASSIK S, Fihri OF, BOLLO E, EL HOUADFI M, TLIGUI N (2021) Evaluation semi-quantitative des lésions histopathologiques respiratoires chez la dinde moyennant un système de scoring lésionnel: Infection expérimentale par le virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 9 (3)

- Biquand É, Demeret C (2016) Résolution de la structure de l'ARN polymérase dépendante de l'ARN trimérique des virus influenza : son impact sur notre compréhension des interactions de la polymérase avec les facteurs viraux et cellulaires. *Virologie* 20 (6):302-320. doi:10.1684/vir.2016.0672
- Blagodatski A, Trutneva K, Glazova O, Mityaeva O, Shevkova L, Kegeles E, Onyanov N, Fede K, Maznina A, Khavina E, Yeo SJ, Park H, Volchkov P (2021) Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens* 10 (5):630. doi:10.3390/pathogens10050630
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15):2114-2120. doi:doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Boumart Z, Bamouh Z, Jazouli M, Zecchin B, Fusaro A, Salviato A, Monne I, Tadlaoui KO, Harrak ME (2019) Pathogenicity and full genome sequencing of the avian influenza H9N2 Moroccan isolate 2016. *Avian diseases* 63 (1):24-30. doi:doi:10.1637/11941-080418-Reg.1
- Brugère-Picoux J (2007) Actualités sur les maladies émergentes. *Scis* 2 (2e)
- Buisson Y, Nicand É, Saliou P (2007) La grippe en face. Xavier Montauban SA,
- Busquets N, Alba A, Napp S, Sánchez A, Serrano E, Rivas R, Núñez JI, Majó N (2010) Influenza A virus subtypes in wild birds in North-Eastern Spain (Catalonia). *Virus Res* 149 (1):10-18
- Butt AM, Siddique S, Idrees M, Tong Y (2010) Avian influenza A (H9N2): computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population. *Virol J* 7 (1):1-11. doi:doi:10.1186/1743-422X-7-319
- Butt K, Smith GJ, Chen H, Zhang L, Leung YC, Xu K, Lim W, Webster RG, Yuen K, Peiris JM (2005) Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *Journal of clinical microbiology* 43 (11):5760-5767. doi:doi:10.1128/JCM.43.11.5760-5767.2005
- Byrd-Leotis L, Cummings RD, Steinhauer DA (2017) The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int J Mol Sci* 18 (7). doi:10.3390/ijms18071541
- Calnek B, Barnes H, Beard C, Yoder H (1997) Diseases of poultry. Ames. Iowa, USA: Iowa State University Press,
- Capua I, Alexander DJ (2013) Influenza aviaire et maladie de Newcastle. Springer-Verlag Paris,
- Caron A, Abolnik C, Mundava J, Gaidet N, Burger CE, Mochotlhoane B, Bruinzeel L, Chiweshe N, de Garine-Wichatitsky M, Cumming GS (2011) Persistence of low pathogenic avian influenza virus in waterfowl in a Southern African ecosystem. *EcoHealth* 8 (1):109-115. doi:10.1007/s10393-010-0356-4
- Caron A, Cappelle J, Cumming GS, de Garine-Wichatitsky M, Gaidet N (2015) Bridge hosts, a missing link for disease ecology in multi-host systems. *Veterinary Research* 46 (1):83. doi:10.1186/s13567-015-0217-9
- Caron A, Cappelle J, Gaidet N (2017) Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *Journal of Applied Ecology* 54 (3):681-690
- Caron A, Grosbois V, Etter E, Gaidet N, de Garine-Wichatitsky M (2014) Bridge hosts for avian influenza viruses at the wildlife/domestic interface: an eco-epidemiological framework implemented in southern Africa. *Preventive veterinary medicine* 117 (3-4):590-600
- Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD (2008) A Novel Role for Non-Neutralizing Antibodies against Nucleoprotein in Facilitating Resistance to Influenza Virus. *The Journal of Immunology* 181 (6):4168. doi:10.4049/jimmunol.181.6.4168

- Cerda-Armijo C, de León MB, Ruvalcaba-Ortega I, Chablé-Santos J, Canales-del-Castillo R, Peñuelas-Urquides K, Rivera-Morales LG, Menchaca-Rodríguez G, Camacho-Moll ME, Contreras-Cordero JF (2020) High prevalence of avian influenza virus among wild waterbirds and land birds of Mexico. *Avian diseases* 64 (2):135-142
- Cheung TKW, Poon LLM (2007) Biology of Influenza A Virus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1102 (1):1-25. doi:<https://doi.org/10.1196/annals.1408.001>
- Choi Y, Ozaki H, Webby R, Webster R, Peiris J, Poon L, Butt C, Leung Y, Guan Y (2004) Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *J Virol* 78 (16):8609-8614. doi:[doi:10.1128/JVI.78.16.8609-8614.2004](https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8609-8614.2004)
- Chong KC, Lee TC, Bialasiewicz S, Chen J, Smith DW, Choy WSC, Krajden M, Jalal H, Jennings L, Alexander B, Lee HK, Fraaij P, Levy A, Yeung ACM, Tozer S, Lau SYF, Jia KM, Tang JWT, Hui DSC, Chan PKS (2020) Association between meteorological variations and activities of influenza A and B across different climate zones: a multi-region modelling analysis across the globe. *Journal of Infection* 80 (1):84-98. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.09.013>
- Cross G (2002) Hemagglutination inhibition assays. *Semin Avian Exotic Pet Med* 11 (1):15-18. doi:<https://doi.org/10.1053/saep.2002.28236>
- Cui L, Liu D, Shi W, Pan J, Qi X, Li X, Guo X, Zhou M, Li W, Li J (2014) Dynamic reassortments and genetic heterogeneity of the human-infecting influenza A (H7N9) virus. *Nature communications* 5 (1):1-9. doi:[doi:10.1038/ncomms4142](https://doi.org/10.1038/ncomms4142)
- Cumming GS, Caron A, Abolnik C, Cattoli G, Bruinzeel LW, Burger CE, Cecchetti K, Chiweshe N, Mochotlhoane B, Mutumi GL, Ndlovu M (2011) The ecology of influenza A viruses in wild birds in southern Africa. *EcoHealth* 8 (1):4-13. doi:[10.1007/s10393-011-0684-z](https://doi.org/10.1007/s10393-011-0684-z)
- Dadonaite B, Gilbertson B, Knight ML, Trifkovic S, Rockman S, Laederach A, Brown LE, Fodor E, Bauer DLV (2019) The structure of the influenza A virus genome. *Nature Microbiology* 4 (11):1781-1789. doi:[10.1038/s41564-019-0513-7](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0513-7)
- Dakki M, El Agbani M-A, Qninba A (2011) Zones humides du Maroc inscrites jusqu'en 2005 sur la liste de la Convention de Ramsar. Institut Scientifique,
- Dakki M, El Fellah B, Fekhaoui M, El Houadi B, Benhoussa A, Dakki N (2003) Diagnostic pour l'aménagement des Zones humides du nord-est du maroc: Embouchure de la Moulouya. Rapport définitif, pp54
- Dakki MM, Mohamed Amhaouch, Zouhair (2015) Stratégie Nationale des Zones Humides 2015-2024 Stratégie - Plan d'action. Haut-commissariat aux eaux et forêts et à la lutte contre désertification. . [https://medwet.org/wp-content/uploads/2017/03/strategie-nationale - ZH Maroc.pdf](https://medwet.org/wp-content/uploads/2017/03/strategie-nationale-ZH-Maroc.pdf).
- Das B, Tosh C, Kumar M, Nagaraian S, Murugkar H, Shukla S, Tripathi S, Mishra A, Kulkarni D (2014) Isolation and genetic characterization of influenza A (Subtype H5N1) virus from crows in India. *Adv Anim Vet Sci* 2 (11):620-624
- de Graaf M, Fouchier RAM (2014) Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO* 33 (8):823-841. doi:<https://doi.org/10.1002/emboj.201387442>
- Delpont W, Poon AFY, Frost SDW, Kosakovsky Pond SL (2010) Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26 (19):2455-2457. doi:[doi:10.1093/bioinformatics/btq429](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq429)
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler

- D, Daly MJ (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 43 (5):491-498. doi:doi:10.1038/ng.806
- Di Liu WS, Gao GF (2014) Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses. *The Lancet* 384 (9920):869. doi:doi:10.1016/s0140-6736(14)60386-x
- El-Zoghby EF, Arafa A-S, Hassan MK, Aly MM, Selim A, Kilany WH, Selim U, Nasef S, Aggor MG, Abdelwhab E (2012) Isolation of H9N2 avian influenza virus from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) in Egypt. *Archives of virology* 157 (6):1167-1172. doi:doi:10.1007/s00705-012-1269-z
- El Houadfi M, Fellahi S, Nassik S, Guérin J-L, Ducatez MF (2016) First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco. *Virol J* 13 (1):140. doi:doi:10.1186/s12985-016-0596-1
- El Khantour A, El Houadfi M, Nassik S, Tligui NS, El Mellouli F, Sikht F-Z, Ducatez MF, Soulaymani A, Fellahi S (2021) Protective efficacy evaluation of four inactivated commercial vaccines against low pathogenic avian influenza H9N2 virus under experimental conditions in broiler chickens. *Avian diseases* 65 (3):351-357. doi:doi:10.1637/aviandiseases-D-21-00015
- El Khantour A, Soulaymani A, Salek M, Maltouf AF, El Mellouli F, Ducatez MF, Fellahi S (2020) Molecular characterization of the hemagglutinin gene of H9N2 avian influenza viruses isolated from broiler flocks in Morocco from 2016 to 2018. *Vet Arh* 90 (5):477-484. doi:doi:10.24099/vet.arhiv.0724
- El Mellouli F, Abouchoaib N, Zekhnini H, Khayli M, Fusaro A, Idrissi HR, Benhoussa A (2021) Molecular Detection of Avian Influenza Virus in Wild Birds in Morocco, 2016–2019. *Avian Diseases* 66 (1):1-10. doi:doi:10.1637/aviandiseases-D-21-00070
- Elizalde M, Agüero M, Buitrago D, Yuste M, Arias ML, Muñoz MJ, Lelli D, Pérez-Ramírez E, Moreno-Martin AM, Fernández-Pinero J (2014) Rapid molecular haemagglutinin subtyping of avian influenza isolates by specific real-time RT-PCR tests. *J Virol Methods* 196:71-81
- Fadel HM, Afifi R (2017) Investigation of avian influenza infection in wild birds in Ismailia and Damietta cities, Egypt. *Vet world* 10 (6):695
- FAO (2021) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global AIV with zoonotic potential situation update. Rome (Italy). https://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/Global_AIV_Zoonotic_Update/situation_update.html. Accessed Nov 06 2021
- Fereidouni SR, Starick E, Grund C, Globig A, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T (2009) Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Veterinary Microbiology* 135 (3):253-260. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.077>
- Ferenczi M, Beckmann C, Warner S, Loyn R, O'riley K, Wang X, Klaassen M (2016) Avian influenza infection dynamics under variable climatic conditions, viral prevalence is rainfall driven in waterfowl from temperate, south-east Australia. *Veterinary Research* 47 (1):1-12
- Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox N (1997) Long term trends in the evolution of H (3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (15):7712-7718
- Fodor E, Te Velthuis AJW (2020) Structure and Function of the Influenza Virus Transcription and Replication Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10 (9):a038398. doi:10.1101/cshperspect.a038398
- Forrest Heather L, Kim J-K, Webster Robert G (2010) Virus Shedding and Potential for Interspecies Waterborne Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Sparrows and Chickens. *J Virol* 84 (7):3718-3720. doi:10.1128/JVI.02017-09

- Fouchier R, Munster V (2009) Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Rev Sci Tech* 28 (1):49
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen Br, Osterhaus AD (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79 (5):2814-2822
- França MS, Brown JD (2014) Influenza Pathobiology and Pathogenesis in Avian Species. In: Compans RW, Oldstone MBA (eds) *Influenza Pathogenesis and Control - Volume I*. Springer International Publishing, Cham, pp 221-242. doi:10.1007/82_2014_385
- Freytmuth F, Vabret A, Dina J, Daubin C, Gouarin S, Petitjean J, Charbonneau P (2007) Techniques actuelles de diagnostic des infections virales respiratoires en réanimation. *Réanimation* 16 (3):200-209. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.02.018>
- Frymus T, Belák S, Egberink H, Hofmann-Lehmann R, Marsilio F, Addie DD, Boucraut-Baralon C, Hartmann K, Lloret A, Lutz H, Pennisi MG, Thiry E, Truyen U, Tasker S, Möstl K, Hosie MJ (2021) Influenza Virus Infections in Cats. *Viruses* 13 (8). doi:10.3390/v13081435
- Fusade-Boyer M, Djegui F, Batawui K, Byuragaba DK, Jones JC, Wabwire-Mangeni F, Erima B, Atim G, Ukuli QA, Tugume T (2021) Antigenic and molecular characterization of low pathogenic avian influenza A (H9N2) viruses in sub-Saharan Africa from 2017 through 2019. *Emerging microbes infections in Medicine* 10 (1):753-761. doi:doi:10.1080/22221751.2021.1908097
- Fusaro A, Zecchin B, Vrancken B, Abolnik C, Ademun R, Alassane A, Arafa A, Awuni JA, Couacy-Hymann E, Coulibaly MB (2019) Disentangling the role of Africa in the global spread of H5 highly pathogenic avian influenza. *Nature communications* 10 (1):1-13
- Gaidet N, Caron A (2016) Rôle des oiseaux sauvages dans la transmission et la dispersion des virus de l'influenza aviaire : apport de l'éco-épidémiologie dans les écosystèmes afro-tropicaux. *Cah Agric* 25 (5):54001. doi:<https://doi.org/10.1051/cagri/2016037>
- Gaidet N, Caron A, Cappelle J, Cumming GS, Balanca G, Hammoumi S, Cattoli G, Abolnik C, de Almeida RS, Gil P, Fereidouni SR, Grosbois V, Tran A, Mundava J, Fofana B, El Mamy AB, Ndlovu M, Mondain-Monval JY, Triplet P, Hagemeijer W, Karesh WB, Newman SH, Dodman T (2012) Understanding the ecological drivers of avian influenza virus infection in wildfowl: a continental-scale study across Africa. *Proc Biol Sci* 279 (1731):1131-1141. doi:10.1098/rspb.2011.1417
- Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balança G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Lamarque F, Hagemeijer W, Monicat F (2007a) Avian influenza viruses in water birds, Africa. *Emerging Infectious Diseases* 13 (4):626
- Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balança G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Martin V, Tripodi A, Lamarque F (2007b) Influenza surveillance in wild birds in Eastern Europe, the Middle East, and Africa: Preliminary results from an ongoing FAO-led survey. *Journal of Wildlife Diseases* 43 (3):S22
- Gashaw M (2020) A review on avian influenza and its economic and public health impact. *Int J Vet Sci Technol* 4 (1):15-27
- Grog. (2004) Virus grippal : une carte d'identité complexe. In : Informations- Documents- Grippe et autres infections respiratoires aiguës. . Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe <http://www.grog.org/documents/cartevirus.pdf>. Accessed August 03 2022
- Gu M, Chen H, Li Q, Huang J, Zhao M, Gu X, Jiang K, Wang X, Peng D, Liu X (2014) Enzootic genotype S of H9N2 avian influenza viruses donates internal genes to emerging zoonotic influenza viruses in China. *Veterinary microbiology* 174 (3-4):309-315. doi:doi:10.1016/j.vetmic.2014.09.029
- Gu M, Xu L, Wang X, Liu X (2017) Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China. *Veterinary research* 48 (1):1-10. doi:doi:10.1186/s13567-017-0453-2

- Guan Y, Shortridge K, Krauss S, Chin P, Dyrting K, Ellis T, Webster R, Peiris M (2000) H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J Virol* 74 (20):9372-9380. doi:doi:10.1128/JVI.74.20.9372-9380.2000
- Hansbro PM, Warner S, Tracey JP, Arzey KE, Selleck P, O'Riley K, Beckett EL, Bunn C, Kirkland PD, Vijaykrishna D, Olsen B, Hurt AC (2010) Surveillance and analysis of avian influenza viruses, Australia. *Emerg Infect Dis* 16 (12):1896-1904. doi:10.3201/eid1612.100776
- Hassan MM, El Zowalaty ME, Islam A, Khan SA, Rahman MK, Järhult JD, Hoque MA (2020) Prevalence and Diversity of Avian Influenza Virus Hemagglutinin Sero-Subtypes in Poultry and Wild Birds in Bangladesh. *Vet Sci* 7 (2):73
- Hassan N, Kaoutar M, Sara G, Mustapha M (2017) Focus on Poultry in Morocco. *Advances in Environmental Biology* 11:1+. doi:<https://link.gale.com/apps/doc/A518588590/AONE?u=anon~de5f3275&sid=googleScholar&xid=6178e5a7>
- He L, Jiang K, Wu Q, Duan Z, Xu H, Liu J, Cui Z, Gu M, Wang X, Liu X (2014) Two amino acid substitutions in the haemagglutinin of the 2009 pandemic H1N1 virus decrease direct-contact transmission in guinea pigs. *Journal of General Virology* 95 (12):2612-2617. doi:doi:10.1099/vir.0.067694-0
- Henkel JR, Weisz OA (1998) Influenza Virus M2 Protein Slows Traffic along the Secretory Pathway: pH PERTURBATION OF ACIDIFIED COMPARTMENTS AFFECTS EARLY GOLGI TRANSPORT STEPS *. *Journal of Biological Chemistry* 273 (11):6518-6524. doi:10.1074/jbc.273.11.6518
- Henry R, Murphy FA (2018) Etymologia: Hemagglutinin and Neuraminidase. *Emerging infectious diseases* 24 (10):1849-1849. doi:10.3201/eid2410.et2410
- Hervé S, Schmitz A, Briand F-X, Gorin S, Quéguiner S, Niqueux É, Paboeuf F, Scoizec A, Le Bouquin-Leneveu S, Eterradosi N, Simon G (2021) Serological Evidence of Backyard Pig Exposure to Highly Pathogenic Avian Influenza H5N8 Virus during 2016–2017 Epizootic in France. *Pathogens* 10 (5). doi:10.3390/pathogens10050621
- Hilmi K, Koutitonsky VG, Orbi A, Lakhdar JI, Chagdali M (2005) Oualidia lagoon, Morocco: an estuary without a river. *African Journal of Aquatic Science* 30 (1):1-10. doi:10.2989/16085910509503828
- 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* 107 (4):912-923. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.042>
- Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS (2017) UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35 (2):518-522. doi:doi:10.1093/molbev/msx281
- Homme P, Easterday B (1970) Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A/Turkey/Wisconsin/1966 virus. *Avian diseases*:66-74. doi:doi.org/10.2307/1588557
- Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, Webster RG (1995) Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico. *Virology* 213 (1):223-230. doi:<https://doi.org/10.1006/viro.1995.1562>
- ICTV. (2021) Virus Taxonomy: The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature. ICTV. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed August 03 2022
- Jeevan T, Darnell D, Gradi EA, Benali Y, Kara R, Guetarni D, Rubrum A, Seiler PJ, Crumpton JC, Webby RJ, Derrar F (2019) A(H9N2) influenza viruses associated with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. *Influenza Other Respir Viruses* 13 (6):622-626. doi:10.1111/irv.12675

- Jegede A, Fu Q, Berhane Y, Lin M, Kumar A, Guan J (2018) H9N2 avian influenza virus retained low pathogenicity after serial passage in chickens. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 82 (2):131-138
- Jin H, Wang W, Yang X, Su H, Fan J, Zhu R, Wang S, Shi H, Liu X (2018) Evolution of H9N2 avian influenza virus in embryonated chicken eggs with or without homologous vaccine antibodies. *BMC Vet Res* 14 (1):71. doi:doi:10.1186/s12917-018-1391-6
- Kaboudi K (2019) Low pathogenic avian influenza virus subtype H9N2 in poultry in north Africa: Current status. *Veterinary Sciences: Research and Reviews* 5 (2):73-79. doi:DOI: 10.17582/journal.vsr/2019/5.2.73.79
- Kammon A, Heidari A, Dayhum A, Eldaghayes I, Sharif M, Monne I, Cattoli G, Asheg A, Farhat M, Kraim E (2015) Characterization of avian influenza and Newcastle disease viruses from poultry in Libya. *Avian Diseases* 59 (3):422-430
- Kariithi HM, Welch CN, Ferreira HL, Pusch EA, Ateya LO, Binepal YS, Apopo AA, Dulu TD, Afonso CL, Suarez DL (2020) Genetic characterization and pathogenesis of the first H9N2 low pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens in Kenyan live bird markets. *Infection, Genetics Evolution & Development* 78:104074. doi:doi:10.1016/j.meegid.2019.104074
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30 (4):772-780. doi:doi:10.1093/molbev/mst010
- Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Lipatov AS, Krauss S, Webster RG (2004) Structural Differences among Hemagglutinins of Influenza A Virus Subtypes Are Reflected in Their Antigenic Architecture: Analysis of H9 Escape Mutants. *J Virol* 78 (1):240-249. doi:doi:10.1128/JVI.78.1.240-249.2004
- Khan SU, Berman L, Haider N, Gerloff N, Rahman MZ, Shu B, Rahman M, Dey TK, Davis TC, Das BC (2014) Investigating a crow die-off in January–February 2011 during the introduction of a new clade of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 into Bangladesh. *Archives of virology* 159 (3):509-518
- Khawaja J, Naeem K, Ahmed Z, Ahmad S (2005) Surveillance of avian influenza viruses in wild birds in areas adjacent to epicenter of an outbreak in federal capital territory of Pakistan. *Int J Poult Sci* 4 (1):39-43
- Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Katunuma N (1992) Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 267 (19):13573-13579. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42250-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42250-8)
- Kilbourne E (2006) Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Disease journal* 12 (1):9. doi:10.3201/eid1201.051254
- Kochs G, García-Sastre A, Martínez-Sobrido L (2007) Multiple Anti-Interferon Actions of the Influenza A Virus NS1 Protein. *J Virol* 81 (13):7011-7021. doi:10.1128/JVI.02581-06
- Kosakovsky P, Frost SDW (2005) Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Molecular Biology and Evolution* 22 (5):1208-1222. doi:doi:10.1093/molbev/msi105
- Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S (2008) Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 14 (2):86-92. doi:<https://doi.org/10.1007/s10156-008-0596-1>
- Lamb RA, Krug, R.M. (2001) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: D.M. K, Howley, P.M. (ed) *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, pp 1487–1532.

- Landolt GA, Olsen CW (2007) Up to new tricks – A review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Anim Health Res Rev* 8 (1):1-21. doi:10.1017/S1466252307001272
- LARBI I, Ghedira K, Butcher GD, Rego N, Arbi M, Naya H, Tougorti H, El Behi I, Nsiri J, Lachheb J (2021) Phylogenetic Analysis and Assessment of the Pathogenic Potential of Avian Influenza Virus H9N2 in Wild Waterfowl, Wild Birds, and Lagoon Water in Tunisia. *Research Square*
- Lecoq H (2001) [Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898?]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie* 324 (10):929-933. doi:10.1016/s0764-4469(01)01368-3
- Lee C-W, Song C-S, Lee Y-J, Mo I-P, Garcia M, Suarez DL, Kim S-J (2000) Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. *Avian diseases*:527-535. doi:doi:10.2307/1593091
- Lefrere L (2012) Contribution à l'étude de deux lagunes atlantiques marocaines, Khnifiss et Oualidia: faune malacologique, biologie de trois mollusques bivalves et contamination métallique. Université Ibn Zohr Agadir, Morocco,
- Li C, Wang S, Bing G, Carter RA, Wang Z, Wang J, Wang C, Wang L, Wu G, Webster RG (2017) Genetic evolution of influenza H9N2 viruses isolated from various hosts in China from 1994 to 2013. *Emerging microbes infections in Medicine* 6 (1):1-11. doi:doi:10.1038/emi.2017.94
- Li H, Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 26 (5):589-595. doi:doi:10.1093/bioinformatics/btp698
- Li M-L, Rao P, Krug RM (2001) The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO* 20 (8):2078-2086. doi:<https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.2078>
- Lin J-H, Chiu S-C, Cheng J-C, Chang H-W, Hsiao K-L, Lin Y-C, Wu H-S, Salemi M, Liu H-F (2011) Phylodynamics and Molecular Evolution of Influenza A Virus Nucleoprotein Genes in Taiwan between 1979 and 2009. *PLoS One* 6 (8):e23454. doi:10.1371/journal.pone.0023454
- Lo FT, Zecchin B, Diallo AA, Racky O, Tassoni L, Diop A, Diouf M, Diouf M, Samb YN, Pastori A, Gobbo F, Ellero F, Diop M, Lo MM, Diouf MN, Fall M, Ndiaye AA, Gaye AM, Badiane M, Lo M, Youm BN, Ndao I, Niaga M, Terregino C, Diop B, Ndiaye Y, Angot A, Seck I, Niang M, Soumare B, Fusaro A, Monne I (2022) Intercontinental Spread of Eurasian Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) to Senegal. *Emerging infectious diseases* 28 (1):234-237. doi:10.3201/eid2801.211401
- Maanan M (2003) Sedimentological study of Sidi Moussa lagoon, Morocco
ÉTUDE SÉDIMENTOLOGIQUE DU REMPLISSAGE DE LA LAGUNE DE SIDI MOUSSA, MAROC. Faculte des sciences El Jadida,
- Maciej FB (2008) Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* 26:C8-C14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.011>
- Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG (2001) H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* 281 (2):156-162. doi:doi:10.1006/viro.2000.0799
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20 (9):1297-1303. doi:doi:10.1101/gr.107524.110.
- Monne I, Ormelli S, Salviato A, De Battisti C, Bettini F, Salomoni A, Drago A, Zecchin B, Capua I, Cattoli G (2008) Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *Journal of clinical microbiology* 46 (5):1769-1773

- Mosnier A, Launay O, Martinez L, Gavazzi G, Josset L, Crepey P, Hannoun C, Weil-Olivier C, Gaillat J (2018) Vaccin grippal quadrivalent : quels changements pour quels bénéfices ? *La Presse Médicale* 47 (10):842-853. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.06.013>
- Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B (2007) Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog* 3 (5):e61
- Munster VJ, Fouchier RA (2009) Avian influenza virus: of virus and bird ecology. *Vaccine* 27 (45):6340-6344. doi:10.1016/j.vaccine.2009.02.082
- Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL (2012) Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. *PLOS Genetics* 8 (7):e1002764. doi:10.1371/journal.pgen.1002764
- Naeem K (2003) The Avian Influenza H7 N3 Outbreak in South Central Asia. *Avian Diseases* 47:31-35
- Naeem K, Ullah A, Manvell R, Alexander D (1999) Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *The Veterinary record* 145 (19):560. doi:DOI:10.1136/vr.145.19.560
- Nagy A, Mettenleiter T, Abdelwhab E (2017) A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. *Epidemiology Infection and Chemotherapy* 145 (16):3320-3333. doi:doi:10.1017/S0950268817002576
- Neumann G, Chen H, Gao GF, Shu Y, Kawaoka Y (2010) H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell Res* 20 (1):51-61. doi:10.1038/cr.2009.124
- Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2014) IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32 (1):268-274. doi:doi:10.1093/molbev/msu300
- OIE. (2021) Influenza aviaire (y compris l'infection par les virus de l'influenza aviaire hautement pathogènes). OIE. https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf. Accessed August 03 2022
- Oliver I, Roberts J, Brown CS, Byrne AM, Mellon D, Hansen RDE, Banyard AC, James J, Donati M, Porter R, Ellis J, Cogdale J, Lackenby A, Chand M, Dabrera G, Brown IH, Zambon M (2022) A case of avian influenza A(H5N1) in England, January 2022. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 27 (5). doi:10.2807/1560-7917.es.2022.27.5.2200061
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA (2006) Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science* 312 (5772):384-388. doi:10.1126/science.1122438
- Palese P (2007) Orthomyxoviridae : the viruses and their replication. *Fields Virology*:1647-1689
- Pannwitz G, Wolf C, Harder T (2009) Active surveillance for avian influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. *Journal of wildlife diseases* 45 (2):512-518
- Park KJ, Kwon H-i, Song M-S, Pascua PNQ, Baek YH, Lee JH, Jang H-L, Lim J-Y, Mo I-P, Moon H-J (2011) Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programmes. *Journal of General Virology* 92 (1):36-50. doi:doi:10.1099/vir.0.024992-0
- Paterson D, Fodor E (2012) Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLOS Pathogens* 8 (12):e1003019. doi:10.1371/journal.ppat.1003019

- Peacock T, Reddy K, James J, Adamiak B, Barclay W, Shelton H, Iqbal M (2016) Antigenic mapping of an H9N2 avian influenza virus reveals two discrete antigenic sites and a novel mechanism of immune escape. *Sci Rep* 6 (1):18745. doi:doi:10.1038/srep18745
- Peacock TP, Benton DJ, Sadeyen J-R, Chang P, Sealy JE, Bryant JE, Martin SR, Shelton H, McCauley JW, Barclay WS, Iqbal M (2017) Variability in H9N2 haemagglutinin receptor-binding preference and the pH of fusion. *Emerging Microbes & Infections* 6 (1):1-7. doi:doi:10.1038/emi.2016.139
- Peacock TP, Harvey WT, Sadeyen J-R, Reeve R, Iqbal M (2018) The molecular basis of antigenic variation among A(H9N2) avian influenza viruses. *Emerging Microbes & Infections* 7 (1):1-12. doi:10.1038/s41426-018-0178-y
- Peacock TTP, James J, Sealy JE, Iqbal M (2019) A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses* 11 (7):620. doi: doi:10.3390/v11070620
- Peiris J, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster R, Shortridge K (2001) Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol* 75 (20):9679-9686. doi:doi:10.1128/JVI.75.20.9679-9686.2001
- Peiris M, Yuen K, Leung C, Chan K, Ip P, Lai R, Orr W, Shortridge K (1999) Human infection with influenza H9N2. *The Lancet* 354 (9182):916-917. doi:doi:10.1016/S0140-6736(99)03311-5
- Perdue ML (2008) Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses. In: Swayne DE e (ed) *Avian influenza*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp 23-42
- Perdue ML, García M, Senne D, Fraire M (1997) Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res* 49 (2):173-186. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)01468-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)01468-8)
- Pérez-Ramírez E, Acevedo P, Allepuz A, Gerrikagoitia X, Alba A, Busquets N, Díaz-Sánchez S, Álvarez V, Abad FX, Barral M (2012) Ecological factors driving avian influenza virus dynamics in Spanish wetland ecosystems. *PLoS One* 7 (11):e46418
- Pérez-Ramírez E, Gerrikagoitia X, Barral M, Höfle U (2010) Detection of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds in Castilla-La Mancha (south central Spain). *Veterinary microbiology* 146 (3-4):200-208
- Perroncito E (1878) Epizootia tifoide nei gallinacei. *Annali Accad Agri Torino*:87-126
- Pflug A, Lukarska M, Resa-Infante P, Reich S, Cusack S (2017) Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res* 234:103-117. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.013>
- Plague F, Aviaire G (2006) Avian influenza. *Virol J* 5:54
- Prokopyeva EA, Zinserling VA, Bae Y-C, Kwon Y, Kurskaya OG, Sobolev IA, Kozhin PM, Komissarov A, Fadeev A, Petrov V, Shestopalov AM, Sharshov KA (2019) Pathology of A(H5N8) (Clade 2.3.4.4) Virus in Experimentally Infected Chickens and Mice. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2019:4124865. doi:10.1155/2019/4124865
- Qninba A, Benhoussa A, Hammada S, Azeroual A (2003) Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR). Catégories approuvées dans la Recommandation 4:9
- Rafik M (1991) [Study of the techniques of extensive carpet shell cultivation in Sidi Moussa lagoon [Morocco]]. [French].
- RahimiRad S, Alizadeh A, Alizadeh E, Hosseini SM (2016) The avian influenza H9N2 at avian-human interface: A possible risk for the future pandemics. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 21. doi:doi: 10.4103/1735-1995.187253
- Rott R (1992) The pathogenic determinant of influenza virus. *Veterinary Microbiology* 33 (1):303-310. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90058-2)

- Ruiz S, Jimenez-Bluhm P, Di Pillo F, Baumberger C, Galdames P, Marambio V, Salazar C, Mattar C, Sanhueza J, Schultz-Cherry S (2020) Temporal dynamics and the influence of environmental variables on the prevalence of avian influenza virus in main wetlands in central Chile. *Transbound Emerg Dis*
- Runstadler J, Happ G, Slemons R, Sheng Z-M, Gundlach N, Petrula M, Senne D, Nolting J, Evers D, Modrell A (2007) Using RRT-PCR analysis and virus isolation to determine the prevalence of avian influenza virus infections in ducks at Minto Flats State Game Refuge, Alaska, during August 2005. *Archives of virology* 152 (10):1901-1910
- Saegerman C, Meulemans G, Van Reeth K, Marlier D, Yane F, Vindevogel H, Brochier B, van den Berg T, Thiry E Evaluation, contrôle et prévention du risque de transmission du virus influenza aviaire à l'homme. In: ANNALES DE MEDECINE VETERINAIRE, 2004. vol 2. pp 65-77. doi:<http://hdl.handle.net/1854/LU-4382949>
- Samy A, Naguib MM (2018) Avian respiratory coinfection and impact on avian influenza pathogenicity in domestic poultry: field and experimental findings. *Veterinary sciences* 5 (1):23. doi:doi:10.3390/vetsci5010023
- Schäfer W (1955) Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest. *Zeitschrift für Naturforschung B* 10 (2):81-91. doi:doi:10.1515/znb-1955-0205
- Sha B, Luo M (1997) Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* 4 (3):239-244. doi:10.1038/nsb0397-239
- Shapiro B, Rambaut A, Drummond AJ (2005) Choosing Appropriate Substitution Models for the Phylogenetic Analysis of Protein-Coding Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 23 (1):7-9. doi:doi:10.1093/molbev/msj021
- Shen Y-Y, Ke C-W, Li Q, Yuan R-Y, Xiang D, Jia W-X, Yu Y-D, Liu L, Huang C, Qi W-B (2016) Novel reassortant avian influenza A (H5N6) viruses in humans, Guangdong, China, 2015. *Emerging infectious diseases* 22 (8):1507. doi:doi:10.3201/eid2208.160146
- Shi W, Li W, Li X, Haywood J, Ma J, Gao GF, Liu D (2014) Phylogenetics of varied subtypes of avian influenza viruses in China: potential threat to humans. *Protein cell & Bioscience* 5 (4):253-257. doi:doi:10.1007/s13238-014-0036-1
- Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y (2004) PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320 (2):258-266. doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.11.030>
- Shortridge K Pandemic influenza: a zoonosis? In: *Seminars in respiratory infections*, 1992. vol 1. pp 11-25
- Sims LD, Ellis TM, Liu KK, Dyrting K, Wong H, Peiris M, Guan Y, Shortridge KF (2003) Avian Influenza in Hong Kong 1997–2002. *Avian Diseases* 47 (s3):832-838. doi:10.1637/0005-2086-47.s3.832
- Soliman A, Saad M, Elassal E, Amir E, Plathonoff C, Bahgat V, Elbadry M, Ahmed LaS, Fouda M, Gamaleldin M (2012) Surveillance of avian influenza viruses in migratory birds in Egypt, 2003–09. *Journal of wildlife diseases* 48 (3):669-675
- Song H, Nieto Gloria R, Perez Daniel R (2007) A New Generation of Modified Live-Attenuated Avian Influenza Viruses Using a Two-Strategy Combination as Potential Vaccine Candidates. *J Virol* 81 (17):9238-9248. doi:10.1128/JVI.00893-07
- Song W, Qin K (2020) Human-infecting influenza A (H9N2) virus: A forgotten potential pandemic strain? *Zoonoses and Public Health* 67 (3):203-212. doi:<https://doi.org/10.1111/zph.12685>

- Sorrell EM, Wan H, Araya Y, Song H, Perez DRJPotNAoS (2009) Minimal molecular constraints for respiratory droplet transmission of an avian–human H9N2 influenza A virus. *J Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (18):7565-7570
- Spackman E, Senne DA, Myers T, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL (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* 40 (9):3256-3260
- Stallknecht DE, Shane S (1988) Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Veterinary research communications* 12 (2):125-141
- Suarez DL (2000) Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary microbiology* 74 (1-2):15-27
- Suarez DL, Das A, Ellis E (2007) Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian diseases* 51 (s1):201-208
- Suarez DL, Schultz-Cherry S (2000) Immunology of avian influenza virus: a review. *Dev Comp Immunol* 24 (2):269-283. doi:[https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00078-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00078-6)
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4 (1):vey016. doi:doi:10.1093/ve/vey016
- Sun Y, Liu J (2015) H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. *Protein cell & Bioscience* 6 (1):18-25. doi:doi:10.1007/s13238-014-0111-7
- Suptawiwat O, Jeamtua W, Boonarkart C, Kongchanagul A, Puthawathana P, Auewarakul P (2013) Effects of the Q223R mutation in the hemagglutinin (HA) of egg-adapted pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus on virus growth and binding of HA to human- and avian-type cell receptors. *Acta Virol* 57 (3):333-338. doi:doi:europemc.org/abstract/MED/24020758
- Swayne DE, Kapczynski DR (2008) Vaccines, Vaccination, and Immunology for Avian Influenza Viruses in Poultry. In: *Avian Influenza*. pp 407-451. doi:<https://doi.org/10.1002/9780813818634.ch19>
- Swayne DE, Pavade G, Hamilton K, Vallat B, Miyagishima K (2011) Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and low-pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech* 30 (3):839-870. doi:10.20506/rst.30.3.2081
- Swayne DE SD, Sims LD. (2013.) Influenza. In: *Diseases of poultry*. Swayne DE. In: Blackwell eW (ed). Ames, Iowa, USA, pp 181–218.
- Swayne DE, Sims LD (2020) Veterinary Vaccines: Principles and Applications, Metwally. doi:<https://doi.org/10.1002/9781119506287.ch18>
- Swayne DE, Suarez DL, Sims LD (2013) Influenza. In: *Diseases of Poultry*. pp 181-218. doi:<https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch6>
- Swayne DE, Suarez DL, Sims LD (2020) Influenza. In: *Diseases of Poultry*. pp 210-256. doi:<https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch6>
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ, Dye C (2001) Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356 (1411):983-989. doi:10.1098/rstb.2001.0888
- Tian H, Zhou S, Dong L, Van Boeckel TP, Pei Y, Wu Q, Yuan W, Guo Y, Huang S, Chen W, Lu X, Liu Z, Bai Y, Yue T, Grenfell B, Xu B (2015) Climate change suggests a shift of H5N1 risk in migratory birds. *Ecological Modelling* 306:6-15. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.08.005>
- Tombari W, Nsiri J, Larbi I, Guerin JL, Ghram A (2011) Genetic evolution of low pathogenecity H9N2 Avian influenza viruses in Tunisia: acquisition of new mutations. *Virol J* 8 (1):1-12
- Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X,

- Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (11):4269-4274. doi:10.1073/pnas.1116200109
- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9 (10):e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657
- Torrontegi O, Alvarez V, Acevedo P, Gerrikagoitia X, Höfle U, Barral M (2019) Long-term avian influenza virus epidemiology in a small Spanish wetland ecosystem is driven by the breeding Anseriformes community. *Veterinary research* 50 (1):1-12
- Turrell L, Lyall JW, Tiley LS, Fodor E, Vreede FT (2013) The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications* 4 (1):1591. doi:10.1038/ncomms2589
- Umar S, Guerin JL, Ducatez MF (2017) Low pathogenic avian influenza and coinfecting pathogens: a review of experimental infections in avian models. *Avian Diseases* 61 (1):3-15. doi:doi:10.1637/11514-101316-Review
- Valentina C, Marian M, Lineke B, Carmen E, Monique de V, André De B, Rachel S, Oanh V, Ron AMF, Thijs K (2022) HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N8) OUTBREAK IN A WILD BIRD RESCUE CENTER, THE NETHERLANDS: CONSEQUENCES AND RECOMMENDATIONS. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 53 (1):41-49. doi:10.1638/2021-0083
- Van Dijk JG, Hoyer BJ, Verhagen JH, Nolet BA, Fouchier RA, Klaassen M (2014) Juveniles and migrants as drivers for seasonal epizootics of avian influenza virus. *Journal of Animal Ecology* 83 (1):266-275
- Verhagen JH, Munster VJ, Majoor F, Lexmond P, Vuong O, Stumpel JB, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Schutten M, Slaterus R (2012) Avian influenza A virus in wild birds in highly urbanized areas. *PLoS One* 7 (6):e38256
- Villarreal C (2007) Experience in control of avian influenza in the Americas. *Dev Biol (Basel)* 130:53-60
- Walker AP, Fodor E (2019) Interplay between Influenza Virus and the Host RNA Polymerase II Transcriptional Machinery. *Trends Microbiol* 27 (5):398-407. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.013>
- Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmqvist J, Fouchier RA, Fransson T, Haemig PD, Karlsson M, Lundkvist Å (2007) Surveillance of influenza virus A in migratory waterfowl in Northern Europe. *Emerging infectious diseases* 13 (3):404
- Wan H, Perez DR (2007) Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H9N2 Influenza Viruses Determines Cell Tropism and Replication in Human Airway Epithelial Cells. *J Virol* 81 (10):5181-5191. doi:doi:10.1128/JVI.02827-06
- Wan H, Sorrell EM, Song H, Hossain MJ, Ramirez-Nieto G, Monne I, Stevens J, Cattoli G, Capua I, Chen L-M (2008) Replication and transmission of H9N2 influenza viruses in ferrets: evaluation of pandemic potential. *PLoS One* 3 (8):e2923. doi:doi:10.1371/journal.pone.0002923
- Wang J, Qiu JX, Soto C, DeGrado WF (2011) Structural and dynamic mechanisms for the function and inhibition of the M2 proton channel from influenza A virus. *Curr Opin Struct Biol* 21 (1):68-80. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.12.002>
- Webster RG (1998) Influenza: an emerging disease. *Emerg Infect Dis* 4(3):436-441 4 (3). doi:10.3201/eid0403.980325
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56 (1):152-179. doi:10.1128/mr.56.1.152-179.1992

- Webster RG, Hulse DJ (2004) Microbial adaptation and change: avian influenza. *Revue scientifique et technique* 23 (2):453-465. doi:10.20506/rst.23.2.1493
- Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Copal Murti K (1978) Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84 (2):268-278. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90247-7)
- White LF, Pagano M (2008) Transmissibility of the Influenza Virus in the 1918 Pandemic. *PLoS One* 3 (1):e1498. doi:10.1371/journal.pone.0001498
- Whittaker GR (2001) Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 3 (5):1-13. doi:10.1017/S1462399401002447
- WHO (2017) Influenza Virological Surveillance in the WHO African Region, Epidemiological Week 43, 2017. WHO. <https://www.afro.who.int/fr/health-topics/influenza/influenza-epidemiological-bulletin>. Accessed August 03 2022
- WHO. (2022) Human infection with avian influenza A(H5) viruses WHO. <https://www.who.int/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai-20220401.pdf>. Accessed August 03 th 2022
- Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, Yeo GHT, Ong SH, Wong CH, Khor CC, Petric R, Hibberd ML, Nagarajan N (2012) LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Research* 40 (22):11189-11201. doi: doi:10.1093/nar/gks918.
- Xing Z, Cardona C, Dao P, Crossley B, Hietala S, Boyce W (2008) Inability of real-time reverse transcriptase PCR assay to detect subtype H7 avian influenza viruses isolated from wild birds. *Journal of clinical microbiology* 46 (5):1844-1846
- Xu J, Li S, Yang Y, Liu B, Yang H, Li T, Zhang L, Li W, Luo X, Zhang L, Pan M (2018) Human infection with a further evolved avian H9N2 influenza A virus in Sichuan, China. *Science China Life Sciences* 61 (5):604-606. doi:10.1007/s11427-017-9150-8
- Yacini KFF (2007) Thèse doctorat en médecine vétérinaire : analyse de quelques facteurs de risques à l'introduction et dissémination de l'influenza aviaire faiblement hautement pathogène au Maroc.
- Yang J, Müller NF, Bouckaert R, Xu B, Drummond AJ (2019) Bayesian phylodynamics of avian influenza A virus H9N2 in Asia with time-dependent predictors of migration. *PLoS computational biology* 15 (8):e1007189. doi:doi:10.1371/journal.pcbi.1007189
- Yong-Feng Z, Fei-Fei D, Jia-Yu Y, Feng-Xia Z, Chang-Qing J, Jian-Li W, Shou-Yu G, Kai C, Chuan-Yi L, Xue-Hua W (2017) Intraspecies and interspecies transmission of mink H9N2 influenza virus. *Sci Rep* 7 (1):1-7. doi:doi:10.1038/s41598-017-07879-1
- Yoon S-W, Webby RJ, Webster RG (2014) Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. In: Compans RW, Oldstone MBA (eds) *Influenza Pathogenesis and Control - Volume I*. Springer International Publishing, Cham, pp 359-375. doi:10.1007/82_2014_396
- Zecchin B, Minoungou G, Fusaro A, Mactar S, Ouedraogo-Kaboré A, Schivo A, Salviato A, Marciano S, Monne I (2017) Influenza A (H9N2) Virus, Burkina Faso. *Emerging infectious diseases* 23 (12):2118. doi:doi: 10.3201/eid2312.171294
- Zhang K, Zhang Z, Yu Z, Li L, Cheng K, Wang T, Huang G, Yang S, Zhao Y, Feng N (2013) Domestic cats and dogs are susceptible to H9N2 avian influenza virus. *Virus Res* 175 (1):52-57. doi:doi:10.1016/j.virusres.2013.04.004
- Zhang P, Tang Y, Liu X, Peng D, Liu W, Liu H, Lu S, Liu X (2008) Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China

- during a 5 year period (1998–2002). *Journal of General Virology* 89 (12):3102-3112. doi:doi:10.1099/vir.0.2008/005652-0
- Zhang Z, Li R, Jiang L, Xiong C, Chen Y, Zhao G, Jiang Q (2016) The complexity of human infected AIV H5N6 isolated from China. *BMC Infect Dis* 16 (1):1-6. doi:doi:10.1186/s12879-016-1932-1
- Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, George KS, Hatta M, Kawaoka Y, Wentworth DE (2009) Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J Virol* 83 (19):10309-10313. doi:doi:10.1128/JVI.01109-09
- Zhou H, Zhang A, Chen H, Jin M (2011) Emergence of novel reassortant H3N2 influenza viruses among ducks in China. *Archives of Virology* 156 (6):1045-1048. doi:10.1007/s00705-011-0940-0

ANNEXE 1 : Détail de la préparation des réactifs et les étapes de l'extraction de l'ARN avec intérêt de chaque étape pour le kit Machery Nagel NucleoSpin RNA Virus

Préparation des réactifs :

RNA carrier : livré lyophilisé à suspendre dans 1ml du RAV1 et apposition de la date de préparation et de péremption sur le flacon.

RAV1 : Ajout du RNA carrier en suspension.

Remarque :

Le RAV1 est conservé :

1 à 2 semaines à température ambiante

4 semaines à 4°C, il faut faire attention à la cristallisation, la solution est chauffée à 40-60°C maximum 5min avant utilisation

Alliquotés et stocké à -20°C pour une longue période.

RAW : Aucune préparation

RAV3 : Ajout de 100ml d'Ethanol Absolu et apposition de la date de préparation sur le flacon

Tous les réactifs sont aliquotés sur des flacons de 15 ml et 1.5ml pour le tampon d'élution. Les tubes sont identifiés en mentionnant le nom du réactif et la date de préparation.

5.3.2 Etape de l'extraction

Etape	Conditions de réalisation	Commentaire
La lyse des cellules et récupération du matériel génétique	*150 µl d'échantillon dans 600 µl du RAV1+RNA carrier. *Bien mélanger et vortexer *Incubation 5 min à 70°C	Le RNA carrier est utilisé comme transporteur d'ARN pour optimiser le rendement de l'extraction
Binding	*600 µl d'Ethanol Absolu. *Bien mélanger et vortexer *Fixation des acides nucléiques sur la colonne en silice *2 passages de 650- 700µl en *centrifugeuse à 12000 rpm pendant 2min	L'éthanol permet la précipitation des acides nucléiques
Lavage	-1er lavage est réalisé par la solution RAW *Ajout de 500 µl pour chaque échantillon	Les étapes de lavage sont nécessaires pour éliminer tous les débris cellulaires et les inhibiteurs

*Centrifuger à 12000 rpm pendant
 2min
 -2ème lavage est réalisé avec le RAV3
 *Ajout de 600 µl pour chaque
 échantillon
 *centrifuger à 12000 rpm pendant
 2min
 -3ème lavage est réalisé par RAV3
 *Ajout de 200 µl, centrifuger à 14000
 rpm pendant 5 min

Le 3^{ème} lavage est recommandé
 pour éliminer au maximum les
 traces de l'éthanol et sécher la
 colonne (risque d'inhibition)

Elution	*Ajout de 50 µl de tampon d'élution ou l'eau grade PCR préalablement chauffé à 70°C (Ajouter doucement et de façon perpendiculaire sur la colonne) *Temps d'incubation 1-2 min en température ambiante *Centrifuger à 14000 rpm pendant 1 min.	Le chauffage du tampon d'élution et le temps d'incubation optimise le rendement de l'extraction
---------	---	--

ANNEXE II : Protocole du laboratoire de référence de l'Influenza aviaire et de la maladie de New Castle pour la préparation des librairies pour le séquençage sur la plateforme Illumina MiSeq

Avian Influenza Community Reference Laboratory



Nextera XT DNA library preparation for sequencing on Illumina MiSeq platform

Purpose and field of application

The protocol describes the operating procedures to prepare DNA libraries for the subsequent sequencing on Illumina MiSeq platform. Nextera XT DNA library preparation and Nextera XT index kits are used to fragment DNA and add adapter sequences onto the DNA template. The procedure can be applied to PCR amplicons, double-stranded cDNA or genomic DNA.

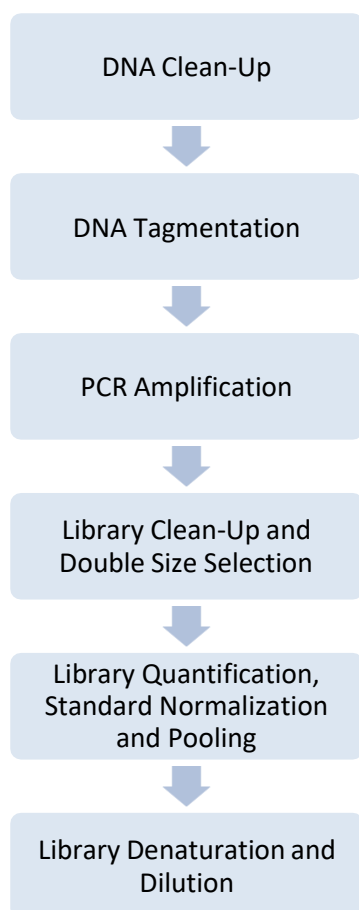


Figure 1. Nextera XT DNA library preparation workflow.

Reference documents

Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide (Document #15031942 v05; May 2019)

Definitions and acronyms

- **Adapter:** known oligonucleotide sequence bound to the 5' and 3' ends of each DNA fragment in a sequencing library and complementary to the lawn of oligos on the surface of Illumina sequencing flow cells
- **Cluster:** clonal grouping of template DNA bound to the surface of a flow cell. Each cluster is seeded by a single template DNA strand and clonally amplified through bridge amplification until the cluster has ~1000 copies. Each cluster on the flow cell produces a single sequencing read. For example, 10.000 clusters on the flow cell would produce 10.000 single reads and 20.000 paired-end reads

- **Coverage level:** average number of reads that align to, or "cover," known reference bases. For example, a whole genome sequenced at 30x coverage means that, on average, each base in the genome was sequenced 30 times
- **Flow cell:** glass slide with one, two, or eight physically separated lanes, depending on the instrument platform. Each lane is coated with a lawn of surface bound, adapter-complimentary oligos. A single library or a pool of multiplexed libraries can be run per lane, depending on the application parameters
- **Index:** unique sequence ligated to DNA fragments within a sequencing library for downstream in silico sorting and identification. Illumina indexes are typically between 8–12 bp. Libraries with unique indexes can be pooled together, loaded into one lane of a sequencing flow cell and sequenced in the same run. Reads are later identified and sorted via bioinformatic software. Altogether, this process is known as “multiplexing”
- **Low diversity libraries:** libraries where a significant number of reads have the same sequence. This lack of variation shifts the base composition because the reads are no longer at random
- **NGS library:** random collection of DNA fragments of specific size flanked at both ends by known sequences (adaptors) for high-throughput sequencing
- **Read:** nucleotide sequence generated by NGS platforms
- **Tagmentation:** process combining the DNA fragmentation and adapter ligation reactions into a single step
- **bp:** base pair
- **DEPC water:** diethyl pyrocarbonate-treated water
- **dscDNA:** double-stranded complementary DNA
- **dsDNA:** double-stranded DNA
- **HTS:** high-throughput sequencing
- **NGS:** next generation sequencing
- **PCR:** polymerase chain reaction
- **RNase:** ribonuclease

Reagents/solutions/diagnostic kits

Component	Supplier/Specification	Preservation
DEPC water	Commercial or laboratory prepared	Room temperature
10 mM Tris-HCl pH 8.0, reagent grade water, or TE buffer	Commercial or laboratory prepared	Room temperature
200 mM Tris-HCl pH7	Commercial or laboratory prepared	Room temperature
Fresh 70% Ethanol	Laboratory prepared	Room temperature
Fresh 80% Ethanol	Laboratory prepared	Room temperature
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies (Cat. No. 5067-4626)	Room temperature, 2°C to 8°C
Agencourt® AMPure® XP beads	Beckman Coulter (Cat. No. A63880/1/2)	2°C to 8°C
Nextera XT DNA Library Preparation Kit (see Table 2 for content)	Illumina (Cat. No. FC-131-1024/96)	see Table 2
Nextera XT Index Kit v2 (choose one of the four available A/B/C/D set)	Illumina (Cat. No. FC-131-2001/2/3/4)	≤ -18°C
10 nM PhiX control v3	Illumina (Cat. No. FC-110-3001)	≤ -18°C
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies (Cat. No. Q32851/ Q32854)	Room temperature, 2°C to 8°C
Stock 1.0 N NaOH	Commercial or laboratory prepared	Room temperature

Table 1. Reagents and kits used for Illumina MiSeq library preparation.

Component	Acronym	Preservation
Amplicon Tagment Mix	ATM	-25°C to -15°C
Tagment DNA Buffer	TD	-25°C to -15°C
Nextera PCR Master Mix	NPM	-25°C to -15°C
Resuspension Buffer	RSB	-25°C to -15°C
Library Normalization Additives 1*	LNA1	-25°C to -15°C
Library Normalization Wash 1*	LNW1	2°C to 8°C
Hybridization Buffer	HT1	-25°C to -15°C
Neutralize Tagment Buffer	NT	Room temperature
Library Normalization Beads 1*	LNB1	2°C to 8°C
Library Normalization Storage Buffer 1*	LNS1	Room temperature

Table 2. Reagents included into the Nextera® XT DNA Library Preparation Kit.*Reagents not used in this protocol as the standard normalization has been preferred to the bead-based normalization method.

DNA Clean-Up

The AMPure XP beads kit is used to purify the genomic DNA, dscDNA and PCR amplicons and to remove shortnucleotide fragments such as free primers, primer dimers, nucleotides, salts and enzymes.

Procedure:

- Equilibrate the Agencourt AMPure XP beads at room temperature for 30 minutes before use and then gently shake the Agencourt AMPure tube to resuspend any magnetic particles – beads – that may have settled
- Prepare the mix by adding Agencourt AMPure XP beads according to the DNA sample volume. The beads volume for a given sample can be obtained from the following equation:
Agencourt AMPure XP beads volume = 1.8 x volume of DNA eluted sample (Table 3)

Component	Volume (µl)
DNA eluted sample	45
Agencourt AMPure XP beads	81
FINAL VOLUME	126

Table 3. Example of AMPure XP beads to DNA eluted sample volume.

- Thoroughly pipette mix 10 times the DNA-beads solution and incubate at room temperature for 5 minutes for maximum recovery
- Place the reaction plate (or tubes) onto a magnetic stand (for a 96 sample plate or for 0.5-1.5 ml tubes) and wait for 2-5 minutes to separate the beads from the solution
- Aspirate the cleared solution from each well of the reaction plate (or tubes) and discard. Do not remove the plate or tubes from the magnetic stand. If any beads are inadvertently aspirated into the tips, dispense the beads back to the plate, let the plate rest on the magnetic stand for 2 minutes and confirm that the supernatant is clear
- Dispense 200 µl of 70% ethanol (freshly prepared) to each well of the reaction plate (or tube) and incubate at room temperature for 30 seconds. Do not disturb the magnetic beads while adding the wash buffer; that is, carefully and gently pipette the liquid into each well or tube and not directly onto the beads
- Aspirate the ethanol and discard
- Repeat the previous washing step (for a total of two washes)
- Let the plate (or open tubes) air-dry for ≤ 5 minutes. Make sure you allow the plate or tubes to dry completely. Make sure all the ethanol has evaporated from the wells or tubes before adding the elution buffer. If not, the ethanol will inhibit subsequent enzymatic steps
- Add 40 µL of elution buffer (10 mM Tris HCl) to each well of the reaction plate (or tube) directly

onto the beads

- Place the reaction plate (or tubes) on the benchtop, pipette mix 10 times and incubate at room temperature for 2 minutes
- Transfer the reaction plate (or tubes) onto a magnetic stand (for a 96 sample plate or for 0.5-1.5 ml tubes) and wait for 1-2 minutes to separate beads from solution
- Transfer the cleared solution into a new plate or tube

DNA Tagmentation

Nextera Transposome™ complex (comprised in the Nextera XT DNA Sample Preparation Kit) is used to simultaneously fragment dsDNA and tag both 5' and 3' ends with adapter sequences for the PCR amplification. Of note, the protocol is optimized for 1 ng of input DNA; indeed, it is recommended to quantify starting DNA before proceeding with the following steps.

Procedure:

- Quantify starting DNA and dilute in 10 mM Tris HCl pH 8.0 to obtain a 0.2 ng/μl final concentration
- Thaw on ice both the TD and ATM reagents
- Set the thermal cycle as follows and choose the preheat lid option
 - 55°C for 5 minutes
 - Hold at 10°C
- Gently invert the thawed TD tube 3–5 times and then centrifuge briefly. Add 10 μl of TD and then 5 μl of DNA (0.2 ng/μl) to each well of a new 96-well PCR plate or 0.2 ml RNase-free PCR tubes. Pipette to mix. Note that the TD contains formamide
- Gently invert the thawed ATM tube 3–5 times and then centrifuge briefly. Add 5 μl of ATM to each well or tube and pipette to mix. Note that the ATM contains formamide
- Cover the plate with adhesive seal (if a 96-well PCR plate is used) and centrifuge at 280 × g for 1 minute
- Place the reaction in the thermal cycler and run the tagmentation program as stated above. Ensure the lid is heated during the incubation
- Visually check the NT for precipitates; if present, vortex until all particulates are resuspended. Add 5 μl of NT to each well or tube and pipette mix
- Centrifuge at 280 × g for 1 minute and incubate at room temperature for 5 minutes

PCR Amplification

During this step the tagmented DNA is amplified via a limited-cycle PCR program. Use the full amount of recommended input DNA as well as the recommended number of PCR cycles to ensure libraries producing high-quality sequencing results.

Procedure:

- Equilibrate index 1 (N7XX) and index 2 (S5XX) at room temperature for 20 min before use.

Gently invert each tube and centrifuge briefly

- Place NPM into ice or remove from freezer just before use
- Set the thermal cycle following the temperature as reported in Table 4 and choose the preheat lid option

Step	Temperature (°C)	Time	Cycle Number
Gap filling	72	3 min	1
Denaturation	95	30 sec	1
Amplification	95	10 sec	12
	55	30 sec	
	72	30 sec	
Final extension	72	5 min	1
Hold	10	∞	

Table 4. PCR thermal profile.

- Arrange the index 1 (N7XX) and 2 (S5XX) respectively in horizontal and vertical order in the TruSeq Index Plate Fixture (or laboratory rack) as shown in Figure 2
- Record their positions on the lab tracking form

	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX	 N7XX
 S5XX													
 S5XX													
 S5XX													
 S5XX													
 S5XX													
 S5XX													
 S5XX													

Figure 2. TruSeq Index Plate Fixture arrangement.

- Add 5 µl of each index 1 (N7XX) adapter down each column. Replace the original orange cap on each adapter tube with a new orange cap
- Add 5 µl of each index 2 (S5XX) adapter across each row. Replace the original white cap on each adapter tube with a new white cap
- Add 15 µl of NPM to each well or tube containing index adapters

- Add 25 µl of tagged DNA to each corresponding well of the plate or tube and pipette to mix
- Cover the plate with adhesive seal (if a 96-well PCR plate is used)
- Centrifuge at 280 × g at 20°C for 1 minute
- Place the reaction in the thermal cycler and run the pre-set program (Table 4). Ensure the lid is heated during incubation. Note. If you interrupt the procedure, seal the plate (or tubes) and store at 2°C to 8°C up to 2 days. Alternatively, leave on the thermal cycler overnight.

Library Clean-Up and Double Size Selection

The AMPure XP beads kit is here used to purify the DNA libraries and remove short library fragments. Procedure:

- Equilibrate the Agencourt AMPure XP beads at room temperature for 30 minutes before use and then gently shake the Agencourt AMPure tube to resuspend any magnetic particles – beads – that may have settled. During the whole process frequently vortex the AMPure XP tube to make sure the beads are evenly distributed
- Thaw the RSB at room temperature. RSB can be then stored at 4°C after the initial thaw
- Dilute an aliquot of AMPure XP beads stock 1:2 with DEPC water
- Add 1.6X of diluted AMPure XP beads according to the amplified library volume. Add 80 µl of diluted beads to a new plate (or tubes) if you use 50 µl of sample library
- Transfer 50 µl of amplified library from each well of the PCR plate or tube to the corresponding wells of the new plate (or 0.5-1.5 ml tubes) containing the diluted AMPure XP beads
- Gently pipette mix the reaction 10 times and incubate at room temperature for 5 minutes
- Place the reaction plate or tubes on a magnetic stand (for a 96 sample plate or for 0.5-1.5 ml tubes) and wait until the liquid is clear (~2-3 minutes)
- Meanwhile add 15 µl of AMPure XP beads (not diluted) to a new plate (or tubes)
- Transfer the cleared solution from the reaction plate or tubes into the corresponding wells of the new plate (or tubes) containing the AMPure XP beads
- Gently pipette mix 10 times and incubate at room temperature for 5 minutes
- Place the reaction plate or tubes on the magnetic stand (for a 96 sample plate or for 0.5-1.5 ml tubes) and wait for the solution to clear (~2-3 minutes)
- Aspirate the cleared solution from each well of the plate or tube and discard. Do not remove the plate or tubes from the magnetic stand. If any beads are inadvertently aspirated into the tips, dispense the beads back to the wells, let the plate rest on the magnetic stand for 2 minutes and confirm that the supernatant is clear
- Dispense 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to each well of the reaction plate or tube and incubate on the magnetic stand at room temperature for 30 seconds. Do not disturb the magnetic beads while adding the wash buffer; that is, carefully and gently pipette the buffer into each well and not directly onto the beads. Always prepare fresh 80% ethanol for wash steps as it can absorb water from the air and impact your results

- Aspirate the ethanol and discard. Do not remove the plate or tubes from the magnetic stand. If any beads are inadvertently aspirated into the tips, dispense the beads back to the wells, let the plate rest on the magnetic stand for 2 minutes and confirm that the supernatant is clear
- Repeat the previous washing step (for a total of two washes)
- Using a micropipette, remove any residual of ethanol from each well of the plate or tube and let the plate (or the tubes) air-dry for 5 minutes on the magnetic stand.
- Make sure all the ethanol has evaporated from the wells before adding the elution buffer (RBS), if not, the ethanol will inhibit subsequent enzymatic steps
- Add 30 µl of RSB to each well of the reaction plate or tube. Remove from the magnetic stand, pipette mix 10 times or vortex for 30 seconds and incubate at room temperature for 5 minutes
- Place the reaction plate or tubes on a magnetic stand (for a 96 sample plate or for 0.5-1.5 ml tubes) and wait until the liquid is clear (~5 minutes)
- Transfer the cleared solution into a new plate or 0.2 ml tubes

Note. If you interrupt the procedure, seal the plate (or tubes) and store at -25°C to -15°C up to 7 days.

Library Quantification, Standard Normalization and Pooling

To proceed with the next steps it is critical that the libraries have the same final molar concentration before being pooled. In order to calculate the library molar concentration:

- Use Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) following the manufacturer's instructions to determine the DNA concentration in ng/µl
- Run 1 µl of each undiluted library on Agilent Technology 2100 Bioanalyzer by using the Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) and following the manufacturer's instructions to determine the average size of library fragments

Procedure:

- Derive the library concentration in nM by applying the formula as follows:

$$\left[\frac{\text{DNA concentration } \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{average library size})} \right] * 10^6 = \text{DNA concentration in } \frac{\text{nM}}{\text{mol}}$$

Note. In order to obtain the most accurate sequencing results, library concentration ≥ 2 nM and average library fragments size ranging from 300 to 1000 bp are recommended.

- Dilute concentrated libraries using RSB or 10 mM Tris-HCl pH 8.0 to obtain a 2 or 4 nM final concentration. To be sequenced in the same run it is critical that all libraries have the same molarity

- Pool libraries with unique indices by transferring an equal volume from each library to a 2.0 ml tube. Depending on coverage needs, up to 96 libraries can be pooled for one MiSeq run

Library Denaturation and Dilution

To perform cluster generation and sequencing, both the pooled DNA and Illumina PhiX control libraries are denatured with NaOH and diluted with hybridization buffer (HT1). The PhiX control serves as an internal control and must be diluted at the same loading concentration as the DNA libraries and added to each pooled library.

Procedure:

2nM DNA Library Denaturation and Dilution*

- Thaw HT1 at room temperature. Once thawed, store it at 2°C to 8°C or keep it on ice until use
- Prepare 1 ml of fresh 0.2 N NaOH dilution. The use of freshly diluted NaOH and 0.2 N NaOH concentration in the denaturation solution is highly recommended. If not, cluster generation on MiSeq and library hybridization to the flow cell can be compromised
- Combine 10 µl of 2 nM pooled libraries and 10 µl of freshly diluted 0.2 N NaOH in a microcentrifuge tube
- Discard the remaining 0.2 N NaOH if it is not used within the next 12 hours to prepare the Illumina PhiX control. Otherwise keep it aside
- Briefly vortex and centrifuge at 280 × g for 1 minute
- Incubate at room temperature for 5 minutes to denature the DNA into single strands
- Add 10 µl of 200 mM Tris-HCl pH7. Pipette mix 10 times and centrifuge at 280 × g for 1 minute
- Add 970 µl of pre-chilled HT1 to obtain 1 ml of 20 pM denatured DNA library to keep on ice
- Dilute the denatured DNA library to the desired final input concentration at a final volume of 600 µl following the instructions reported in Table 5
- Invert the tube several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution
- Place the denatured and diluted library on ice until you are ready to load your samples onto the MiSeq reagent cartridge

*If you start from 4 nM DNA pooled libraries, follow the same protocol as the one used with 2 nM libraries and modify the reagent volumes accordingly, in order to obtain a 20 pM denatured library concentration. Refer to Table 5 to finally dilute libraries.

Note. If you interrupt the procedure, store the DNA library at -25°C to -15°C up to 3 weeks. After such time, cluster numbers tend to decrease.

PhiX Library Denaturation and Dilution

- Thaw HT1 at room temperature. Once thawed, store it at 2°C to 8°C or keep it on ice until use
- Prepare 1 ml of fresh 0.2 N NaOH dilution; otherwise use the dilution prepared for DNA library denaturation if it is still fresh (within 12 hours)
- Combine 2 µl of 10 nM PhiX library and 3 µl of 10 mM Tris-HCl pH 8.0

- Briefly vortex and centrifuge at $280 \times g$ for 1 minute
- Add 5 μl of 0.2 N NaOH. Pipette mix or briefly vortex and centrifuge at $280 \times g$ for 1 minute
- Incubate at room temperature for 5 minutes to denature the PhiX into single strands
- Add 990 μl of pre-chilled HT1 to obtain 1 ml of 20 pM denatured PhiX library to keep on ice
- Use pre-chilled HT1 to dilute the denatured PhiX library to the same loading concentration as DNALibraries following the instructions reported in Table 5
- Invert the tube several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution
- Place the denatured and diluted library on ice until you are ready to load your samples onto the MiSeq reagent cartridge

Note. If you interrupt the procedure, store the PhiX library at -25°C to -15°C up to 3 weeks. After such time, cluster numbers tend to decrease.

Final input concentration	6 pM	8 pM	10 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM library	180 μl	240 μl	300 μl	360 μl	450 μl	600 μl
Pre-chilled HT1	420 μl	360 μl	300 μl	240 μl	150 μl	0

Table 5. Volumes of both 20 pM denatured DNA and PhiX libraries and pre-chilled HT1 to the final input library concentration.

DNA and PhiX Libraries Assembly

- Combine freshly denatured and diluted DNA and PhiX libraries in a final mixture volume of 600 μl . Use 1% of PhiX concentration spike-in in the final library solution or at least 5% for low diversity libraries. A higher concentration spike-in of PhiX helps balance the overall lack of sequence diversity
- Place on ice until you are ready to load it onto the reagent cartridge

ANNEXE III: Productions scientifiques

AVIAN DISEASES 66:000–000, 2022

Original Article—

Molecular Detection of Avian Influenza Virus in Wild Birds in Morocco, 2016–2019

Fatiha El Mellouli,^{AF} Nabil Abouchaib,^A Hasnae Zekhnini,^B Mounir Khayli,^C Alice Fusaro,^D Hamid Rguibi Idrissi,^{AE} and Abdelaziz Benhoussa^A

^ABiodiversity, Ecology and Genome Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, 4 Avenue Ibn Battouta, 10106 Rabat, Morocco

^BImmunology and Biodiversity Laboratory, Faculty of Science Ain chock, Hassan II University of Casablanca, 20100 Casablanca, Morocco

^CEpidemiology and Health Surveillance Unit (SEVS), Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat-Instituts, 6472 Rabat, Morocco

^DIstituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 35020 Legnaro, Italy

^EÉcole supérieure de Technologie de Lâayoune, Quartier 24 Mars, 3007 Lâayoune, Morocco

Received 8 August 2021; Accepted 22 October 2021; Published ahead of print 22 December 2021

SUMMARY. Avian influenza (AI) is a zoonotic disease significant to both public and animal health, caused by influenza virus A, and affects domestic poultry, wild birds, and mammals including humans. Aquatic birds are considered the natural reservoir of this virus. In 2016, Morocco experienced the first occurrence of low pathogenic H9N2 avian influenza virus (AIV) in poultry; however, no cases were reported in wild birds. The present study aimed to monitor the presence of AIV in wild birds in Morocco in order to trace the possible sources of the viruses affecting poultry. Between 2016 and 2019, 967 samples obtained from 480 birds representing 56 different wild bird species, 20 families, and 8 orders, mostly from Charadriiformes, Anseriformes, Pelecaniformes, and Passeriformes, were collected from various wetlands and relevant ornithologic sites in Morocco. These field samples consisted of 374 cloacal swabs, 321 tracheal swabs, 54 fecal samples, and 218 organ pools including the trachea, lung, liver, spleen, heart, intestine, and brain. The samples were examined for the presence of AIV using TaqMan-based real-time reverse transcriptase-PCR (rRT-PCR) targeting the matrix gene, followed by further subtyping rRT-PCR tests targeting the H1–H16 genes. The AI matrix gene was detected in 18 out of 967 samples (1.86%); positive samples were detected in 17 birds belonging to 10 bird species: two redshanks (*Tringa totanus*), one little stint (*Calidris minuta*), one ruddy turnstone (*Arenaria interpres*), one common snipe (*Gallinago gallinago*), one common greenshank (*Tringa nebularia*), one black-winged stilt (*Himantopus himantopus*), two black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*), one slender-billed gull (*Chroicocephalus genei*), six cattle egrets (*Bubulcus ibis*), and one Eurasian coot (*Fulica atra*). AIV was detected in 2 wetlands and 1 ornithologic site (Sidi Moussa Oualidia Complex, Smir lagoon and El Jadida Coast) and the highest positivity was revealed in fresh fecal samples (11.1%), indicating the suitability of this matrix for wild bird surveillance. Our results highlight that waders, gulls, and cattle egrets are the most affected species and may represent a potential risk for AI introduction in the poultry sector in Morocco. Regular monitoring of wild birds in Morocco, focusing in particular in the areas and species identified in this study as a high risk of virus circulation, should be implemented to anticipate and prevent possible AIV spread.

RESUMEN. Detección molecular del virus de la influenza aviar en aves silvestres en Marruecos, entre los años 2016 al 2019.

La influenza aviar (IA) es una enfermedad zoonótica importante para la salud pública y animal, causada por el virus de la influenza A y afecta a la avicultura comercial, las aves silvestres y los mamíferos, incluyendo a los humanos. Las aves acuáticas se consideran el reservorio natural de este virus. En el año 2016, Marruecos experimentó la primera aparición del virus de la influenza aviar de baja patogenicidad H9N2 en avicultura; sin embargo, no se notificaron casos en aves silvestres. El presente estudio tuvo como objetivo monitorear la presencia del virus de influenza aviar en aves silvestres en Marruecos con el fin de rastrear las posibles fuentes de los virus que afectan a las aves comerciales. Entre los años 2016 y 2019, se recolectaron 967 muestras de 480 aves que representan 56 especies diferentes de aves silvestres, 20 familias y 8 órdenes, principalmente de Charadriiformes, Anseriformes, Pelecaniformes y Passeriformes, de varios humedales y sitios ornitológicos relevantes en Marruecos. Estas muestras de campo consistieron en 374 hisopos cloacales, 321 hisopos traqueales, 54 muestras fecales y 218 conjuntos de órganos que incluyeron tráquea, pulmón, hígado, bazo, corazón, intestino y cerebro. Las muestras se examinaron para detectar la presencia del virus de la influenza aviar mediante transcripción reversa y PCR en tiempo real basada en TaqMan (rRT-PCR) que estuvo dirigida al gene de la matriz, seguida de más pruebas de subtipificación de rRT-PCR dirigidas a los genes H1 al H16. El gene de la matriz de influenza aviar se detectó en 18 de 967 muestras (1.86%); Se detectaron muestras positivas en 17 aves pertenecientes a 10 especies de aves: dos archibebes comunes (*Tringa totanus*), un correlimos chico (*Calidris minuta*), un vuelvepiedras común (*Arenaria interpres*), una agachadiza común (*Gallinago gallinago*), un archibebe claro (*Tringa nebularia*), una cigüeñuela común (*Himantopus himantopus*), dos gaviotas reidoras (*Chroicocephalus ridibundus*), una gaviota picofina (*Chroicocephalus genei*), seis garzas ganaderas (*Bubulcus ibis*) y una focha común (*Fulica atra*). El virus de la influenza aviar se detectó en 3 de los 17 humedales (Complejo Sidi Moussa-Walidia, Costa El Jadida y Laguna Smir) y la mayor positividad se reveló en muestras fecales frescas (11.1%), lo que indica la idoneidad de esta matriz para la vigilancia de aves silvestres. Estos resultados destacan que las aves zancudas, las gaviotas y las garzas ganaderas son las especies más afectadas y pueden representar un riesgo potencial para la introducción de influenza aviar en el sector avícola de Marruecos. Se debe implementar un monitoreo regular de las aves silvestres en Marruecos, centrándose en particular en las áreas y especies identificadas en este estudio como de alto riesgo de circulación del virus, para anticipar y prevenir la posible propagación del virus de la influenza aviar.

^FCorresponding author. E-mail: fatihaelmellouli@gmail.com

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Key words: Avian influenza, wild birds, Morocco, Real time RT-PCR

Abbreviations: AIV = Avian influenza virus; CISA-INIA = Center for Animal Health Research. National Institute for Agronomic Research; Ct = cycle threshold; M gene = matrix gene; SPF = specific-pathogen-free; rRT-PCR = real-time reverse transcriptase-PCR

Avian influenza (AI) is a contagious disease that represents a significant source of global concern for both animal and public health (1). AI is caused by the influenza virus A genus, members of the *Orthomyxoviridae* family (2), and its genome consists of eight negative-sense, single-stranded RNA segments (3). Influenza A viruses are subtyped according to the characteristics of the two surface glycoproteins: HA and NA. Until now, 16 HA (H1–H16) and 9 NA (N1–N9) subtypes have been identified in birds (4), all of them in avian species in diverse combinations (5). In addition, two novel subtypes, H17N10 (6) and H18N11 (7), were discovered in bats. Based on the virus pathogenicity when infecting poultry, avian influenza viruses (AIVs) are classified into two groups: low pathogenic avian influenza viruses (LPAIVs) and highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIVs). Pathogenicity varies among avian species, particularly among different wild bird species (8,9).

Influenza viruses are known to be common in avians and mammals, including humans. Wild birds, mainly migratory aquatic birds, are considered the natural reservoir of all 16 HA and 9 NA of the AIVs (9,10). Many studies worldwide have pointed out that waterfowl belonging to the Anseriformes order (ducks, geese, and swans) and the Charadriiformes order as the most implicated birds in the persistence of AIV (11). However, recent studies revealed an important prevalence of AIV in terrestrial birds, which has highlighted their potential role in the transmission of AIVs (12,13,14).

Although the first documented isolation of AIV from wild birds occurred in Africa (A/Tern/S.A./61 [H5N3]) (15), there is a knowledge gap in the ecology of AIV in tropical areas (9,16). In addition, the role of tropical environments in the maintenance of AIV among wild birds has remained an understudied issue (17), if we exclude a limited number of reports describing the circulation of AIVs in wild birds across Africa (18,19,20). Indeed, AIV monitoring studies are focused on Europe, Asia, and many parts of America, whereas the African continent is mostly underrepresented (11). To our knowledge, only two large-scale studies of AIV in Africa were conducted, in 2006 and 2017, with only 12 and 23 out of 54 countries participating, respectively, during the first and the second surveillances (21,22).

North African countries serve as spring migratory areas for wild birds. Hundreds of thousands of sub-Saharan African wintering birds migrate every year to their nesting grounds. In the North African wetlands, from March to May, tens of thousands of Eurasian migratory aquatic birds gather along with Afro-tropical water birds that reside in North Africa throughout the year (23). Hence, the North African wetlands may provide an environment for AIV persistence in spring and for the rise of novel AIVs through the reassortment between multiple AIV strains from diverse geographic origins (23).

One single AIV survey was conducted in Morocco in 2006; the study focused only on two wetlands (Loukkos Marais and Oualidia), and less than 150 wild aquatic migratory birds were collected in the time span of 12 days. AIV was found in 4 out of 30 wild ducks, while the information on the subtypes detected is not available (22).

In January 2016, Morocco faced the first AI outbreak caused by a low pathogenic H9N2 subtype. Once introduced, the virus quickly spread across the country, causing devastating effects in domestic poultry (24). Emergency vaccinations were applied to all poultry production sectors. The authorities announced the control of the virus in April 2016 (24). The explored routes for virus introduction, such as the illegal poultry trade into Morocco, the contact between migratory wild birds and poultry, and imported birds such as Falconidae (falcons) from Middle Eastern countries, were inconclusive. However, no information on AIVs circulating in wild birds is available. Therefore, this study aimed to investigate the presence of AIV in 56 aquatic and land wild bird species collected from 17 wetlands and six other locations in Morocco along the Atlantic flyway, which connects Europe to the eastern African coast, from Morocco to South Africa, and covering the period 2016 to 2019 using real-time reverse transcriptase-PCR (rRT-PCR) in order to assess the risk for possible AI introductions in poultry.

MATERIALS AND METHODS

Study. From early November 2016 to mid-May 2019, wild bird samples were collected from 17 wetlands and relevant ornithologic sites in Morocco. Other wild bird samples were collected from different locations during routine AIV surveillance. Sampling sites included the wetlands near areas where AI outbreaks caused by H9N2 had been reported in poultry in 2016 (Fig.1).

Study species were chosen among bird orders recognized as major AIV reservoirs, notably migratory waterfowls and land birds including Anseriformes, Charadriiformes, Pelecaniformes, and Passeriformes (19%, 25.4%, 27.9%, and 14.2%, respectively [Table 1]). These species were sampled according to their abundance in the selected wetlands and to site accessibility.

Field sampling activities were coordinated by the national forestry department (Department of Waters and Forestry), the national veterinary services, local ornithologist teams, and national hunting associations. Mainly, the samples were collected during the cold season (autumn–spring). The primary data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Sample collection. Cloacal and tracheal swab samples were collected from 239 live birds captured in traps by ornithologists, while veterinarians sampled one injured bird and 22 imported live falcons from Middle Eastern countries (Qatar and United Arab Emirates). These imported falcons were released into the wild for pigeon hunting and are maintained at falcon breeding and training facilities in contact with other avian species, making them a potential source of AIV for poultry. Fifty-four samples of fresh droppings were also collected at roosting areas for a resident population of cattle egrets, a bird colony in permanent contact with wild migratory birds near poultry farms. Fecal samples were taken from the environment with a sterile cotton swab and placed in an individual bag. Of 218 dead birds, 202 had been shot by hunters and 16 were found dead and collected by veterinarians during AI monitoring activities in autumn–winter 2016–2017; among them, 10 were unidentified wild bird species.

Upon collection, bird carcasses and tracheal and cloacal swabs taken from live birds, as well as fecal samples, were immediately sent to the laboratory or stored at 4–8 °C for a maximum of 24 hr. The samples

Table 1. Number of sampled birds by order, family, and species, and number of positive birds, date of sampling, and origin.

Order	Family	Species	No. sampled birds	No. PCR-positive birds (%)	Sampling date of positive birds	Location of positive samples
Anseriformes (91 birds)	Anatidae (6 species, 91 birds)	Mallard (<i>Anas platyrhynchos</i>)	58	—	—	—
		Northern shoveler (<i>Spatula clypeata</i>)	20	—	—	—
		Eurasian teal (<i>Anas crecca</i>)	3	—	—	—
		Gadwall (<i>Mareca strepera</i>)	1	—	—	—
		Ferruginous duck (<i>Aythya nyroca</i>)	1	—	—	—
		Common pochard (<i>Aythya ferina</i>)	8	—	—	—
		Little stint (<i>Calidris minutus</i>)	7	1 (14.3)	Jan. 18, 2017	SMOC ^A
		Redshank (<i>Tringa totanus</i>)	5	2 (40)	Feb. 8, 2017	Wetland
		Ruddy turnstone (<i>Arenaria interpres</i>)	3	1 (33.3)	Mar. 29, 2017	SMOC ^A
		Common greenshank (<i>Tringa nebularia</i>)	2	1 (50)	Mar. 14, 2017	Wetland
Charadriiformes (122 birds)	Scolopacidae (11 species, 24 birds)	Semipalmated sandpiper (<i>Calidris pusilla</i>)	1	—	—	—
		Spotted sandpiper (<i>Actitis macularia</i>)	1	—	—	—
		Common sandpiper (<i>Actitis hypoleucos</i>)	1	—	—	—
		Eurasian curlew (<i>Numenius arquata</i>)	1	—	—	—
		Eurasian whimbrel (<i>Numenius phaeopus</i>)	1	—	—	—
		Common snipe (<i>Gallinago gallinago</i>)	1	1 (100)	Mar. 7, 2017	SMOC ^A
		Ruff (<i>Philomachus pugnax</i>)	1	—	—	Wetland
		Great black-backed gull (<i>Larus marinus</i>)	56	—	—	—
		Black-headed gull (<i>Chroicocephalus ridibundus</i>)	6	2 (33.3)	Feb. 8, 2017	SMOC ^A
		Yellow-legged gull (<i>Larus michahellis</i>)	4	—	Mar. 7, 2017	Wetland
Laridae (7 species, 70 birds)	Laridae (7 species, 70 birds)	Grey-headed gull (<i>Chroicocephalus cirrocephalus</i>)	1	—	—	—
		Bonaparte's gull (<i>Chroicocephalus philadelphia</i>)	1	—	—	—
		Sandwich tern (<i>Thalasseus sandwicensis</i>)	1	—	—	—
		Slender-billed gull (<i>Chroicocephalus genei</i>)	1	1 (100)	Jan. 10, 2017	SMOC ^A
		Grey plover (<i>Pluvialis squatarola</i>)	4	—	—	Wetland
		European golden plover (<i>Pluvialis apricaria</i>)	4	—	—	—
		Common ringed plover (<i>Charadrius hiaticula</i>)	1	—	—	—
		Kentish plover (<i>Charadrius alexandrinus</i>)	1	—	—	—
		Northern lapwing (<i>Vanellus vanellus</i>)	1	—	—	—
		Black-winged stilt (<i>Himantopus himantopus</i>)	11	1 (9.1)	Dec. 28, 2016	SMOC ^A
Gruiformes (21 birds)	Recurvirostridae (2 species, 12 birds)	Pied avocet (<i>Recurvirostra avosetta</i>)	1	—	—	Wetland
		Black-necked grebe (<i>Podiceps nigricollis</i>)	3	—	—	—
	Podicipedidae	Eurasian oystercatcher (<i>Haematopus ostralegus</i>)	2	—	—	—
		Eurasian coot (<i>Fulica atra</i>)	18	1 (5.6)	Jan. 10, 2017	Smir Lagoon
	Rallidae (3 species, 21 birds)	(<i>Fulica</i> spp.)	2	—	—	—
		Red-knobbed coot (<i>Fulica cristata</i>)	1	—	—	—

Table 1. Continued.

Order	Family	Species	No. sampled birds	No. AIV PCR-positive birds (%)	Sampling date of positive birds	Location of positive samples
Pelecaniformes (134 birds)	Ardeidae (4 species, 127 birds)	Cattle egret (<i>Bubulcus ibis</i>)	123	6 (4.9)	Apr. 11, 2018	El Jadida Coast
		Little egret (<i>Egretta garzetta</i>)	2	—	—	—
		Grey heron (<i>Ardea cinerea</i>)	1	—	—	—
		Night heron (<i>Nycticorax</i> spp.)	1	—	—	—
		Glossy ibis (<i>Plegadis falcinellus</i>)	7	—	—	—
Passeriformes (68 birds)	Threskiornithidae	House sparrow (<i>Passer domesticus</i>)	28	—	—	—
	Passeridae	Eurasian magpie (<i>Pica pica</i>)	24	—	—	—
	Corvidae	Ficedula hypoleuca (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	4	—	—	—
	Muscicapidae	Common nightingale (<i>Luscinia megarhynchos</i>)	2	—	—	—
	Phylloscopidae	Common chiffchaff (<i>Phylloscopus collybita</i>)	2	—	—	—
		Western Bonelli's warbler (<i>Phoenicoperus roseus</i>)	2	—	—	—
	Buphagidae	Red-billed oxpecker (<i>Buphagus erythrorhynchus</i>)	4	—	—	—
	Sylviidae	Common whitethroat (<i>Sylvia communis</i>)	1	—	—	—
	Laniidae	Woodchat shrike (<i>Lanius senator</i>)	1	—	—	—
Falconiformes	Falconidae	Falcons (<i>Falco</i> spp.)	22	—	—	—
Suliformes	Phalacrocoracidae	Great cormorant (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	8	—	—	—
		Imperial shag (<i>Leucocarbo albertinensis</i>)	3	—	—	—
Phoenicopteriformes	Phoenicopteridae	Greater flamingo (<i>Phoenicopterus roseus</i>)	1	—	—	—
Other unidentified bird species			10	—	—	—
Total			480	17 (3.54)	—	—

^A SMOG Wetland = Sidi Moussa- Oualidia Complex wetland.

were transported at refrigerated temperature and were immediately processed upon receipt in the laboratory. Samples from dead birds included tracheal and cloacal swabs as well as organ samples including the trachea, lung, liver, spleen, heart, intestine, and brain according to World Organisation for Animal Health (OIE) recommendations (25).

A total of 967 samples were examined, which included 374 cloacal swabs, 321 tracheal swabs, 54 fecal samples, and 218 organ pools from 480 wild birds of 56 different wild bird species.

Sample processing. Tracheal and cloacal swabs, as well as fecal and organ samples, were put in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 $\pm$ 0.2, containing 10,000 IU/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin, 0.25 mg/ml gentamycin, and 5,000 IU/ml nystatin and incubated for 2 hr. Briefly, organ and fecal samples were transferred into sterile tubes containing stainless steel beads and homogenized at 3000 $\times$ g for 3 min by Bead Blaster 24 Homogenizer (Benchmark Scientific, 2600, Sayreville, NJ). Swab fluids and homogenates were then clarified by centrifugation at 15,000 $\times$ g for 3 min to remove the suspended solids. The supernatants were stored at -80°C until further analysis.

RNA extraction. RNA was extracted directly from sample supernatants, including organ pools, using a NucleoSpin[®] RNA Virus Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The extraction was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 150 μl of the sample suspension was incubated with 600 μl of RAV1 lysis buffer supplemented with carrier RNA at 70 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. After incubation, 600 μl of absolute ethanol were added to the lysate. Next, the entire sample was applied to the spin column. The sample was then washed and centrifuged as recommended by the manufacturer. Finally, the RNA was eluted in 50 μl of nuclease-free water provided in the kit and stored at -80°C .

TaqMan-based real-time RT-PCR. A molecular technique using One-step rRT-PCR was used to detect the presence of AIV. Initial screening was performed by targeting the matrix gene (M gene) using the primers and probes described by Spackman *et al.* (26). Then, for all AIV-positive samples, testing was carried out by rRT-PCR targeting the H5, H7, and H9 genes as well as further rRT-PCRs to detect the H1–H4, H6, H8, and H10–H16 genes for AIV subtyping, using the primers and probes described by Monne *et al.* (27) and Elizalde *et al.* (28), respectively.

The AgPath-ID One-step RT-PCR Kit (Ambion, Applied Biosystems, Grand Island, NY) was used with a final volume of 20 μl containing 3 μl of RNA template and 17 μl of RT-PCR Mix under the following conditions:

M gene. Ten microliters of 2 $\times$ RT-PCR buffer, 4.8 μl of PCR grade water, 0.4 μl of each primer (20 μM), 0.6 μl of probe (10 μM), and 0.8 μl of 25 $\times$ enzymes mix. Amplification conditions were as follows: reverse transcription at 45 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min, initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, 45 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15 sec, and annealing and elongation at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 45 sec.

H5. Ten microliters of 2 $\times$ RT-PCR buffer, 5.3 μl of PCR grade water, 0.3 μl of each primer (20 μM), 0.3 μl of probe (10 μM), and 0.8 μl of 25 $\times$ enzymes mix.

H7. Ten microliters of 2 $\times$ RT-PCR buffer, 4.7 μl of PCR grade water, 0.3 μl of forward primer (20 μM), 0.9 μl of reverse primer (20 μM), 0.3 μl of probe (10 μM), and 0.8 μl of 25 $\times$ enzymes mix.

H9. Ten microliters of 2 $\times$ RT-PCR buffer, 4.8 μl of PCR grade water, 0.5 μl of each primer (20 μM), 0.4 μl of probe (10 μM), and 0.8 μl of 25 $\times$ enzymes mix.

Amplification conditions for H5, H7, and H9 were as follows: reverse transcription at 45 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min, initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, 45 cycles of denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 30 sec, and annealing and elongation at 54 $^{\circ}\text{C}$ for 45 sec.

The rRT-PCRs to detect H1–H4, H6, H8, and H10–H16 genes for AIV subtyping were conducted according to Elizalde *et al.* (28).

The ROX channel was set as reference passive at the end of each cycle step.

Table 2. Positive controls used in the assays

Positive control RNA	Extraction positive control
H1N1 RNA AIV; A/Duck/Alb/35/76	H7N7
H2N3 RNA AIV; A/Duck/Germ/1215/73	H9N2
H3N2 RNA AIV; A/Turkey/Eng/69	H5N1
H3N8 RNA AIV; A/Psitt/It/2873/00	H5N8
H4N6 RNA AIV; A/Duck/Czech/56	H7N3
H5N2 RNA AIV; A/Turk/It/90302/05	H7N1
H5N2 RNA AIV; A/Ost/Den/72420/96	H1N1
H6N8 RNA AIV; A/OST/RSA/946/98	H3N8
H7N1 RNA AIV; A/TK/Italy/2676/99	H6N8
H7N7 RNA AIV; A/TKY/Eng/647/77	H10N1
H8N4 RNA AIV; A/Turk/Ont/6118/68	—
H9N2 RNA AIV; A/TKY/Wix/1/66	—
H10N9 RNA AIV; A/RSA/EgGoos/238/98	—
H11N6 RNA AIV; A/DK/Eng/56	—
H12N5 RNA AIV; A/Duck/Alb/60/76	—
H13N6 RNA AIV; A/Gull/Maryland/704/77	—
H14N6 RNA AIV; A/Mall/Gurj/244/82	—
H15N9 RNA AIV; A/Sheerwater/WA/2576/79	—
H16N3 RNA AIV; A/Gull/DK/68110/02	—

The rRT-PCR assays were performed with ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA) and Aria Mx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 96-well plate real-time PCR machines. The data were automatically analyzed using the software packages provided with the ABI 7500 Fast and Aria Mx and were then rechecked manually.

Controls. The following positive controls were used: One AIV (H9N2) field isolate (A/chicken/Morocco/01/2016 Accession Number: KU947112.1) obtained from the Virology Department in the National Expertise and Control Service in Rabat. Positive controls for extraction were provided by the IZS Influenza virus Reference Laboratory (Italy), while the Center for Animal Health Research, National Institute for Agronomic Research (CISA-INIA, Spain) offered positive-control RNAs, as shown in Table 2. Deionized water was used as a negative control.

Viral isolation and identification. For all AIV-positive samples, virus isolation was attempted by inoculating 100–200 μl of the original material into the allantoic cavity of 9–11-day-old embryonated specific-pathogen-free (SPF) chicken eggs according to the standard method (25). On the seventh day after inoculation, the allantoic fluid was harvested and tested for AIV using hemagglutination tests following OIE recommendations (25). The allantoic fluid was then inoculated a second and a third time into a new group of embryonated SPF chicken eggs. Hemagglutination tests and rRT-PCR were performed on the second- and third-passage allantoic fluids.

Among the positive samples, we selected six samples (four fecal samples and two organ samples) with the lowest cycle threshold (Ct) values (Ct < 33) for complete genome sequencing using the protocol previously described in Fusaro *et al.* (29).

RESULTS

Between November 2016 and May 2019, from 17 wetlands and six other locations, we collected 967 samples from 470 bird species belonging to the following orders: Anseriformes (19%), Charadriiformes (25.4%), Pelecaniformes (27.9%), Passeriformes (14.2%), Gruiformes (4.4%), Falconiformes (4.6%), Suliformes (2.3%), Phoenicopteriformes (0.2%), and 10 other unidentified bird species. The samples consisted of 374 cloacal swabs, 321 tracheal swabs, 54 fecal samples, and 218 organ pools including the trachea, lung, liver, spleen, heart, intestine, and brain. To identify AI-positive birds, all

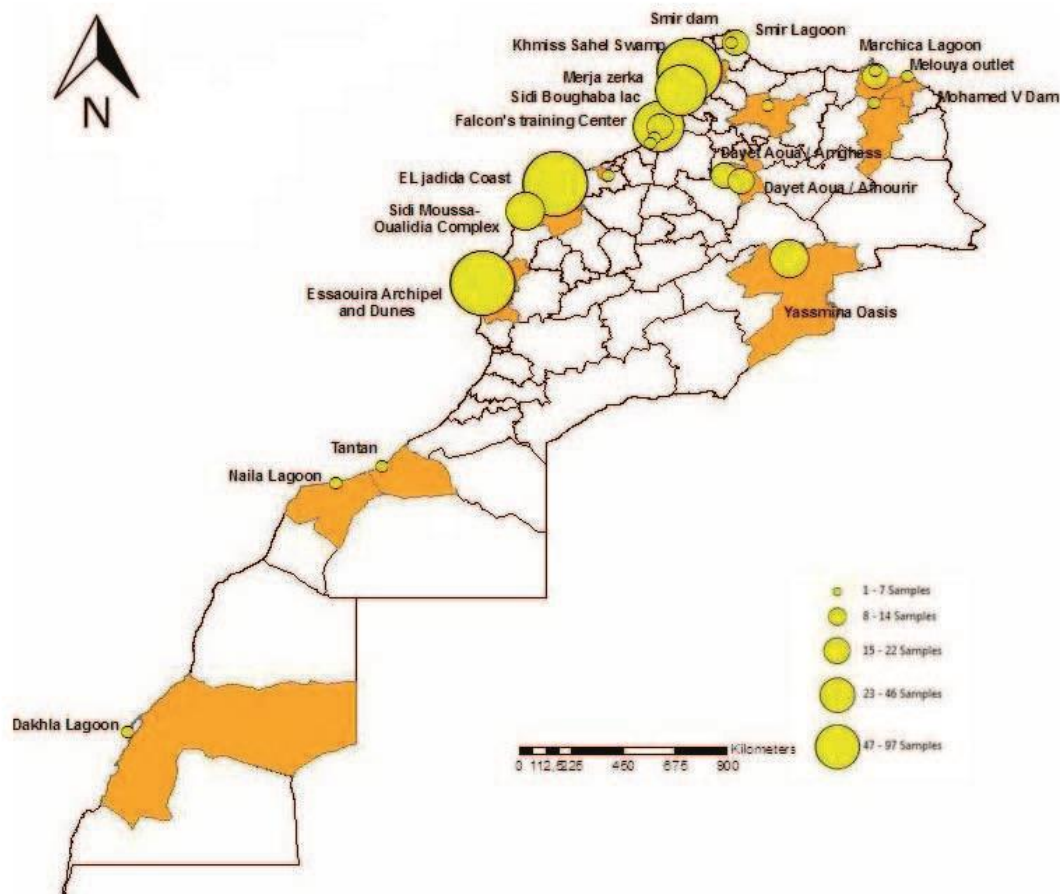


Fig. 1. Locations of sampling sites.

the samples, including the allantoic fluid from the virus isolation assays, were examined by rRT-PCR targeting the M gene. The cut-off Ct was assigned the value of 35 for all AIV-positive samples, while the samples having Ct values higher than 35 were considered negative.

The rRT-PCR assays determined that 6 out of 54 fecal samples (11.1%), 10 out of 218 organ pools (4.6%), and 2 out of 374 cloacal swabs (0.5%) were positive, while all tracheal swabs tested negative. Overall, AIV was detected in 1.86% (18 out of 967 samples) of tested samples. The rRT-PCR Ct values for M gene-positive samples ranged between 31.45 and 34.82, with the lowest Ct values registered for the fresh fecal samples (31.45–33.11), followed by organ samples (32.76–33.60) and cloacal swabs (33.64 and 34.82). Positive samples were obtained from 17 birds out of 480 (3.54%) belonging to 10 bird species, five families, and three orders, specifically six card egrs (*Bubulcus ibis*), two redshanks (*Tringa totanus*), two black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*), one little stint (*Calidris minuta*), one ruddy turnstone (*Arenaria interpres*), one common snipe (*Gallinago gallinago*), one common greenshank

(*Tringa nebularia*), one slender-billed gull (*Chroicocephalus genei*), one black-winged stilt (*Himantopus himantopus*), and one Eurasian coot (*Fulica atra*) (Table 1).

The percentage of positive AI per bird family was as follows: 6/24 (25%) Scolopacidae (order: Charadriiformes), 1/12 (8.3%) Recurvirostridae (order: Charadriiformes), 1/21 (4.8%) Rallidae (order: Gruiformes), 6/127 (4.7%) Ardeidae (order: Pelecaniformes), and 3/70 (4.3%) Laridae (order: Charadriiformes), while none of the 91 birds of the Anatidae family resulted as infected (Table 1).

The highest percentage of AI-positive birds was recorded in orders Charadriiformes (shorebirds and gulls; 10/122, 8.2%), Gruiformes (1/21, 4.8%), and then Pelecaniformes (6/134, 4.5%; Table 1).

Among regions, the positive AI percentage proved to be the highest in Sidi Moussa-Qualidia Complex Wetland (10/23, 43.5%) followed by El Jadida Coast (6/78, 7.7%) and then Smir Lagoon (1/14, 7.1%). These sites are close to industrial poultry farms and are located on the Atlantic Flyway (Fig. 1). All other sampled areas were virus free (Table 1).

Similar percentages of positive AI were recorded in 2017 and 2018 (10/162, 6.2% and 6/101, 5.9%, respectively), while the lowest percentage was registered in 2016 (1/127, 0.8%). None of the 90 birds sampled in 2019 was positive.

All the positive samples were tested using specific primers and probes for the H5, H7, and H9 subtypes, and none was found positive. Then specific rRT-PCR tests targeting H1–H4, H6, H8, and H10–H16 subtypes were carried out, but all samples remained untyped and viral isolation and sequencing failed.

DISCUSSION

Until the end of December 2015, no official report on any subtype of AI in industrial poultry had been recorded in Morocco. However, the first outbreak of H9N2 in the country was reported in January 2016 in poultry production sectors (24). In only a few weeks, the virus spread throughout the country, infecting layer and breeder farms; this caused severe respiratory symptoms, a decrease in feed consumption, an important drop in egg production (up to 80%), and mortality rates varying from 2% to 15% (24). Following these outbreaks, Moroccan authorities planned a national surveillance campaign for AIV in migratory birds to predict and prevent the virus spread in poultry. Neighboring North African countries had notified the first report of H9N2 in poultry in 2005 in Lybia, followed by Egypt in 2006, Tunisia in 2009, and Algeria in 2017 (30,31,32,33). In November 2016, Algeria reported the first case of H7N1 AIV infection in dead migratory birds in the natural park of Ghardaia in South Algeria (34). In Tunisia, H9N2 AIVs emerged in 2009, generating several epidemics in commercial poultry farms (31), but the first isolation of the H9N2 AIV in wild birds in Tunisia was reported in 2014; the virus caused the first epidemic with high mortality in wild aquatic birds and wild birds in Tunisia in 2018 (35). However, no reporting of any massive mortality in wild birds was registered in Morocco.

In the present study, we report the presence of AIV in wild birds in Morocco. Based on the rRT-PCR tests, AIV was detected in 1.86% of the tested samples from 17 bird species, most of them shorebirds, gulls, and cattle egrets. The overall AIV prevalence was (3.54%), which is lower than in previous publications (12,36). In a similar study conducted in wild birds between 2003 and 2009 in different locations in Egypt, the AIV was detected in 9.4% of birds (36), whereas a much higher prevalence of AIV (39%) among wild water birds and land birds was detected in Mexico between 2010 and 2012 (12). The low AIV prevalence in our study may be related to the targeted species, the sample type, the geographic area, or the period of time selected for the study.

The highest percentage of positive AI was found in the order Charadriiformes, mostly shorebirds and gulls, and all of them migrating birds, which is in agreement with previous studies considering Charadriiformes as AIV reservoirs in natural ecosystems (9,37). On the contrary, birds belonging to the Anatidae family were all AIV-negative, although species in Anseriformes order are believed to be the natural hosts of AIV (37). During the first large-scale surveillance of AIV in water birds conducted in 12 African countries in 2006, the AIV was detected in four out of 30 Eurasian ducks sampled from Morocco (22). However, sometimes, even in this family, AIV prevalence may be low (0.29%), as reported in a long-term AIV surveillance carried out in a small Spanish wetland during 2012–2014 (38). In addition, several studies showed that in Europe

AIV prevalence in wild ducks follows a seasonal pattern, with significant variability between seasons: a high prevalence in the summer and autumn and a low prevalence in the winter and spring (39,40,41). However, in our study the Anatidae birds were only collected in the cold season from autumn to winter; the absence of AIV in the Anatidae family could mean that the period chosen for the survey coincided with a low-prevalence period. Our study, as many AIV surveillance studies in wetlands, was planned to detect AIV circulation in wild birds during the migratory and wintering period (40,42). Hence, continuous monitoring during an entire annual cycle might have allowed investigating the potential role of wild birds in maintaining AIV in the Moroccan wetlands.

AIV was detected in a resident colony of cattle egrets with a percentage of 4.9%. Such a finding supports the potential role of this bird species in the AIV epidemiology and therefore strengthens the assumption that cattle egrets may serve as a “bridge” in the transmission of AIVs between poultry and wild birds (13,14). No AIV was detected in order Passeriformes, including Passeridae (Old World sparrows) and Corvidae (crow family), which may be due to the low sample size for both bird families (5.8% and 5%, respectively). Previous studies reported the isolation of H5N1 from crows in India (43), Bangladesh (44), and a natural infection with H9N2 in crows in Pakistan (13). This suggests that terrestrial wild birds such as crows may be involved in AIV transmission. While most researches have concentrated on aquatic wild migratory birds, some surveys reported a significant prevalence of AIV among land birds. For example, recent comparison studies of the prevalence of AIV in different groups of wild birds (aquatic birds and terrestrial birds; resident and migratory) in eastern Mexico revealed an exceptionally high prevalence in land birds (49%) compared to aquatic birds (26%) (12). Thus, focusing studies on cattle egrets and land bird species for AIV detection might highlight their role in the AIV persistence and spread, as previously suggested (45).

The present study showed a variable percentage of positive AI among regions and between years, ranging from 7.1% to 43.5% and from 0.8% to 6.2%, respectively, which is in accordance with previous publications (46,47,48). Three studies conducted in a region with similar, Mediterranean-like climate, such as Spain, revealed that AIV prevalence varied according to the geographic area and the year of the study: 1.70%, 2.58%, and 5% in Castilla-La Mancha, Catalonia, and the Basque Country, (2007–2009); in Castilla-La Mancha (2005–2007) and in Catalonia (2006–2009) respectively (46,47,48), with significant prevalence variations between years, fluctuating from 0.82 to 7.67% (46). Moreover, in Egypt between 2003 and 2009, the AIV prevalences among regions were 10%–15%, except in Middle Egypt (4%) (36).

In our study, a high positive AI percentage (11.1%) was detected in fecal samples, which is in agreement with previous studies (38,49,50). In a survey conducted in the wetlands of Chile (49), the virus was detected in 4.28% of the droppings, showing significant seasonal fluctuations, with a peak of 30% in the summer. In Spain and Australia, close prevalence values ranging from 1.7% to 5.43% were reported (38,50). Thus, fecal sampling can be used for large-scale surveys of the virus because fecal collection offers a large capacity of sampling, requires much less time than other methods, and allows protection of birds from capture and hunting (51). However, the probability of isolating a viable AIV sample from a fecal sample is usually lower than the one that would be obtained from fresh tracheal and cloacal swabs (52). Otherwise, virus isolation from field samples is sometimes impossible due to the low amount

of genetic material and/or incapacity of certain AIVs from wild birds to adapt and develop sufficiently high titers in embryonated SPF chicken eggs (53).

The high M gene Ct values obtained for positive samples in the present study may reflect a low amount of AIV genetic material in the samples. Indeed, some factors could decrease rRT-PCR sensitivity, such as the diversity of HA genes in wild bird strains (54,55) and a low viral copy number in the sample that is below the limit of detection of rRT-PCR (26); AIVs have an exceptionally high variability, even within one HA subtype (52), and the sensitivity of rRT-PCR for wild bird samples is lower than in poultry (55).

Besides high variability, as RNA viruses, AIVs have high mutation rates. The fixation rate in the HA gene is higher than the one in the M gene, i.e., 5.7×10^{-3} substitutions/site per year (56). This might explain the failure of detecting the subtypes.

In summary, the present study revealed the presence of AIV in wild birds, mostly shorebirds, gulls, and cattle egrets, at three studied sites close to areas where industrial poultry farms are concentrated, meaning that wild birds could represent a significant source of AIV for poultry in Morocco. Focusing studies on those sites may help to advance our understanding of AI epidemiology in wild birds in Morocco. Higher AIV detection rates in Charadriiformes are in agreement with findings of previous studies, while all Anatidae birds sampled in winter were negative, different from that described in other reports. Continuous monitoring during an entire annual cycle may help to determine the role of wild birds in maintaining AIV in Moroccan wetlands. Our study revealed that the cattle egret (genus *Bubulcus*) species is susceptible to AIV infection, as previously described; targeting cattle egrets and terrestrial bird species could show their involvement in the spread and persistence of AIV. The highest positivity and the lowest Ct values were associated with fresh droppings samples; hence, fecal sampling could be used for large-scale AIV surveys because it provides a high sample capacity, takes less time than other techniques, and contributes to the protection of birds from capture and hunting.

These findings justify the need to further maintain routine active surveillance for AIV in wild birds by implementing an in-depth investigation of the interface between wild bird populations in wetlands and poultry farms in order to anticipate future AIV outbreaks. Moreover, the massive circulation in wild birds of HPAI H5 viruses in 2020–2021 in the Eurasian continent and their subsequent spread to West and South Africa (57), likely through migratory birds, further emphasizes the importance of increasing AI surveillance in areas such as Morocco, which serves as a wild bird corridor between Europe and Africa.

REFERENCES

1. Sorrell EM, Wan H, Araya Y, Song H, Perez DR. Minimal molecular constraints for respiratory droplet transmission of an avian–human H9N2 influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 106:7565–7570; 2009.
2. Lamb, RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*, 4th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins. p. 1487–1532; 2001.
3. Perdue ML. Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses. In: Swayne DE, ed. *Avian influenza*. Ames (IA): Wiley Blackwell Publishing. p. 23–42; 2008.
4. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen BR, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 79:2814–2822; 2005.
5. Swayne DE, Suarez DE, Sims LD. Influenza. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V, editors. *Diseases of poultry*. 13th ed. Ames (IA): Wiley-Blackwell. p. 181–218; 2013.
6. Tong S, Li Y, Rivallier P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, *et al.* A distinct lineage of influenza A virus from bats *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 109:4269–4274; 2012.
7. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, *et al.* New World bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9:e1003657; 2013.
8. Munster VJ, Fouchier RA. Avian influenza virus: of virus and bird ecology. *Vaccine* 27:6340–6344; 2009.
9. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 56:152–179; 1992.
10. Hansbro PM, Warner S, Tracey JP, Arzey KE, Selleck P, O’Riley K, Beckett EL, Bunn C, Kirkland PD, Vijaykrishna D, *et al.* Surveillance and analysis of avian influenza viruses, Australia. *Emerg Infect Dis.* 16:1896–1904; 2010.
11. Blagodatki A, Trutneva K, Glazova O, Mityaeva O, Shevkova L, Kegeles E, Onyanov M, Fede K, Maznina A, Khavina E, *et al.* Avian influenza in wild birds and poultry: dissemination pathways, monitoring methods, and virus ecology. *Pathogens* 10:630; 2021.
12. Cerda-Armijo C, de León MB, Ruvalcaba-Ortega I, Chablé-Santos J, Canales-del-Castillo R, Peñuelas-Urquides K, Rivera-Morales LG, Menchaca-Rodríguez G, Camacho-Moll ME, Contreras-Cordero JF. High prevalence of avian influenza virus among wild waterbirds and land birds of Mexico. *Avian Dis.* 64:135–142; 2020.
13. Khawaja J, Naem K, Ahmed Z, Ahmad S. Surveillance of avian influenza viruses in wild birds in areas adjacent to epicenter of an outbreak in federal capital territory of Pakistan. *Int J Poult Sci.* 4:39–43; 2005.
14. Caron A, Grosbois V, Etter E, Gaidet N, de Garine-Wichatitsky M. Bridge hosts for avian influenza viruses at the wildlife/domestic interface: an eco-epidemiological framework implemented in southern Africa. *Prev Vet Med.* 117:590–600; 2014.
15. Becker W. The isolation and classification of tern virus: influenza virus A/tern/South Africa/1961. *J Hygiene* 64:309–320; 1966.
16. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 312:384–388; 2006.
17. Gaidet N, Caron A, Cappelle J, Cumming GS, Balança G, Hammoumi S, Cattoli G, Abolnik C, de Almeida RS, Gil P, *et al.* Understanding the ecological drivers of avian influenza virus infection in wildfowl: a continental-scale study across Africa. *Proc Biol Sci.* 279:1131–1141; 2012.
18. Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balança G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Martin V, Tripodi A, Lamarque F. Influenza surveillance in wild birds in Eastern Europe, the Middle East, and Africa: preliminary results from an ongoing FAO-led survey. *J Wildl Dis.* 43:S22; 2007.
19. Caron A, Abolnik C, Mundava J, Gaidet N, Burger CE, Mochothoane B, Bruinzeel L, Chiweshe N, de Garine-Wichatitsky M, Cumming GS. Persistence of low pathogenic avian influenza virus in waterfowl in a southern African ecosystem. *EcoHealth* 8:109–115; 2011.
20. Cumming GS, Caron A, Abolnik C, Cattoli G, Bruinzeel LW, Burger CE, Cecchetti K, Chiweshe N, Mochothoane B, Mutumi GL, *et al.* The ecology of influenza A viruses in wild birds in southern Africa. *EcoHealth* 8:4–13; 2011.
21. World Health Organization. Influenza virological surveillance in the WHO African Region: Epidemiological Week 25, June 19 to 25, 2017. *Influenza Virological Surveillance* 3:1–3; 2017.
22. Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balança G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Lamarque F, Hagemeijer W, Monicat F. Avian influenza viruses in water birds, Africa. *Emerging Infect Dis.* 13:626; 2007.
23. [OIE] World Organisation for Animal Health. Chapter 3.3.2. Avian infectious bronchitis. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris (France): OIE [modified 2018 May; accessed 2021 Jun 15]. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.02_AIB.pdf; 2018.

24. Houadfi ME, Fellahi S, Nassik S, Guérin J-L, Ducatez MF. First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco. *Virol J.* 13:1–7; 2016.
25. [OIE] World Organisation for Animal Health. Chapter 3.3.4. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris (France): OIE [modified 2021 May; accessed 2021 Jun 15]. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf; 2021.
26. Spackman E, Senne DA, Myers T, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* 40:3256–3260; 2002.
27. Monne I, Ormelli S, Salviato A, De Battisti C, Bettini F, Salomoni A, Drago A, Zecchin B, Capua I, Cattoli G. Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *J Clin Microbiol.* 46:1769–1773; 2008.
28. Elizalde M, Agüero M, Buitrago B, Yuste M, Arias ML, Muñoz MJ, Lelli D, Pérez-Ramírez E, Moreno-Martin AM, Fernández-Pinero J. Rapid molecular haemagglutinin subtyping of avian influenza isolates by specific real-time RT-PCR tests. *J Virol Methods* 196:71–81; 2014.
29. Fusaro A, Zecchin B, Vrancken B, Abolnik C, Ademun R, Alassane A, Arafat A, Awuni J A, Couacy-Hymann E, Coulbaly M B, et al. Disentangling the role of Africa in the global spread of H5 highly pathogenic avian influenza. *Nature Communications* 10: 1–13; 2019.
30. Al-Garib SO, Kammon A, Asheg A, Hamid M, Fathalla H, Lawala A. Detection of antibodies to avian influenza H9N2 in broiler flocks clinically expressing a respiratory disease syndrome. *Proceeding of the 15th Congress & Exhibition of the World Veterinary Poultry Association*. 15th World Veterinary Poultry Congress; 2007 Oct; Beijing (China): Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. p. 130–130; 2007.
31. Tombari W, Nsiri J, Larbi I, Guerin JL, Ghram A. Genetic evolution of low pathogenicity H9N2 avian influenza viruses in Tunisia: acquisition of new mutations. *Virol J.* 8:1–12; 2011.
32. El-Zoghby EF, Arafat A-S, Hassan MK, Aly MM, Selim A, Kilany WH, Selim U, Nasef S, Aggor MG, Abdelwhab E. Isolation of H9N2 avian influenza virus from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) in Egypt. *Arch Virol* 157:1167–1172; 2012.
33. Jeevan T, Darnell D, Gradi EA, Benali Y, Kara R, Guetarni D, Rubrum A, Seiler PJ, Crumpton JC, Webby RJ, et al. A(H9N2) influenza viruses associated with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. *Influenza Other Respir Viruses* 13:622–626; 2019.
34. Barberis A, Boudaoud A, Gorrill A, Loupias J, Ghram A, Lachheb J, Alloui N, Ducatez MF. Full-length genome sequences of the first H9N2 avian influenza viruses isolated in the Northeast of Algeria. *Virol J.* 17:1–16; 2020.
35. Larbi I, Ghedira K, Butcher GD, Rego N, Arbi M, Naya H, Tougorti H, El Behi I, Nsiri J, Lachheb J. Phylogenetic analysis and assessment of the pathogenic potential of avian influenza virus H9N2 in wild waterfowl, wild birds, and lagoon water in Tunisia. *Research Square* [accessed 2021 Jun 26]; 2021. doi:10.21203/rs.3.rs-482794/v1.
36. Soliman A, Saad M, Elassal E, Amir E, Plathonoff C, Bahgat V, Elbadry M, Ahmed LAS, Fouda M, Gamaleldin M. Surveillance of avian influenza viruses in migratory birds in Egypt, 2003–09. *J Wildl Dis.* 48:669–675; 2012.
37. Stallknecht DE, Shane S. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun.* 12:125–141; 1988.
38. Torrontegui O, Alvarez V, Acevedo P, Gerrikagoitia X, Höfle U, Barral M. Long-term avian influenza virus epidemiology in a small Spanish wetland ecosystem is driven by the breeding Anseriformes community. *Vet Res.* 50:1–12; 2019.
39. Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 3:e61; 2007.
40. Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmberg J, Fouchier RA, Fransson T, Haemig PD, Karlsson M, Lundkvist Å. Surveillance of influenza virus A in migratory waterfowl in Northern Europe. *Emerging Infect Dis.* 13:404; 2007.
41. Van Dijk JG, Hoyer BJ, Verhagen JH, Nolet BA, Fouchier RA, Klaassen M. Juveniles and migrants as drivers for seasonal epizootics of avian influenza virus. *J Anim Ecol.* 83:266–275; 2014.
42. Verhagen JH, Munster VJ, Majoer F, Lexmond P, Vuong O, Stumpel JB, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Schutten M, Slaters R. Avian influenza A virus in wild birds in highly urbanized areas. *PLoS One* 7:e38256; 2012.
43. Das B, Tosh C, Kumar M, Nagarajan S, Murugkar H, Shukla S, Tripathi S, Mishra A, Kulkarni D. Isolation and genetic characterization of influenza A (subtype H5N1) virus from crows in India. *Adv Anim Vet Sci.* 2:620–624; 2014.
44. Khan SU, Berman L, Haider N, Gerloff N, Rahman MZ, Shu B, Rahman M, Dey TK, Davis TC, Das BC. Investigating a crow die-off in January–February 2011 during the introduction of a new clade of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 into Bangladesh. *Arch Virol.* 159:509–518; 2014.
45. Caron A, Cappelle J, Gaidet N. Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *J Appl Ecol.* 54:681–690; 2017.
46. Busquets N, Alba A, Napp S, Sánchez A, Serrano E, Rivas R, Núñez JJ, Majó N. Influenza A virus subtypes in wild birds in north-eastern Spain (Catalonia). *Virus Res.* 149:10–18; 2010.
47. Pérez-Ramírez E, Acevedo P, Allepuz A, Gerrikagoitia X, Alba A, Busquets N, Díaz-Sánchez S, Álvarez V, Abad FX, Barral M. Ecological factors driving avian influenza virus dynamics in Spanish wetland ecosystems. *PLoS One* 7:e46418; 2012.
48. Pérez-Ramírez E, Gerrikagoitia X, Barral M, Höfle U. Detection of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds in Castilla-La Mancha (south central Spain). *Vet Microbiol.* 146:200–208; 2010.
49. Ruiz S, Jimenez-Bluhm P, Di Pillo F, Baumberger C, Galdames P, Marambio V, Salazar C, Mattar C, Sanhueza J, Schultz SJT, et al. Temporal dynamics and the influence of environmental variables on the prevalence of avian influenza virus in main wetlands in central Chile. *Transbound Emerg Dis.* 68:1601–1614; 2021.
50. Ferenczi M, Beckmann C, Warner S, Loyn R, O’Riley K, Wang X, Klaassen M. Avian influenza infection dynamics under variable climatic conditions, viral prevalence is rainfall driven in waterfowl from temperate, south-east Australia. *J Anim Ecol.* 47:1–12; 2016.
51. Pannwitz G, Wolf C, Harder T. Active surveillance for avian influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. *J Wildl Dis.* 45:512–518; 2009.
52. Suarez DL. Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol.* 74:15–27; 2000.
53. Runstadler J, Happ G, Slemmons R, Sheng Z-M, Gundlach N, Petrus M, Senne D, Nolting J, Evers D, Modrell A. Using rRT-PCR analysis and virus isolation to determine the prevalence of avian influenza virus infections in ducks at Minto Flats State Game Refuge, Alaska, during August 2005. *Arch Virol.* 152:1901–1910; 2007.
54. Suarez DL, Das A, Ellis E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis.* 51:201–208 2007.
55. Xing Z, Cardona C, Dao P, Crossley B, Hietala S, Boyce W. Inability of real-time reverse transcriptase PCR assay to detect subtype H7 avian influenza viruses isolated from wild birds. *J Clin Microbiol.* 46:1844–1846; 2008.
56. Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox N. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94:7712–7718 1997.
57. [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global AIV with zoonotic potential situation update. Rome (Italy): FAO [modified 2021-10-27 ; accessed 2021 Nov 06] . https://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/Global_AIV_Zoonotic_Update/situation_update.html; 2021.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Moroccan veterinary services, the Department of Waters and Forestry, the ornithologist teams, and the hunting associations for collecting bird samples, as well as the

laboratory staff for processing the samples. We are grateful to Dr. Isabella Monne from the Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) Influenza Virus Reference Laboratory (Italy) and Dr. Miguel Angel Jimenez-Clavero and Dr. Jovita Fernandez-Pinero from the CISA-

INIA (Spain) for providing positive controls. We also thank the team of the IZS Influenza Virus Reference Laboratory for the technical support and Ms. Francesca Ellero from the IZS Influenza Virus Reference Laboratory for editing the manuscript.

Article

Spatiotemporal Dynamics, Evolutionary History and Zoonotic Potential of Moroccan H9N2 Avian Influenza Viruses from 2016 to 2021

Fatiha El Mellouli ^{1,*}, Mohamed Mouahid ², Alice Fusaro ³, Bianca Zecchin ³, Hasnae Zekhnini ⁴, Abderrazak El Khantour ⁵, Edoardo Giussani ³, Elisa Palumbo ³, Hamid Rguibi Idrissi ^{1,6}, Isabella Monne ³ and Abdelaziz Benhoussa ¹

- ¹ Biodiversity, Ecology and Genome Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, 4 Avenue Ibn Battouta, Rabat 10106, Morocco; hrguibi@hotmail.com (H.R.I.); benhoussa@hotmail.com (A.B.)
- ² Mouahid's Veterinary Clinic, Temara 12000, Morocco; mohamedmouahid@gmail.com
- ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 35020 Legnaro, Italy; afusaro@izsvenezie.it (A.F.); bzecchin@izsvenezie.it (B.Z.); egiussani@izsvenezie.it (E.G.); epalumbo@izsvenezie.it (E.P.); imonne@izsvenezie.it (I.M.)
- ⁴ Immunology and Biodiversity Laboratory, Faculty of Science Ain chock, Hassan II University of Casablanca, Casablanca 20100, Morocco; ha.zekhnini@gmail.com
- ⁵ Division of Pharmacy and Veterinary Inputs, Food Safety National Office (ONSSA), Rue Ikhlal Cym, PB 4509 Akkari, Rabat 10050, Morocco; abder_elkhanthour@yahoo.fr
- ⁶ Ecole supérieure de Technologie de Lâayoune, Quartier 24 Mars, Lâayoune 3007, Morocco
- * Correspondence: fatihaelmellouli@gmail.com; Tel.: +212-661-328711



Citation: El Mellouli, F.; Mouahid, M.; Fusaro, A.; Zecchin, B.; Zekhnini, H.; El Khantour, A.; Giussani, E.; Palumbo, E.; Rguibi Idrissi, H.; Monne, I.; et al. Spatiotemporal Dynamics, Evolutionary History and Zoonotic Potential of Moroccan H9N2 Avian Influenza Viruses from 2016 to 2021. *Viruses* **2022**, *14*, 509. <https://doi.org/10.3390/v14030509>

Academic Editor: Caijun Sun

Received: 29 January 2022

Accepted: 24 February 2022

Published: 1 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The H9N2 virus continues to spread in wild birds and poultry worldwide. At the beginning of 2016, the H9N2 Avian influenza virus (AIV) was detected in Morocco for the first time; despite the implementation of vaccination strategies to control the disease, the virus has become endemic in poultry in the country. The present study was carried out to investigate the origins, zoonotic potential, as well as the impact of vaccination on the molecular evolution of Moroccan H9N2 viruses. Twenty-eight (28) H9N2 viruses collected from 2016 to 2021 in Moroccan poultry flocks were isolated and their whole genomes sequenced. Phylogenetic and evolutionary analyses showed that Moroccan H9N2 viruses belong to the G1-like lineage and are closely related to viruses isolated in Africa and the Middle East. A high similarity among all the 2016–2017 hemagglutinin sequences was observed, while the viruses identified in 2018–2019 and 2020–2021 were separated from their 2016–2017 ancestors by long branches. Mutations in the HA protein associated with antigenic drift and increased zoonotic potential were also found. The Bayesian phylogeographic analyses revealed the Middle East as being the region where the Moroccan H9N2 virus may have originated, before spreading to the other African countries. Our study is the first comprehensive analysis of the evolutionary history of the H9N2 viruses in the country, highlighting their zoonotic potential and pointing out the importance of implementing effective monitoring systems.

Keywords: avian influenza virus; H9N2; phylogeny; molecular evolution; Morocco

1. Introduction

The H9N2 AIV was initially isolated from turkeys in Wisconsin in the United States of America in 1966 (A/turkey/Wisconsin/1/1966(H9N2)) [1]. In Asia, the first cases of H9N2 infection in poultry were recorded in Hong Kong in the 1970s [2]. In the 1990s, the H9N2 spread became more extensive with several outbreaks affecting industrial poultry in China, Germany, South Korea, Italy, Iran, Pakistan, the USA, South Africa, and Ireland [3–5]. This led to a persistent viral circulation in many countries in Asia, the Middle East, and North Africa [6], where the virus has attained endemic status in poultry populations [7–9]. Today, H9N2 is considered the most prevalent, and damaging, low-pathogenic avian influenza

(LPAI) subtype in poultry worldwide [7], presenting a threat to both animal and human health [9,10]. H9N2 infections usually cause minor clinical disease in poultry, which makes its identification in the field rather challenging [11]. However, despite their low pathogenicity, H9N2 viruses may cause variable pathogenicity and mortality in domestic poultry [5,6,12], especially when associated with immunosuppression or coinfection with other viruses or bacteria [3,11,13,14], resulting in significant economic losses [5,6,12].

The H9N2 virus has a zoonotic potential with interspecies transmission between poultry and mammals, including swine and humans [15–18]. At least 59 human cases have been reported to date [9]. Furthermore, H9N2 viruses have proved able to provide partial or even complete sets of internal gene segments to zoonotic avian influenza viruses (AIVs), leading to the emergence of human-lethal reassortants, as in the case of China in 2013 with the appearance of H7N9 and H10N8 viruses, and, a year later of the H5N6 subtype [19–26] posing serious risks to public health. Moreover, there are multiple reports of H9N2 natural infection in other mammals, such as ferrets [27], mice [28], minks, foxes, raccoon dogs [29], cats, and dogs [30].

Based on their genetic characteristics, the H9N2 AIVs are divided into three major lineages: the G1-like lineage (A/Quail/Hong Kong/G1/97), the Korean-like lineage (A/Chicken/Korea/38349-p96323/96 and A/Duck/Hong Kong/Y439/97) and the Y280-like lineage (A/Duck/Hong Kong/Y280/97, A/Chicken/Beijing/1/94, and A/Chicken/Hong Kong /G9/97) [3–5,31]. Until now, the G1-like lineage has been the only one found in Africa [32].

Since the early 2000s, the emergence of H9N2 viruses has been reported in several North African countries, including Libya in 2006 [33], Egypt in 2006 [34], and Tunisia in 2009 [35]. Additionally, following the first isolation of the LPAI H9N2 virus in Morocco in January 2016 [36], H9N2 viruses have been extensively circulating in North Africa, spreading to West Africa, as well as to East Africa. Since 2017, H9N2 viruses have been detected in Algeria [37] and in several Sub-Saharan African countries, including Burkina Faso [38], Ghana [32], Uganda, Kenya, Senegal [39], Benin Republic, and Togo [40]. All H9N2 viruses detected in poultry in Africa belong to the G1 lineage and are related to those isolated in the United Arab Emirates.

In Morocco, following its first identification in 2016, the H9N2 virus has spread rapidly across the country, causing significant economic losses in poultry [36]. A previous study revealed that the Moroccan isolate might be related to the Middle East isolate A/chicken/Dubai/D2506.A/2015 [41]. The virus showed high pathogenicity under field conditions with aggravation of the disease in case of coinfection with other respiratory diseases [41,42]. Despite the swift implementation of a mass poultry vaccination program following the onset of the disease, the virus became endemic in all poultry sectors of the country [43]. Knowledge of the evolutionary history and the circulation of the Moroccan H9N2 viruses is crucial for public and animal health in Morocco. A better understanding of the epidemiological and geographic origins of the Moroccan H9N2 viruses might help to improve the control and management of future outbreaks. In this study, we characterized the whole genome of H9N2 AIVs collected in Morocco from 2016 to 2021, exploring the spatiotemporal dynamics and the acquisition of mutations of particular concern for animal and human health.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

From 2016 to 2021, thanks to the establishment of a program to monitor the presence of influenza viruses in poultry in Morocco, samples were collected from 81 poultry farms located in seven different regions in the country, including layers, breeders, turkeys, and broiler flocks of varying ages. Most flocks (72.84%, 59/81) were vaccinated against AIV H9N2. Oropharyngeal, cloacal swabs and organ samples were collected from chickens and turkeys, stored at 2–8 °C, and sent to the laboratory within 24 h for further analysis.

2.2. Real Time RT-PCR for H9 Gene Detection

Swabs, as well as tissue samples, were re-suspended in 1 mL of phosphate-buffered saline (pH 7.4 $\pm$ 0.2, supplemented with 10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL gentamycin, and 5000 IU/mL nystatin), thoroughly homogenized by using Bead Blaster 24 Homogenizer (Benchmark Scientific, 2600, Sayreville, NJ, USA). After centrifugation at $1500\times g$ for 10 min at 4 °C, total RNA was purified with the NucleoSpin® RNA Virus Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA was then eluted in 50 μ L RNase-free water. All samples were tested by RT PCR for the influenza A matrix gene as described by Spackman, E. et al. (2002) [44]. The positive samples were then tested for the H9 gene detection by RT-PCR according to Monne, I. et al. (2008) [45] by using the AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit (Ambion, Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA). The rRT-PCR was performed with Aria Mx (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 96-well plate real-time PCR devices.

2.3. Whole Genome Sequencing

The complete genomes were amplified using SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as previously described by Zhou B. et al. (2009) [46]. Amplicons were purified by using Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) and quantified with Qubit™ DNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sequencing libraries were prepared with the Illumina Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and sequenced on the Illumina MiSeq platform (2 $\times$ 250 bp Paired-End; Illumina, San Diego, CA, USA).

Read quality was assessed using FastQC v0.11.2 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, accessed on 4 June 2021) and raw data were filtered by removing reads with more than 10% of undetermined bases, reads with more than 100 bases with Q score below seven, and duplicated paired-end reads. Remaining reads were clipped from Illumina Nextera XT adaptors with scythe v0.991 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>, accessed on 4 June 2021) and trimmed with sickle v1.33. (<https://github.com/najoshi/sickle>, accessed on 4 June 2021). Reads were cropped to a maximum of 250 bases length using trimmomatic [47]. Reads shorter than 80 bases or unpaired after previous filters were discarded. High-quality reads were aligned against a reference genome using BWA v0.7.12 [48]. Alignment was processed using Picard-tools v2.1.0 and GATK v3.5 [49,50] in order to correct potential errors, realign reads around indels and recalibrate base quality. LoFreq v2.1.2 [51] was used to call Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Consensus sequences were submitted to the GISAID EpiFlu™ database (<http://www.gisaid.org>, accessed on 6 January 2022) under the accession numbers listed in Table 1.

2.4. Phylogenetic and Evolutionary Analyses

After sequence alignment using MAFFT v7 [52], IQTREE v1.6 was used to perform ultrafast bootstrap resampling analyses (1000 replications) to generate the maximum likelihood phylogenetic trees [53,54]. Trees were visualized with FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, accessed on 30 June 2021).

Phylogenetic network analyses using the Median Joining method implemented in the program NETWORK 10 (<https://www.fluxus-engineering.com/>, accessed on 4 June 2021) were performed on the HA gene sequences of the H9N2 influenza viruses collected in Morocco in the period 2016–2021 [55]. This method uses a parsimony approach to reconstruct the relationships between highly-similar sequences, and allows the creation of “median vectors,” which represent un-sampled sequences used to connect the existing genotypes in the most parsimonious way.

Table 1. H9N2 isolates related information and GISAID accession numbers.

Year	Virus	Subtype	Flock	Age (d/w ¹)	Collection Date	Region	Location	GISAID Accession Number
2016	A/chicken/Morocco/19RS1944-1/2016	H9N2	Breeders	na	25 January 2016	Fès-Meknès	Fès	EPI1950238–EPI1950245
	A/chicken/Morocco/19RS1944-2/2016	H9N2	Broilers	na	26 January 2016	Rabat-Salé-Kénitra	Kénitra	EPI1950325–EPI1950332
	A/pheasant/Morocco/19RS1944-13/2019	H9N2	na	na	19 March 2019	Casablanca-Settat	Ain Borja	EPI1950209–212, 214–216 and EPI1950384
	A/pheasant/Morocco/19RS1944-14/2019	H9N2	na	na	19 March 2019	Casablanca-Settat	Ain Borja	EPI1950217–EPI1950224
2019	A/chicken/Morocco/1_456_21RS1333-1/2019	H9N2	Layers	26 w	16 February 2019	Rabat-Salé-Kénitra	Skhourat Temara	EPI1950349–EPI1950356
	A/chicken/Morocco/2_924_21RS1333-2/2019	H9N2	Breeders	33 w	3 April 2019	Casablanca-Settat	El Jadida	EPI1950230, 233, 235–237 and EPI1950385
	A/chicken/Morocco/3_1004_21RS1333-3/2019	H9N2	Broilers	15 d	11 April 2019	Fès-Meknès	Fès	EPI1950246–EPI1950253
	A/chicken/Morocco/4_2573_21RS1333-4/2019	H9N2	Broilers	34 d	5 September 2019	Fès-Meknès	Setrou	EPI1950277–EPI1950284
	A/chicken/Morocco/5_2781_21RS1333-5/2019	H9N2	Broilers	29 w	24 September 2019	Fès-Meknès	Fès	EPI1950254–EPI1950261
	A/chicken/Morocco/7_3046_21RS1333-7/2019	H9N2	Broilers	24 d	19 October 2019	Fès-Meknès	Ifrane	EPI1950262, 265, 267–269 and EPI1950386
	A/chicken/Morocco/8_3465_21RS1333-8/2019	H9N2	Layers	22 w	29 November 2019	Rabat-Salé-Kénitra	Bouznika	EPI1950309–EPI1950316
	A/chicken/Morocco/21_4574_21RS1333-23/2020	H9N2	Broilers	42 w	25 February 2020	Fès-Meknès	Meknès	EPI1950270–EPI1950276
	A/chicken/Morocco/9_4410_21RS1333-9/2020	H9N2	Breeders	43 w	26 February 2020	Fès-Meknès	El Hajeb	EPI1950317–320, 322–324 and EPI1950387
	A/chicken/Morocco/10_4437_21RS1333-10/2020	H9N2	Broilers	34 d	29 February 2020	Fès-Meknès	Setrou	EPI1950285–EPI1950292
2020	A/chicken/Morocco/11_4438_21RS1333-11/2020	H9N2	Broilers	34 d	29 February 2020	Fès-Meknès	Setrou	EPI1950293–EPI1950300
	A/chicken/Morocco/12_4476_21RS1333-12/2020	H9N2	Layers	33 w	3 March 2020	Rabat-Salé-Kénitra	Bouznika	EPI1950301–EPI1950308
	A/chicken/Morocco/13_4562_21RS1333-13/2020	H9N2	Broilers	34 d	12 March 2020	Casablanca-Settat	El Jadida	EPI1950225–EPI1950229
	A/chicken/Morocco/14_4636_21RS1333-14/2020	H9N2	Broilers	27 d	20 March 2020	Casablanca-Settat	Casablanca	EPI1950194–EPI1950200
	A/chicken/Morocco/16-1_6595_21RS1333-17/2020	H9N2	Broilers	39 d	23 November 2020	Rabat-Salé-Kénitra	Rommant	EPI1950365–EPI1950369
	A/chicken/Morocco/16-2_6595_21RS1333-18/2020	H9N2	Broilers	39 d	23 November 2020	Rabat-Salé-Kénitra	Rommant	EPI1950370–EPI1950375
	A/chicken/Morocco/17_6650_21RS1333-19/2020	H9N2	Broilers	41 d	28 November 2020	Rabat-Salé-Kénitra	Bouznika	EPI1950186–EPI1950193
	A/chicken/Morocco/18_6657_21RS1333-20/2020	H9N2	Broilers	37 d	30 November 2020	Rabat-Salé-Kénitra	Skhourat Temara	EPI1950357–EPI1950364
	A/chicken/Morocco/19_6700_21RS1333-21/2020	H9N2	Layers	44 w	4 December 2020	Casablanca-Settat	Casablanca	EPI1950870–EPI1950875
	A/chicken/Morocco/22-1_72_21RS1333-24/2021	H9N2	Broilers	21 d	11 February 2021	Tanger-Tétouan-Al Hoceïma	Tangeir	EPI1950376–EPI1950383
2021	A/chicken/Morocco/24_520_21RS1333-28/2021	H9N2	Broilers	40 d	18 March 2021	Casablanca-Settat	Casablanca	EPI1950201–EPI1950208
	A/chicken/Morocco/25-1_3155_21RS1333-29/2021	H9N2	Broilers	40 d	9 April 2021	Rabat-Salé-Kénitra	Sidi Bouhker El Haj	EPI1950333–EPI1950340
	A/chicken/Morocco/25-2_3155_21RS1333-30/2021	H9N2	Broilers	40 d	9 April 2021	Rabat-Salé-Kénitra	Sidi Bouhker El Haj	EPI1950341–EPI1950348
	A/chicken/Morocco/26-2_917_21RS1333-32/2021	H9N2	Layers	19 w	28 April 2021	Béni Mellal-Khémira	Béni Mellal	EPI1950178–EPI1950185

¹ d: days; w: weeks; na: not available.

The evolutionary rate and the time to the most common recent ancestor (tMRCA) were estimated for all the gene segments using BEAST v1.10.4 [56]. Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampling analyses employing an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock, that allows for rate variation across lineages, and the SRD06 substitution model (HKY85 + Γ 4 with two partitions—1st + 2nd positions vs. 3rd position γ , base frequencies, and Γ -rate heterogeneity unlinked across all codon positions) were implemented [57]. Tree Annotator v1.10.4 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator/>, accessed on 11 August 2021) was used to summarize the Maximum Clade Credibility (MCC) trees, which were then visualized in FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, accessed on 11 August 2021).

2.5. Analysis of Selection Pressures

Site-specific selection pressures for the HA gene segment of the Moroccan H9N2 viruses were measured as the ratio of nonsynonymous (dN) to synonymous (dS) nucleotide substitutions per site. Specifically, the Mixed Effects Model of Evolution (MEME) and the fixed-effects likelihood (FEL) methods were used to infer sites subjected to episodic or pervasive positive selection [58,59]. Analyses were performed using the Datamonkey online version of the Hy-Phy package [60]. All analyses used the GTR model of nucleotide substitution and ML phylogenetic trees.

3. Results

3.1. Phylogenetic and Evolutionary Analyses

In the framework of the surveillance activity implemented in Morocco between 2016 and 2021, field samples collected from 81 poultry farms were submitted to the laboratory to be tested for the presence of AIV. Overall, 76 out of 81 (76/81) tested positive for AIV and specifically for the H9 subtype (Figure 1 shows the location of the sampled and the positive farms). In total, 28 representative positive samples were selected based on the year and area of collection for whole genome sequencing. Specifically, we obtained the complete genome of 22 viruses and the partial genome of 6 viruses (Table 1).

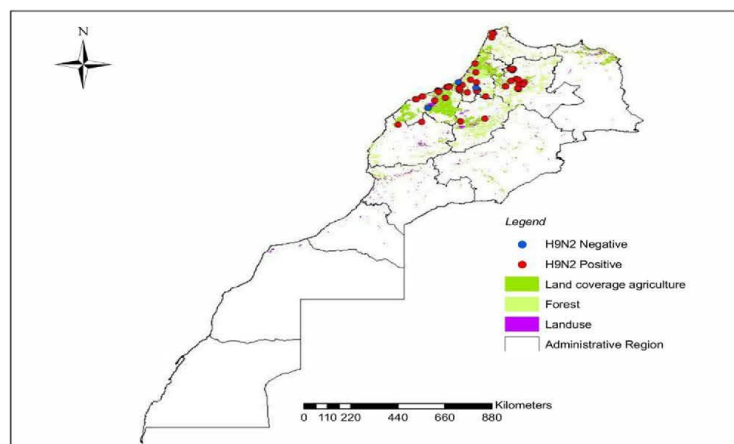


Figure 1. Location of the sampled and positive farms.

Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (HA) gene segment revealed that all the H9N2 viruses collected in the country since 2016 belong to the G1 lineage and cluster with H9N2 viruses identified in the Middle East (United Arab Emirates and Oman), North Africa (Algeria), and West Africa (Burkina Faso, Senegal, Togo, Ghana, Benin) between 2015 and 2020 (Figure 2). The phylogenetic trees of the other gene segments confirm the

same genetic clustering (see Supplementary Materials Figures S1–S7). The tree topologies indicate that the H9N2 viruses from Morocco had evolved into multiple genetic groups within the country. However, the lack of a consistency of the groups among the different phylogenies is suggestive of the occurrence of multiple inter-subtype reassortment events.

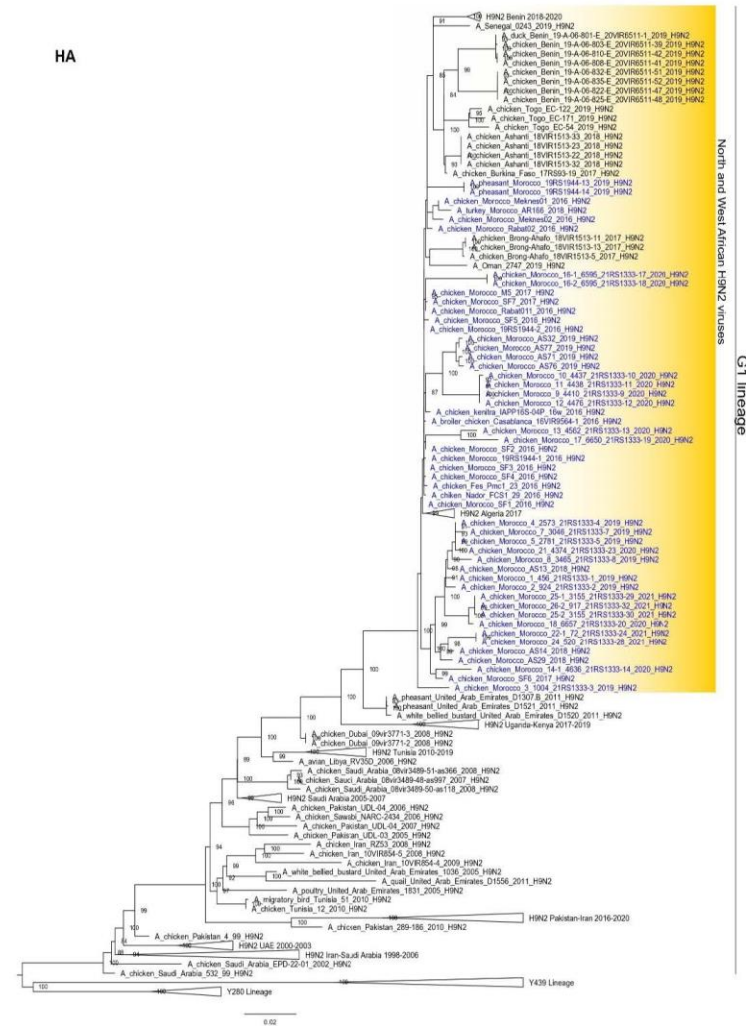


Figure 2. Maximum Likelihood phylogenetic tree of the HA gene (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this study are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes.

Virus evolution into multiple genetic clusters is evident also from the HA median-joining network analysis. Although all the 2016–2017 sequences (yellow in Figure 3) show a high genetic relationship (from 1 to 16 nucleotide differences) and cluster together on the centre of the network, the viruses collected in 2018–2019 (green in Figure 3) and 2020–2021 (blue in Figure 3) separate from the 2016–2017 progenitor viruses by long branches (from 15 to 54 nucleotide differences) that spread from the centre in multiple directions, forming

separate clusters. The high number of median vectors, representing the lost ancestral sequences, clearly indicate a relevant data gap. No particular grouping was observed according to the geographical origin, which suggests a wide virus dispersal within the country.

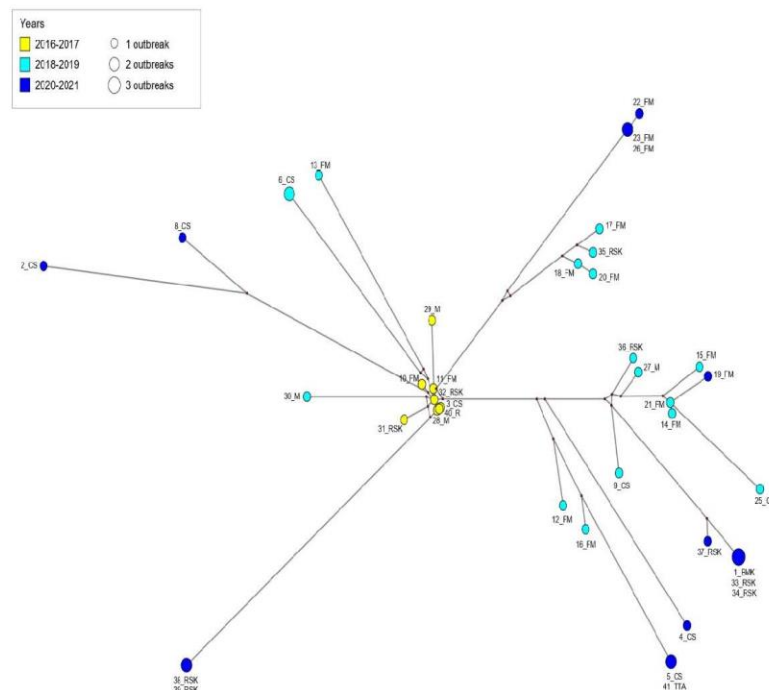


Figure 3. The HA median-joining network showing high genetic relationship between all 2016 and 2017 H9N2 Moroccan viruses while the viruses of 2018–2019 and 2020–2021 are separated from their 2016–2017 ancestors by long branches.

To investigate the role of Morocco in the geographic spread of the H9N2 viruses of the G1 lineage, we performed a Bayesian phylogeographic analysis. Our results showed a virus spread from the Middle East to Morocco, and subsequently from Morocco to Algeria and from Morocco to West Africa. All of these transitions were well supported by Bayes Factors higher than 20 ($BF > 20$, Figure 4). This finding suggests that Morocco might have played a central role in the spread of the H9N2 virus in the African continent, although this interpretation may have been biased by the higher number of sequences from Morocco compared to the ones from other African countries.

3.2. Molecular Analysis and Positively Selected Sites

The molecular analysis revealed that the H9N2 viruses from Morocco present the same cleavage site (RSSR/GLF) as the previously identified North African H9N2 viruses of the G1 lineage. In addition, most of the Moroccan viruses possess the amino acid Leucine at position 226 and Threonine at position 155 (H3 numbering) of the HA receptor binding site; these mutations imply preferential binding to human-like $\alpha 2$ -6-linked sialic acid (SA $\alpha 2$ -6) receptors [61,62]. Of note, site 226 has been identified as under positive selection by both MEME and FEL methods (p -value < 0.05) (Table 2). The H9N2 Moroccan viruses show three different amino acids in this position: Leucine (L), Glutamine (Q), and Arginine (R). These amino acid substitutions may affect not only the virus receptor binding properties but also

influence its antigenic specificity [63]. Although amino acids L and Q have frequently been identified in viruses belonging to the G1 lineage, R has rarely been observed in the H9N2 viruses (one virus from Algeria and one from Morocco). Previous studies demonstrated that this mutation is associated with change of the pandemic 2009 (H1N1) viral HA binding preference, from the human-type receptor, α 2,6-linked sialic acid, to the avian-type receptor, α 2,3-linked sialic acid [64,65].

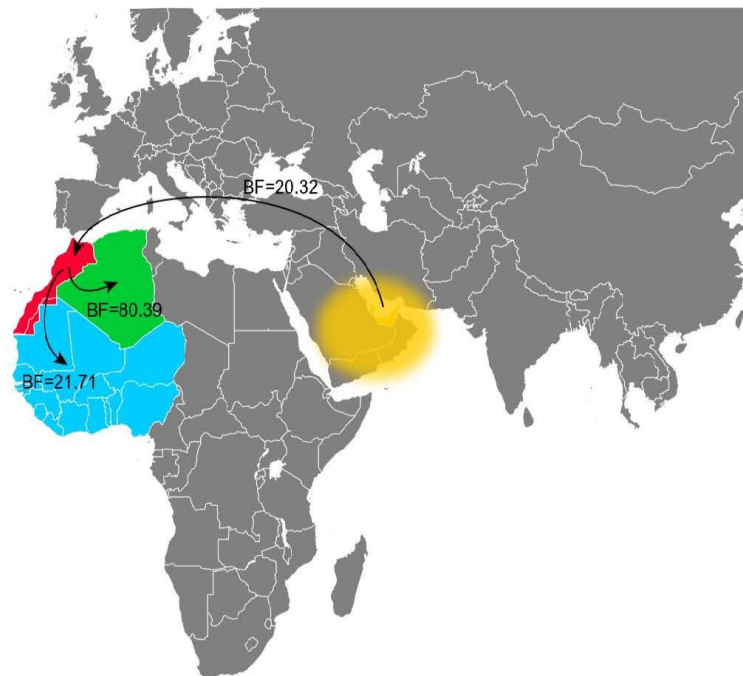


Figure 4. Spatiotemporal dynamics describing the geographic origins of Moroccan H9N2 viruses and the virus spread from Morocco to other African countries. Supported transitions are indicated by continuous lines (BF > 20).

In addition to 226, in the HA gene we identified three further sites (sites 190, 160, and 186) under positive selection: one (site 190) using both methods, while the other two were recognized only by FEL. Of note, all these sites fall within the receptor-binding domain and/or antigenic sites [63,66,67].

Table 2. Sites under positive selection (p -value < 0.05) in the Moroccan H9N2 viruses HA protein.

Method	Site (H9 Numbering)	Site (H3 Numbering)	p -Value	Aminoacids		References
MEME	180	190	0.03	A, T, V	RBS, antigenic site B	[67]
	216	226	0.03	L, Q, R	RBS, antigenic site D	[68]
	180	190	0.02	A, T, V	RBS, antigenic site B	[67]
FEL	216	226	0.02	L, Q, R	RBS, antigenic site D	[68]
	150	160	0.03	G, N, V	antigenic site B	[64]
	176	186	0.04	P, A	RBS	[69]

* H9 numbering.

4. Discussion

In Morocco, the first outbreak of LPAI H9N2 was described in broiler flocks in January 2016 [36]. The virus was later isolated from layers and breeders in different regions of the country. As part of a surveillance program, the national veterinary services implemented mass vaccination against H9N2 using homologous inactivated vaccines in all sectors of poultry production, first for breeders and layers, and a few days later for turkey and broiler flocks. The outbreak was controlled in 3–4 months, after which the vaccination was authorized for all types of poultry production using autogenous and heterologous inactivated vaccines. Over the past 5 years, 13 H9N2 vaccines originating from different H9 strains, i.e., from Morocco, UAE, Korea, Turkey, Italy, Egypt, were available and commercialized in Morocco (see Supplementary Materials Table S2). Despite this vaccine availability, a recent study on the effectiveness of the four most used vaccines in Moroccan poultry farms has confirmed the need to continuously adapt the vaccine strains to the virus circulating in the field [69]. In the neighboring North African countries, vaccination against AIV H9N2 is also implemented in poultry production sectors using different vaccine types, such as inactivated homologous vaccines and vectored vaccines in Algeria. In Tunisia, vaccination using inactivated homologous vaccines for chicken and turkey breeders and layers has been performed since 2015, but to the present day, no vaccination has been used in broiler flocks. In Egypt, vaccination is currently implemented using local and non-local strains, with variable efficacy. In contrast, vaccination in the field has never been reported in Libya [70]. Despite such vaccination approaches, LPAI H9N2 has become enzootic in North Africa and continues to cause economic losses even in the vaccinated flocks. Thus, circulating H9N2 viruses in North Africa need to be further investigated, and at the same time, revision of employed vaccines and of regional surveillance activities should be implemented.

Our results indicate that all Moroccan H9N2 viruses from 2016 to 2021 belong to the G1 like-lineage and are related to the viruses from the Middle East and North and West Africa, as described in previous reports [43,71]. Results obtained from the spatial analysis demonstrated that AIV H9N2 had been introduced into Morocco from the Middle East, probably through the import of falcons for hunting, and has been circulating in the country for the last six years. The study also showed that the H9N2 G1 like-lineage is the predominant H9 genotype in Moroccan poultry farms. From Morocco, the virus spread to Algeria and West Africa, suggesting the key role of Morocco in the H9N2 virus dispersal on the continent, as reported in previous studies [32,37–40]. Such virus-spread might have occurred through the movement of poultry professionals [38] and/or the trade of poultry products, since the export market of day-old-chicks and hatching eggs from Morocco to West Africa is well documented [72]. However, the gap in epidemiological data, as well as the limited number of sequences available from the other African countries, might have affected our results and biased our interpretation. Evolutionary and network analyses of the H9N2 viruses from Morocco indicate a high similarity among all the 2016–2017 HA sequences, which is in accordance with previous studies [43,71]. Long branches separate the 2018–2019 and 2020–2021 viruses from their ancestors (2016–2017). This might be explained by the implementation of vaccination from 2016 onwards. The high vaccination coverage and the use of multiple types of vaccines may have driven the virus evolution in multiple directions, with the consequent generation of multiple separate genetic groups in the country. This was further confirmed by the identification of several sites in the HA protein under positive selection located in the RBS or antigenic sites, which may facilitate vaccine escapes, considering the fact that most (71.05%, 54/76) of the H9N2 positive flocks were vaccinated.

As previously observed in the H9N2 African viruses [32,38,40,73], most of Moroccan H9N2 HA protein harbored mammalian-adaptive mutations, including the hemagglutinin human-like marker 216L (226 in H3 numbering), which promotes preferential binding to the α 2–6-linked sialic acid receptors of human epithelial cells [60] and was described as an immune escape mechanism [62]. The evidence for positive selection of the 226L marker

during serial passage of the virus in chickens was provided by Jegede et al., 2018 [74], suggesting that the H9N2 viruses acquired the mammalian adaptation while circulating in poultry. However, specific receptor-binding studies will be instrumental to assess the zoonotic potential of the H9N2 Moroccan viruses, as other mutations in the HA and internal proteins may be necessary for a successful avian to human adaptation. The present work is the first comprehensive study that provides an overview of the historical origins and evolutionary features of Moroccan H9N2 AIV, based on the Bayesian phylodynamic analysis and whole genome characterization. Over the past five years, the H9N2 AIV in Morocco has shown a rapid genetic diversification, likely directed by selective pressure exerted by vaccine-induced antibodies. The observed mutations and reassortments might extend the range of host species and could lead to the emergence of new strains [75,76]. In addition, our study demonstrates that viruses with a marker well-described in literature associated with zoonotic potential (226L, H3 numbering) may represent a serious risk for public health in Morocco. Hence, the circulation of H9N2 AIV should be investigated in other species, such as wild birds and mammals, including humans, to better understand virus ecology in Morocco. All the more so as a recent molecular study on the presence of the AIV in wild birds staying in the corridor of wetlands during their winter crossing in Morocco, showed a high positivity-rate of the influenza virus in different birds species [77]. Continuous systematic surveillance of molecular evolution of H9N2 AIV is strongly needed to anticipate the emergence of novel H9N2 strains escaping vaccine protection or with an increased human pandemic potential.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14030509/s1>, Figure S1: Maximum Likelihood phylogenetic tree of the NA gene segment (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this report are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes; Figure S2: Maximum Likelihood phylogenetic tree of the PB2 gene segment (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this report are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes; Figure S3: Maximum Likelihood phylogenetic tree of the PB1 gene segment (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this report are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes; Figure S4: Maximum Likelihood phylogenetic tree of the PA gene segment (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this report are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes; Figure S5: Maximum Likelihood phylogenetic tree of the NP gene segment (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this report are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes; Figure S6: Maximum Likelihood phylogenetic tree of the M gene segment (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this report are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes; Figure S7: Maximum Likelihood phylogenetic tree of the NS gene segment (IQ-TREE v.1.6.8). The H9N2 viruses from Morocco analyzed in this report are marked in blue. Ultra-fast bootstrap supports equal to or higher than 80% are indicated next to the nodes; Figure S8: the HA median-joining network for Moroccan regions; Table S1: Moroccan H9N2 viruses from 2016 to 2021 included in the study; Table S2: List of H9N2 vaccines available in Morocco.

Author Contributions: Conceptualization, F.E.M., A.F. and A.B.; Data curation, F.E.M. and B.Z.; Formal analysis, F.E.M., B.Z. and H.Z.; Funding acquisition, A.F. and I.M.; Investigation, M.M., H.Z., A.E.K. and H.R.I.; Methodology, F.E.M., A.F., H.Z. and E.P.; Project administration, H.R.I. and A.B.; Resources, F.E.M., M.M. and A.F.; Software, B.Z. and E.G.; Supervision, A.F. and A.B.; Validation, F.E.M. and A.F.; Visualization, F.E.M.; Writing—original draft, F.E.M., A.F. and B.Z.; Writing—review and editing, M.M., A.F., B.Z. and I.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The primary data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgments: We acknowledge the International Atomic Energy Agency (IAEA) for providing the funding for Fatiha El Mellouli's training on Sequencing and Phylogeny of Influenza viruses at the IZSVE, Padova, Italy. We are grateful to Mounir Khayli from the Epidemiology and Health Surveillance Unit (SEVS/ONSSA), Rabat and Mohamed Rida Salam from the Immunology and Biodiversity Laboratory, Faculty of Science Ain chock, Hassan II University of Casablanca for their technical support and we also thank Francesca Ellero from the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova, Italy for editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Homme, P.; Easterday, B. Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A/Turkey/Wisconsin/1966 virus. *Avian Dis.* **1970**, *66*, 74. [\[CrossRef\]](#)
2. Shortridge, K.F. Pandemic influenza: A zoonosis? *Semin. Respir. Infect.* **1992**, *7*, 11–25. [\[PubMed\]](#)
3. Sun, Y.; Liu, J. H9N2 influenza virus in China: A cause of concern. *Protein Cell.* **2015**, *6*, 18–25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Butt, A.M.; Siddique, S.; Idrees, M.; Tong, Y. Avian influenza A (H9N2): Computational molecular analysis and phylogenetic characterization of viral surface proteins isolated between 1997 and 2009 from the human population. *Virol. J.* **2010**, *7*, 319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Lee, C.-W.; Song, C.-S.; Lee, Y.-J.; Mo, I.-P.; Garcia, M.; Suarez, D.L.; Kim, S.-J. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96. *Avian Dis.* **2000**, *44*, 527–535. [\[CrossRef\]](#)
6. Alexander, D.J. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* **2007**, *25*, 5637–5644. [\[CrossRef\]](#)
7. Nagy, A.; Mettenleiter, T.; Abdelwhab, E. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. *J. Infect. Chemother.* **2017**, *145*, 3320–3333. [\[CrossRef\]](#)
8. Yang, J.; Müller, N.F.; Bouckaert, R.; Xu, B.; Drummond, A.J. Bayesian phylodynamics of avian influenza A virus H9N2 in Asia with time-dependent predictors of migration. *PLoS Comput. Biol.* **2019**, *15*, e1007189. [\[CrossRef\]](#)
9. Peacock, T.T.P.; James, J.; Sealy, J.E.; Iqbal, M. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses* **2019**, *11*, 620. [\[CrossRef\]](#)
10. Peiris, M.; Yuen, K.; Leung, C.; Chan, K.; Ip, P.; Lai, R.; Orr, W.; Shortridge, K. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* **1999**, *354*, 916–917. [\[CrossRef\]](#)
11. Samy, A.; Naguib, M.M. Avian respiratory coinfection and impact on avian influenza pathogenicity in domestic poultry: Field and experimental findings. *Vet. Sci.* **2018**, *5*, 23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Naeem, K.; Ullah, A.; Manvell, R.; Alexander, D. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *Vet. Rec.* **1999**, *145*, 560. [\[CrossRef\]](#)
13. Umar, S.; Guerin, J.L.; Ducatez, M.F. Low pathogenic avian influenza and coinfecting pathogens: A review of experimental infections in avian models. *Avian Dis.* **2017**, *61*, 3–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Zhang, P.; Tang, Y.; Liu, X.; Peng, D.; Liu, W.; Liu, H.; Lu, S.; Liu, X. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5 year period (1998–2002). *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 3102–3112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Butt, K.; Smith, G.J.; Chen, H.; Zhang, L.; Leung, Y.C.; Xu, K.; Lim, W.; Webster, R.G.; Yuen, K.; Peiris, J.M. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 5760–5767. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Matrosovich, M.N.; Krauss, S.; Webster, R.G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology* **2001**, *281*, 156–162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Peiris, J.; Guan, Y.; Markwell, D.; Ghose, P.; Webster, R.; Shortridge, K. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: Potential for genetic reassortment? *J. Virol.* **2001**, *75*, 9679–9686. [\[CrossRef\]](#)
18. Gu, M.; Xu, L.; Wang, X.; Liu, X. Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China. *Vet. Res.* **2017**, *48*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
19. Gu, M.; Chen, H.; Li, Q.; Huang, J.; Zhao, M.; Gu, X.; Jiang, K.; Wang, X.; Peng, D.; Liu, X. Enzootic genotype S of H9N2 avian influenza viruses donates internal genes to emerging zoonotic influenza viruses in China. *Vet. Microbiol.* **2014**, *174*, 309–315. [\[CrossRef\]](#)
20. Guan, Y.; Shortridge, K.; Krauss, S.; Chin, P.; Dyrting, K.; Ellis, T.; Webster, R.; Peiris, M. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J. Virol.* **2000**, *74*, 9372–9380. [\[CrossRef\]](#)
21. Shen, Y.-Y.; Ke, C.-W.; Li, Q.; Yuan, R.-Y.; Xiang, D.; Jia, W.-X.; Yu, Y.-D.; Liu, L.; Huang, C.; Qi, W.-B. Novel reassortant avian influenza A (H5N6) viruses in humans, Guangdong, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Zhang, Z.; Li, R.; Jiang, L.; Xiong, C.; Chen, Y.; Zhao, G.; Jiang, Q. The complexity of human infected AIV H5N6 isolated from China. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 600. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. RahimiRad, S.; Alizadeh, A.; Alizadeh, E.; Hosseini, S.M. The avian influenza H9N2 at avian-human interface: A possible risk for the future pandemics. *J. Res. Med. Sci.* **2016**, *21*, 51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Cui, L.; Liu, D.; Shi, W.; Pan, J.; Qi, X.; Li, X.; Guo, X.; Zhou, M.; Li, W.; Li, J. Dynamic reassortments and genetic heterogeneity of the human-infecting influenza A (H7N9) virus. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3142. [\[CrossRef\]](#)
25. Di Liu, W.S.; Gao, G.F. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses. *Lancet* **2014**, *384*, 869. [\[CrossRef\]](#)
26. Shi, W.; Li, W.; Li, X.; Haywood, J.; Ma, J.; Gao, G.F.; Liu, D. Phylogenetics of varied subtypes of avian influenza viruses in China: Potential threat to humans. *Protein Cell.* **2014**, *5*, 253–257. [\[CrossRef\]](#)
27. Wan, H.; Sorrell, E.M.; Song, H.; Hossain, M.J.; Ramirez-Nieto, G.; Monne, I.; Stevens, J.; Cattoli, G.; Capua, I.; Chen, L.-M. Replication and transmission of H9N2 influenza viruses in ferrets: Evaluation of pandemic potential. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2923. [\[CrossRef\]](#)
28. Choi, Y.; Ozaki, H.; Webby, R.; Webster, R.; Peiris, J.; Poon, L.; Butt, C.; Leung, Y.; Guan, Y. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *J. Virol.* **2004**, *78*, 8609–8614. [\[CrossRef\]](#)
29. Yong-Feng, Z.; Fei-Fei, D.; Jia-Yu, Y.; Feng-Xia, Z.; Chang-Qing, J.; Jian-Li, W.; Shou-Yu, G.; Kai, C.; Chuan-Yi, L.; Xue-Hua, W. Intraspecies and interspecies transmission of mink H9N2 influenza virus. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7429. [\[CrossRef\]](#)
30. Zhang, K.; Zhang, Z.; Yu, Z.; Li, L.; Cheng, K.; Wang, T.; Huang, G.; Yang, S.; Zhao, Y.; Feng, N. Domestic cats and dogs are susceptible to H9N2 avian influenza virus. *Virus Res.* **2013**, *175*, 52–57. [\[CrossRef\]](#)
31. Li, C.; Wang, S.; Bing, G.; Carter, R.A.; Wang, Z.; Wang, J.; Wang, C.; Wang, L.; Wu, G.; Webster, R.G. Genetic evolution of influenza H9N2 viruses isolated from various hosts in China from 1994 to 2013. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Awuni, J.A.; Bianco, A.; Dogbey, O.J.; Fusaro, A.; Yingar, D.T.; Salviato, A.; Ababio, P.T.; Milani, A.; Bonfante, F.; Monne, I. Avian influenza H9N2 subtype in Ghana: Virus characterization and evidence of co-infection. *Avian Pathol.* **2019**, *48*, 470–476. [\[CrossRef\]](#)
33. Kammon, A.; Heidari, A.; Dayhum, A.; Eldaghayes, I.; Sharif, M.; Monne, I.; Cattoli, G.; Asheg, A.; Farhat, M.; Kraim, E. Characterization of avian influenza and Newcastle disease viruses from poultry in Libya. *Avian Dis.* **2015**, *59*, 422–430. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. El-Zoghby, E.F.; Arafa, A.-S.; Hassan, M.K.; Aly, M.M.; Selim, A.; Kilany, W.H.; Selim, U.; Nasef, S.; Aggor, M.G.; Abdelwhab, E. Isolation of H9N2 avian influenza virus from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) in Egypt. *Arch. Virol.* **2012**, *157*, 1167–1172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Tombari, W.; Nsiri, J.; Larbi, I.; Guerin, J.L.; Ghram, A. Genetic evolution of low pathogenicity H9N2 Avian influenza viruses in Tunisia: Acquisition of new mutations. *Virol. J.* **2011**, *8*, 467. [\[CrossRef\]](#)
36. El Houadfi, M.; Fellahi, S.; Nassik, S.; Guérin, J.-L.; Ducatez, M.F. First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco. *Virol. J.* **2016**, *13*, 140. [\[CrossRef\]](#)
37. Jeevan, T.; Darnell, D.; Gradi, E.A.; Benali, Y.; Kara, R.; Guetarni, D.; Rubrum, A.; Seiler, P.J.; Crumpton, J.C.; Webby, R.J. A (H9N2) influenza viruses associated with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. *Influenza Other Respir. Viruses* **2019**, *13*, 622–626. [\[CrossRef\]](#)
38. Zecchin, B.; Minoungou, G.; Fusaro, A.; Moctar, S.; Ouedraogo-Kaboré, A.; Schivo, A.; Salviato, A.; Marciano, S.; Monne, I. Influenza A (H9N2) Virus, Burkina Faso. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2118. [\[CrossRef\]](#)
39. Kariithi, H.M.; Welch, C.N.; Ferreira, H.L.; Pusch, E.A.; Ateya, L.O.; Binopal, Y.S.; Apopo, A.A.; Dulu, T.D.; Afonso, C.L.; Suarez, D.L. Genetic characterization and pathogenesis of the first H9N2 low pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens in Kenyan live bird markets. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *78*, 104074. [\[CrossRef\]](#)
40. Fusade-Boyer, M.; Djegui, F.; Batawui, K.; Byuragaba, D.K.; Jones, J.C.; Wabwire-Mangeni, F.; Erima, B.; Atim, G.; Ukuli, Q.A.; Tugume, T. Antigenic and molecular characterization of low pathogenic avian influenza A (H9N2) viruses in sub-Saharan Africa from 2017 through 2019. *Emerg. Microbes Infect.* **2021**, *10*, 753–761. [\[CrossRef\]](#)
41. Boumart, Z.; Bamouh, Z.; Jazouli, M.; Zecchin, B.; Fusaro, A.; Salviato, A.; Monne, I.; Tadlaoui, K.O.; Harrak, M.E. Pathogenicity and full genome sequencing of the avian influenza H9N2 Moroccan isolate 2016. *Avian Dis.* **2019**, *63*, 24–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Belkasmi, S.F.; Fellahi, S.; Touzani, C.D.; Faraji, F.Z.; Maaroufi, I.; Delverdier, M.; Guérin, J.-L.; Fihri, O.F.; El Houadfi, M.; Ducatez, M.F. Co-infections of chickens with avian influenza virus H9N2 and Moroccan Italy 02 infectious bronchitis virus: Effect on pathogenesis and protection conferred by different vaccination programmes. *Avian Pathol.* **2020**, *49*, 21–28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. El Khantour, A.; Soulaymani, A.; Salek, M.; Maltouf, A.F.; El Mellouli, F.; Ducatez, M.F.; Fellahi, S. Molecular characterization of the hemagglutinin gene of H9N2 avian influenza viruses isolated from broiler flocks in Morocco from 2016 to 2018. *Vet. Arh.* **2020**, *90*, 477–484. [\[CrossRef\]](#)
44. 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. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 3256–3260. [\[CrossRef\]](#)
45. Monne, I.; Ormelli, S.; Salviato, A.; Battisti, C.D.; Bettini, F.; Salomoni, A.; Drago, A.; Zecchin, B.; Capua, I.; Cattoli, G. Development and Validation of a One-Step Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Subtype H5, H7, and H9 Avian Influenza Viruses. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1769–1773. [\[CrossRef\]](#)
46. Zhou, B.; Donnelly, M.E.; Scholes, D.T.; George, K.S.; Hatta, M.; Kawaoka, Y.; Wentworth, D.E. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J. Virol.* **2009**, *83*, 10309–10313. [\[CrossRef\]](#)
47. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [\[CrossRef\]](#)

48. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 589–595. [\[CrossRef\]](#)
49. DePristo, M.A.; Banks, E.; Poplin, R.; Garimella, K.V.; Maguire, J.R.; Hartl, C.; Philippakis, A.A.; Del Angel, G.; Rivas, M.A.; Hanna, M.; et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 491–498. [\[CrossRef\]](#)
50. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernytsky, A.; Garimella, K.; Altshuler, D.; Gabriel, S.; Daly, M. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1297–1303. [\[CrossRef\]](#)
51. Wilm, A.; Aw, P.P.K.; Bertrand, D.; Yeo, G.H.T.; Ong, S.H.; Wong, C.H.; Khor, C.C.; Petric, R.; Hibberd, M.L.; Nagarajan, N. LoFreq: A sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 11189–11201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Nguyen, L.-T.; Schmidt, H.A.; Von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2014**, *32*, 268–274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Hoang, D.T.; Chernomor, O.; Von Haeseler, A.; Minh, B.Q.; Vinh, L.S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *35*, 518–522. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Bandelt, H.J.; Forster, P.; Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 37–48. [\[CrossRef\]](#)
56. Suchard, M.A.; Lemey, P.; Baele, G.; Ayres, D.L.; Drummond, A.J.; Rambaut, A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* **2018**, *4*, vey016. [\[CrossRef\]](#)
57. Shapiro, B.; Rambaut, A.; Drummond, A.J. Choosing Appropriate Substitution Models for the Phylogenetic Analysis of Protein-Coding Sequences. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *23*, 7–9. [\[CrossRef\]](#)
58. Kosakovsky Pond, S.L.; Frost, S.D.W. Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 1208–1222. [\[CrossRef\]](#)
59. Murrell, B.; Wertheim, J.O.; Moola, S.; Weighill, T.; Scheffler, K.; Kosakovsky Pond, S.L. Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002764. [\[CrossRef\]](#)
60. Delpont, W.; Poon, A.F.Y.; Frost, S.D.W.; Kosakovsky Pond, S.L. Datamonkey 2010: A suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2455–2457. [\[CrossRef\]](#)
61. Wan, H.; Perez, D.R. Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H9N2 Influenza Viruses Determines Cell Tropism and Replication in Human Airway Epithelial Cells. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5181–5191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Peacock, T.P.; Benton, D.J.; Sadeyen, J.-R.; Chang, P.; Sealy, J.E.; Bryant, J.E.; Martin, S.R.; Shelton, H.; McCauley, J.W.; Barclay, W.S.; et al. Variability in H9N2 haemagglutinin receptor-binding preference and the pH of fusion. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Peacock, T.P.; Harvey, W.T.; Sadeyen, J.-R.; Reeve, R.; Iqbal, M. The molecular basis of antigenic variation among A(H9N2) avian influenza viruses. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 176. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Suptawiwat, O.; Jeamtua, W.; Boonarkart, C.; Kongchanagul, A.; Puthawathana, P.; Auewarakul, P. Effects of the Q223R mutation in the hemagglutinin (HA) of egg-adapted pandemic 2009 (H1N1) influenza A virus on virus growth and binding of HA to human- and avian-type cell receptors. *Acta Virol.* **2013**, *57*, 333–338. Available online: <http://europepmc.org/abstract/MED/24020758> (accessed on 4 January 2022).
65. He, L.; Jiang, K.; Wu, Q.; Duan, Z.; Xu, H.; Liu, J.; Cui, Z.; Gu, M.; Wang, X.; Liu, X. Two amino acid substitutions in the haemagglutinin of the 2009 pandemic H1N1 virus decrease direct-contact transmission in guinea pigs. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 2612–2617. [\[CrossRef\]](#)
66. Peacock, T.; Reddy, K.; James, J.; Adamiak, B.; Barclay, W.; Shelton, H.; Iqbal, M. Antigenic mapping of an H9N2 avian influenza virus reveals two discrete antigenic sites and a novel mechanism of immune escape. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18745. [\[CrossRef\]](#)
67. Kaverin, N.V.; Rudneva, I.A.; Ilyushina, N.A.; Lipatov, A.S.; Krauss, S.; Webster, R.G. Structural Differences among Hemagglutinins of Influenza A Virus Subtypes Are Reflected in Their Antigenic Architecture: Analysis of H9 Escape Mutants. *J. Virol.* **2004**, *78*, 240–249. [\[CrossRef\]](#)
68. Wan, Z.; Ye, J.; Xu, L.; Shao, H.; Jin, W.; Qian, K.; Wan, H.; Qin, A.; Lyles, D.S. Antigenic Mapping of the Hemagglutinin of an H9N2 Avian Influenza Virus Reveals Novel Critical Amino Acid Positions in Antigenic Sites. *J. Virol.* **2014**, *88*, 3898–3901. [\[CrossRef\]](#)
69. El Khantour, A.; El Houadfi, M.; Nassik, S.; Tligui, N.S.; El Mellouli, F.; Sikht, F.-Z.; Ducatez, M.F.; Soulaymani, A.; Fellahi, S. Protective efficacy evaluation of four inactivated commercial vaccines against low pathogenic avian influenza H9N2 virus under experimental conditions in broiler chickens. *Avian Dis.* **2021**, *65*, 351–357. [\[CrossRef\]](#)
70. Kaboudi, K. Low pathogenic avian influenza virus subtype H9N2 in poultry in north Africa: Current status. *Vet. Sci. Res. Rev.* **2019**, *5*, 73–79. [\[CrossRef\]](#)
71. Amal, E.-B.; Saâdi, N.; Asma, F.; Moncef, B.; Ouafae, F.F. Characterization and Phylogenetic Analysis of the Hemagglutinin Gene in H9 Influenza Viruses from Chickens in Morocco from 2017 to 2019. *Avian Dis.* **2020**, *64*, 310–314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

72. Hassan, N.; Kaoutar, M.; Sara, G.; Mustapha, M. Focus on Poultry in Morocco. *Adv. Environ. Biol.* **2017**, *11*, 209678240. Available online: <https://link.gale.com/apps/doc/A518588590/AONE?u=anon~{}de5f3275&sid=googleScholar&xid=6178e5a7> (accessed on 6 January 2022).
73. Arbi, M.; Souiai, O.; Rego, N.; Larbi, I.; Naya, H.; Ghram, A.; Houimel, M. Historical origins and zoonotic potential of avian influenza virus H9N2 in Tunisia revealed by Bayesian analysis and molecular characterization. *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 1527–1540. [CrossRef] [PubMed]
74. Jegede, A.; Fu, Q.; Berhane, Y.; Lin, M.; Kumar, A.; Guan, J. H9N2 avian influenza virus retained low pathogenicity after serial passage in chickens. *Can. J. Vet. Res.* **2018**, *82*, 131–138. [PubMed]
75. Jin, H.; Wang, W.; Yang, X.; Su, H.; Fan, J.; Zhu, R.; Wang, S.; Shi, H.; Liu, X. Evolution of H9N2 avian influenza virus in embryonated chicken eggs with or without homologous vaccine antibodies. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 71. [CrossRef]
76. Park, K.J.; Kwon, H.-I.; Song, M.-S.; Pascua, P.N.Q.; Baek, Y.H.; Lee, J.H.; Jang, H.-L.; Lim, J.-Y.; Mo, I.-P.; Moon, H.-J. Rapid evolution of low-pathogenic H9N2 avian influenza viruses following poultry vaccination programmes. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 36–50. [CrossRef]
77. El Mellouli, F.; Abouchoaib, N.; Zekhnini, H.; Khayli, M.; Fusaro, A.; Idrissi, H.R.; Benhoussa, A. Molecular Detection of Avian Influenza Virus in Wild Birds in Morocco, 2016–2019. *Avian Dis.* **2021**, *66*, 1–10. [CrossRef]

Résumé

La présente étude visait à détecter la présence du virus de l'Influenza Aviaire (VIA) chez les oiseaux sauvages au Maroc afin de tracer les sources possibles des virus affectant les volailles et à investiguer les origines, le potentiel zoonotique, ainsi que l'impact de la vaccination sur l'évolution moléculaire des virus H9N2 marocains. Entre 2016 et 2019, 967 échantillons provenant de 480 oiseaux représentant 56 espèces d'oiseaux sauvages, 20 familles et 8 ordres, ont été prélevés dans diverses zones humides et sites ornithologiques pertinents au Maroc. 374 écouvillons cloacaux, 321 écouvillons trachéaux, 54 échantillons de fèces frais et 218 mélanges d'organes ont été examinés pour la présence du VIA par rRT-PCR en temps réel pour la détection du gène M et des gènes H1 à H16. Le gène M a été détecté dans 1.86% des échantillons chez 10 espèces dans 2 zones humides et 1 site ornithologique (Complexe Sidi Moussa-Oualidia, Lagune de Smir et Côte d'El Jadida) et la positivité la plus élevée a été révélée dans des échantillons fécaux frais (11,1%), indiquant la pertinence de cette matrice pour la surveillance des oiseaux sauvages. Nos résultats soulignent que les échassiers, les goélands et les hérons garde-boeufs sont les plus touchés. Un suivi régulier des oiseaux sauvages au Maroc, notamment dans les zones et les espèces identifiées dans cette étude, doit être mis en place pour anticiper et prévenir la propagation du VIA. Vingt-huit (28) virus H9N2 collectés de 2016 à 2021 dans des élevages avicoles marocains ont été isolés et leurs génomes entiers séquencés. Les analyses phylogénétiques et évolutives ont montré que les virus marocains H9N2 appartiennent à la lignée G1 et sont étroitement apparentés aux virus isolés en Afrique et au Moyen-Orient. Une grande similitude entre toutes les séquences d'hémagglutinine (HA) de 2016-2017 a été observée, tandis que les virus identifiés en 2018-2019 et 2020-2021 étaient séparés de leurs ancêtres de 2016-2017 par de longues branches. Des mutations de la protéine HA associées à une dérive antigénique et à un potentiel zoonotique accru ont également été trouvées. Les analyses phylogéographiques bayésiennes ont révélé que le Moyen-Orient était la région d'origine du virus marocain H9N2, avant de se propager aux autres pays africains. Notre étude est la première analyse complète de l'histoire évolutive des virus H9N2 au Maroc, soulignant leur potentiel zoonotique et l'importance de mettre en place des systèmes de surveillance efficaces.

Mots-clefs : Influenza aviaire, Oiseaux sauvages, Maroc, RT-PCR en temps réel, H9N2, Phylogénie, séquençage, évolution moléculaire.

Abstract

The present study aimed to monitor the presence of Avian Influenza Virus (AIV) in wild birds in Morocco in order to trace the possible sources of the viruses affecting poultry and to investigate the origins, zoonotic potential, as well as the impact of vaccination on the molecular evolution of Moroccan H9N2 viruses. Between 2016 and 2019, 967 samples from 480 birds representing 56 wild bird species, 20 families and 8 orders, were collected from various wetlands and relevant ornithological sites in Morocco. 374 cloacal swabs, 321 tracheal swabs, 54 fresh faecal samples and 218 organ pools were examined for the presence of AIV by real-time rRT-PCR for the detection of the M gene and H1-H16 genes. The M gene was detected in 1.86% of the samples in 10 species in 2 wetlands and 1 ornithological site (Sidi Moussa-Oualidia Complex, Smir Lagoon and El Jadida Coast) and the highest positivity was revealed in fresh faecal samples (11.1%), indicating the suitability of this matrix for monitoring wild birds. Our results highlight that waders, gulls and cattle egrets are the most affected. Regular monitoring of wild birds in Morocco, particularly in the areas and species identified in this study, should be implemented to anticipate and prevent the spread of VIA. Twenty-eight (28) H9N2 viruses collected from 2016 to 2021 in Moroccan poultry flocks were isolated and their whole genomes sequenced. Phylogenetic and evolutionary analyses showed that Moroccan H9N2 viruses belong to the G1-like lineage and are closely related to viruses isolated in Africa and the Middle East. A high similarity among all the 2016–2017 hemagglutinin (HA) sequences was observed, while the viruses identified in 2018–2019 and 2020–2021 were separated from their 2016–2017 ancestors by long branches. Mutations in the HA protein associated with antigenic drift and increased zoonotic potential were also found. The Bayesian phylogeographic analyses revealed the Middle East as being the region where the Moroccan H9N2 virus may have originated, before spreading to the other African countries. Our study is the first comprehensive analysis of the evolutionary history of the H9N2 viruses in Morocco, highlighting their zoonotic potential and pointing out the importance of implementing effective monitoring systems.

Keywords: Avian influenza, wild birds, Morocco, Real time RT-PCR, H9N2, phylogeny, sequencing, molecular evolution.