



**HAL**  
open science

## Virulence et faible évolution génétique de virus de la maladie de Newcastle vélogènes isolés en Ouganda

Denis K Byarugaba, Kizito K. Mugimba, John B. Omony, Martin Okitwi, Agnes Wanyana, Maxwell O. Otim, Halid Kirunda, Jessica L. Nakavuma, Angélique Teillaud, Mathilde Paul, et al.

► **To cite this version:**

Denis K Byarugaba, Kizito K. Mugimba, John B. Omony, Martin Okitwi, Agnes Wanyana, et al..  
Virulence et faible évolution génétique de virus de la maladie de Newcastle vélogènes isolés en Ouganda.  
11èmes Journées de la Recherches Avicole, Mar 2015, Tours, France. hal-02739493

**HAL Id: hal-02739493**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02739493v1>**

Submitted on 2 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# VIRULENCE ET FAIBLE EVOLUTION GENETIQUE DE VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE VELOGENES ISOLEES EN OUGANDA

Byarugaba Denis K.<sup>1</sup>, Mugimba Kizito K.<sup>1</sup>, Omony John B.<sup>1</sup>, Okitwi Martin<sup>1</sup>, Wanyana Agnes<sup>1</sup>, Otim Maxwell O.<sup>2</sup>, Kirunda Halid<sup>3</sup>, Nakavuma Jessica L.<sup>1</sup>, Teillaud Angélique<sup>4,5</sup>, Paul Mathilde C.<sup>5,4</sup>, Ducatez Mariette F.<sup>4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Makerere University, P.O. Box 7062, Kampala, Uganda

<sup>2</sup> Uganda National Council of Science and Technology, P.O. Box 6884 Kampala, Uganda

<sup>3</sup> National Livestock Resources Research institute, P.O. Box 96, Tororo, Uganda

<sup>4</sup> INRA UMR 1225 IHAP, F-31076, Toulouse, France,

<sup>5</sup> Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1225, IHAP, F-31076, Toulouse, France

\* Auteur correspondant : [m.ducatez@envt.fr](mailto:m.ducatez@envt.fr)

## RÉSUMÉ

La maladie de Newcastle est toujours une maladie sévère de la volaille, en particulier dans les systèmes de production de secteur 4 (basse-cour), et ce malgré la vaccination des volailles commerciales. La volaille apparemment saine provenant de marchés d'oiseaux vivants a été soupçonnée d'être une source majeure de la propagation de la maladie dans les élevages villageois.

Cette étude avait pour but de (i) vérifier la présence de souches virulentes dans les marchés en Ouganda et (ii) comprendre leur lien moléculaire avec les souches responsables d'épizooties dans la région et dans le monde.

Entre janvier et juin 2011, 1357 échantillons ont été collectés et 114 souches du virus de la maladie de Newcastle ont pu être isolées (8,7 % de prévalence par isolement) sur de la volaille apparemment saine provenant de marchés d'oiseaux vivants de tout le pays. Les isolats ont été pathotypés en utilisant trois méthodes : durée moyenne avant la mort sur œufs embryonnés (MDT), index de pathogénicité intracérébrale (ICPI) sur poussins de 1 jour, et séquençage du motif du site de clivage de la protéine de fusion. Les gènes de la fusion (F) et de l'hémagglutinine-neuraminidase (HN) d'une partie des isolats ont également été séquencés.

Les isolats, tous vélogènes, ont été classés en génotypes et sous-génotypes sur la base du système de génotypage récemment décrit par Diel et al (2012). Les virus ougandais appartiennent à un nouveau sous-génotype : Vd, au sein du génotype V. Ce sous-génotype ne comprend que des souches ougandaises et kényanes. Les virus ougandais présentent une faible diversité génétique, notamment en comparaison avec leurs homologues vélogènes d'Afrique de l'Ouest. La présence de souches de virus de la maladie de Newcastle virulentes dans des marchés d'oiseaux vivants peut représenter un risque pour des épizooties de maladie de Newcastle dans des élevages non commerciaux.

## ABSTRACT

### High pathogenicity and low genetic evolution of avian paramyxovirus type I (Newcastle disease virus) isolated from live bird markets in Uganda

Newcastle disease is still a serious disease of poultry especially in backyard free-range production systems despite the availability of cross protective vaccines. Healthy-looking poultry from live bird markets have been suspected as a major source of disease spread although limited studies have been conducted to ascertain the presence of the virulent strains in the markets and to understand how they are related to outbreak strains. This study evaluated the occurrence of Newcastle disease virus in samples collected from poultry in live bird markets across Uganda. The isolates were pathotyped using standard methods (mean death time (MDT), intracerebral pathogenicity index (ICPI), and sequencing of the fusion protein cleavage site motif) and also phylogenetically analysed after sequencing of the full fusion and hemagglutinin-neuraminidase genes. The isolates were classified into genotypes and subgenotypes based on the full fusion protein gene classification system and compared with other strains in the region and world-wide. Virulent avian paramyxovirus type I (APMV-1) (Newcastle disease virus) was isolated in healthy-looking poultry in live bird markets. The viruses belonged to a new subgenotype, Vd, in genotype V, and clustered together with Tanzania and Kenya strains. They harbored low genetic diversity. The occurrence of virulent APMV-1 strains in live bird markets may serve as sources of Newcastle disease outbreaks in non-commercial farms.

## INTRODUCTION

La maladie de Newcastle (ND) est très contagieuse et affecte les poulets et d'autres espèces de volailles ainsi que des oiseaux sauvages. Elle dévaste les élevages qui ne sont pas vaccinés lors d'épidémies périodiques, engendrant jusqu'à 70-100% de mortalité. La maladie est causée par des virus à ARN appartenant aux Paramyxovirus Aviaries de type 1 (APMV-1, ou virus de la maladie de Newcastle, NDV) [1]. Les souches ont été classées en fonction de leur pouvoir pathogène : asymptomatiques, lentogènes, mésogènes et vélogènes. Génétiquement, les souches de NDV sont largement divisées en deux sous-types : virulent et non virulent, sur la base du site d'activation du domaine de clivage pour le précurseur de la protéine de fusion (F) qui doit être clivé en F1 et F2, rendant le virus infectieux. Biologiquement, les formes virulentes sont déterminées avec des indices de pathogénicité intracérébrale (ICPI) supérieurs ou égaux à 0.7 ou par des mesures du temps moyen avant la mort (MDT) ou de l'index de pathogénicité intraveineux (IVPI) [2].

Bien que la maladie soit enzootique dans la plupart des pays Africains, il y a encore peu d'études se penchant sur l'écologie, l'épidémiologie moléculaire, la diversité génétique et la distribution du NDV sur le continent. On estime que la ND chez les poulets villageois provient des oiseaux qui excrètent du virus durant et après incubation ou après vaccination. Il semble aussi que bien que la vaccination confère une protection, certains oiseaux continuent d'excréter le virus alors qu'ils sont d'apparence saine. Les épidémies durant la saison sèche ne seraient pas seulement dues à une meilleure survie virale dans ces conditions, mais aussi au commerce des animaux durant cette période.

La classification génétique de l'APMV-1 continue d'évoluer. Récemment, une méthode de génotypage rationnel a été proposée par Diel et *al.* (2012). Elle est basée sur les distances moyennes d'évolution inter-populations de la protéine F complète, avec des valeurs limites pour déterminer les nouveaux génotypes (>10% de distance génétique moyenne inter-population) et les nouveaux sous-génotypes (de 3 à 10% de distance génétique moyenne inter-populations) [3]. Différentes lignées ont été décrites dans de nombreuses zones d'Afrique, sur la base du site de clivage de la protéine de fusion [3], et quelques équipes commencent à utiliser le système décrit par Diel et *al.*

L'objectif de cette étude était d'évaluer la présence de pathotypes de NDV dans les marchés d'oiseaux vivants en Ouganda et de déterminer leur diversité génétique et leurs liens en utilisant la nouvelle

nomenclature du NDV. L'étude dans son intégralité est décrite dans Byarugaba et *al.* (2014) [4].

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Echantillons

Des écouvillons trachéaux et cloacaux ont été collectés sur l'ensemble du territoire (Figure 1) entre Janvier et Juin 2011. Les prélèvements ont été conservés dans 1500 µl de milieu de transport viral (VTM). Au total 1357 échantillons ont été collectés avec au moins 30 échantillons par site ou par marché. Tous les échantillons ont été transportés dans l'azote liquide puis transférés à -80°C avant d'être analysés.

### 1.2. Isolement viral et caractérisation biologique

Les souches de NDV ougandaises ont été isolées sur œufs embryonnés de poule de 9 à 11 jours comme décrit dans le manuel de l'OIE [2]. De même, ICPI et MDT ont été déterminés sur embryons de poule comme recommandé [2].

### 1.3. Détection moléculaire, séquençage, et analyse de séquences

Au total 49 isolats représentatifs ont été séquencés pour les gènes F (29 isolats) et HN (38 isolats) complets, respectivement. Dix-neuf de ces isolats ont été séquencé à la fois sur F et HN. Pour le reste des 65 isolats, seul le site de clivage de F a été séquencé afin de confirmer le pathotype. Les amplicons ont été séquencés sur un séquenceur ABI à capillaires (méthode Sanger). La phylogénie et les calculs de distances génétiques ont été réalisés avec MEGA v5. Les numéros d'accession des séquences ougandaises de cette étude sont : HG937535-HG937591. Les protocoles exacts (avec les amorces) et le détail des références bibliographiques sont disponibles dans notre étude complète [4].

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Au total, 114 isolats ont été obtenus (114/1357 soit 8.7% de prévalence par isolement). Seuls 19 échantillons ont révélé la présence de virus à la fois dans les écouvillons trachéaux et cloacaux. La région nord a comptabilisé le plus fort pourcentage d'isolement : 22,1%, suivi de la région centre : 13,1%, puis de la région est : 11,2% et la plus faible prévalence concerne la région ouest : 6,9% (Figure 1). Certains poulets présentaient des symptômes de la ND lors des prélèvements avec un taux d'isolement de 28,6% (6/21) chez les poulets malades contre 9% (108/1229) chez les poulets en bonne santé.

Tous les isolats avaient des valeurs d'ICPI très élevées, comprises entre 1.60 et 1.86 et de faibles MDT, signes de souches vélogènes. Tous les isolats arboraient <sup>112</sup>RRQKR\*F<sup>117</sup> pour site de clivage de F,

prédictif de la vélogénicité (pathogénicité) des souches à nouveau.

Les gènes de la fusion (F) et de l'hémagglutinine-neuraminidase (HN) d'une partie des isolats ont également été séquencés dans leur intégralité. Nos isolats se regroupaient avec les virus du génotype V et les quelques séquences de NDV Ougandais disponibles jusque-là mais dans un sous-groupe distinct appelé Vd et ceci pour les deux gènes F, (Figure 2) et HN (données non présentées). Les résultats phylogénétiques ont été confirmés en comparant les distances d'évolutions : les distances entre le sous-génotype Vd des virus d'Afrique de l'Est intégrés à l'analyse et les sous-génotypes Va, Vb et Vc allaient de 10 à 13%, chiffre supérieur à la distance nécessaire pour qu'un nouveau sous-génotype soit défini (3 à 10% [3]). Cette analyse de la distance d'évolution entre génotypes a été réalisée en considérant le sous-génotype Vd comme un génotype à part entière et a montré des distances comprises entre 11.3 et 23.9% entre les virus Vd et les 17 autres génotypes (11.3% entre Vd et V ; 23.9% entre Vd et XI, données non présentées). Cependant, il semble difficile de considérer les virus NDV d'Afrique de l'Est (Vd) comme un génotype complet distinct lorsque l'on regarde seulement l'arbre topographique.

Les souches de NDV ougandais se groupaient toutes ensemble et avec quelques souches du Kenya et de Tanzanie. Nos souches se distinguaient des virus des génotypes Ia identifié en Tanzanie, II identifié en Tanzanie et en Ethiopie, IV identifié au Soudan, XIII au Burundi et en Tanzanie, VI en Tanzanie et au Soudan, VI en Ethiopie (Figure 2), et VIId au Soudan, en Ethiopie et en Afrique du Sud. Le génotype V qui nous concerne en Ouganda a été principalement détecté en Amérique centrale et du nord avec la description de 3 sous-génotypes jusqu'à présent (Va, Vb et Vc).

La similarité des souches ougandaises, tanzaniennes et kenyanes suggère des échanges de volailles vivantes aux frontières, sans doute facilités par le peu de contrôles douaniers. Cependant nos souches diffèrent des souches du Soudan ou du Burundi. Les conflits au Nord-Ouganda/Sud-Soudan depuis de nombreuses années pourraient expliquer cette observation.

Une faible diversité génétique a été observée parmi les souches ougandaises de NDV de 2011 avec des distances génétiques comprises entre 0.0 et 2.6% et 0.0 à 3.5% pour les gènes F et HN, respectivement. Cette observation est également valable au sein de toutes les souches connues de NDV ougandais, (séquences virales disponibles pour des souches de 2001 et de 2011 uniquement) avec des distances génétiques (basées sur des séquences partielles) comprises entre 1.5 et 2.6% pour le gène F et entre 1.6 et 4.1% pour le gène HN.

Divers génotypes de NDV ont été reportés en Afrique de l'Ouest en complément d'études d'épidémiologie moléculaire dans le reste du monde. La diversité génétique observée par Snoeck et *al.* en 2013 en Afrique de l'Ouest est bien supérieure à celle que nous observons en Ouganda. En effet, au sein d'un même génotype, elle varie entre 0 et 4.6% pour le génotype XIVa (souches de 2007 à 2011 n=15; 0 à 4.6% pour les souches de 2009 uniquement, n=12) et entre 0 et 5.8% pour le génotype XVIIa (souches de 2006 à 2011 n=38; 0.1 to 5.0% pour les souches de 2009 uniquement, n=21). Cette différence peut s'expliquer par le fait (i) qu'il y a très peu d'isolats d'Afrique de l'Est qui ont été examinés au niveau moléculaire et que pour la plupart d'entre eux seules des séquences partielles du site de clivage de F ont été analysées, mais aussi (ii) que le Nigéria est bien plus grand que l'Ouganda, avec un commerce de volailles plus complexe avec ses voisins mais aussi des échanges internationaux.

Nous avons pu isoler des souches vélogènes de NDV chez des oiseaux asymptomatiques cliniquement, ce qui illustre une réplication virale et une possible transmission de ces souches très virulentes capables de causer des épizooties. Cette observation est importante pour le choix de souches vaccinales utilisées en Afrique, la stratégie la plus efficace à l'heure actuelle pour contrôler les épizooties de ND. Des études vaccinales ont été menées avec des souches d'Afrique du Sud et d'Afrique de l'Ouest et ont montré une protection croisée avec un virus hétérologue même si les oiseaux vaccinés excrétaient tout de même du virus vélogène. Ces études combinées à nos données confirment bien que des oiseaux sains puissent être porteurs de virus vélogène capable d'infecter des populations naïves.

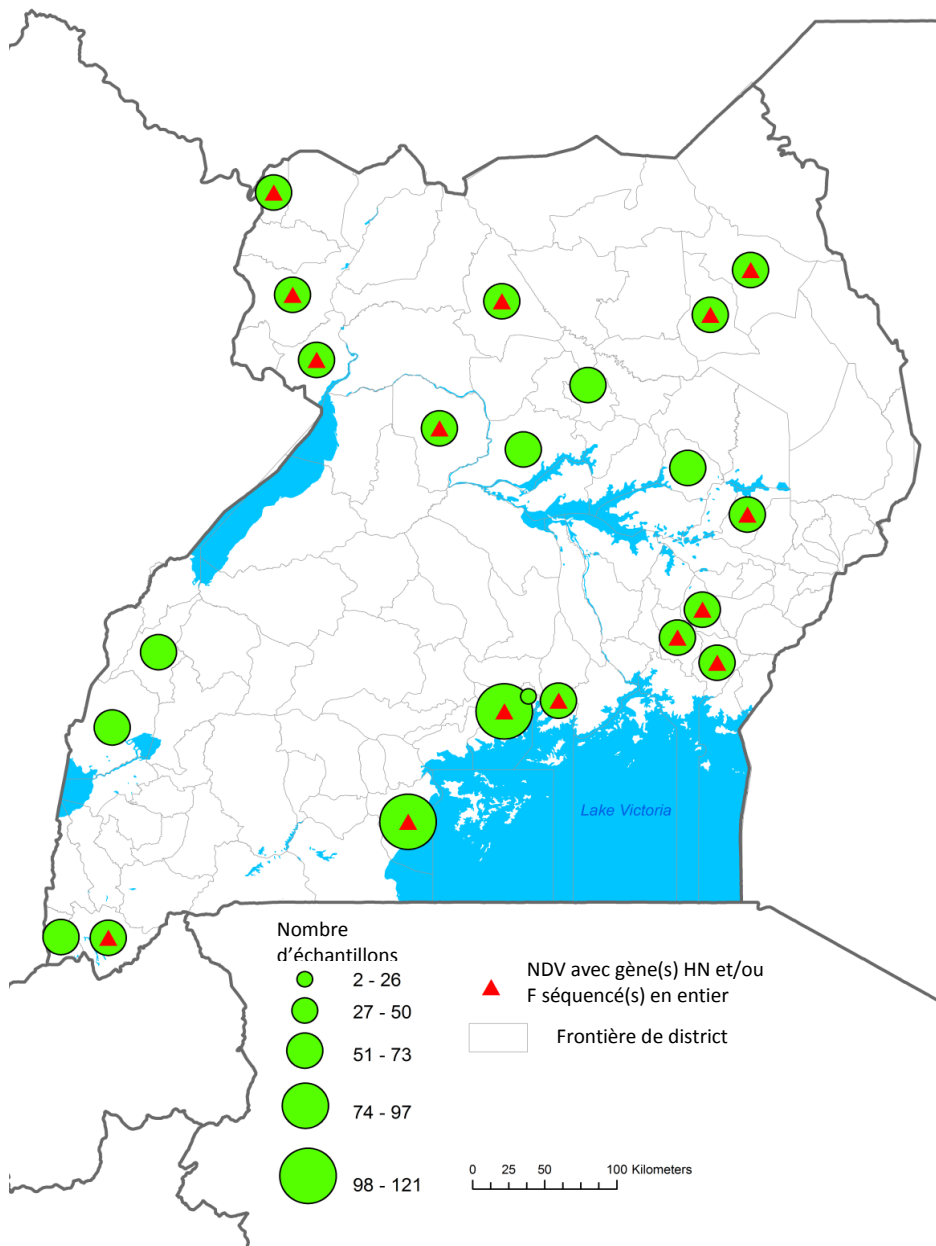
## CONCLUSION

Cette étude est la première à l'échelle de l'Ouganda. Elle a montré la circulation de souches vélogènes de NDV en Ouganda chez des oiseaux apparemment sains sur des marchés de volailles vivantes. Nous avons mis en évidence un nouveau sous-génotype de NDV, Vd, avec une faible variabilité génétique et qui circule en Ouganda, au Kenya et en Tanzanie. Cette étude a des implications pour les stratégies de vaccination et de contrôle au niveau des frontières.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alexander DJ: Newcastle disease, other paramyxoviruses and Pneumovirus infections. In Diseases of Poultry. 11th Edition. Edited by Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Ames: Iowa State University Press; 2003:63–99.
2. OIE: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal, 6th Ed. Paris; 2008.
3. Diel DG, et al: Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. Infect Genet Evol, 2012, 12(8):1770-1779.
4. Byuragaba et al: High pathogenicity and low genetic evolution of avian paramyxovirus type I (Newcastle disease virus) isolated from live bird markets in Uganda. Virol J, 2014

**Figure 1.** Carte de l'Ouganda et origine des échantillons collectés.



**Figure 2.** Arbre phylogénétique (ML) du gène de fusion des NDV ougandais (niveau nucléotidique). Les NDV ougandais ont été comparés à A) toutes les souches disponibles sur GenBank ou B) des souches de référence et toutes les souches du génotype V et d’Afrique de l’Est disponibles.

