THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, G®n®tique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. GUILLAUME LE LOC'H

le lundi 13 avril 2015

Titre :

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES AVIPOXVIRUS CHEZ L'OUTARDE HOUBARA

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, V®t®rinaires, Agronomiques et Bioing®nieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions H¹ tes - Agents Pathog¯nes - IHAP

Directeur(s) de Thèse :

M. STEPHANE BERTAGNOLI

MME CHRISTELLE CAMUS-BOUCLAINVILLE

Rapporteurs :

M. GABRIELE SORCI, UNIVERSITE DE BOURGOGNE

M. GERD SUTTER, LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITAT MUNCHEN

Membre(s) du jury :

M. CHRISTOPHE PASQUIER, CHU TOULOUSE, Pr®sident

Mme CHRISTELLE CAMUS-BOUCLAINVILLE, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. MICHEL SAINT-JALME, MUSEUM D'HISTOIRE NATURELLE, Membre

M. PASCAL ARNE, ENV MAISON ALFORT, Membre

M. STEPHANE BERTAGNOLI, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

Remerciements

Je remercie tout d'abord les bailleurs de fond des programmes de conservation d'outardes houbaras, son Altesse Cheikh Mohamed bin Zayed Al Nahyan, Prince Héritier d'Abou Dhabi et président de l'International Fund for Houbara Conservation (IFHC), son Excellence Mohammed Al Bowardi vice-président de l'IFHC, son Altesse Cheikh Mohamed bin Rashid Al Maktum, fondateur de l'Emirates Centre for Conservation of Houbara (ECCH) et Mohamed Beljafla, directeur de l'ECCH. Je remercie également Jacques Renaud, fondateur de RENECO.

Merci à Gabriele Sorci et Gerd Sutter d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, à Christophe Pasquier, Michel Saint Jalme et Pascal Arné d'avoir accepté de faire partie de mon jury, et à Philippe Jacquiet et Thierry Baldet d'avoir fait partie de mon comité de thèse.

Merci à Frédéric Lacroix, directeur exécutif de RENECO qui a accepté, malgré toutes les contraintes que cela impliquait quant à mon travail chez RENECO, que je réalise cette thèse. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à sa réalisation.

Merci à Stéphane Bertagnoli et Christelle Camus-Bouclainville d'avoir accepté de me diriger pendant ces trois années et demie. Merci pour votre disponibilité et le temps que vous avez pu me consacrer. Merci Stéphane pour tes mille idées et merci Christelle d'avoir remis Stéphane dans le droit chemin par moment.

Merci à Jean-Luc Guérin qui m'a accueilli au sein de cette équipe où je me suis toute de suite senti bien. Merci pour tes conseils avisés et ta disponibilité, et merci pour la suite…

Merci à Pascal Arné qui me suit depuis de nombreuses années, m'a poussé à suivre ma passion des oiseaux puis m'a poussé vers la recherche.

Merci à Mariette Ducatez, Mathilde Paul et Guillaume Croville d'avoir chacun à leur tour partagé leur science et de m'avoir consacré leur temps précieux sans compter.

Merci à Maxence Delverdier pour les analyses histologiques des lésions, à Yves Hingrat pour ses relectures et ses conseils, à Carole Heyd pour les différentes cartes et à Alexandre François pour nos tentatives de travailler sur les insectes vecteurs.

Merci à Florian Grard d'avoir été un appui fiable et solide quand j'étais loin de Toulouse et merci à Mam-Noury Amadou Souley pour sa participation à une partie du travail de thèse.

Merci à Josyane Loupias et Brigitte Peralta pour leur aide technique et à toute l'équipe IHVV de l'UMR 1225 pour son accueil chaleureux lors de mes brefs passages et pour avoir su montrer patience et disponibilité.

Merci à Mar Carrasco, Imane Smaïni, Mohamed Tangarfi, Mohamed Abdessamad, Angel Perez-Grimaldi, Mohamed Idendel, Hassan Chadli et toutes les équipes élevage et vétérinaire des projets de conservation de m'avoir aidé en collectant ces nombreuses données et en m'apportant leur appui.

Merci à Adeline, Guillaume et Pipou de m'avoir offert gîte, couvert et amour lors de mes passages sur Toulouse. Merci aussi à Clément et ses colocs de m'avoir permis de me sentir à nouveau étudiant et merci à Pauline de m'avoir accueilli malgré ses travaux.

Merci à Gwen, Eric, Pierre, Yves, Romain, Delphine, Marjorie, Jérôme, Chloé, Sylvain, Juan, Imane, Latifa, Clio, Benoît, Nicolas et tous les Missouris et Enjilois d'avoir fait de ces années au Maroc une magnifique page de notre vie. Merci à Mar(iquita), Cédric, Toni de m'avoir accueilli loin du Maroc et de la France.

Delphine, merci d'avoir été là, même quand je n'étais pas là ! Mariette, merci pour ton incisivité ! Florian, merci pour ton humour ! Merci pour votre amitié.

Et pour finir, je ne remercierai jamais assez celle qui accepte depuis des années de me suivre pour le meilleur et pour le pire. Merci Aurélie pour n'avoir jamais cessé de me pousser à réaliser mes rêves même quand cela impliquait des sacrifices pour toi. Merci d'avoir accepté mes absences pendant ces années. Merci pour ton amour. Merci de nous avoir donné deux magnifiques enfants, Camille et Mathilde.

Table des matières

LISTE DES FIGURES v
LISTE DES TABLEAUX vii
LISTE DES ABREVIATIONS viii
CHAPITRE I : INTRODUCTION 1
A. LES AVIPOXVIRUS 1
1. *Structure et caractéristiques* 1
2. *Taxonomie, évolution et phylogénie* 7
3. *Variole aviaire* 12
i. Épidémiologie 12
ii. Clinique 16
B. L'OUTARDE HOUBARA 21
1. *Taxonomie et distribution* 21
2. *Biologie* 21
3. *Conservation* 23
4. *Élevage* 27
5. *Gestion sanitaire* 31
i. Épidémiosurveillance 32
ii. Prophylaxie 33
6. *Variole aviaire et Outarde houbara* 34
C. OBJECTIFS DE RECHERCHE 38
CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE 41
A. ÉPIDEMIOLOGIE DE LA VARIOLE AVIAIRE EN ELEVAGE CONSERVATOIRE D'OUTARDES HOUBARA 41
1. *Contexte* 41
2. *Problématique et objectifs* 42
3. *Démarche expérimentale* 43
i. Population 43
ii. Collecte des données 43
iii. Indicateurs calculés 45
iv. Analyse moléculaire 47
4. *Article 1* 48
5. *Conclusion* 61
i. Manifestations cliniques 61
ii. Facteurs climatiques 62
iii. Espèce et captivité 62
iv. Age et statut vaccinal 63
B. IMPACT DE LA VARIOLE AVIAIRE SUR LES PERFORMANCES DE L'OUTARDE HOUBARA EN ELEVAGE 65
1. *Contexte* 65
2. *Problématique* 65
3. *Démarche expérimentale* 66
i. Choix effectués 66
ii. Matériel et méthodes 67
(a) Populations et période d'étude 67
(b) Variables dépendantes : performances de reproduction 68
(c) Variables explicatives : variole aviaire et variables confondantes. 68
(d) Analyse statistique 70
4. *Résultats* 72
i. Description des variables 72
ii. Analyse statistique 74
5. *Discussion et conclusion* 77

C. DIVERSITE ET EVOLUTION DES AVIPOXVIRUS 81
1. *Contexte* *81*
2. *Problématique et objectifs* *81*
3. *Démarche expérimentale* *82*
i. Prélèvements 82
ii. PCR, séquençage et analyses bio-informatiques 84
4. *Article 2* *87*
5. *Article 3* *104*
6. *Conclusion* *117*
i. Diversité et origine des souches virales 117
ii. Coïnfection, recombinaison et spécificité d'hôte 119
D. INFECTIONS EXPERIMENTALES 121
1. *Contexte* *121*
2. *Problématique et objectifs* *122*
3. *Démarche expérimentale* *123*
i. Choix de la souche 123
ii. Choix des oiseaux 124
iii. Choix du mode opératoire 125
iv. Matériel et méthodes 125
(a) Virus 125
(b) Oiseaux et infections 126
(c) Suivi des oiseaux 127
(d) PCR quantitative 128
(e) Hématologie et électrophorèse des protéines plasmatiques 129
(f) Histologie 130
(g) Analyses statistiques 130
4. *Résultats* *131*
i. Mise en place de la PCR quantitative 131
ii. Infections avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale 132
(a) Expression clinique 132
(b) Virémie 135
(c) Analyses moléculaires et histologiques des lésions 135
iii. Infections avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion 136
(a) Expression clinique 136
(b) Poids et consommations d'aliments 138
(c) Paramètres hématologiques 139
(d) Analyses moléculaires et histologiques des lésions 139
5. *Discussion et conclusion* *141*
i. Reproduction de la maladie 141
ii. Expression clinique et modifications physiologiques 143
iii. Conclusion 147
CHAPITRE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES 148
A. TAXONOMIE DES AVIPOXVIRUS 149
B. ÉCOLOGIE DES AVIPOXVIRUS 151
C. APPORT A LA GESTION SANITAIRE D'ELEVAGES CONSERVATOIRES 155
1. *Prophylaxie sanitaire* *155*
2. *Prophylaxie médicale* *156*
3. *Prise en charge médicale* *157*
4. *Déplacements d'oiseaux* *158*
5. *Évaluation des risques et surveillance épidémiologique* *158*
D. CONCLUSION 159
BIBLIOGRAPHIE 160

Liste des figures

FIGURE 1. REPRESENTATION DES DEUX FORMES DE PARTICULES VIRALES MATURES DES POXVIRUS. ©SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS.....2

FIGURE 2. GENOMES DES CINQ AVIPOXVIRUS SEQUENCES, D'APRES OFFERMAN *ET AL.* 2014 (11).....4

FIGURE 3. CYCLE DE REPLICATION DU VIRUS DE LA VACCINE, D'APRES MOSS 2013 (4).....6

FIGURE 4. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES CHORDOPOXVIRUS CONSTRUIT A PARTIR DES SEQUENCES EN ACIDES AMINES DE 17 PROTEINES CONSERVEES, D'APRES GUBSER *ET AL.* 2004 (15).....8

FIGURE 5. PHYLOGENIE DES AVIPOXVIRUS CONSTRUITE A PARTIR DU LOCUS P4B, D'APRES GYURANECZ *ET AL.* 2013 (2).....10

FIGURE 6. LESIONS DE VARIOLE AVIAIRE : FORMES CUTANEES (1 ET 2) ET DIPHTERIQUE (3), CELLULES BALLONISEES CONTENANT DES INCLUSIONS INTRACYTOPLASMIQUES EOSINOPHILES CARACTERISTIQUES (4), D'APRES FRIEND *ET AL.* 1999 (105) ET TRIPATHY *ET AL.* 2013 (20).....18

FIGURE 7. OUTARDE HOUBARA NORD-AFRICAINE (*C. UNDULATA*) A GAUCHE ET OUTARDE HOUBARA ASIATIQUE (*C. MACQUEENII*) A DROITE. © IFHC.....21

FIGURE 8. AIRES DE REPARTITION DES DEUX ESPECES D'OUTARDE HOUBARA ET DISTRIBUTION DES PROJETS DE CONSERVATION ETUDIES.....26

FIGURE 9. PHOTO AERIENNE DU SITE D'ENJIL, A L'ECWP, AU MAROC. ©ECWP.....28

FIGURE 10. CAGES DE REPRODUCTEURS EN EXTERIEUR (1) ET EN BATIMENT (2), BATTERIES DE REPRODUCTEURS (3), VOLIERES POUR LA PREPARATION DES OISEAUX AU RELACHER (4). ©ECWP ET IFHC.....29

FIGURE 11. INCIDENCE DE LA VARIOLE AVIAIRE PAR AGE POUR LES TROIS POPULATIONS ETUDIEES.....46

FIGURE 12. AVERAGE MONTHLY MORBIDITY RATES, TEMPERATURES AND NUMBERS OF DAYS OF PRECIPITATIONS, (A) FOR AFRICAN HOUBARA AND ASIAN HOUBARA BUSTARD IN MOROCCO AND (B) FOR ASIAN HOUBARA BUSTARD IN THE UNITED ARAB EMIRATES.....53

FIGURE 13. MONTHLY MORBIDITY RATES AND FLOCKS SIZE (A) FOR AFRICAN HOUBARA AND ASIAN HOUBARA BUSTARD IN MOROCCO AND (B) FOR ASIAN HOUBARA BUSTARD IN THE UNITED ARAB EMIRATES.....55

FIGURE 14. LESIONS OF POX INFECTIONS IN HOUBARA. MODERATE CUTANEOUS LESIONS ON THE ANGLE OF THE MOUTH (A), THE EYELID (B) AND THE LEG (C), LARGE CUTANEOUS LESION (D) ON THE LEG AND DIPHTHERITIC LESIONS IN THE ORAL CAVITY (E).....56

FIGURE 15. DISTRIBUTION DES PARADES ET DES PONTES POUR CHAQUE POPULATION.....73

FIGURE 16. BOITES A MOUSTACHE DES PERFORMANCES POUR LES VARIABLES VAR1 ET VAR2.....75

FIGURE 17. PROTOCOLE DE COLLECTE DES LESIONS DE VARIOLE AVIAIRE.....83

FIGURE 18. STRUCTURE DU LOCUS FPV140, D'APRES JARMIN *ET AL.* 2006 (1).....86

FIGURE 19. NEIGHBOR-JOINING PHYLOGENETIC TREE OF P4B DNA SEQUENCES.....94

FIGURE 20. NEIGHBOR-JOINING PHYLOGENETIC TREE OF FPV140 DNA SEQUENCES.....96

FIGURE 21. EVIDENCE OF RECOMBINATION BETWEEN CNPV/*CHLAMYDOTIS UNDULATA*/MA/001/2009 AND SUBCLADES B1 AND B2 STRAINS.....97

FIGURE 22. PCR AMPLIFICATION OF AN INTERNAL SEGMENT OF THE FPV140 LOCUS FOR DISCRIMINATION BETWEEN SUBCLADES B1 AND B2.....98

FIGURE 23. DISTRIBUTION OF STRAINS COLLECTED IN HOUBARA BUSTARDS IN 3 BREEDING PROJECTS.....99

FIGURE 24. PHYLOGENETIC TREES ANALYZING ALL AVAILABLE AVIPOXVIRUS SEQUENCES OF THE (A) P4B, (B) CNPV186, AND (C) DNA POLYMERASE GENES. 113
FIGURE 25. ORIGINE POSSIBLE DES VIRUS FWPV-LIKE ISOLES CHEZ L'OUTARDE HOUBARA. 118
FIGURE 26. COURBES D'AMPLIFICATION DE LA GAMME DE LA PCR QUANTITATIVE CIBLANT UNE SEQUENCE DE L'ORF *CNPV185* DES VIRUS DU SOUS-CLADE B2. 132
FIGURE 27. DISTRIBUTION DES TEMPS D'INCUBATION POUR CHAQUE PATTE. 134
FIGURE 28. LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UNE SEMI-PURIFICATION VIRALE. 135
FIGURE 29. ÉVOLUTION D'UNE LESION EXPERIMENTALE DEPUIS LE STADE DE PAPULE JUSQU'AU STADE DE MASSE CROUTEUSE. 137
FIGURE 30. ÉVOLUTION DES POIDS MOYENS POUR LES OISEAUX CONTROLES ET INFECTES A PARTIR DU JOUR DE L'INOCULATION. 138
FIGURE 31. ÉVOLUTION DES CONSOMMATIONS MOYENNES POUR LES OISEAUX CONTROLES ET INFECTES A PARTIR DU JOUR DE L'INOCULATION. 139
FIGURE 32. EXAMEN HISTOLOGIQUE DES LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UN BROYAT DE LESION. 140

Liste des tableaux

TABLEAU 1. CARACTERISTIQUES DES ELEVAGES CONSERVATOIRES D'OUTARDES HOUBARA..... 27

TABLEAU 2. SYNTHESE DES PRINCIPAUX EPISODES PUBLIES DE VARIOLE AVIAIRE SUR DES OUTARDES HOUBARA. 35

TABLE 3. MAIN EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF POX INFECTIONS IN THE THREE STUDY POPULATIONS. 52

TABLE 4. AGE AND SPECIES-SPECIFIC CUMULATIVE MORBIDITY RATES DURING THE FOUR OUTBREAKS OF POX DISEASE. 54

TABLE 5. CLADE DISTRIBUTION OF VIRUSES IDENTIFIED IN HOUBARA. 56

TABLEAU 6. CARACTERISTIQUES DES QUATRE POPULATIONS ETUDIEES. 68

TABLEAU 7. LISTE DES VARIABLES EXPLICATIVES UTILISEES DANS L'ANALYSE. 71

TABLEAU 8. PROPORTION D'OISEAUX AYANT PARADE OU PONDU DANS CHAQUE POPULATION ET POUR LES DEUX MODALITES DES VARIABLES VAR1 ET VAR2. 74

TABLEAU 9. COEFFICIENT DES VARIABLES SELECTIONNEES DANS LE MODELE FINAL POUR CHAQUE POPULATION. 76

TABLEAU 10. LESIONS COLLECTEES ET ETUDIEES. 84

TABLE 11. DISTRIBUTION OF LESIONS COLLECTED IN HOUBARA BUSTARD CAPTIVE-BREEDING PROJECTS FROM 2008 THROUGH 2013. 90

TABLE 12. GENBANK ACCESSION NUMBERS OF STRAINS ISOLATED AND USED IN THIS STUDY. 92

TABLE 13. WITHIN AND BETWEEN SUBCLADE MEAN GENETIC DISTANCES FOR P4B SEQUENCES. 95

TABLE 14. AVIPOXVIRUS SEQUENCES SELECTED FOR THE MOLECULAR CLOCK ANALYSES. 106

TABLE 15. MEAN AND 95% HPD OF THE BAYESIAN POSTERIOR ESTIMATES OF SUBSTITUTION RATE AND TMRCA FOR AVIPOXVIRUSES. 112

TABLEAU 16. ANALYSES REALISEES A PARTIR DES PRELEVEMENTS SANGUINS LORS DES DEUX SERIES D'INFECTIONS EXPERIMENTALES. 128

TABLEAU 17. VARIABLES SUR LESQUELLES L'EFFET DE L'INFECTION A ETE TESTE. 131

TABLEAU 18. LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UNE SEMI-PURIFICATION VIRALE 133

TABLEAU 19. LESIONS INDUITES PAR L'INOCULUM ISSU D'UN BROYAT DE LESION. 137

TABLEAU 20. VARIABLES SUR LESQUELLES L'INFECTION A EU UN EFFET SIGNIFICATIF, ET COEFFICIENTS DE CES EFFETS. 139

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AIC : critère d'information d'Akaike

CAM : membrane chorio-allantoïdienne

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

CNPV : canarypox virus

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EAU : Émirats Arabes Unis

ECCH : Emirates Centre for Houbara Conservation

ECWP : Emirates Center for Wildlife Propagation

EID50 : fifty percent embryo infective dose

EV : particule virale enveloppée

FWPV : fowlpox virus

ICTV : Comité International sur la Taxonomie des virus

ITR : séquences répétées inversées terminales

kDa : kilo Dalton

kpb : kilo paires de bases

MV : particule virale mature

NARC : National Avian Research Center

ORF : cadre ouvert de lecture (open reading frame)

pb : paires de bases

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PFU : plaque-forming unit / pock forming-unit

PSPV : psittacinepox virus

REV : rétrovirus de la réticuloendothéliose

SKHBC-AD : Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center aux Émirats Arabes Unis

SKHBC-KZ : Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center au Kazakhstan

UICN : Union internationale pour la conservation de la nature

Chapitre I : Introduction

A. Les avipoxvirus

Les avipoxvirus sont classés dans la famille des *Poxviridae*, la sous-famille des *Chordopoxvirinae* et le genre *Avipoxvirus*. Sur la base des données génétiques disponibles, les avipoxvirus se positionnent dans trois clades : les fowlpox-like virus (FWPV-like, clade A), les canarypox-like virus (CNPV-like, clade B) et les psittacinepox-like virus (PSPV-like, clade C) (1–3).

1. Structure et caractéristiques

Les poxvirus sont des virus enveloppés à ADN. Ils sont parmi les plus gros virus connus et possèdent une morphologie complexe, visible en microscopie électronique (virion enveloppé en forme de brique). Mesurant environ 330 x 280 x 200 nm, la particule virale mature (MV : mature virion) des avipoxvirus est constituée d'un core dense et biconcave adossé à deux corps latéraux logés dans les concavités (4) et entouré d'une enveloppe constituée de divers lipides et de nombreuses protéines (virales et cellulaires) ; à titre d'exemple, l'enveloppe du MV du virus de la vaccine contient au moins 22 protéines différentes (5). La particule virale peut acquérir une seconde enveloppe à partir du compartiment membranaire intracellulaire, avant d'être expulsée de la cellule (6). Elle est alors appelée particule virale enveloppée (EV : enveloped virion) (Figure 1). Les protéines structurales des avipoxvirus ont majoritairement été identifiées par homologie de séquence avec le génome du virus de la vaccine. Jusqu'à 31 protéines structurales ont ainsi été identifiées. Des travaux ont également permis, soit par purification virale et électrophorèse en gel de polyacrylamide (7), soit par production et utilisation d'anticorps monoclonaux (8), d'identifier certaines protéines structurales des avipoxvirus, notamment une protéine immunodominante de 35 kDa impliquée dans l'attachement du MV à la cellule et codée par le gène *FPV140* chez les virus FWPV-like et le gène *CNPV186* chez les virus CNPV-like[1]. Le génome des poxvirus est niché dans le core, complexé avec des protéines. Formé d'un double brin d'ADN linéaire, il est constitué d'une région génomique centrale entourée par deux régions

[1] Dans la suite du manuscrit, les gènes commençant par FPV désignent les gènes des virus FWPV-like et ceux commençant par CNPV, les gènes des virus CNPV-like.

identiques de séquences répétées inversées terminales (ITR) qui forment des structures en épingle à cheveux à chacune de ses extrémités.

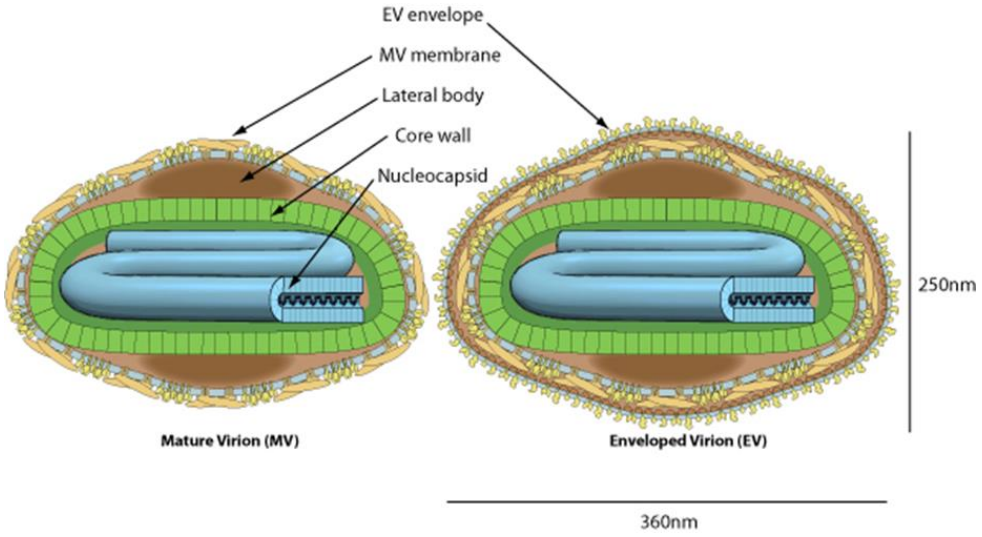

Figure 1. Représentation des deux formes de particules virales matures des poxvirus. ©Swiss Institute of Bioinformatics

Les avipoxvirus sont les poxvirus qui possèdent les plus gros génomes, avec toutefois une grande variabilité puisque leurs génomes mesurent de 266 kpb à 365 kpb avec 244 à 328 cadres ouverts de lecture (ORF) (9–12). Seuls cinq génomes complets d'avipoxvirus sont actuellement publiés. Quatre sont des virus FWPV-like : une souche pathogène de fowlpox virus (FPVUS) (9), une souche de fowlpox virus atténuée sur fibroblastes embryonnaires de poulet (FP9) (12), une souche virulente isolée sur un pigeon biset domestique (*Columba livia*) (FeP2) et une souche virulente isolée sur un manchot du Cap (*Spheniscus demersus*) (PEPV) (11). Le génome complet d'un seul virus CNPV-like est publié, celui d'une souche pathogène de canarypox virus (CNPVATCC VR-111) (10). Parmi les génomes de ces cinq avipoxvirus, 179 gènes conservés sont systématiquement retrouvés (11), alors que 90 seulement le sont parmi les *Chordopoxvirinae* et 49 seulement parmi tous les poxvirus (13) (Figure 2). Les gènes conservés, indispensables aux fonctions virales de base telles que la réplication, la transcription ou l'assemblage de la particule virale, sont localisés dans la partie centrale du génome et les gènes codant pour les facteurs de pathogénicité et de spectre d'hôte sont situés vers les extrémités du génome (14,15). Classiquement, chez les poxvirus, la région centrale est ainsi relativement conservée alors que les parties distales sont plus variables, ceci a notamment bien été montré chez les virus du genre *Orthopoxvirus* (sous-famille des *Chordopoxvirinae*) (13,15). Chez les avipoxvirus cependant, trois

parties centrales du génome présentent de profonds remaniements avec des inversions, transpositions et délétions de groupes de gènes impliqués dans l'interaction virus-hôte (10,15), cela même entre virus d'un unique clade (11). Ainsi, au sein des virus FWPV-like, le génome de FeP2 présente une délétion de 16 kpb par rapport à celui de FPVUS. Une seconde particularité du génome des avipoxvirus, et qui peut expliquer leur grande taille, est l'existence de dix familles de gènes[2] qui représentent jusqu'à 49% du génome chez CNPVATCC VR-111 (38% chez FPVUS) (10). Il s'agit notamment de gènes codant pour des protéines à répétitions ankyrine (31 à 51 copies chez les virus non atténués), de gènes orthologues des gènes codant pour la protéine N1R du virus du fibrome de Shope ou pour la protéines p28 de l'Ectromelia virus (gène Serpin ; 8 à 26 copies), et de gènes orthologues du gène du virus de la vaccine codant pour la protéine B22R (4 à 6 copies) (11). La perte de gènes codant pour les protéines à répétitions ankyrine jouerait un rôle dans l'atténuation des virus comme cela a été montré chez le fowlpox virus de la souche FP9 qui, après 438 passages sur fibroblastes embryonnaires de poulets, ne possède plus que 22 de ces gènes contre 31 chez la souche pathogène FPVUS (12). Les fowlpox virus ont la particularité de pouvoir intégrer dans leur génome des séquences complètes du rétrovirus de la réticuloendothéliose (REV) (16). Cette intégration semble ancienne et elle n'est pas retrouvée chez les avipoxvirus des autre clades, ni chez tous les virus FWPV-like (17,18). On l'observe dans les génomes de virus pathogènes alors que seules des séquences incomplètes de REV, correspondant aux répétitions terminales longues du génome rétroviral, sont retrouvées dans les souches vaccinales (17). Ces observations suggèrent un rôle de ces séquences rétrovirales dans la pathogénicité des virus, notamment à travers le développement d'une immunosuppression chez l'hôte (19). L'origine de cette intégration n'est pas connue, mais on suppose qu'elle s'est faite par échange de matériel génétique à l'occasion de coïnfections. Il a en effet aussi été trouvé dans le génome d'un fowlpox virus une ORF codant pour une protéine similaire à une protéine codée par le virus de la maladie de Marek[3] et, à l'inverse, des homologues d'ORF de fowlpox virus ont été retrouvés dans les génomes de virus de la maladie de Marek (20).

[2] On appelle famille de gènes un ensemble de gènes qui se sont formés par duplications successives depuis un gène ancestral unique.

[3] Le virus de la maladie de Marek est un herpesvirus du genre *Mardivirus*.

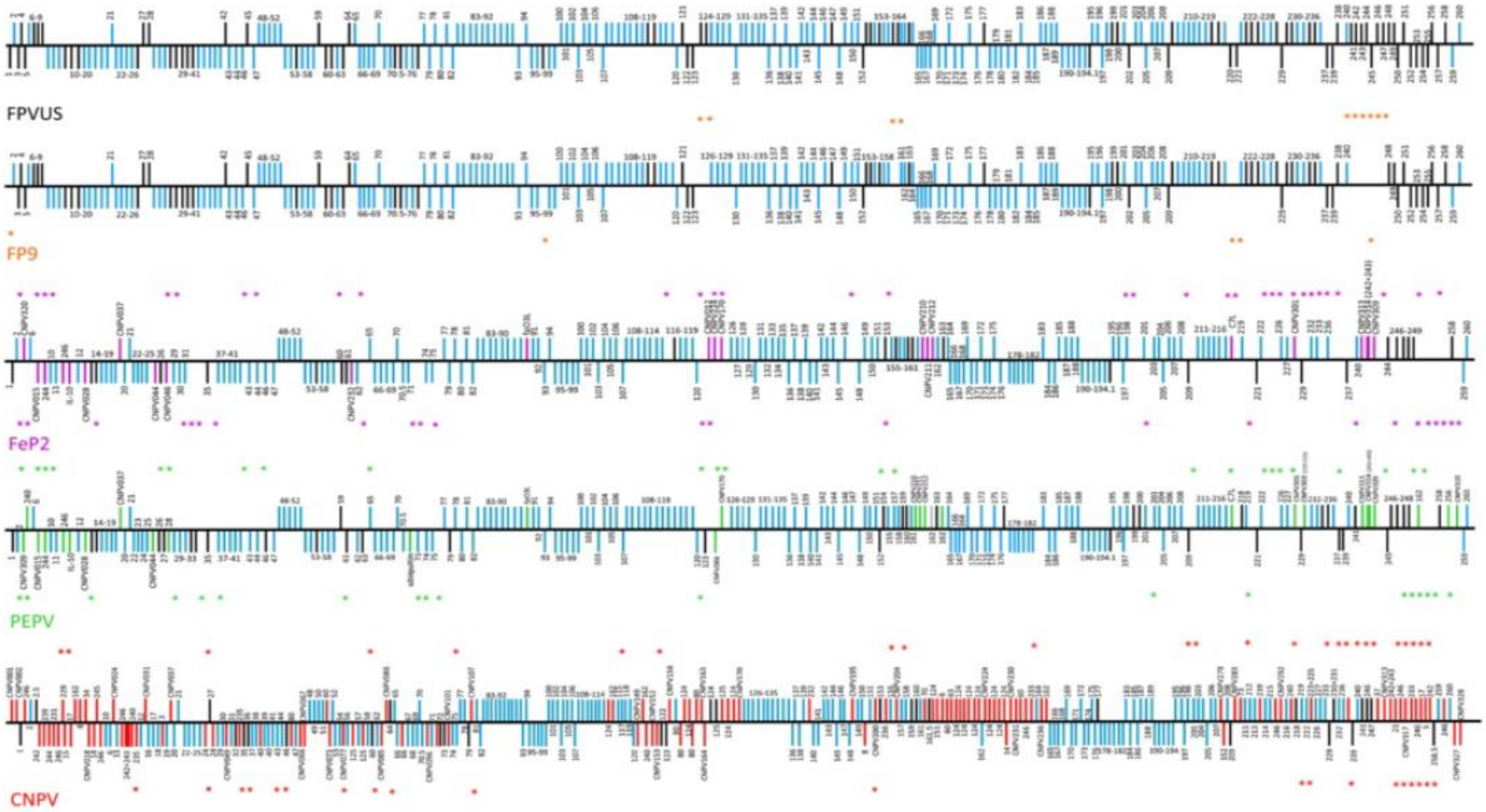

Figure 2. Génomes des cinq avipoxvirus séquencés, d'après Offerman *et al.* 2014 (11).

Le génome du virus FPVUS sert de référence. Pour chaque génome, les barres verticales orientées vers le haut représentent les gènes transcrits vers la droite, celles orientées vers le bas, les gènes transcrits vers la gauche. Les gènes partagés par les cinq génomes sont en bleu et ceux partagés par au moins deux génomes sont en noir. Les différences pour chaque génome par rapport à FPVUS sont de la couleur du nom du génome et un astérisque montre les délétions par rapport à FPVUS.

La réplication des poxvirus est originale dans le fait que la synthèse et l'encapsidation de l'ADN sont cytoplasmiques et utilisent par conséquent un grand nombre de protéines d'origine virale. Les différentes phases de la réplication des avipoxvirus sont très similaires à celles des autres poxvirus (4), quel que soit le type cellulaire aviaire (20) (Figure 3). La première étape d'absorption, de fusion des enveloppes virales avec la membrane cytoplasmique et d'internalisation de la nucléocapside se produit une heure post-infection lors d'infection de l'épithélium cutané, et deux heures post-infection s'il s'agit d'infection de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM). La décapsidation commence alors et s'accompagne de la transcription des gènes précoces grâce à des enzymes et des facteurs de transcriptions contenus dans la nucléocapside. Avec la fin de la décapsidation, débutent la réplication de l'ADN et l'expression des gènes intermédiaires puis tardifs, permettant ainsi la production de l'ensemble des protéines structurales et le début de l'assemblage des particules virales (21). La visualisation des premières particules immatures est possible environ 12 heures post-infection dans les usines virales de la cellule. Ces usines grossissent à partir de 16 heures post-infection et davantage de particules virales immatures y sont visibles. Cependant peu de particules matures sont visibles avant 47 heures post-infection. L'accumulation de ces particules matures près de la membrane cytoplasmique permet la visualisation au microscope d'inclusions intracytoplasmiques éosinophiles typiques (appelées également corps de Bollinger), dès 72 heures post-infection lors d'infection de l'épithélium cutané, et dès 96 heures post-infection lors d'infection de CAM. Les formes EV acquièrent une enveloppe supplémentaire et sont expulsées hors de la cellules en premier (6). Le virus peut également sortir de la cellule sous forme de MV, ayant la capacité à infecter d'autres cellules, lors de lyse cellulaire (21). Plus généralement, la production virale suit deux étapes : une hyperplasie cellulaire durant les 72 premières heures de l'infection puis une seconde phase qui commence vers 60 heures post-infection et durant laquelle la synthèse d'ADN viral et la production de particules virales matures augmentent nettement.

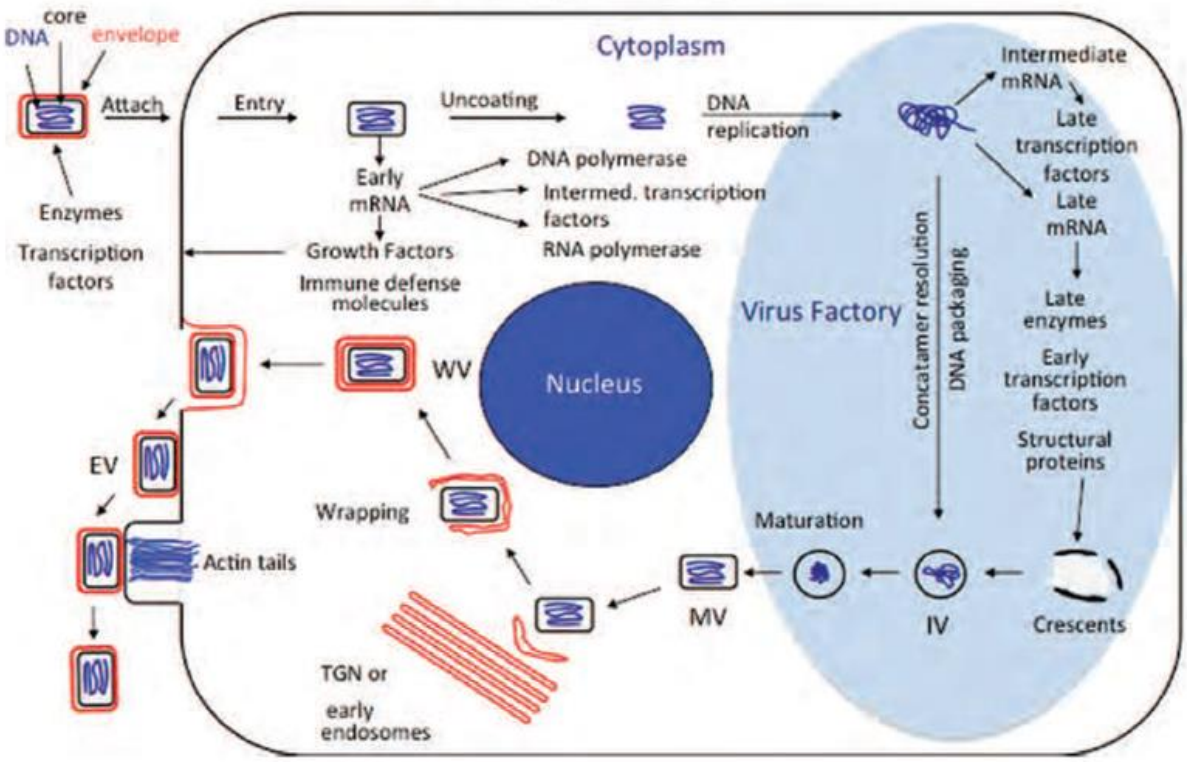

Figure 3. Cycle de réplication du virus de la vaccine, d'après Moss 2013 (4).

Le cycle de réplication des avipoxvirus est très proche de celui du virus de la vaccine. Abréviations utilisées : EV, enveloped virion ; IV, immature virion ; MV, mature virion ; WV, wrapped virion.

Les avipoxvirus se répliquent généralement bien sur différents types de cellules aviaires primaires : fibroblastes embryonnaires de poulet, de canard, cellules rénales de poulet (…), et aux moins deux lignées cellulaires immortalisées permettent la croissance de certains avipoxvirus : une lignée cellulaire de caille (QT35) et une lignée cellulaire tumorale hépatique de poulet (LMH) (20,22). Il est parfois nécessaire de réaliser une adaptation du virus par plusieurs passages sur cellules avant d'observer des effets cytopathiques. Certains auteurs notent cependant que certaines souches issues d'oiseaux sauvages échouent à croître sur cellules, malgré des passages répétées (23–25). De nombreuses lignées cellulaires de mammifères ont également été testées avec différents avipoxvirus et, à de rares exception près (26), aucune croissance virale n'y est observée (21,27). Les avipoxvirus sont capables d'initier leur cycle de réplication en pénétrant dans la cellule mammifère, initiant la transcription de gènes et la réplication de l'ADN viral, mais les particules virales sont incapables de devenir matures et donc de quitter la cellule sous une forme compétente (21). Le cycle incomplet des avipoxvirus dans la très grande majorité des cellules de mammifères, leur capacité à intégrer des

gènes étrangers et l'absence à priori d'immunité préalable chez les mammifères en font des outils particulièrement intéressants pour le développement de vaccins vectorisés chez les mammifères, notamment l'homme, mais également chez les oiseaux (20,28,29).

2. Taxonomie, évolution et phylogénie

La famille des *Poxviridae* comprend deux sous-familles, celle des *Chordopoxvirinae* qui regroupent les poxvirus infectant les vertébrés et celle des *Entomopoxvirinae* dont les représentants infectent les insectes. De nombreuses études ont analysé les relations entre poxvirus et ont essayé de définir leur taxonomie. Le nombre croissant de génomes complets disponibles (les génomes de 25 à 29 espèces de poxvirus sont totalement séquencés et, pour certaines espèces, des génomes de plusieurs souches sont disponibles) a permis d'affiner ces analyses et les différentes approches utilisées ont fourni des classifications relativement similaires (Figure 4) (14,15,30,31). Parmi les *Chordopoxvirinae*, dix genres sont actuellement identifiés : *Orthopoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Crocodylipoxvirus* et *Avipoxvirus* (31). Le genre *Orthopoxvirus* est d'importance majeure en santé humaine puisque qu'il comprend le virus de la variole et celui de la vaccine. L'évolution générale des poxvirus reste sujette à discussion. Une étude a montré que l'ensemble des poxvirus aurait divergé d'un ancêtre commun il y a environ 500000 ans et que le genre *Orthopoxvirus* aurait émergé il y a 300000 ans, donnant naissance aux espèces actuelles il y a 14000 ans et ce à un taux de substitutions par site et par an de 0,9 à 1,2 x 10^{-6} (32). Les évolutions des virus de la variole et de la myxomatose, un leporipoxvirus, ont davantage été étudiées et les vitesses d'évolution sont étonnamment rapides pour des virus à ADN double-brin, avec des taux estimés 10^{-5} substitutions par site et par an (33,34). Chez les orthopoxvirus au moins, l'évolution et la spéciation se seraient faites par pertes de gènes à partir d'un ancêtre commun (35,36).

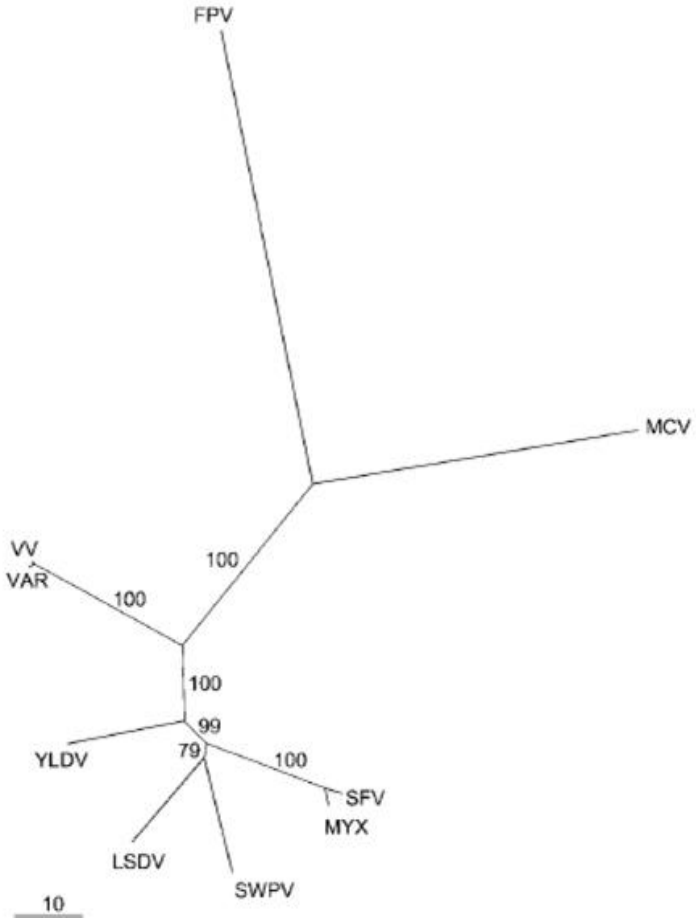

Figure 4. Arbre phylogénétique des chordopoxvirus construit à partir des séquences en acides aminés de 17 protéines conservées, d'après Gubser *et al.* 2004 (15).

Abréviations utilisées : VV, *Vaccinia virus* ; VAR, *Variola virus* ; YLDV, *Yaba-like disease virus* ; LSDV, *Lumpy skin disease virus* ; SWPV, *Swinepox virus* ; MYX, *Myxoma virus* ; SFV, Shope fibroma virus ; MCV, *Molluscum contagiosum virus* ; FPV, *Fowlpox virus*. Les genres représentés sont les suivants : *Orthopoxvirus* (VV et VAR), *Yatapoxvirus* (YLDV), *Leporipoxvirus* (MYX et SFV), *Capripoxvirus* (LSDV), *Suipoxvirus* (SWPV), *Molluscipoxvirus* (MCV) et *Avipoxvirus* (FPV). Les genres *Cervidpoxvirus*, *Parapoxvirus* et *Crocodylipoxvirus* ne sont pas représentés.

Dans le genre *Avipoxvirus*, dix espèces sont actuellement reconnues par le Comité International sur la Taxonomie des virus (ICTV) (37) : *Canarypox virus*, *Fowlpox virus* (espèce type du genre), *Juncopox virus*, *Mynahpox virus*, *Pigeonpox virus*, *Psittacinepox virus*, *Quailpox virus*, *Sparrowpox virus*, *Starlingpox virus* et *Turkeypox virus*. Elles ont été définies à partir de critères phénotypiques et génétiques longtemps utilisés pour distinguer les différents avipoxvirus : espèces hôtes et protections croisées, caractéristiques pathologiques sur l'hôte et de croissance sur CAM et cellules aviaires, et profils de restriction du génome (38–40). Malgré cela, la démarcation entre espèces reste floue et la description de toujours plus d'avipoxvirus implique une révision de ces critères (29). Depuis une dizaine d'année, l'application d'outils de génotypage à

l'identification des avipoxvirus a permis de commencer à construire la phylogénie de ces virus. L'utilisation d'une séquence d'environ 578 nucléotides du gène *FPV167*/*CNPV240*, orthologue du gène *A3L* du virus de la vaccine et qui code pour la protéine de nucléocapside 4b (appelé P4b dans le reste du manuscrit), est actuellement considérée comme l'outil de référence pour identifier et caractériser un avipoxvirus (1–3,41–43). Ce gène présente l'avantage d'être bien conservé parmi les avipoxvirus (83% d'identité entre les séquences en acides aminés de FPVUS et CNPVATCC VR-111) (10) et désormais, l'amplification et le séquençage de P4b sont presque systématiquement réalisés lors d'isolement de nouveaux virus. A l'heure actuelle au moins 368 séquences de P4b sont disponibles sur GenBank (44). Les analyses phylogénétiques de P4b donnent toutes des résultats similaires et permettent la définition des trois clades mentionnés précédemment : clade A (FWPV-like), clade B (CNPV-like) et cade C (PSPV-like) (1–3). Le clade C, dont peu de représentant sont décrits, semble le plus distant alors que les clades A et B descendraient d'un ancêtre commun. Sept sous-clades sont décrits dans le clade A et trois dans le clade B (2) (Figure 5).

Plus récemment, d'autres loci ont été utilisés afin de préciser la phylogénie des avipoxvirus. Un premier locus appelé fpv140 encadre le gène *FPV140*/*CNPV186* en s'appuyant sur les gènes *FPV139*/*CNPV184* et *FPV141*/*CNPV187* (1). Il a l'avantage de présenter une discrimination par la taille entre les séquences des virus FWPV-like (environ 2 kpb) et CNPV-like (environ 3 kpb), ces derniers intégrant un gène supplémentaire (*CNPV185*) dans la séquence. Les gènes *FPV140* et *CNPV186*, orthologues du gène *H3L* du virus de la vaccine et qui codent pour une protéine d'enveloppe immunodominante du MV (cf. p1), sont assez variables (seulement 57% d'identité entre les séquences en acides aminés de FPVUS et CNPVATCC VR-111) et permettent une meilleure discrimination que P4b dans certains clades ou sous-clades (45,46). Toutefois il semblerait que les amorces actuellement utilisées pour amplifier fpv140 ne permettent pas d'amplifier l'ADN de certains avipoxvirus, notamment les virus PSPV-like (1,47).

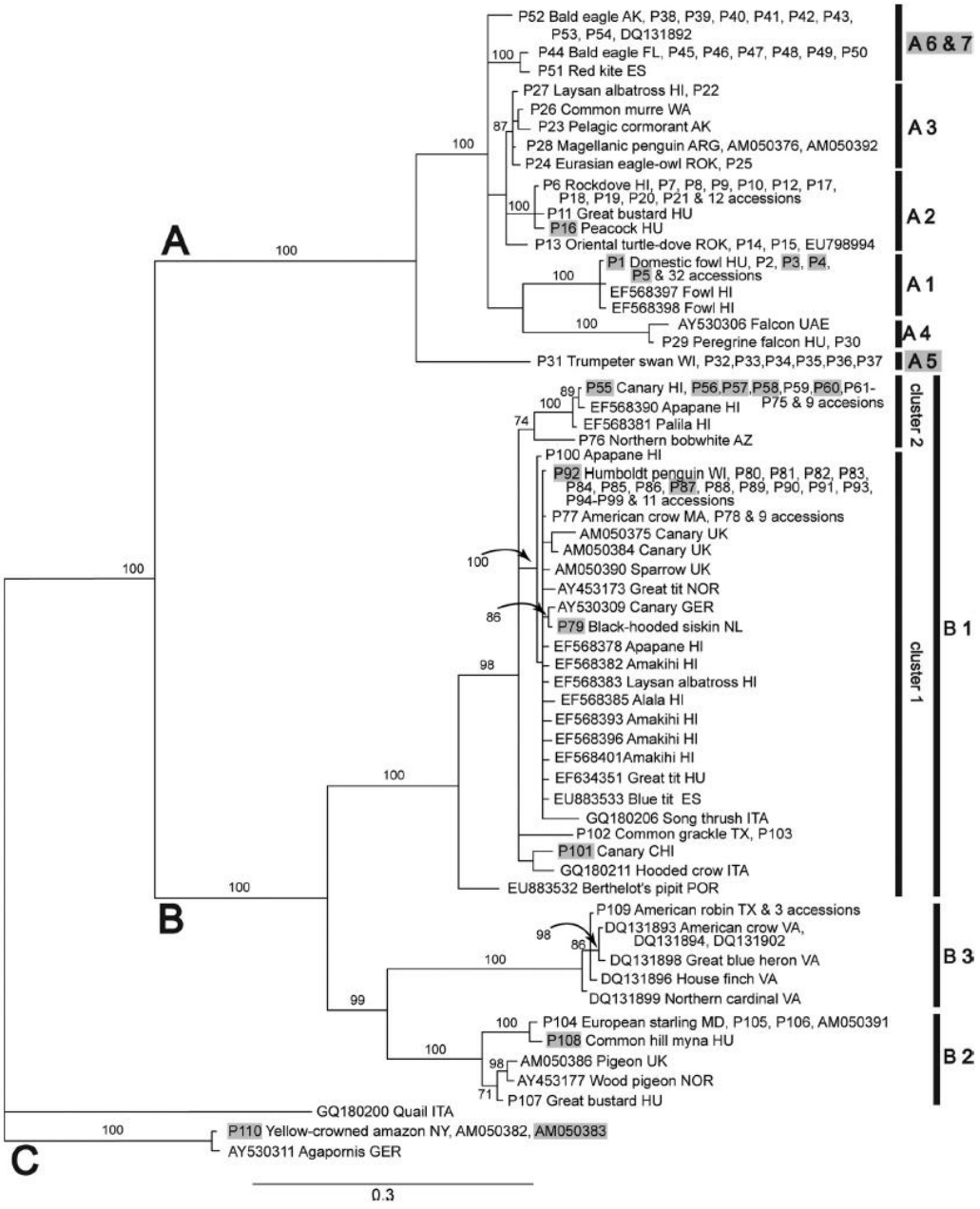

Figure 5. Phylogénie des avipoxvirus construite à partir du locus P4b, d'après Gyuranecz *et al.* 2013 (2).

Les autres loci qui ont été utilisés sont un locus de 4,5 kpb qui s'appuie sur les gènes *FPV193*/*CNPV267* et *FPV203*/*CNPV274* (48), un locus de 5,9 kpb qui s'appuie sur les gènes *FPV109*/*CNPV136* et *FPV117*/*CNPV145* (49), un locus de 700 pb qui s'appuie sur les gènes *FPV175*/*CNPV248* et *FPV176*/*CNPV249*, un locus de 700 pb correspondant à une partie du gène *FPV126*/*CNPV171* (45) et enfin un locus appelé DNA pol qui correspond à une partie du gène *FPV094/CNPV121* (2). A l'exception de ce dernier locus, qui a été utilisé sur un grand nombre d'avipoxvirus et qui s'est montré efficace pour construire des arbres phylogénétiques très proches de ceux obtenus avec P4b (2), les

autres loci n'ont été testés que sur un nombre restreint d'avipoxvirus, appartenant à un nombre limité de clades et sous-clades et peu de séquences sont donc disponibles dans les bases de données. Toutefois, l'étude de ces loci supplémentaires a permis de confirmer la diversité existante au sein du genre *Avipoxvirus*. L'analyse de ces différents loci et des cinq génomes complets montrent une telle diversité que certains auteurs suggèrent une révision taxonomique qui placerait les avipoxvirus dans une sous-famille distincte de celle des *Chordopoxvirinae* (1,10,29). Par ailleurs, l'utilisation de divers loci a permis de commencer à explorer les phénomènes d'émergence de nouvelles souches virales. Au moins deux études mentionnent de possibles recombinaisons entre virus d'un même clade mais de deux sous-clades différents (2,49), les phénomènes de recombinaison étant par ailleurs connus chez d'autres chordopoxvirus (50–52). De même, l'émergence de souches de fowlpox virus virulentes est régulièrement rapportée (53–55) et a été notamment attribuée à l'intégration de séquences complètes de REV dans le génome de ces virus (55,56).

La dénomination des clades et espèces du genre *Avipoxvirus* s'appuie sur une apparente spécificité d'hôtes de ces virus, justifiée par des observations de terrain et divers études d'infections expérimentales (38,39,57–59). La plupart des auteurs la considèrent comme acquise, au moins chez la majorité des espèces aviaires (2,48), bien que certains la critiquent (1,47). Il semblerait cependant que cette spécificité soit le cadre général et qu'une espèce, ou une famille d'espèces hôtes, soit préférentiellement, mais pas seulement, infectée par des virus d'un même sous-clade, ces derniers pouvant lui être spécifiques. Par exemple, chez les sturnidés (étourneaux et mainates) seuls des virus CNPV-like du sous-clade B2 ont été isolés, ces derniers n'ayant été par ailleurs que très rarement isolés sur d'autres espèces d'oiseaux (2). Dans certaines circonstances (mélange en captivité de différentes espèces aviaires « exotiques », prédation de proies infectées…) un hôte pourrait aussi être infecté par un virus d'un autre sous-clade voire d'un autre clade et développer des lésions mais ces cas constitueraient des culs-de-sac épidémiologiques. Des auteurs se sont interrogés sur les mécanismes de spéciation et d'adaptation des poxvirus à leurs hôtes et au moins 12 familles de gènes ont été identifiées comme étant impliquées dans la spécificité d'hôte (31). Parmi celles-ci, seules les trois familles de gènes ANK/F-Box (gènes codant pour des protéines à répétitions ankyrine), p28/N1R et Serpin sont retrouvées chez les avipoxvirus. D'autres gènes de spécificité d'hôtes, comme les gènes E3L et K3L du virus de la vaccine, n'ont pas

d'équivalent chez les avipoxvirus. Aucune étude des mécanismes d'adaptation des avipoxvirus à leurs hôtes n'a été réalisée, et seule la comparaison du génome d'une souche de fowlpox atténué (FP9) avec celui d'une souche pathogène (FPVUS) a permis d'émettre quelques hypothèses (12). Après 438 passages sur cellules, la perte chez FP9 de 39% des gènes de la famille ANK/F-Box a permis aux auteurs de suggérer que ces gènes pouvaient jouer un rôle dans l'adaptation du virus à son hôte, rejoignant ainsi les conclusions de travaux menés sur d'autres poxvirus (60,61).

3. Variole aviaire

La variole aviaire a été décrite vers le milieu du 19ème siècle, suite aux premier cas cliniques rapportés dans la littérature et à l'observation au microscope en 1873 par Bollinger de larges inclusions intracytoplasmiques éosinophiles contenant des particules virales typiques de la variole aviaire (les corps de Bollinger) (62,63). Par la suite, plusieurs noms ont été utilisés pour décrire la maladie : épithélioma contagieux, diphtérie aviaire, variola gallinarum. Désormais, le terme variole aviaire (*avian pox*) est largement utilisé bien qu'on puisse encore trouver le terme poxvirose aviaire dans certains articles de vulgarisation.

i. Épidémiologie

Les agents responsables de la variole aviaire sont tous les virus du genre *Avipoxvirus*. La maladie est rapportée sur un grand nombre d'espèces sauvages et domestiques. Des cas de variole aviaire spontanés ont été décrits sur au moins 278 espèces (pour environ 9800 décrites) appartenant à 20 ordres (64). Il est possible que toutes les espèces d'oiseaux soient sensibles aux infections par des avipoxvirus bien que, comme mentionné précédemment, une certaine spécificité d'hôte existe. Une espèce aviaire donnée peut présenter des sensibilités différentes suivant les souches d'avipoxvirus qui l'infectent, et même être réfractaire à certaines souches. Des cas de variole aviaire ont été rapportés sur tous les continents, aussi bien dans des milieux continentaux qu'insulaires (2,45).

La contamination par un avipoxvirus se fait par pénétration du virus dans une brèche cutanée ou lors de son contact avec une muqueuse, les cellules des muqueuses orales, respiratoires supérieures, cloacales et oculaires étant particulièrement sensibles. Si le virus entre au contact d'une peau saine, il ne sera pas capable d'y pénétrer, mais même une faible abrasion lui permettra d'infecter les cellules épithéliales. Les

avipoxvirus sont assez résistants dans le milieu extérieur, particulièrement dans les matières sèches comme les poussières de plume ou les croûtes où ils peuvent rester infectieux de plusieurs mois à plusieurs années (20). Le portage mécanique du virus par divers supports inertes étant possible, la transmission peut s'effectuer par contact entre une plaie ou une muqueuse et un objet contaminé comme du matériel d'élevage ou d'insémination, les mains d'un manipulateur…(64,65) En élevage, le confinement des oiseaux et les fortes densités peuvent générer des aérosols de poussières de plumes qui peuvent être inhalés, provoquant une contamination de l'appareil respiratoire supérieur et l'apparition de lésions diphtériques dans la cavité oro-pharyngée et la trachée (20,64). Dans les autres contextes (oiseaux sauvages, élevages extensifs…), l'apparition de lésions diphtériques sur les muqueuses est moins bien expliquée mais pourrait, par exemple, être due chez les jeunes oiseaux au nourrissage à la main (66).

Toutefois, tous les auteurs s'accordent pour dire que le mode de transmission le plus fréquent se fait par les insectes piqueurs (20,64,66), même si aucune étude épidémiologique n'a permis d'apprécier l'importance relative des différents modes de transmission, et que relativement peu d'auteurs ont étudié expérimentalement le rôle des insectes piqueurs (67–69). Les quelques études, datant de plusieurs dizaines d'années, concluent toutes que les insectes joueraient uniquement un rôle de vecteur mécanique, le virus ne s'y multipliant pas. Pour devenir porteur, les moustiques doivent se nourrir sur la lésion ou à sa proximité immédiate et ils sont capables de transmettre le virus à un nouvel hôte jusqu'à quatre semaines après s'être contaminés (68,69). Au moins 11 espèces de diptères ont été identifiées comme vecteurs possibles (20). Le portage étant mécanique, il est probable qu'un beaucoup plus grand nombre d'espèces, même non piqueuses, puisse l'être également, par exemple en entrant en contact avec une lésion ulcérée puis en se nourrissant sur la plaie d'un individu sain (68).

L'importance du rôle des insectes, et notamment des culicidés, dans l'épidémiologie de la variole aviaire a été surtout démontrée indirectement. Il a par exemple été montré que les variations d'incidence de la variole aviaire étaient souvent saisonnières et qu'elles suivaient les courbes d'abondance de diverses espèces de culicidés (64,70,71). De même, les abondances géographiques de certains vecteurs sont corrélées avec les variations de prévalence de la maladie (71,72). Enfin, d'autres observations, comme la diminution d'incidence lors d'utilisation de volières imprégnées d'insecticides (73), ou les corrélations positives entre hémoparasitisme et présence de

lésions varioliques (72,74), sont aussi en faveur d'un rôle des insectes dans la transmission des avipoxvirus. Ces diverses études ont ainsi permis d'identifier des périodes et circonstances à risque : climat humide et chaud propice aux insectes, forte densité, proximité de gîtes larvaires… Divers facteurs de risque individuels ont aussi été évoqués. Alors que le sexe n'a jamais été identifié comme tel, l'âge peut être un facteur de risque. Plusieurs études rapportent des taux de morbidité ou de mortalité plus importants chez les jeunes oiseaux (73,75), bien que ce ne soit pas systématique (76–79). Une corrélation positive entre variole aviaire et infections par d'autres agents pathogènes est également régulièrement observée. Ces corrélations ont particulièrement été étudiées pour les infections par des plasmodiums et des avipoxvirus sur certains passereaux à Hawaï (74) et en Nouvelle Zélande (80), et sur des pipits de Berthelot (*Anthus berthelotii*) sur les îles de la Macaronésie (81).

La variole aviaire est assez répandue dans les élevages industriels de poulets (*Gallus gallus domesticus*) et surtout de dindes (*Meleagris gallopavo*), et elle persiste voire se répand dans certaines régions, malgré les programmes vaccinaux. Cela a, par exemple, été observé ces dernières années aux États-Unis ou en Chine (20,55). La morbidité est généralement modérée et la mortalité réduite mais peu de données existent quant aux prévalences exactes. Les quelques rapports qui sont publiés font état de taux de morbidité pouvant aller de moins de 1% avec une létalité nulle (82), à 100%, avec une létalité de 100% sur des poulets non vaccinés (55). Sur la volaille de basse-cour, des taux de morbidité de 79% ont été rapportés au Mexique (83) et, au Nigéria, la séroprévalence a été estimée à 23% (84). Sur ces espèces la variole aviaire peut avoir un impact économique par les pertes qu'elle cause mais également par les retards de croissance et les chutes de ponte induits (20).

Lors d'introduction d'avipoxvirus dans des élevages d'oiseaux exotiques, les incidences sont généralement plus élevées, probablement du fait que les oiseaux sont naïfs par rapport à la souche virale introduite. Une morbidité importante sans mortalité peut être notée, comme cela a été observé dans un élevage d'œdicnèmes criards (*Burhinus oedicnemus*) (85), mais souvent une mortalité est associée. Ainsi, un épisode de variole aviaire sur des poussins de paons (*Pavo cristatus*) a permis d'enregistrer des taux de morbidité et de mortalité respectivement de 45% et 27% (73). Dans un élevage d'inséparables à face rose (*Agapornis roseicollis*), les taux de mortalité ont atteint 38% sur les juvéniles sans dépasser 3% chez les adultes (75), et dans un élevage de canaris

(*Serinus canaria*), 65% des individus ont péri lors d'une épizootie (86). À ce titre, la variole aviaire peut être une menace pour le succès d'élevages conservatoires d'espèces menacées, comme cela a été par exemple décrit dans un élevage de faucons pèlerins (*Falco peregrinus*), en Allemagne (23). Dans d'autres contextes de captivité, comme celui des parcs zoologiques et des centres de sauvegarde de la faune sauvage, le mélange et la promiscuité de diverses espèces sont propices à l'apparition d'épizooties de variole aviaire (64,87).

Sur les oiseaux sauvages, la plupart des cas de variole aviaire rapportés sont des observations fortuites de cas ponctuels. Toutefois, plusieurs études ont été menées sur diverses espèces, notamment en milieux insulaires, pour évaluer la prévalence de la maladie et mesurer son impact sur la survie et les succès de reproduction. Dans les environnements où le virus est présent depuis longtemps, une adaptation des espèces hôtes indigènes s'est mise en place, et la variole aviaire est généralement endémique à des prévalences relativement faibles, de l'ordre de 0,5% à 1,5% (64,88). Quelques études rapportent des prévalences plus élevées, de 2% à 6% sur diverses espèces de passereaux (89,90) à 37% sur des colins de Virginie (*Colinus virginianus*) (88) et jusqu'à 100% sur des dindons sauvages à certaines périodes de l'année (70). Récemment, la description en Angleterre d'une épizootie de variole aviaire due à une souche CNPV-like, qui semble s'étendre sur le continent européen et qui concerne exclusivement les mésanges charbonnières (*Parus major*), pose de nombreuses questions quant à l'apparition et à la diffusion de nouvelles souches virales (76,91). Quelques études apportent des éléments de réponse en montrant que les modifications anthropiques des milieux comme l'agriculture (92) et l'urbanisation (93) peuvent jouer un rôle en augmentant artificiellement les densité d'oiseaux (concentration sur les points de nourrissage artificiels) ou en immunodéprimant les individus (stress, utilisation de pesticides…), permettant ainsi à des souches virales de diffuser plus efficacement. Dans les milieux insulaires, les introductions de nouvelles souches virales, de nouvelles espèces d'insectes vecteurs ou d'espèces hôtes non-indigènes représentent des risques majeurs pour les espèces indigènes qui sont généralement naïves vis-à-vis de souches « exotiques », voire parfois vis-à-vis des avipoxvirus en général (64,71). Diverses études menées aux Galápagos (94), à Hawaï (72,74), dans les îles Canaries (79) et en Nouvelle Zélande (80) montrent que les avipoxvirus peuvent largement contaminer certaines espèces et causer leur déclin. Par exemple, des prévalences de 17% à 35% sur diverses

espèces de passereaux à Hawaï et de 50% sur des alouettes pispolettes (*Calandrella rufescens*) dans les îles Canaries ont été notées et sont corrélées à une diminution des populations. La variole aviaire a un impact sur ces espèces en les rendant plus sensibles à la prédation (95) ou à des infections secondaires, en réduisant leur succès de reproduction (96,97) ou en causant leur mort.

ii. Clinique

Les durées d'incubation rapportées pour la variole aviaire sont généralement de quatre à dix jours lors d'infection naturelles, durées confirmées lors d'infections expérimentales. Deux études démontrent pourtant que cette durée peut être beaucoup plus longue allant jusqu'à un mois (38) et même 43 jours lors d'infection expérimentale d'amakihis familiers (*Hemignathus virens*) avec un virus CNPV-like non atténué (98). Les lésions peuvent ensuite persister plusieurs semaines avant une possible guérison spontanée. Un auteur rapporte la persistance de lésions varioliques sur un pic flamboyant (*Colaptes auratus*) pendant 13 mois (99).

La variole aviaire se présente sous trois formes : cutanée (ou sèche), diphtérique (ou humide), et septicémique (Figure 6). La forme cutanée est la plus couramment rencontrée. Elle se manifeste par l'apparition de lésions prolifératives sur les régions cutanées aptères (bec, cire, paupières, crête, barbillons, pattes) (20,64). Ces lésions dues à une hyperplasie des cellules épithéliales se présentent d'abord comme des papules qui deviennent enflammées et grossissent. Des vésicules apparaissent à leur surface et grossissent jusqu'à devenir confluentes puis percer, donnant à la lésion un aspect de masse ulcérée qui va progressivement évoluer vers une masse très vascularisée et couverte d'une croûte plus ou moins volumineuse. En cas d'évolution favorable, la lésion se dessèche progressivement et la croûte tombe, laissant place à du tissu cicatriciel sain (20). La forme diphtérique est la seconde forme la plus courante. Elle peut être observée seule ou en association avec la forme cutanée et se manifeste par l'apparition de lésions diphtériques, généralement sur les muqueuses orales, respiratoires supérieures, cloacales et oculaires. Les lésions se présentent comme des papules enflammées qui grossissent, deviennent confluentes et se couvrent d'une pseudomembrane nécrotique jaunâtre. Le retrait de cette pseudomembrane fait apparaître des ulcères hémorragiques. Les lésions peuvent s'étendre aux sinus et les obstruer (20). La forme septicémique, beaucoup plus rare, est très majoritairement observée chez les canaris. En

élevage, elle se manifeste par des dyspnées soudaines sur une grande partie du cheptel, rapidement suivi par une mortalité importante (>70%) (66). Dans ce cas de figure, des lésions peuvent être observées dans l'appareil respiratoire profond (présence d'exsudats dans la trachée et les sinus, induration des poumons, épaississement des sacs aériens) mais également dans d'autres organes comme le thymus ou le foie (86). Enfin, des localisations atypiques de lésions ont été sporadiquement décrites sur des régions plumées du corps possiblement suite à des lésions de picage (100,101), dans le cloaque suite à des inséminations contaminées (65) et sous forme de lésions pseudo-tumorales sur des os de la face et d'autres parties du corps (75). Microscopiquement, une hypertrophie et une hyperplasie de l'épithélium associées à un processus inflammatoire sont observées. Les cellules infectées apparaissent ballonisées et contiennent des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles caractéristiques (20) (Figure 6).

Les raisons du développement d'une forme de variole aviaire plutôt que d'une autre ne sont pas connues, mais il est certain que la souche virale et la sensibilité de l'hôte sont des facteurs déterminants. Les infections expérimentales utilisant une inoculation transcutanée ou intradermique ont très majoritairement échoué à induire des lésions à distance du point d'inoculation. En revanche, une étude ayant utilisé un inoculation par voie intraveineuse a permis d'induire une forme cutanée avec de multiples lésions et d'objectiver une virémie entre trois et sept jours post-infection (102). La morbidité et la mortalité lors de variole aviaire sont dues à la gêne physique occasionnée par les lésions : locomotion altérée lors de forme cutanée, difficulté de préhension des aliments et obstruction des voies digestive et aériennes supérieures lors de forme diphtérique, cette dernière étant par conséquent plus débilitante (20,64).

Les lésions de variole aviaire, bien que relativement caractéristiques, ne suffisent pas à confirmer le diagnostic de la maladie, d'autres maladies pouvant induire des lésions relativement similaires : abcès, infections par des papillomavirus, parasitoses externes ou tumeurs pour la forme cutanée (103), et candidose, capillariose, carence en vitamine A ou trichomonose pour la forme diphtérique (64). Les examens de choix pour confirmer un cas de variole aviaire sont classiquement : (i) l'histologie qui permet, après coloration par la méthode de Gimenez (104) ou par le colorant de Wright, la visualisation des corps de Bollinger dans les cellules épithéliales infectées, (ii) la microscopie électronique et (iii) l'isolement du virus sur CAM ou sur cellules. Des méthodes moléculaire permettent maintenant un diagnostic beaucoup plus rapide :

polymorphisme de taille des fragments de restriction, utilisation de sonde ADN, PCR (réaction en chaîne par polymérase) et PCR quantitative (20,64). L'amplification du locus P4b (cf. p7) est désormais l'outil le plus utilisé pour confirmer le diagnostic de variole aviaire. Ce locus offre l'avantage de pouvoir être amplifié pour la très grande majorité des souches d'avipoxvirus (2,42), mais il est nécessaire de séquencer l'amplicon pour préciser la souche virale alors que le locus fpv140 permet une discrimination par la taille sur gel entre les virus CNPV-like et FWPV-like (1).

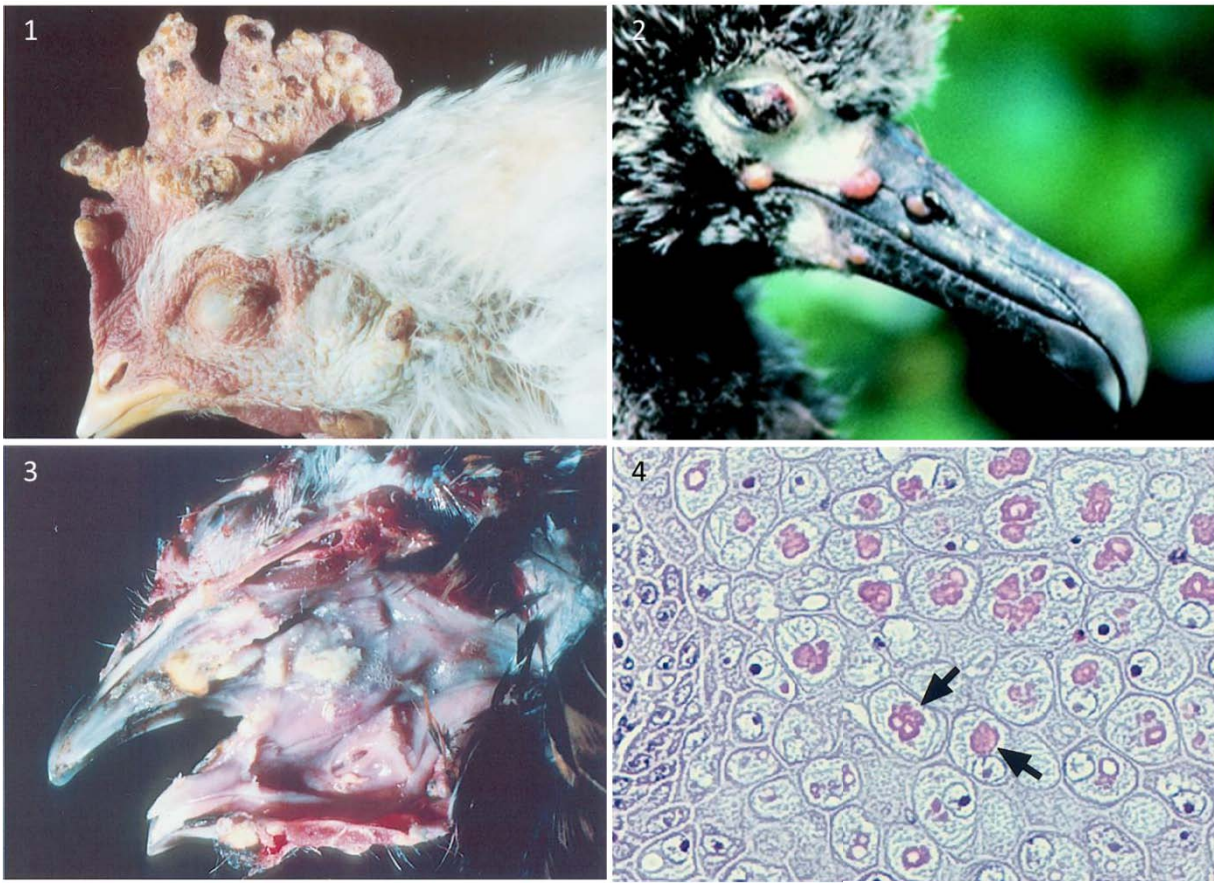

Figure 6. Lésions de variole aviaire : formes cutanées (1 et 2) et diphtérique (3), cellules ballonisées contenant des inclusions intracytoplasmiques éosinophiles caractéristiques (4), d'après Friend *et al.* 1999 (105) et Tripathy *et al.* 2013 (20).

Le diagnostic immunologique de la variole aviaire est également possible et c'est surtout la réponse humorale qui est mesurée. Divers outils, aucun n'ayant été commercialisés, ont été développés et utilisés dans le cadre d'études de protections croisées entre souches virales ou pour évaluer des séroprévalences : immunodiffusion sur gel d'agarose, séroneutralisation virale et divers ELISA indirects ou compétitifs (19,20,57,80,106,107). Parmi ces nombreuses études, peu se sont intéressées à la cinétique de la production en anticorps. Des infections expérimentales ont montré que

des anticorps circulants sont détectables dès une à deux semaines post-infection et que leur taux atteint un pic vers quatre semaines post-infection (19,108) ou continue à augmenter plusieurs semaines de suite (109). La détection d'anticorps est possible jusqu'à au moins 30 semaines post-infection (109). La réponse humorale dépend de la souche virale utilisée et au moins une étude montre que la présence de séquence intégrale de REV dans des souches FWPV-like modulerait cette réponse (56). Il n'y a pas d'évidence dans la littérature qu'un transfert d'immunité in-ovo puisse exister. Très peu d'études se sont intéressées à la réponse cellulaire pourtant considérée comme importante lors de variole aviaire (20). Une étude expérimentale a montré une réponse lymphoprolifération entre deux et quatre semaines post-infection (110), mais une autre étude sur des poussins de un jour a montré, au contraire, une diminution de la réponse lymphocytaire dès une semaine post-infection, les auteurs suggérant que la présence de séquences intégrales de REV dans les souches soit la cause de l'immunodépression (19). Il semblerait qu'une immunité protectrice cellulaire ou humorale puisse dans certains cas perdurer jusqu'à un an post-infection (66) et on ne sait pas si un individu peut rester porteur du virus sans présenter de signes d'infection.

Lors de forme cutanée de variole aviaire, un traitement de l'oiseau peut être entrepris, consistant en l'exérèse des lésions et leur cautérisation avec de la povidine iodée ou à l'azote liquide par exemple (64). Il est plus difficile d'agir lors de lésions diphtérique, mais un traitement de support peut être administré : antibiotiques locaux ou systémiques contre les surinfections et supplémentation en vitamine A afin de favoriser la cicatrisation des épithéliums. En cas d'épizootie ou de présence endémique de variole aviaire dans un élevage, un nettoyage et une désinfection de l'environnement et des équipements doivent être effectués, des mesures de lutte contre les vecteurs entreprises et les oiseaux infectés doivent être isolés.

La prévention de la variole aviaire passe également par la vaccination qui est pratiquée depuis plus de 70 ans. Des vaccins composés de souches de fowlpox virus et pigeonpox virus ont largement été utilisés pour vacciner des élevages de poulets et de dindes en zone d'endémie, et des vaccins composés de souches de canarypox virus ont été utilisés dans des élevages de canaris. Tous sont des vaccins vivants atténués sur CAM ou cellules et administrés généralement par transfixion de la membrane alaire (ou patagium). Leur administration induit une forme bénigne de la maladie et la prise vaccinale est évaluée par l'apparition d'un gonflement ou d'une petite croûte (*take*) au

point d'inoculation, sept à dix jours après la vaccination (111). Une mauvaise administration du vaccin, comme son application sur une muqueuse, peut provoquer l'apparition d'une forme plus grave de la maladie. L'immunité conférée peut durer entre six et douze mois (20).

Depuis quelques dizaines d'années des épizooties de variole aviaire sont notées dans des élevages de poulets et de dindes vaccinés. Ces échecs vaccinaux sont attribués à la présence de séquences complètes de REV dans les génomes des souches virulentes alors que ces séquences sont absentes dans les souches vaccinales, probablement suite à l'adaptation du virus lors de son atténuation sur cellule (17,18,55,56). Sur les espèces « exotiques », la vaccination doit être entreprise avec beaucoup de prudence car se pose la question de l'innocuité de la souche vaccinale et de la protection croisée qu'elle offre vis-à-vis d'une infection par une souche antigénétiquement différente (64). Une étude expérimentale a montré qu'une souche vaccinale du sous-clade B1 (virus CNPV-like) provoquait des formes sévères de la maladie pouvant aller jusqu'à la mort sur des amakihis familiers. Sur les oiseaux immunisés ayant survécu, la protection s'est montrée efficace lors d'infection avec une souche génétiquement très proche de la souche vaccinale mais a échoué quand une autre souche du sous-clade B1 plus différente était utilisée (112). D'autres études de protection croisée ont été réalisées utilisant divers modèles aviaires et divers virus et leurs conclusions sont contradictoires. Alors que la plupart ne montrent pas d'immunité croisée entre virus de clades différents voire au sein d'un même clade (25,39,56), au moins une étude récente conclut à une protection croisée entre une souche CNPV-like et une souche FWPV-like (108).

B. L'Outarde houbara

1. Taxonomie et distribution

L'Outarde houbara est une espèce paléarctique appartenant à l'ordre des *Otidiformes* et à la famille des *Otididae* (113). Longtemps considéré comme ne comprenant qu'une seule espèce divisée en trois sous-espèces, le genre *Chlamydotis* est désormais scindé en deux espèces distinctes, sur la base de critères génétiques et comportementaux (114–117) (Figure 7) : l'Outarde houbara asiatique ou Outarde de Macqueen (*Chlamydotis macqueenii*) (118), dont l'aire de répartition s'étend de la vallée du Nil, en Égypte, au désert de Gobi, en Chine, et l'Outarde houbara nord-africaine (*Chlamydotis undulata*), elle-même divisée en deux sous-espèces : *C. undulata undulata* (119) dont l'aire de répartition s'étend de la Mauritanie à l'Égypte et *C. undulata fuerteventurae* (120) endémique des îles Canaries en Espagne. Dans la suite du manuscrit, les termes « outarde » et « outarde houbara » font référence, sauf mention contraire, aux deux espèces du genre *Chlamydotis*.



Figure 7. Outarde houbara nord-africaine (*C. undulata*) à gauche et Outarde houbara asiatique (*C. macqueenii*) à droite. © IFHC

2. Biologie

L'Outarde est un oiseau adapté aux environnements désertiques, qui se distribue dans l'ensemble des régions arides à semi-arides (entre 50 et 400 mm de précipitations

annuelles) (121) de son aire de répartition. Elle est retrouvée des plaines côtières aux hauts plateaux et fréquente généralement les régions à faible densité humaine (122).

L'Outarde est qualifiée d'omnivore et d'opportuniste, se nourrissant d'une grande variété de végétaux, d'invertébrés et plus rarement de petits vertébrés. Son régime alimentaire s'adapte aux variations locales et saisonnières des ressources (123,124). Ainsi, durant l'hiver, les plantes constituent la part principale du régime tant chez l'espèce asiatique (124,125) que chez l'espèce africaine (126). L'opportunisme de ces oiseaux peut les conduire à se nourrir dans des champs de céréales et de légumineuses (127,128) notamment lorsque les ressources naturelles sont très pauvres.

Le système socio-sexuel de l'Outarde est un système de type lek diffus[4] (129,130) et seules les femelles prennent part à l'élevage des jeunes. La saison de reproduction de l'Outarde est longue. Les mâles commencent à parader en janvier et les femelles initient les pontes quelques semaines plus tard. Les périodes de ponte varient selon les régions. Alors qu'en Afrique du Nord les femelles peuvent pondre de février à juin (131), les périodes de ponte sont plus courtes pour les populations migratrices d'Asie, s'étalant de mars à mai. En Oman, elles peuvent durer d'octobre à mai suivant les années (132). Les pontes sont généralement composées de 2 à 3 œufs chez l'espèce africaine et de 3 à 4 œufs chez l'espèce asiatique (132). Les pontes de remplacement sont fréquentes et, en cas de conditions environnementales propices, certaines femelles peuvent élever deux couvées successives (129). Les œufs, pondus à même le sol dans une simple dépression, sont couvés par la femelle seule pendant 22 à 24 jours (131). Les poussins nidifuges sont nourris au bec par la mère durant les premiers jours et ils restent avec celle-ci pendant environ trois mois, bien qu'étant capables de voler dès l'âge d'un mois (123,132).

L'Outarde présente un comportement grégaire en période inter-nuptiale formant généralement de petits groupes de deux à dix individus souvent peu denses (121). De récentes études ont montré que l'espèce africaine, qui était encore considérée il y a quelques années comme sédentaire, pouvait être qualifiée de migratrice partielle (129). Ses mouvements sont différents suivant le sexe et la saison. Les femelles, caractérisées par un domaine vital multimodal, sont capables de parcourir plusieurs centaines de kilomètres entre les sites de reproduction et d'hivernage alors que les mâles sont

[4] Un lek est un agrégat de males reproducteurs que les femelles visitent dans l'unique but de fertiliser leurs œufs. Le terme diffus caractérise les leks pour lesquels les distances inter-mâles sont élevées.

majoritairement sédentaires avec un domaine vital unimodal (130). Les jeunes oiseaux présentent des mouvements de dispersion variables, en fonction notamment de leur condition corporelle et de facteurs climatiques (133,134). L'espèce asiatique présente un schéma de migration plus complexe puisque seules les populations du nord de l'Asie (du Kazakhstan à la Mongolie) migrent. Les populations se reproduisant à l'ouest du Kazakhstan contournent la mer Caspienne et hivernent en Iran, en Irak et au nord de l'Arabie Saoudite alors que celles se reproduisant plus à l'est traversent le Turkménistan, l'Ouzbékistan et le nord-ouest de l'Inde pour hiverner en Afghanistan, en Iran, au Pakistan et dans la péninsule Arabe. (135,136). Toutefois, des populations résidentes existent dans la plupart des pays d'Asie centrale ainsi que dans certains pays du Moyen Orient et de la péninsule arabe, conduisant ainsi des populations migratrices et sédentaires à se côtoyer à certaines périodes de l'année.

Très peu d'informations sur les agents pathogènes présents chez les outardes sauvages existent et les rares données disponibles sont généralement des observations ponctuelles réalisées lors d'études en écologie ou lors de suivi des chasses des fauconniers arabes. L'imputation de mortalité à des maladies infectieuses est difficile à objectiver car les cadavres sont souvent trouvés en mauvais état, plusieurs jours après le décès de l'oiseau. Ainsi, seules les causes de mortalité évidentes (prédation, électrocution, trafic) peuvent être déterminées. Les maladies virales et bactériennes ont été très peu explorées sur les outardes sauvages. Une seule étude portant sur six outardes asiatiques capturées pour être équipées d'émetteurs satellites a permis de détecter des anticorps anti-avipoxvirus sur un oiseau et des anticorps anti-paramyxovirus de type 1 sur un autre, mais aucun virus n'a pu être isolé (137). Des études sur le parasitisme d'individus sauvages ont montré que les oiseaux sont largement parasités par différentes espèces d'helminthes (138,139), certaines étant à priori propres à l'Outarde (140).

3. Conservation

Les densités d'outardes sont mal connues et seules des informations parcellaires existent. En 2014, selon BirdLife International, la population asiatique était estimée entre 79000 et 97000 individus, plus de la moitié des oiseaux se reproduisant dans le sud du Kazakhstan (114). L'état des populations de cette espèce est également mal connu et les données les plus fiables viennent d'études menées au Kazakhstan et qui

permettent d'estimer la diminution des effectifs dans le pays entre 26 et 36% de 2000 à 2009 (141), avec cependant de fortes disparités géographiques, certaines zones ayant paradoxalement connu une augmentation des populations. Plus généralement, les taux de déclin actuels sont estimés autour de 25% pour la population occidentale de l'espèce asiatique et entre 40 à 50% pour sa population orientale (142). Au milieu des années 1990, la population de l'espèce africaine était estimée à 9800 individus (143) principalement distribués en Algérie au Maroc. Le déclin de cette espèce a été estimé autour de 25% entre 1984 et 2004 (142), mais grâce aux efforts de conservation mis en œuvre au Maroc les populations ont tendance à augmenter localement ces dernières années à un taux estimé entre 1 et 10%. Malgré cela, l'espèce africaine, comme l'espèce asiatique (144), reste classée comme vulnérable sur la liste rouge de l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) et figure en annexe I de la Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction (CITES), ceci car les tendances à l'échelle de l'Afrique du Nord sont encore mal connues et parce que l'impact des efforts de conservation reste à évaluer à long terme (145).

De nombreux facteurs expliquent le déclin généralisé des populations d'outardes. Les principales causes sont la chasse intensive, le braconnage et la dégradation des habitats (114,146–148). La chasse au faucon est pratiquée par les peuples arabes depuis plusieurs siècles, quand l'outarde constituait une source de subsistance pour les peuples nomades. L'attachement à cette tradition est resté fort dans les pays arabes du Golfe et l'intensification de la chasse sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'outarde à la faveur de moyens logistiques plus accessibles en font la principale menace pour les populations d'outardes (114). Une autre conséquence de l'intensification de la chasse est le besoin important d'outardes qu'ont les fauconniers pour entraîner leurs faucons. Cette demande se traduit par un fort braconnage et un trafic d'oiseaux, principalement depuis le Pakistan et l'Iran vers les pays du Golfe. Dans les années 1980, il était estimé que jusqu'à 2000 outardes pouvaient être vendues annuellement aux Émirats Arabes Unis (EAU) (146). La chasse et le braconnage seraient ainsi responsables de plus de 70% de la mortalité observée sur certaines zones d'hivernage (149). La dégradation des habitats a également une conséquence importante sur les populations d'outardes. Ainsi, le surpâturage modifie la disponibilité en ressources animales et végétales, provoque un dérangement des femelles pendant

l'incubation et réduit le couvert végétal. Aux Émirats Arabes Unis, la dégradation des habitats pourrait être à l'origine de l'absence d'observations récentes d'oiseaux hivernant (135).

Face au déclin des populations sauvages d'outardes, des programmes de conservation ont été développés depuis quelques dizaines d'années. Le premier projet a été créé en 1986 au National Wildlife Research Center (NWRC) à Taïf, en Arabie Saoudite et le développement d'autres projets a suivi en Afrique du Nord, au Moyen Orient et en Asie centrale. Afin de fédérer et d'unir les efforts de recherche et de conservation de l'Outarde menés par divers projets, le Cheikh Mohammed bin Zayed al Nahyan, prince héritier d'Abou Dhabi fonde l'International Fund for Houbara Conservation (IFHC) en 2006. Les objectifs de l'IFHC sont la protection des populations d'outardes, la prise de conscience de leur fragilité et la mise en œuvre d'efforts de conservation sur l'ensemble de leurs aires de répartition via une coopération internationale (150). Actuellement l'IFHC finance quatre projets de conservation :

- Le National Avian Research Center (NARC) aux Émirats Arabes Unis, créé en 1989 ;
- L'Emirates Center for Wildlife Propagation (ECWP) au Maroc, créé en 1995 ;
- Le Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center au Kazakhstan (SKHBC-KZ), créé en 2008 ;
- Le Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center aux Émirats Arabes Unis (SKHBC-AD), créé en 2012.

L'IFHC a confié la gestion de ses projets à la société RENECO for Wildlife Preservation, fondée en 1986 pour apporter une expertise technique et scientifique à la conservation de l'Outarde. En plus de ces quatre projets, la société RENECO gère également deux projets financés par d'autres bailleurs de fonds arabes :

- L'Emirates Centre for Houbara Conservation (ECCH) en Ouzbékistan, fondé en 2007 par le Sheikh Mohammed Bin Rashid Al Maktum, prince héritier de Dubaï ;
- Le Rawdat Al Faras Houbara Breeding Center (RAF-HBC) au Qatar, crée en 2013 et financé par le Qatar.

Ces six projets ont été étudiés dans le présent travail (Figure 8).

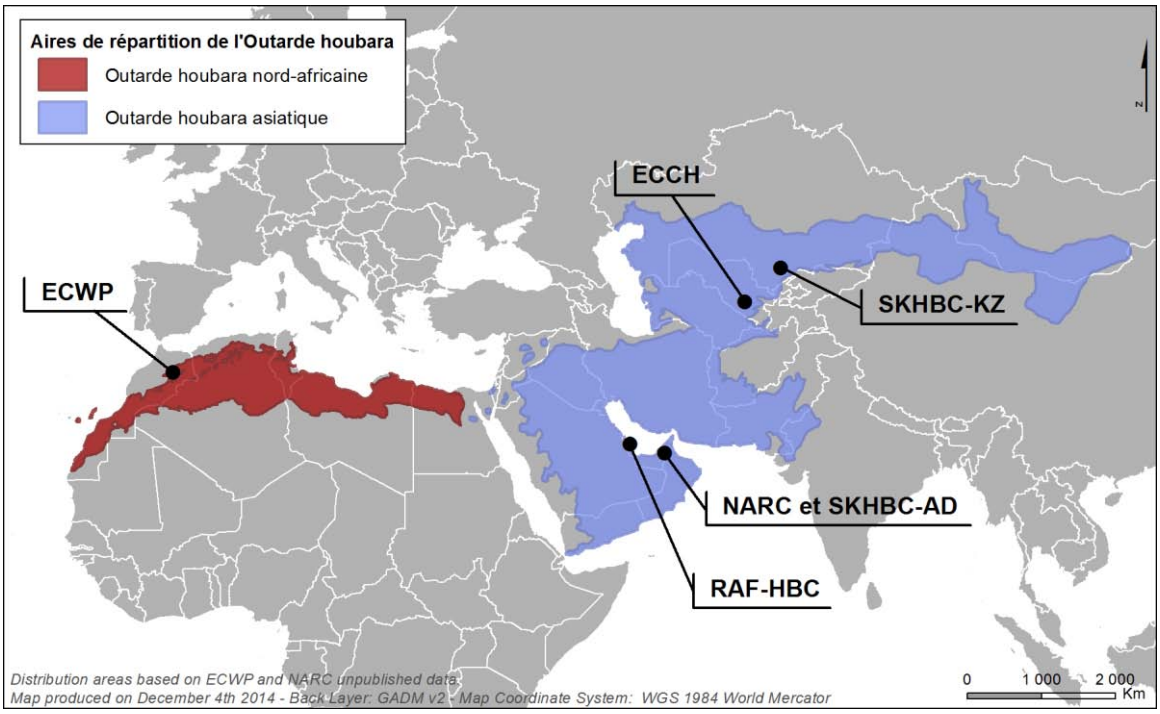

Figure 8. Aires de répartition des deux espèces d'Outarde houbara et distribution des projets de conservation étudiés.

RENECO s'efforce de mener une stratégie de conservation cohérente sur l'ensemble des projets dont elle a la gestion. Cette stratégie a d'abord été développée à l'ECWP avec l'objectif principal de permettre le maintien de populations viables d'outardes dans l'Oriental marocain, compatible avec la persistance d'une chasse traditionnelle, sous couvert d'une gestion cohérente des populations (151). Les quatre axes majeurs de cette stratégie, qui suivent les recommandations de l'IUCN (152) relatives à la réintroduction et au renforcement des populations, sont :

1. Entreprendre des recherches sur le terrain pour acquérir les connaissances essentielles à la biologie des espèces et évaluer la distribution des populations et leur statut.
2. Maintenir une population captive viable capable de produire des individus susceptibles d'être relâchés, tout en maintenant le potentiel génétique initial.
3. Identifier les zones favorables à la création de réserves naturelles et au renforcement des populations existantes.
4. Renforcer les populations sauvages par des relâchers réguliers.

Les autres projets gérés par RENECO s'appuient sur cette stratégie pour se développer et mener à bien la conservation de l'Outarde dans les régions où ils sont

implantés. Par ailleurs, dans les pays où la communauté de fauconniers est importante, un axe supplémentaire s'ajoute, qui consiste à lutter contre le braconnage et le trafic illégal d'outardes par la mise à disposition pour les fauconniers d'outardes issues d'élevage et destinées à l'entraînement des faucons. Depuis leur création, ces projets ont permis de relâcher 99302 outardes africaines et 37071 outardes asiatiques. Au Maroc, un taux de survie relativement important (plus de 50% de survie un an après le relâcher) (153) et la capacité des oiseaux et à se reproduire dans la nature, combinée aux mesures de protection des populations (gestion de la chasse), ont permis de rétablir des populations viables au sein des zones d'intervention de l'ECWP. Les relâchers effectués par les autres projets sont encore trop récents pour évaluer correctement leur impact.

4. Élevage

Des élevages d'outardes ont été développés dans les six projets de conservation susmentionnés. Les caractéristiques de ces élevages en termes d'effectif et de production d'oiseaux sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des élevages conservatoires d'outardes houbara.

Projet	Pays	Date de création	Espèce reproduite	Reproducteurs présents en 2014	Poussins produits en 2014
NARC	EAU	1989	*C. macqueenii*	9211	23680
SKHBC-AD		2012			
ECWP[1]	Maroc	1995	*C. undulata*[2]	9276	20109
ECCH	Ouzbékistan	2007	*C. macqueenii*	1653	1153
SKHBC-KZ	Kazakhstan	2008	*C. macqueenii*	1625	1253
RAF-HBC	Qatar	2013	*C. macqueenii*	1395	1272

[1] l'ECWP est constitué de deux sites d'élevage : Enjil et Missour, distants de 50 km.
[2] *C. macqueenii* a également été élevée et reproduite à ECWP de 2006 à 2012 afin de constituer un stock de reproducteurs transféré intégralement aux Émirats Arabes Unis en 2012.

Les élevages sont implantés dans des pays de l'aire de répartition de l'Outarde et, à l'exception du projet kazakh, sur des zones où des populations d'outardes sont présentes naturellement. Ils sont tous construits dans des zones désertiques (NARC, RAF-HBC et SKHBC-AD) dont la végétation est extrêmement clairsemée ou dans des zones steppiques (ECWP, ECCH et SKHBC-KZ) dont la végétation est rase et éparse (Figure 9). Les climats de ces zones sont qualifiés de semi-aride à aride et les élevages

sont construits dans des zones à très faible densité humaine et loin des grandes agglomérations.

La mise en défens systématique des sites ainsi que les modifications anthropiques liées à leurs aménagements (zone d'irrigation, de détente pour le personnel résident, cultures de luzerne pour nourrir les outardes…) ont permis à la végétation de se développer et de former un couvert plus dense qu'à l'extérieur des sites, offrant des ressources et des zones de refuge et de reproduction à diverses espèces animales, vertébrées et invertébrées.



Figure 9. Photo aérienne du site d'Enjil, à l'ECWP, au Maroc. ©ECWP

Les sites sont conçus avec toutes les infrastructures nécessaires à une certaine autonomie et différentes zones peuvent y être distinguées : les zones administratives et logistiques (bureaux, garages, buanderies), les zones privatives et récréatives (logement du personnel, restaurants, lieux de détentes, jardins…) et enfin les zones d'élevage (bâtiments et unités d'élevage, incubation, clinique, laboratoire, élevages d'insectes et cultures de luzerne). Les structures d'élevage à proprement parler sont divisées géographiquement et fonctionnellement en unités dédiées chacune à des phases d'élevages et des filières différentes. Suivant l'unité d'élevage et le site, les oiseaux peuvent être hébergés en bâtiment ou à l'extérieur, dans des batteries, des cages ou des

grandes volières extérieures (Figure 10). D'une manière générale, les juvéniles[5] sont élevés par groupe de 6 à 12 individus dans des cages ou des volières et les adultes[6] individuellement dans des batteries ou des cages. Les densités d'oiseaux dans les unités d'élevage restent relativement faibles par rapport à ce qui est observé en élevage avicole classique.



Figure 10. Cages de reproducteurs en extérieur (1) et en bâtiment (2), batteries de reproducteurs (3), volières pour la préparation des oiseaux au relâcher (4). ©ECWP et IFHC

Les populations captives de chaque projet sont issues de populations fondatrices constituées suite à des collectes d'œufs autorisées et réalisées plusieurs années de suite en Algérie et au Maroc pour l'ECWP, au Pakistan, en Iran, au Yémen et au Kazakhstan pour le NARC, le RAF-HBC et le SKHBC-AD, au Kazakhstan pour le SKHBC-AD et en Ouzbékistan pour l'ECCH. La gestion génétique de ces populations captives vise à maximiser la représentation des fondateurs. En d'autres termes, tous les efforts sont faits pour éviter la sélection de certains génotypes et pour préserver la diversité génétique d'origine (154). À partir de ces populations fondatrices, la première phase de

[5] Le terme juvénile désigne ici un oiseau depuis sa naissance jusqu'à son relâcher dans la nature ou, pour un oiseau destiné à être reproducteur, à son transfert dans le stock de reproducteurs, ceci correspondant à un âge moyen de 9 mois.

[6] Le terme adulte désigne ici un oiseau qui a quitté la phase juvénile.

développement des projets de conservation a été d'augmenter la population captive afin d'obtenir, en un nombre limité de générations, un nombre suffisant de reproducteurs captifs permettant une production importante d'oiseaux destinés à renforcer les populations sauvages. Cette phase, toujours en cours au SKHBC-KZ et à l'ECCH, est terminée à l'ECWP, au NARC, au RAF-HBC et au SKHBC-AD qui produisent désormais un surplus important d'individus destinés à renforcer les populations sauvages et dans une moindre mesure à être donnés aux fauconniers afin de lutter contre le braconnage et le trafic d'oiseaux sauvages.

Afin d'optimiser la gestion génétique et la reproduction des outardes en captivité, des techniques de reproduction et d'élevage artificiels sont utilisées (123). Durant la saison de reproduction, qui s'étale de janvier à juin, la semence des mâles est collectée et analysée avant d'être utilisée pour inséminer des femelles. Les œufs pondus sont prélevés et incubés artificiellement afin de provoquer chez la femelle une ponte de remplacement. Cette technique permet une production de quatre à cinq pontes par saison de reproduction, le pic de ponte étant observé entre avril et mai suivant les sites. Les poussins sont ensuite élevés à la main suivant un protocole adapté à leur devenir :

- Oiseaux destinés à renforcer les populations sauvages : ils sont élevés avec pour objectif d'être relâchés dans la nature entre les âges de trois mois et d'un an tout en ayant des chances de survie maximales. Pour ce faire, le contact avec ces oiseaux est limité au maximum et tout le protocole d'élevage est orienté vers l'acquisition d'un comportement sauvage, l'apprentissage de la recherche de nourriture, et une habituation physiologique à l'absence de source d'eau libre. Ces oiseaux sont, dès l'âge d'un mois, placés par petits groupes dans de grandes volières extérieures sur sol naturel et avec une intervention humaine limitée. Les oiseaux destinés à être donnés aux fauconniers pour l'entraînement de leurs oiseaux sont élevés selon ce même protocole.
- Oiseaux destinés à renouveler le cheptel de reproducteurs captifs : ils reçoivent dès leur éclosion une imprégnation forte et sont habitués à la présence humaine. L'objectif est d'habituer ces oiseaux aux conditions de captivité et de les rendre aptes à la reproduction artificielle. Ces oiseaux sont constamment maintenus en cage ou batterie, sur litière artificielle et les interventions humaines sont importantes.

L'élevage des poussins à la main durant les premières semaines de vie ainsi que la gestion artificielle de la reproduction et de l'incubation impliquent un nombre très important d'intervenants sur la plupart des phases d'élevage. À titre d'exemple, ECWP a employé pendant le premier semestre 2014 plus de 650 personnes dédiées uniquement à l'élevage des oiseaux. Malgré le grand nombre de reproducteurs maintenus en captivité et la production importante de poussins sur chaque projet, les oiseaux sont tous suivis individuellement. Chaque individu a un identifiant qui lui est propre et toutes les données relatives à sa croissance, ses performances de reproduction, ses déplacements et son état de santé sont collectées selon des protocoles stricts, et archivées dans une base informatique dédiée.

5. Gestion sanitaire

Depuis la création du premier projet de conservation en 1986 en Arabie Saoudite, diverses maladies des outardes en captivité ont été décrites et ont fait l'objet d'assez nombreuses publications (137,155–160). Il est admis que les outardes, lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions de captivité adéquates, sont davantage sujettes aux traumatismes et maladies métaboliques qu'aux maladies infectieuses (137,155,159). Ainsi en 2013 au NARC et au SKHBC-AD, les maladies infectieuses ne comptaient chez les juvéniles et les adultes reproducteurs que pour 26% des diagnostics ante-mortem établis (161) ; à ECWP ces taux étaient respectivement de 13% chez les juvéniles et 20% chez les adultes reproducteurs (162). Parmi les causes infectieuses, une large majorité est attribuable à des infections bactériennes secondaires (colibacilloses, infections à *Enterococcus* spp. et à *Staphyloccocus* spp., salmonelloses dues à des sérovars autres que *Salmonella* Pullorum/Gallinarum…) et les infections primaires, qu'elles soient virales ou bactériennes, sont en général relativement rares.

Cependant, à certaines occasions, les maladies infectieuses peuvent provoquer une morbidité et une mortalité très importantes sur des outardes captives ou présenter un risque majeur pour les projets de conservation. Trois cas de figure sont à considérer. Le premier, qui est décrit depuis longtemps, concerne les oiseaux issus du braconnage et du trafic illégal (137,155). Transportés et maintenus dans des conditions sanitaires pauvres, au contact d'autres espèces aviaires, et soumis à un stress important, ces oiseaux deviennent particulièrement sensibles à diverses maladies, la maladie de Newcastle et la variole aviaire étant les plus communément décrites (163). C'est

d'ailleurs sur un groupe d'outardes asiatiques illégalement importés en Arabie Saoudite pour l'entraînement de faucons qu'ont été décrits les seuls cas d'influenza aviaire hautement pathogènes à H5N1 sur cette espèce (164). Le second cas de figure concerne l'introduction d'agents infectieux dans des lots d'oiseaux captifs particulièrement sensibles, généralement des poussins. Ainsi en 2012, l'introduction d'origine inconnue d'une souche de *Salmonella* Enteritidis sur un lot de poussins à l'éclosion à NARC a provoqué la mort de plus de 45% des poussins durant leurs deux premières semaines de vie (165). Enfin le troisième cas de figure, plus spéculatif mais devant être pris en considération, concerne l'apparition de manquements ou de défauts dans les mesures de biosécurité, et ce particulièrement lors d'augmentation de taille et d'intensification des élevages. Dans cette situation des agents infectieux, même modérément pathogènes, pourraient pénétrer, disséminer et persister au sein des élevages. Cette dernière situation est d'autant plus préoccupante que la grande majorité des données acquises sur les outardes l'ont été sur des effectifs limités, ne permettant pas une évaluation correcte de l'impact potentiel de ces maladies et l'obtention de données épidémiologiques solides. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'aucune étude épidémiologique n'a été publiée sur l'Outarde, la plupart des publications ne faisant que rapporter des cas cliniques sur de petits groupes d'individus.

Afin de prévenir l'introduction, l'apparition et la persistance de maladies infectieuses dans les élevages conservatoires, une stratégie sanitaire a été définie et est appliquée et régulièrement évaluée sur les sites d'élevage. Cette stratégie s'appuie sur deux axes principaux.

i. Épidémiosurveillance

Un programme d'épidémiosurveillance est mis en place avec pour objectifs d'évaluer les risques sanitaires auxquels sont exposés les élevages, de détecter précocement l'apparition de maladies et de démontrer l'absence ou à défaut d'évaluer l'importance de certaines maladies dans les élevages. Ce programme est appliqué sur les oiseaux captifs, l'avifaune sauvage et à terme la volaille domestique, ainsi que sur l'environnement (infrastructures, aliments, eau, personnel). Divers outils sont utilisés pour répondre à ces objectifs :

- Programme de dépistage et surveillance évènementielle ciblant les principales maladies infectieuses avérées ou potentiellement

préoccupantes chez l'Outarde (maladie de Newcastle, variole aviaire, influenza aviaire hautement pathogène, mycoplasmoses, salmonelloses, mycobactérioses aviaires).

- surveillance non spécifique reposant sur l'analyse des bases de données et le calcul de différents indicateurs (taux de morbidité et mortalité, distribution des diagnostics…) et sur la réalisation d'hygiènogrammes sur l'environnement.
- Développement de laboratoires in-situ et création d'un réseau de laboratoires partenaires permettant d'une part de réaliser les analyses prévues par les programmes et d'autre part d'explorer efficacement toute anomalie détectée.

ii. Prophylaxie

La prophylaxie appliquée sur les sites d'élevage vise à limiter l'introduction, la dissémination et la persistance d'agents pathogènes pour l'Outarde. Afin de répondre à ces objectifs, différentes mesures sont mises en place. La conception et l'organisation des élevages permettent de définir des unités épidémiologiques regroupant les oiseaux par filières et catégories d'âge. Ces unités sont séparées géographiquement et possèdent chacune du personnel et du matériel dédié. Leur accès se fait via des vestiaires et l'utilisation de vêtements spécifiques. Chaque unité est elle-même divisée en sous-unités hébergeant un nombre plus limité d'oiseaux et offrant ainsi la possibilité de confiner une zone contaminée. Les flux d'oiseaux, de matériel, de personnel et des divers extrants (déchets, litières sales, cadavres…) sont identifiés et contrôlés entre unités et sous-unités et à l'interface élevage / extérieur. Ces flux sont contrôlés via l'application de marches en avant, l'utilisation de sas, de véhicules dédiés et l'application de mesures de désinfection aux interfaces entre unités. L'utilisation de protocoles de nettoyage et désinfection, un programme de lutte contre les espèces nuisibles, l'application de vides sanitaires réguliers et des efforts pour limiter l'accès aux infrastructures à l'avifaune sauvage complètent ces mesures.

À cette prophylaxie sanitaire, s'ajoute un programme de prophylaxie médicale ciblant la maladie de Newcastle, la variole aviaire et les helminthoses intestinales. Tous les juvéniles reçoivent une première vaccination et un premier traitement antiparasitaire à l'âge d'un mois puis un rappel à deux mois. Un rappel annuel est

administré à tous les reproducteurs (juvéniles et adultes) en fin d'année. La vaccination contre la maladie de Newcastle utilise un vaccin vivant atténué (souche HB1) ou inactivé, suivant le projet, pour la primo-vaccination puis uniquement un vaccin inactivé pour les rappels de primo-vaccination et annuels. Pour la vaccination contre la variole aviaire, un vaccin vivant atténué (souche canarypox virus KP) est utilisé pour toutes les vaccinations. Enfin, les molécules utilisées pour les traitements antiparasitaires dépendent des contextes locaux à chaque projet et sont choisies en fonction des parasitismes rencontrés.

6. Variole aviaire et Outarde houbara

Le premier cas de variole aviaire sur une outarde a été décrit dans un élevage conservatoire en Arabie Saoudite en 1989 (166). L'oiseau infecté, âgé de trois mois, présentait des lésions diphtériques dans la cavité orale et la trachée et une congestion trachéale, pulmonaire, hépatique et splénique. Un avipoxvirus a été isolé par culture sur CAM à partir des lésions trachéales et un paramyxovirus aviaire de type 1 été isolé sur œuf embryonné à partir des lésions pulmonaires et spléniques. Des coïnfections bactériennes ont également été notées sur cet oiseau. L'auteur conclut qu'il s'agit du premier cas de coïnfection variole aviaire / maladie de Newcastle et de la première description de cette forme de variole aviaire sur une outarde. Il rapporte cependant que des cas de variole aviaire cutanée ont toujours été observés dans l'élevage sous forme « d'infections latentes », suggérant que la maladie est observée chez cette espèce depuis la création du projet de conservation en 1986. En revanche, il mentionne qu'à cette époque, aucune observation de variole aviaire n'avait été faite sur des outardes sauvages (157). D'autres auteurs suggèrent que la présence de variole aviaire sur les outardes captives dans les pays du Golfe est connue depuis de nombreuses années (167) et rapportent le cas d'un oiseau sauvage séropositif pour des anticorps anti-avipoxvirus bien que ne présentant aucun signe de variole aviaire (168). À travers les rapports décrivant ces cas (Tableau 2), deux situations générales apparaissent : l'existence endémique de la maladie dans certains élevages conservatoires, avec une morbidité et une mortalité faibles (166,169), et l'apparition d'épizooties avec une mortalité importante sur des lots d'oiseaux braconnés en Asie et importés illégalement dans les pays du Golfe (163,167). Une épizootie avec une mortalité importante sur des juvéniles (49%) a toutefois été rapportée dans un élevage conservatoire, à Agadir au Maroc en

2004 mais l'auteur ne précise pas les conditions zootechniques ni le statut vaccinal des oiseaux, suggérant seulement que les densités d'oiseaux étaient assez élevées (170).

Tableau 2. Synthèse des principaux épisodes publiés de variole aviaire sur des outardes houbara.

Année	Pays	Origine et nombre d'oiseaux	Forme de variole aviaire	Morbidité	Mortalité	Références
1989-1994	Arabie Saoudite	Élevage conservatoire	Cutanée, rarement diphtérique	Faible	Faible	(157,166)
1992-1994	EAU	Élevage conservatoire, n=278	Cutanée	2%	-	(155)
1992-1994	EAU	Trafic illégal, n=208	-	43%	-	(155)
1993	Bahreïn	Trafic illégal, n=123	Cutanée	-	100%	(167)
1996	Pakistan	Trafic illégal, n=1500	-	-	25%	(171)
1997	Pakistan	Trafic illégal, n=1400	-	-	22%	(171)
1998	EAU	Trafic illégal, n=34	Cutanée, diphtérique et septicémique	-	47%	(163)
1998	EAU	Trafic illégal, n=95	-	-	49%	(171)
2004	Maroc	Élevage conservatoire, n=1520	Cutanée, diphtérique et septicémique	-	2% (adultes) à 49% (juvéniles)	(170)

Les facteurs de risque de la variole aviaire chez l'Outarde qui sont rapportés dans ces publications sont de mauvaises conditions zootechniques et sanitaires, des fortes densités, le stress, l'âge, les traumatismes cutanés et les coïnfections, celles-ci ayant été diagnostiquées dans la majorité des épizooties (trichomonose, aspergillose, salmonellose, maladie de Newcastle, réovirose, adénovirose…) (170,171). Hors épizootie, la variole aviaire est surtout observée sous sa forme cutanée avec des lésions « classiques » sur les pattes, le bec et les paupières. Lors d'une épizootie ayant causé la mort de tous les oiseaux infectés, une forme cutanée particulière ne se manifestant que par des lésions prolifératives sur les paupières a été rapportée (167). Il est intéressant de noter que dans au moins deux épizooties, dont celle d'Agadir en 2004, les trois formes de variole aviaire ont été diagnostiquées, la forme septicémique ayant

auparavant été très peu décrite sur d'autres espèces que les canaris. À cette occasion des lésions de broncho-pneumonie proliférative, de pancréatite granuleuse avec présence de corps de Bollinger et d'hépatite ont été observées sur les oiseaux morts de la forme septicémique (163,170). Outre une mortalité brutale causée par cette forme, les lésions varioliques peuvent entraver la locomotion lors d'atteintes des pattes ou gêner la prise alimentaire quand les paupières ou la cavité orale sont atteintes, provoquant un amaigrissement progressif pouvant aller jusqu'à l'inanition et la mort (157,167).

Des recherches d'anticorps anti-avipoxvirus ont été effectuées à quelques occasions sur des oiseaux morbides et sains par immunodiffusion sur gel d'agarose et séroneutralisation virale (163,168,172). Outre le fait que des oiseaux puissent montrer une séroconversion sans présenter de lésions, la principale conclusion de ces études est que la durée pendant laquelle des anticorps sont détectables est assez courte, à priori moins de trois mois, et que certains individus peuvent se re-positiver quelques mois plus tard, suggérant ainsi qu'ils peuvent se débarrasser du virus puis être réinfectés (163). Ces tests sérologiques ont également permis d'apporter quelques éléments d'identification des souches virales infectant l'Outarde. Lors de l'épizootie de Bahreïn en 1993 (Tableau 2), aucune réaction n'a été obtenue entre le virus isolé et des sérums anti-fowlpox, pigeonpox, canarypox et sparrowpox virus alors qu'un virus isolé en 1998 en Arabie Saoudite à partir d'une lésion cutanée sur une outarde a réagi avec un sérum anti-canarypox virus mais pas avec celui dirigé contre un fowlpox virus (157), mettant en évidence une proximité de cette souche avec les virus CNPV-like.

À partir de ces conclusions un test de protection croisée a été réalisé sur des canaris afin de valider la protection conférée par une souche vaccinale de canarypox virus (souche Kanapox) vis-à-vis de l'infection par la souche isolée (169). Les résultats du test ont montré une bonne protection sur les canaris et ont conduit à une modification des protocoles vaccinaux en élevages conservatoires. L'utilisation d'une souche vaccinale de fowlpox virus pour la vaccination (173) a donc été remplacée par la généralisation de la vaccination avec une souche vaccinale de canarypox virus et, au moins dans certains élevages, l'efficacité de ce changement a été validée par la disparition totale de variole aviaire sur les outardes (159). Suite à l'épizootie d'Agadir en 2004, un nouveau vaccin a été développé à partir d'une souche dénommée DuHoPo, isolée sur une outarde en 1998. Des infections expérimentales sur des outardes ont permis de valider ce vaccin vis-à-vis de la souche responsable de cette épizootie.

Cependant aucune information précise sur la souche utilisée n'est disponible, notamment quant à son originalité par rapport à la souche vaccinale de canarypox virus (172). Il est à noter à ce propos que très peu d'informations sont disponibles sur les souches d'avipoxvirus isolées sur des outardes et seules deux séquences sont disponibles sur GenBank (44) : une séquence du locus P4b d'un virus isolé sur une outarde aux Émirats Arabes Unis une séquence du locus fpv140 d'un virus isolé sur une outarde au Maroc. Toutes deux se positionnent dans le sous-clade B1 où l'on retrouve la majorité des souches isolées sur canaris, confirmant les résultats sérologiques obtenus sur le virus isolé en 1998 en Arabie Saoudite.

C. Objectifs de recherche

Cette thèse s'inscrit dans le cadre général de l'acquisition de connaissances sur la biologie de l'Outarde en captivité, dans le but de pérenniser les efforts de conservation de ces espèces en améliorant et sécurisant des élevages conservatoires. Bien que la variole aviaire soit connue chez les outardes depuis la création des premiers projets de conservation, peu de travaux ont été menés pour étudier la maladie chez ces espèces et, jusqu'il y a une dizaine d'année, un consensus existait quant au fait que la maladie n'était qu'une préoccupation sur les oiseaux issus du braconnage et du trafic illégal (171). *A contrario*, il était considéré (i) que bien que présente dans la majorité des élevages conservatoires, elle ne s'y manifestait que de façon sporadique, son apparition étant probablement liée à l'abondance saisonnière d'insectes vecteurs et (ii) que la protection des oiseaux à l'aide une souche vaccinale de canarypox virus était une mesure efficace et suffisante pour contrôler la maladie (159,169). La description en 2004 à Agadir d'une épizootie de variole aviaire a cependant montré que cette maladie pouvait également être une préoccupation en élevage (170), bien que peu d'enseignements aient finalement été tirés de cette épizootie.

Depuis quelques dizaines d'années, la taille des élevages conservatoires d'outardes a considérablement augmenté et certaines structures hébergent maintenant jusqu'à 9000 adultes reproducteurs et produisent annuellement 20000 poussins. Cette augmentation de taille s'est accompagnée d'une amélioration des processus d'élevage mais également d'une standardisation indispensable, rapprochant par certains aspects ces élevages des élevages avicoles industriels. La gestion sanitaire de troupeaux a ainsi fait son apparition, la gestion clinique individuelle perdurant mais étant désormais insuffisante pour garantir la sécurité sanitaire des élevages. À ce titre, il était nécessaire d'acquérir davantage de connaissances sur les maladies de l'Outarde et d'appréhender leur épidémiologie à ces nouvelles échelles et dans ce contexte d'intensification grandissante. La connaissance de l'épidémiologie de la variole aviaire dans les élevages à grande échelle a donc été le premier objectif de cette thèse. Les données collectées à travers le travail quotidien des équipes vétérinaires ont permis de dresser un état des lieux en précisant les grandes caractéristiques de la variole aviaire chez les deux espèces d'outardes : importance de la maladie, temporalité, différences géographiques et catégories d'oiseaux concernés ; ceci afin d'identifier de potentiels facteurs de risque et d'ajuster en conséquence la stratégie sanitaire.

La variole aviaire fait l'objet d'une gestion sanitaire et médicale stricte depuis de nombreuses années : vaccination de tous les oiseaux, prise en charge, isolement et traitement de chaque individu malade. Les impacts financier et logistique de cette gestion sont connus. En revanche, les bénéfices de cette stratégie ne le sont pas clairement et l'existence, malgré tout, d'un impact direct de la maladie sur les oiseaux et donc sur le succès des programmes de conservation n'a jamais été évalué. Le second objectif de cette thèse a donc été de mesurer l'effet que pouvait avoir la variole aviaire sur le succès de reproduction des oiseaux dans le contexte des élevages conservatoires afin d'apprécier indirectement l'efficacité de la gestion médicale actuellement appliquée. Cet objectif a été atteint à travers l'analyse des données collectées lors de deux épisodes de variole aviaire au Maroc.

La réponse au premier objectif de la thèse ayant montré que, malgré l'utilisation systématique d'une souche vaccinale de canarypox virus pour protéger les oiseaux, des épisodes de variole aviaires étaient régulièrement observés, la question de l'efficacité de la stratégie sanitaire s'est posée. Le troisième objectif de la thèse a donc été d'étudier les souches virales responsables de la maladie chez les outardes captives afin d'apporter des éléments de compréhension des échecs vaccinaux rencontrés et plus généralement de mieux connaître la diversité des souches virales circulant dans les projets de conservation. Cette étude, menée sur différents projets et plusieurs années, a permis de préciser la phylogénie et l'évolution des avipoxvirus et a apporté des pistes de réflexion sur les ajustements à apporter à la gestion sanitaire de la variole aviaire chez l'Outarde captive.

Pour préciser les possibles causes des échecs vaccinaux identifiées dans le troisième objectif, et plus généralement pour dépasser les limites de l'analyse rétrospective des données d'élevages et biologiques collectées sur les différents projets de conservation, il est apparu que l'expérimentation était indispensable afin d'acquérir davantage de connaissances sur la variole aviaire chez l'Outarde. Un dernier objectif a donc été fixé, visant à mettre en place un modèle expérimental de variole aviaire chez l'Outarde et à développer des outils de diagnostic et de suivi de l'infection *in vivo* et *ex vivo*. Ces outils ont permis d'acquérir des connaissances supplémentaires sur la biologie de l'infection et ainsi de disposer de nouveaux éléments de compréhension de l'épidémiologie de la variole aviaire.

Les différents enseignements acquis en poursuivant ces quatre objectifs ont été repris dans la discussion générale afin de fournir des recommandations sur la stratégie médicale et sanitaire de la variole aviaire en élevages conservatoires d'outardes. Plus généralement et à la lumière des résultats obtenus dans cette thèse, les enjeux de biosécurité en élevages conservatoires vis-à-vis des maladies infectieuses et l'appréciation du risque que représente la variole aviaire ont aussi été discutés.

Chapitre II : Partie expérimentale

A. Épidémiologie de la variole aviaire en élevage conservatoire d'outardes houbara

1. Contexte

Depuis quelques dizaines d'années, les initiatives de conservation *ex situ* d'espèces animales en déclin se sont développées soit à travers le maintien et la reproduction d'individus en parcs zoologiques, soit par la création d'élevages conservatoires. Le développement de tels élevages a conduit les biologistes à s'interroger et à fournir des recommandations quant à la gestion génétique, zootechnique, éthologique et sanitaire de ce nouveau type d'élevage. Le suivi de ces recommandations et l'amélioration des techniques d'élevage et de relâcher ont permis à plusieurs programmes de conservation de connaître un succès dans la préservation des espèces menacées, comme par exemple pour le Condor de Californie (*Gymnogyps californianus*) et le Putois à pieds noirs (*Mustela nigripes*) (174). Plus récemment l'efficacité des efforts de conservation de l'Outarde africaine au Maroc a été reconnue (145). Malgré cela, les projets de conservation font encore face à de nombreux défis, notamment en ce qui concerne la problématique des maladies infectieuses. En général, très peu de connaissances sur les maladies des espèces d'intérêt sont disponibles et lorsqu'elles le sont, elles sont souvent issues d'individus sauvages. Or le maintien en captivité modifie profondément le risque infectieux pour ces espèces. Alors qu'on peut supposer que les conditions de captivité peuvent être bénéfiques au bien-être des individus (alimentation disponible et équilibrée, réduction de la compétition entre individus, paramètres environnementaux contrôlés…), les contraintes inhérentes aux élevages telles que des densités relativement élevées, des contacts plus fréquents avec l'Homme, la proximité possible avec d'autres espèces domestiques ou sauvages et le maintien en environnement artificiel ou anthropisé peuvent augmenter le risque d'exposition et/ou de diffusion d'agents infectieux entre individus. Une meilleure connaissance de l'épidémiologie des maladies infectieuses dans les élevages conservatoires est donc un prérequis indispensable à la mise en place de mesures de contrôle efficaces et à la sécurisation des initiatives de conservation.

2. Problématique et objectifs

La variole aviaire est devenue ces dernières années une préoccupation grandissante chez les espèces d'oiseaux sauvages. D'une part l'introduction d'avipoxvirus dans des populations naïves, généralement insulaires, est considérée comme la cause de déclins de plusieurs espèces de passereaux aux Galápagos (94), à Hawaï (72,74), sur les îles Canaries (79) et en Nouvelle Zélande (80) mais, également, plusieurs rapports font état d'épizooties ou d'augmentations des prévalences dans des populations d'oiseaux non insulaires (90,91,175), l'épisode le plus remarquable étant l'épizootie de variole aviaire observée chez les mésanges charbonnières en Europe depuis quelques années (76,176). Dans un même temps, certains auteurs notent une augmentation des épizooties en élevages avicoles (20,55). Chez l'Outarde, des cas de variole aviaire sont observés en captivité depuis la création des premiers projets de conservation, c'est-à-dire depuis une trentaine d'années. Bien que la maladie puisse être responsable d'une mortalité importante, au moins dans des contextes zootechniques pauvres (163,166,167,170), elle n'a jamais fait l'objet d'étude épidémiologique et son importance en élevage conservatoire n'est pas bien connue. Ce manquement s'explique probablement par la taille restreinte des élevages il y a encore dix ans, qui permettait d'appréhender les problèmes infectieux à travers une simple gestion clinique individuelle. À l'ECWP, au NARC et au SKHBC-AD, les équipes vétérinaires diagnostiquent depuis plusieurs années des cas de variole aviaire sur les outardes captives malgré une vaccination systématique. Toutefois la grande taille de ces élevages ne leur permet pas d'avoir, à travers de simples observations de terrain, une image claire de la situation sanitaire ni de pouvoir appréhender les situations les plus à risque. Cette première partie de la thèse vise donc à fournir une meilleure image de la situation sanitaire de la variole aviaire dans les élevages d'outardes à grande échelle, en quantifiant l'importance de la maladie selon des critères géographiques, temporels et physiologiques. Elle doit aussi permettre d'identifier de possibles facteurs de risque de la maladie qui pourront faire l'objet d'études ultérieures. Plus généralement, cette étude fournit aussi des informations originales sur l'épidémiologie de la variole aviaire en élevage.

3. Démarche expérimentale

i. Population

L'étude s'est portée sur les trois plus grands projets que sont l'ECWP (Maroc), le NARC et le SKHBC-AD (EAU). Ces trois projets ont été choisis car ils hébergent plusieurs milliers d'oiseaux et parce qu'une certaine constance dans le suivi zootechnique et sanitaire existe, permettant une analyse longitudinale fiable. L'ECWP présente en plus l'intérêt d'avoir hébergé les deux espèces d'Outarde de 2006 à 2012, offrant ainsi la possibilité d'évaluer plus efficacement le facteur espèce. Ce projet est composé de deux sites : Enjil et Missour, distants de 50 km et situés à des altitudes respectives de 1600 et 900 m. Une population par espèce a été considérée pour le Maroc. Le NARC et le SKHBC-AD étant géographiquement très proches (5 km environ) et des échanges d'oiseaux ayant régulièrement lieu entre sites, une seule population a été considérée pour les Émirats Arabes Unis. Les données ont été analysées à partir de 2006 pour le Maroc et à partir de 2011 pour les Émirats Arabes Unis car ce n'est qu'à partir de ces dates que les procédures de gestion médicale et de collecte des données ont été standardisées, celles-ci étant, au moins sur le plan théorique, identiques entre projets.

ii. Collecte des données

La collecte des données médicales s'appuie sur un ensemble de personnel qualifié. Chaque oiseau, bagué avec un identifiant propre, est quotidiennement observé par un technicien d'élevage, qui, s'il observe une anomalie, sollicite une intervention vétérinaire. Lorsque le vétérinaire confirme l'anomalie, il procède à un examen clinique de l'oiseau et reporte sur une fiche dédiée (la « fiche morbidité ») les détails de son examen clinique, ses hypothèses diagnostiques et les traitements prescrits. La collecte des données médicales au sein des élevages étudiés est donc évènementielle et aucun effort supplémentaire de recherche de cas de variole aviaire n'a été fait durant l'étude, évitant ainsi un biais d'interprétation. Le diagnostic de la variole aviaire au sein des projets étudiés est uniquement clinique et l'ensemble des équipes est formé à reconnaître les lésions cutanées, qui sont presque pathognomoniques de la maladie chez l'Outarde, et les lésions diphtériques, également très caractéristiques.

Un cas de variole aviaire est défini comme suit :

Forme sèche :

Présence d'au moins une des lésions suivantes sur la peau, à une jonction cutanéomuqueuse ou sur une muqueuse oculaire ou nasale ;

- Lésion localisée réalisant une surélévation de la peau, ferme au toucher mais non indurée, ne contenant pas de liquide, de couleur blanche, rose ou jaunâtre ;
- Lésion localisée réalisant une surélévation de la peau, de couleur jaunâtre à brune et formée de petites cavités remplies de sérosité ;
- Lésion localisée réalisant une surélévation de la peau et couverte d'une croûte brune à noirâtre ou d'une membrane blanche à jaunâtre (muqueuses oculaire et nasale, paupières) qui, après retrait, présente une surface rose, couverte d'ulcérations parfois sanguinolentes.

Forme diphtérique :

Présence d'au moins une lésion répondant à la définition suivante sur une muqueuse orale (bouche, pharynx, œsophage), respiratoire (glotte, trachée) ou cloacale :

- Lésion localisée réalisant une surélévation de la muqueuse et couverte d'une membrane blanche à jaunâtre qui après retrait présente une surface rose, couverte d'ulcérations parfois sanguinolentes.

Chaque fiche morbidité est ensuite saisie sur une base de données informatique via une interface web. Afin d'éviter au maximum les erreurs de transcription des données papiers et pour faciliter les analyses ultérieures, les données sont saisies à l'aide de thésaurus de termes prédéfinis. Les données, stockées au format Microsoft SQL server, peuvent ensuite être consultées via l'interface web ou exportées par exemple via Microsoft Access pour être analysées. Cette base regroupe toutes les données médicales et d'élevage relatives aux individus captifs.

À partir de cette base de données, les informations suivantes ont été extraites pour chaque individu :

- Site d'élevage ;
- Date de naissance ;
- Date d'arrivée dans l'élevage ;
- Date de sortie de l'élevage ;
- Statut de sortie de l'élevage (mort, relâché, donné aux fauconniers, autre) ;
- Pour tous les cas médicaux dont au moins un des diagnostics comportait le terme « variole aviaire » :
    - Date d'ouverture du cas médical ;
    - Date de résolution du cas médical ;
    - Résolution du cas médical (guérison, euthanasie, mort, réforme) ;
    - Diagnostic (variole aviaire, variole aviaire cutanée, variole aviaire diphtérique) ;
    - Type de diagnostic (diagnostic de certitude, hypothèse diagnostique) ;
    - Signe(s) clinique(s) (type de signe et localisation anatomique).

Afin de pouvoir comparer l'incidence de la variole aviaire avec des tendances climatologiques, les données météorologiques collectées toutes les heures par des stations installées sur les projets ont été récoltées et analysées. Pour le Maroc, les données sont issues des stations d'Enjil et de Missour, pour les Émirats Arabes Unis, les données sont issues de la station de NARC.

iii. Indicateurs calculés

Les données ont ensuite été vérifiées avec de simples requêtes pour identifier puis corriger les erreurs évidentes de dates (date d'ouverture du cas médical < date de naissance, date de fermeture du cas médical > date de sortie du projet…) puis le nombre de cas de variole aviaire a été compté en incluant les récurrences, ne sachant pas s'il s'agissait de rechute ou de réinfection. Les effectifs ont été calculés en sommant le nombre de mois à risque pour tous les oiseaux. Tous les oiseaux captifs ont été considérés comme potentiellement à risque et la période pendant laquelle un oiseau avait un risque de développer la maladie a été définie comme la période allant de son arrivée sur le projet jusqu'à sa sortie, en excluant les périodes pendant lesquelles il était

cliniquement infecté (depuis la date d'ouverture du cas médical jusqu'à la date de résolution). Les effectifs variant beaucoup au cours du temps (production des poussins au printemps puis relâcher des oiseaux à l'automne), il a été décidé de calculer des taux d'incidence plutôt que des incidences cumulées. Ainsi, les taux de morbidité ont été calculés en nombre de cas de variole aviaire pour 1000 oiseau-mois à risque. Une première analyse ayant montré d'assez grandes différences d'incidences entre les âges, les espèces et les projets (Figure 11), par souci de clarté pour cette première étude descriptive, les taux ont ensuite été calculés en regroupant les oiseaux en deux principales catégories d'âges : oiseaux juvéniles (≤365 jours) et oiseaux adultes (>365 jours).

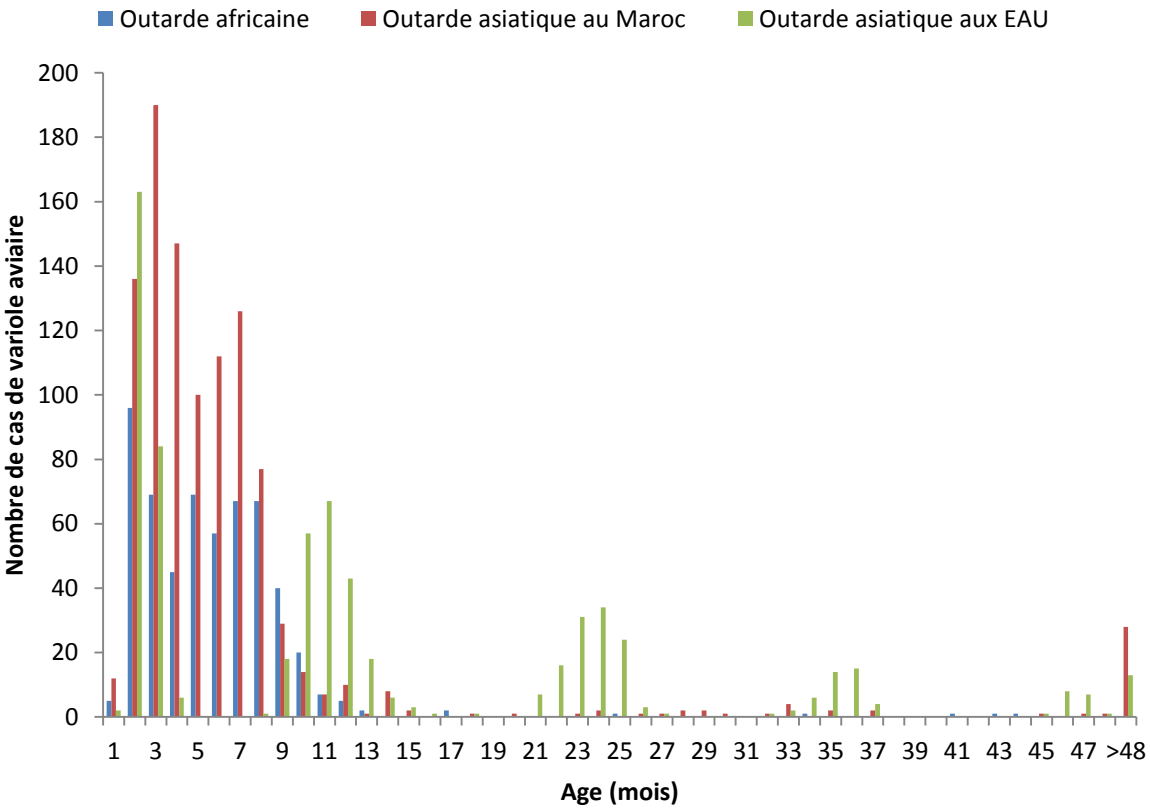

Figure 11. Incidence de la variole aviaire par âge pour les trois populations étudiées.

Le calcul des taux de morbidité par mois pour chacune des populations a permis d'identifier des pics épizootiques (*outbreak*) de la maladie. Alors qu'il existe un relatif consensus sur la définition formelle de la notion de pic épizootique, qui est l'apparition localement pendant une période donnée d'un nombre de cas de maladie plus élevé qu'attendu (177), la définition quantitative de tels pics n'est pas clair et dépend des études et des agents pathogènes en cause (178). Aucune définition n'existant pour la

variole aviaire, nous avons dû interpréter les courbes épidémiologiques afin de trouver une définition adéquate dans le contexte de l'étude. Un pic épizootique de variole aviaire chez l'Outarde en captivité a été défini comme une période durant laquelle les taux de morbidité mensuels sont tous supérieurs à 1,0 cas pour 1000 oiseau-mois à risque et dont au moins deux mois successifs ont des taux de morbidité supérieur à 5,0 cas pour 1000 oiseau-mois à risque.

À partir des données météorologiques, les indicateurs suivant ont été calculés sur une année : température moyenne et nombre moyen de jours de pluie par mois. Pour ECWP, les moyennes ont ensuite été calculées entre Enjil et Missour.

iv. Analyse moléculaire

Bien que le diagnostic clinique de la variole aviaire chez l'Outarde soit aisé, il semblait intéressant de confirmer certains cas par des méthodes moléculaires et d'apprécier si des différences épidémiologiques entre populations pouvaient être dues à des souches différentes. Classiquement, le diagnostic moléculaire de la variole aviaire est effectué par amplification du locus P4b qui permet de confirmer la présence d'ADN viral mais sans discrimination possible entre clades (1–3,41–43). Nous avons donc décidé d'amplifier en plus le locus fpv140 qui permet une discrimination par la taille entre les séquences des virus FWPV-like (1,9 kpb) et CNPV-like (2,8 kpb) (1), et ce même si certains auteurs notent que l'amplification de fpv140 peut être plus difficile que celle de P4b (47). Les lésions ont été prélevées sur un échantillon aléatoire d'oiseaux malades. Parmi 135 lésions dont l'ADN a été extrait, P4b a pu être amplifié à partir de 110 lésions et fpv140 à partir de 94 lésions.

4. Article 1

Cet article a été publié dans la revue *Transboundary and Emerging Diseases* sous la référence :

Le Loc'h G, Paul MC, Camus-Bouclainville C, Bertagnoli S. Outbreaks of pox disease due to canarypox-like and fowlpox-like viruses in large-scale Houbara bustard captive-breeding programmes, in Morocco and the United Arab Emirates. Transbound Emerg Dis. 2015.

Outbreaks of pox disease due to canarypox-like and fowlpox-like viruses in large-scale Houbara bustard captive-breeding programmes, in Morocco and the United Arab Emirates

Guillaume Le Loc'h[1,2,3], Mathilde C. Paul[2,3], Christelle Camus-Bouclainville[2,3], Jean-Luc Guérin[3,2] and Stéphane Bertagnoli[2,3]

[1]RENECO Wildlife Consultants LLC, Abu Dhabi, United Arab Emirates

[2]Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

[3]INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

Abstract

Infectious diseases can be serious threats for the success of reinforcement programmes of endangered species. Houbara Bustard species (*Chlamydotis undulata* and *Chlamydotis macqueenii*), whose populations declined in the last decades, have been captive-bred for conservation purposes for more than 15 years in North Africa and the Middle East. Field observations show that pox disease, caused by avipoxviruses (APV), regularly emerges in conservation projects of Houbara Bustard, despite a very strict implementation of both vaccination and biosecurity. Data collected from captive flocks of Houbara Bustard in Morocco from 2006 through 2013 and in the United Arab Emirates from 2011 through 2013 were analysed, and molecular investigations were carried out to define the virus strains involved. Pox cases (n=2311) were observed during more than half of the year (88% of the months in Morocco, 54% in the United Arab Emirates). Monthly morbidity rates showed strong variations across the time periods considered, species and study sites: Four outbreaks were described during the study period on both sites. Molecular typing revealed that infections were mostly due to canarypox-like viruses in Morocco while fowlpox-like viruses were predominant in the

United Arab Emirates. This study highlights that APV remain a major threat to consider in bird conservation initiatives.

Introduction

Infectious diseases are an important cause of wildlife species extinction and endangerment (179). Recent emergence of infectious diseases in wildlife has been found associated with increasing contacts between livestock and wild populations (180), translocations (181) or wildlife trade (182). In the context of conservation efforts, infectious diseases are also a concern for the sustainability of captive-breeding of endangered species (174). Avipoxviruses (APV) are large enveloped, double-stranded DNA viruses, able to naturally infect more than 23 avian orders, and which are mechanically transmitted by insects (20). APV are considered host specific, and phylogenetic analyses have shown that APV group into two major and one minor clades: fowlpox-like virus (FWPV-like, clade A), canarypox-like virus (CNPV-like, clade B) and psittacinepox-like virus (clade C) (1). APV infections are known to compromise the survival and the breeding success of wild bird species by decreasing their ability to escape predators (95), to fledge and rear chicks (97) or by altering the pairing success (96). Recently, emergence of APV infections has been described in Great tit (*Parus major*) in Europe and especially in the UK; it could represent a threat for this species (91). APV can have dramatic impact on endangered species, especially when APV are introduced in naïve populations as described in Hawaii (71) or Galapagos Islands (49). The disease has also been reported in captive flocks of wild species, such as peregrine falcons in Germany (23) or Houbara Bustard species (hereafter 'Houbara') in the United Arab Emirates (UAE) and Morocco (163,167,183). In this species, only sporadic cases have so far been recorded in captive-breeding projects (157,166,169) and mortality has been reported only in illegally trapped birds (163,167,171).

The African Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata*, hereafter 'African Houbara') and the Asian Houbara Bustard (*Chlamydotis macqueenii*, hereafter 'Asian Houbara') are both vulnerable species (144,145) inhabiting semi-desert areas in North Africa and in the Middle East and Central Asia, respectively. In the last decades, their populations drastically declined due to over-hunting, habitat degradation and poaching (184). In response to this, captive-breeding programmes of Houbara have been implemented for more than 15 years in North Africa, the Middle East and Central Asia. A comprehensive

strategy combining ecological research, reinforcement using captive-bred individuals and hunting management was established to restore Houbara populations (150,151). Thanks to the improvement of captive-breeding techniques and management, the size of captive flocks has progressively increased over the last 15 years from hundreds of initial founders to thousands of adult breeders, allowing to produce 20 000 juveniles each year (150,151). These large-scale captive-breeding of wild endangered species pose unprecedented challenges, especially in maintaining a high level of biosecurity while preserving a high-quality management of every captive individual. In addition, these programmes offer unique opportunities to study epidemiology and physiopathology of infectious diseases for which knowledge is still scarce, and to assess the risk they present for captive populations.

Our study provides, for the first time, epidemiological description of pox disease in captive birds population followed over several years and different sites. We describe outbreaks of pox disease in Houbara captive-breeding projects in Morocco and in the UAE caused by both CNPV-like viruses and FWPV-like viruses despite vaccination and a high biosecurity level. We discuss the possible causes and the potential risks factors of such outbreaks in relation with the scale of captive-breeding projects as well as the potential impact of APV for captive-breeding projects of Houbara and endangered bird species in general.

Materials and Methods

The study was conducted in three Houbara captive-breeding projects: the Emirates Center for Wildlife Propagation (ECWP) in Morocco (33°000N 4°060W), and the National Avian Research Center (NARC) and the Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center of Abu Dhabi (SKHBC-AD) in the UAE (24°240N 55° 260E and 24°210N 55° 260E). The study populations included 108 369 African Houbara and 7 849 Asian Houbara studied from 2006 through 2013 in Morocco, and 44 117 Asian Houbara studied from 2011 through 2013 in the UAE. Asian Houbara were temporarily bred in Morocco from May 2006 through March 2012 to benefit ECWP facilities pending the full development of NARC and SKHBC-AD. In March 2012, all Asian Houbara housed in Morocco were transferred to the UAE. All birds were vaccinated with a live CNPV strain (strain KP, Poulvac P Canary; Pfizer, Weesp, Netherlands) by wing-web method at 30 and 60 days of age and an annual booster was given in December for all breeder birds.

Pox lesions were detected by the veterinarians and the veterinarian technicians on a daily basis as part of routine veterinary management and surveillance of every bird. A pox case was defined as a live Houbara presenting at least one papule, vesicle, plaque or crusty mass on skin, muco-cutaneous junction, ocular or nasal mucosa (dry pox) or at least one diphtheritic lesion on oral, respiratory or cloacal mucosa (diphtheritic pox). Pox lesions were collected from a subset of cases and DNA was extracted with the Nucleo-Spin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's instructions. Locus fpv140 was amplified as previously described (1) with the Illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) and PCR amplicons were analysed on 1% TBE-agarose gels stained with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), allowing fragment-size discrimination between CNPV-like viruses (2.8 kb amplicon) and FWPV-like viruses (1.9 kb amplicon).

Every bird was identified by a leg band; individual data pertaining to birds breeding and medical history were collected and entered in an internal database.

Data related to pox cases were extracted for each study population (African Houbara in Morocco, Asian Houbara in Morocco and Asian Houbara in the UAE). For each of them, cumulative morbidity rates (number of cases for 1000 bird-months at risk) with confidence intervals (CI) were calculated for the entire population and by age category: juveniles (≤365 days old) and adults (>365 days old). Morbidity rate was calculated by using the total number of pox cases, including the recurrences, for the numerator and by summing the number of months spent in each site by all birds at risk for the denominator. For calculation of the population at risk, the presence of bird was considered from its arrival on site (hatching or transfer) until its departure (death, release in the wild or transfer to another site) except for birds clinically infected, which were not included from the diagnosis of pox until their recovery. Monthly morbidity rates were also calculated for each entire study population to define pox outbreaks, which consist of a series of months with a morbidity rate higher than 1.0 case per 1000 bird-months at risk and with at least two successive months presenting a morbidity rate higher than 5.0 cases per 1000 bird-months at risk.

As APV can be transmitted by insects, we hypothesized that the temporal pattern of pox cases may have been related to meteorological variables which influence insect vectors abundance or activity. In addition to data related to Houbara, we thus examined

meteorological data collected continuously by weather stations set up in each study site. Daily precipitations (mm) and temperatures (°C) were extracted from weather databases and, for each month, the average temperature and the average number of days of precipitations were calculated. To assess a possible relationship between meteorological variables or time and morbidity rates, correlation between data was examined using Kendall's rank correlation test.

Results

A total of 1 023 and 556 pox cases were diagnosed in Morocco from 2006 through 2013 in African Houbara and Asian Houbara, respectively, and 658 pox cases were diagnosed in Asian Houbara in the UAE from 2011 through 2013. Cumulative morbidity rates were respectively 0.8 (95% CI=0.8, 0.9), 3.7 (95% CI=3.4, 4.0) and 1.3 (95% CI=1.2, 1.4) cases for 1000 bird-months at risk (Table 3).

Table 3. Main epidemiological characteristics of pox infections in the three study populations.

	Periods	Cases	MR (cases for 1000 bird-months at risk) (95% CI)	MR ratio (relative to African Houbara)	Proportion of months with MR ≤ 1.0 case for 1000 bird-month at risk
African Houbara, Morocco	01/06-12/13	1023	0.8 (0.8-0.9)	-	81% (78/96)
Asian Houbara, Morocco	05/06-03/12	556	3.7 (3.4-4.0)	4.5	41% (29/71)
Asian Houbara, UAE	01/11-12/13	658	1.3 (1.2-1.4)	1.6	71% (34/48)

MR, morbidity rate; CI, confidence interval.

At an annual scale, monthly morbidity rates showed strong variations across time, species and study sites considered (Figure 12). Incidences increased during summer and fall (July to December) in Morocco and during spring (March to June) in the UAE. The annual curve showed that in both sites (Morocco and the UAE), increase of incidences coincided with an increase of temperature and to a lesser extent to an increase of numbers of days of precipitations. In the UAE, incidences became nearly null when temperature exceeded 35°C and precipitations strongly decreased. Significant correlation was found only between monthly morbidity rates of African Houbara and monthly mean temperatures (τ_b=0.16, $p<0.05$). However, correlations between monthly morbidity rates and months were significant ($p<0.01$) for each population.

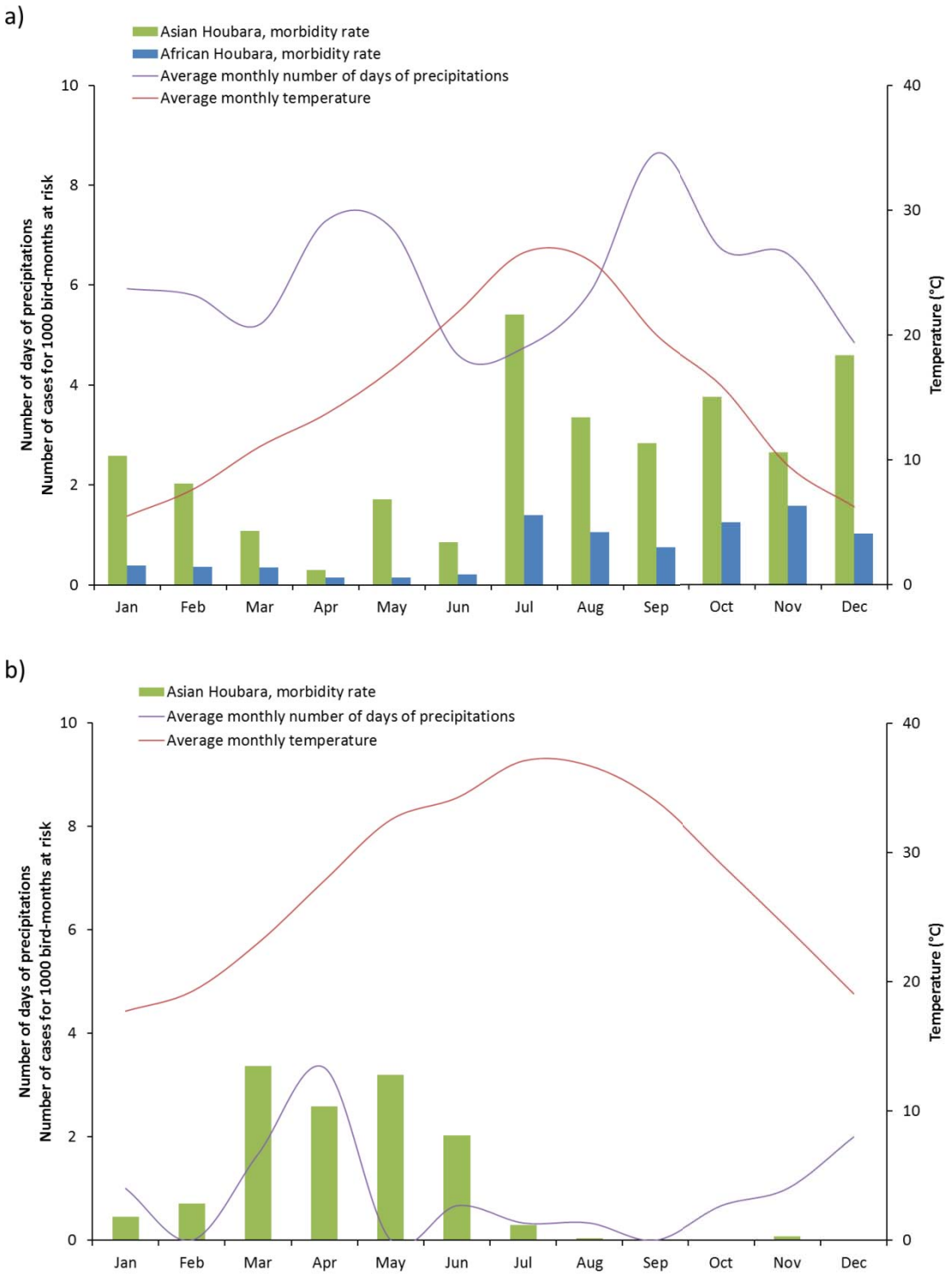

Figure 12. Average monthly morbidity rates, temperatures and numbers of days of precipitations, (a) for African Houbara and Asian Houbara Bustard in Morocco and (b) for Asian Houbara Bustard in the United Arab Emirates.

All mean values were calculated from 2006 through 2013 for Morocco and from 2011 through 2013 for the UAE.

During the study period, the epidemic curves (Figure 13) showed that in both sites, increase of incidence usually coincided with an increase of flock size. Those curves allow identifying several outbreaks: in Morocco, one outbreak was identified for African Houbara and two for Asian Houbara. In the UAE, one outbreak was identified for Asian Houbara (Figure 13). Analysis of age-specific morbidity rates during those outbreaks showed differences related to the study sites: juvenile birds were significantly more infected than adults in Morocco while adult and juvenile birds were equally infected in the UAE (Table 4).

Table 4. Age and species-specific cumulative morbidity rates during the four outbreaks of pox disease.

	Outbreak dates (Outbreak number)	**Cases**	**MR (cases for 1000 bird-months at risk) (95% CI)**		**MR juveniles/MR adults**
			Juveniles	**Adults**	
African Houbara, Morocco	07/09 – 03/10 (1)	613	6.7 (6.1-7.2)	0.2 (0.1-0.3)	33.9
Asian Houbara, Morocco	07/09 – 03/10 (2)	113	8.4 (6.9-10.0)	0.2 (0.0-0.6)	35.8
	06/10 – 04/11 (3)	296	15.5 (13.7-17.2)	0 (-)	-
Asian Houbara, UAE	02/13 – 06/13 (4)	496	5.6 (5.0-6.3)	3.8 (3.2-4.3)	1.5

MR = Morbidity rate, CI = Confidence interval. Outbreaks are defined in Materials and Methods and identified in Figure 13.

Observation of data related to each clinical case revealed that most of them were dry pox (93%) and only 1% of cases combined dry and diphtheritic lesions. Lesions were observed mainly on legs (46–57%), on the beak and in the oral cavity (22–33%) and on eyelids (9–21%) (Figure 14). Locus fpv140 was successfully amplified from 94 lesions. Viruses belonging to FWPV clade as well as to CNPV clade were identified in both species and study sites. However, FWPV-like viruses were more frequently identified (90%) in the UAE while CNPV-like viruses dominated (81%) in Morocco. This was especially true during outbreaks, since at that time, 100% of the strains identified belonged to CNPV clade in Morocco and 95% to FWPV clade in the UAE (Table 5).

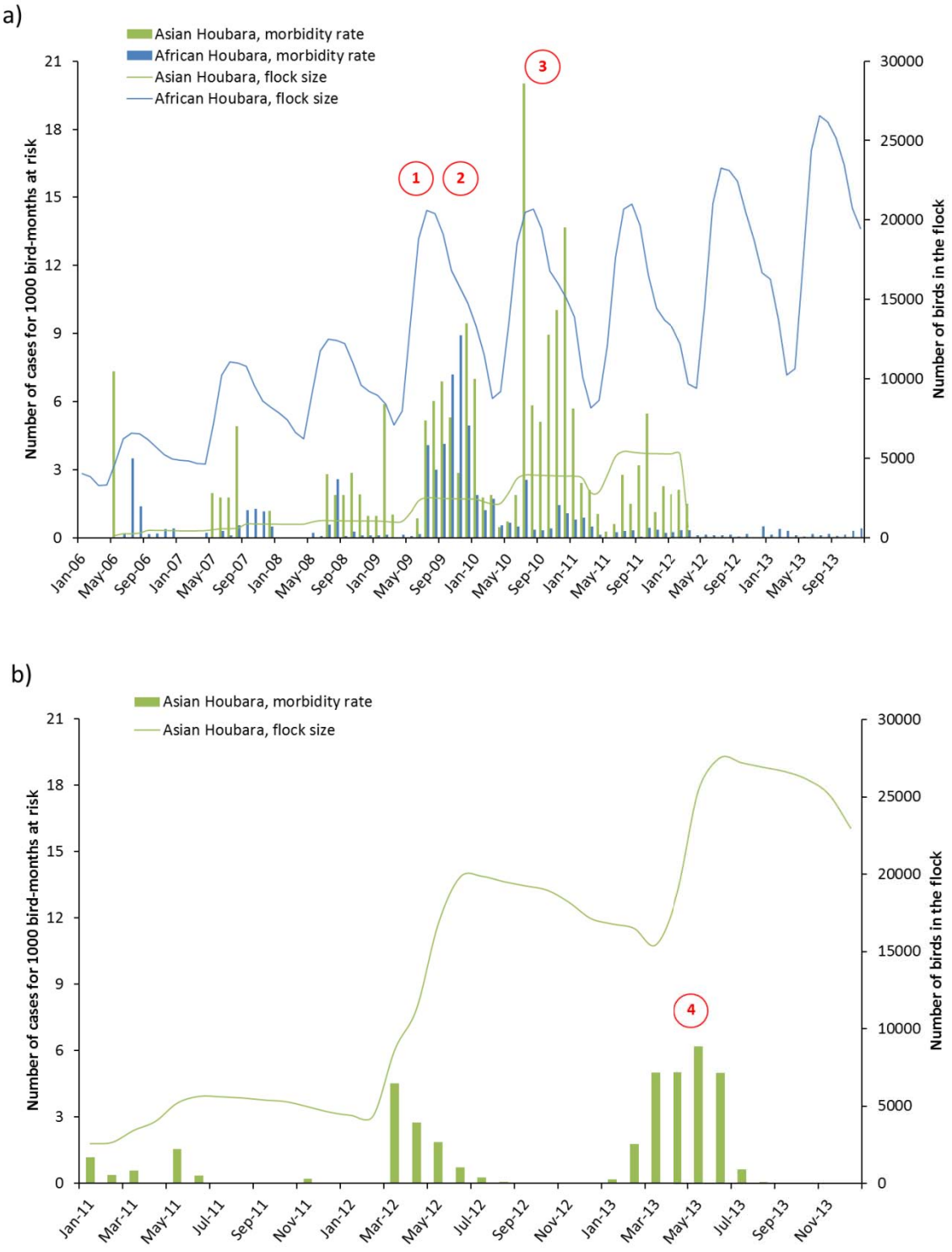

Figure 13. Monthly morbidity rates and flocks size (a) for African Houbara and Asian Houbara Bustard in Morocco and (b) for Asian Houbara Bustard in the United Arab Emirates.

The absence of pox cases recorded from April 2012 through December 2013 for Asian Houbara in Morocco is due to the transfer of the captive flock to another site. Circled numbers refer to outbreaks described in the study: outbreak No. 1 refers to African Houbara in Morocco, outbreaks No. 2 and 3 refer to Asian Houbara in Morocco, and outbreak No. 4 refers to Asian Houbara in the UAE. Outbreaks are defined in the Materials and Methods section.

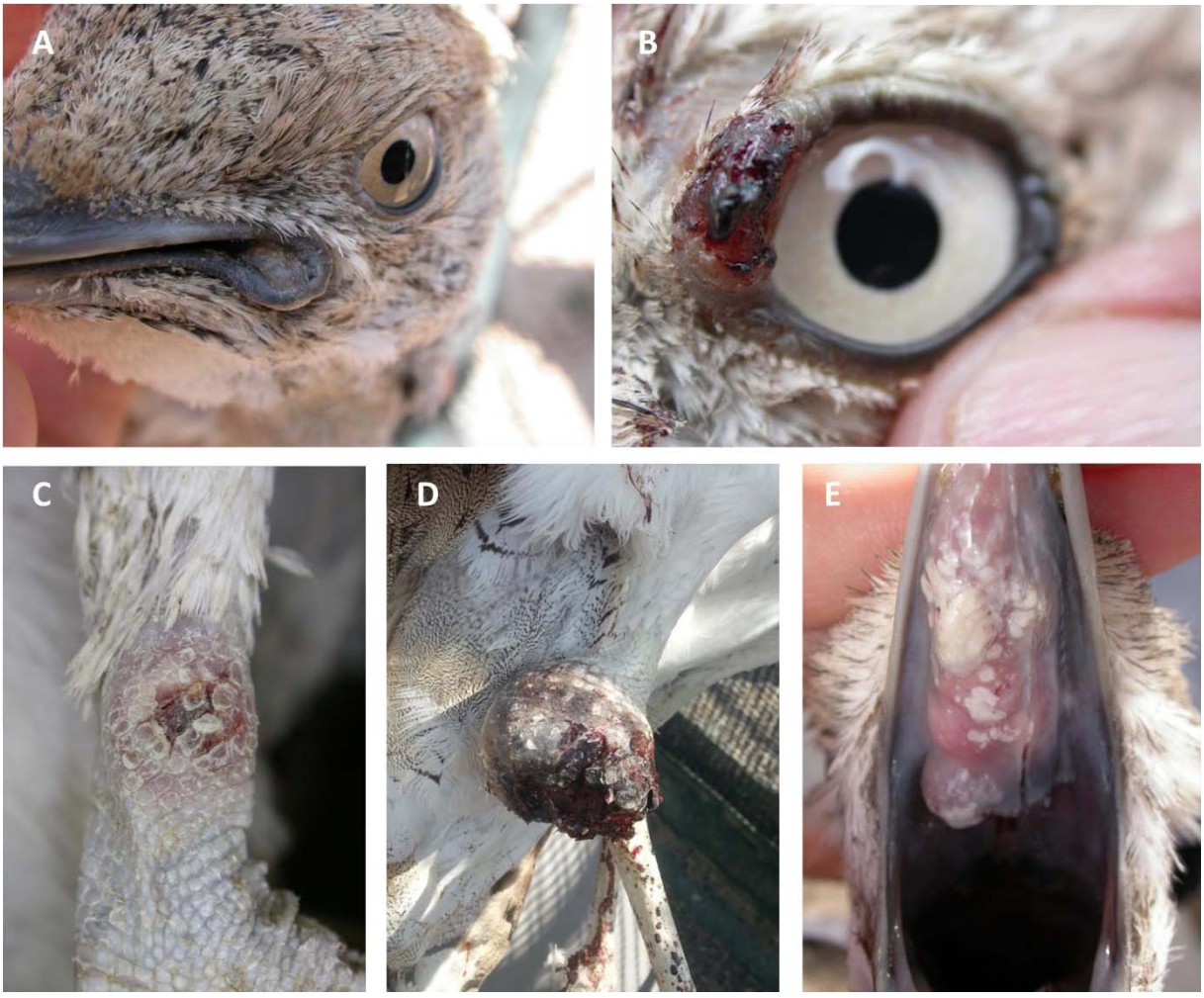

Figure 14. Lesions of pox infections in Houbara. Moderate cutaneous lesions on the angle of the mouth (a), the eyelid (b) and the leg (c), large cutaneous lesion (d) on the leg and diphtheritic lesions in the oral cavity (e).

Table 5. Clade distribution of viruses identified in Houbara.

	Off outbreaks		During outbreaks	
	CNPV-like viruses	**FWPV-like viruses**	**CNPV-like viruses**	**FWPV-like viruses**
African Houbara, Morocco	79% (15)	21% (4)	100% (6)	0% (0)
Asian Houbara, Morocco	65% (11)	35% (6)	100% (10)	0% (0)
Asian Houbara, UAE	50% (2)	50% (2)	5% (2)	95% (36)

CPNV-like = canarypox-like viruses, FWPV-like = fowlpox-like viruses. Figures in brackets correspond to the numbers of strains identified in the present study. Outbreaks are defined in Materials and Methods.

Discussion

We report here repeated pox outbreaks in Houbara captive-breeding projects. While APV have been known for many years to successfully infect Houbara, only sporadic cases had been recorded so far in small captive-breeding projects (157,166,169). Episodes with mortality had also been reported on few illegally trapped birds, which were maintained in poor conditions (163,167,171). Our study, carried out in large-scale captive-bird populations followed over years in North Africa and in the Middle East, allows for a better understanding of APV epidemiology in Houbara captive-breeding projects.

In the two study sites, every bird is vaccinated according to a strict protocol and a high biosecurity level is applied: epidemiological units are defined according to the fate (breeder versus future released individual) and disease-sensitivity of birds (juveniles versus adults). Sanitary measures are implemented per unit: sanitary barriers (changing room, disinfectant mats for vehicles and staff, etc.) are created at the interface breeding/outdoor as well as between all epidemiological units. Staff and equipment are dedicated to each epidemiological unit. One way management is used. Cleaning, disinfection and pest control procedures are regularly applied and facilities access to wild birds is controlled. Birds are housed in individual cages or in small groups in large aviaries. Medical management consists in a daily control of every bird and in isolating and treating individually each infected bird. However, and despite this sanitary management strategy, we found in our study that pox cases occurred during more than half of the year (88% of the months in Morocco, 61% in the UAE) and that seasonal increase of incidence was observed every year. We observed several pox outbreaks for both species and study sites, with monthly morbidity rates reaching 8.9, 20.0 and 6.2 cases for 1000 bird-months at risk, for African Houbara and Asian Houbara in Morocco and Asian Houbara in the UAE, respectively (Figure 13). Unfortunately no data are available from other captive species to compare these rates. Our observations reflect sanitary constraints met by large-scale captive-breeding projects. Indeed, hundreds of technicians work in the projects to guarantee individual good care, but this high number of stakeholders also represents a risk of pathogens spread. Densities of birds increase and certain standardization of protocols are needed, which limits individual adjustment of cares. The impact of increasing flock size is observed in our study. Thus, pox disease incidence has increased from 2011 through 2013 together with the increase of flock size

in the UAE. Another example was observed in Morocco in 2009: the sudden increase of flock size from 2008 through 2009 for both species (flocks have almost doubled in one year) has increased density of birds and can explain the outbreaks observed from July 2009 through March 2010 for both species (Outbreaks No. 1 and 2).

Other factors can promote these outbreaks of pox disease. We observed in our study that cases clustered in time, mostly during summer and fall in Morocco and during spring in the UAE. This suggests a seasonal pattern of APV transmission in Houbara population, which may be influenced by climatic conditions. The relationship between climate and pox incidence has already been described in wild birds (72,92) and attributed to an effect of climate on insect vectors abundance. In Morocco, a hot summer followed by a rainy fall could be favourable to maintain efficient insect vectors population for several months. In the UAE, most of precipitations as well as most of pox cases are observed in the spring. Then, a very hot summer with almost no precipitations likely leads to a strong reduction of insect vectors population and as a result to a decrease of pox incidence. The exposure of birds to vectors is very difficult to control, especially in the context of reinforcement projects. Indeed, in order to prepare birds to be released and to survive in the wild, they need to be reared in outdoor aviaries (185) where contacts with vectors are impossible to avoid. Additionally, insects' abundance can eventually be promoted by other actions associated to bird preparation for release. For example, habitat inside and outside aviaries are improved by promoting vegetation growth to provide shading and increase wild diet sources. Breeding stations are permanent enclosures, which are located in semi-desert or desert areas. They usually include accommodations for staff and irrigation systems (alfalfa fields to feed the Houbara, garden, habitat restoration) and thus, offer permanent water and higher vegetation cover than outside of the enclosure. Breeding stations create artificial oases especially attractive for insects and commensal wild birds (pigeons, sparrows). Such conditions are known to increase pox prevalence in wild bird populations (92,93).

The morbidity rates calculated in the present study significantly differed between the two Houbara species (Table 3), suggesting that the sensitivity to APV may differ between the two Houbara species, independently of the site where they are raised. The higher observed sensitivity of Asian Houbara to APV in Morocco could be due to the fact that this species may be naïve to Moroccan APV strains. Indeed, Asian Houbara have been captive-bred out of their natural distribution area before being transferred in

captive-breeding projects in the UAE. For this reason, we can also wonder whether Asian Houbara has not played the role of amplifier in Morocco. The incidence of pox disease in African Houbara has significantly decreased from 1.2 (95% CI=1.1, 1.2) cases for 1000 bird-months at risk, when Asian Houbara were present, to 0.2 (95% CI=0.1, 0.2) cases for 1000 bird-months at risk after their transfer to the UAE. Exposure of bird species to exotic APV strains is a threat for the sustainability of endangered species (94,98,108) and the implementation of ex situ conservation breeding should consider this risk (174). In our captive-breeding projects, every bird is carefully examined before being released in the wild. If any infectious disease is diagnosed or even suspected, the bird is kept in captivity. Thus, this management prevents from releasing infected individuals. Up to now the prevalence of APV in wild Houbara populations is still unknown, but field observations suggest it is very low because no clinically infected birds were detected during field studies of released and wild birds (more than 300 birds caught from 2006 through 2013). This can be explained because no infected bird is released, by the low density of Houbara in the wild, and by their use of an environment unfavourable to insect vectors compared to captive conditions. However, further studies, using for example seroprevalence, are needed to better assess the prevalence and then appreciate the importance of APV for wild Houbara populations.

We showed in the present study that, in addition to CNPV-like viruses, FWPV-like viruses can be responsible of outbreaks in Houbara. We have recently shown (183) that an unexpected high diversity of APV from CNPV and FWPV clades is able to infect Houbara. These results improved the current knowledge about APV sensitivity of Houbara and more generally about APV host-specificity. Indeed, up to now, it was thought that only CNPV-like viruses could infect Houbara (169), and therefore, vaccination of Houbara in conservation projects has been done only with CNPV strains. Moreover, APV are classically considered to be host species or order specific and, even if this has been recently questioned by various authors (1,2,46), host sensitivity is usually considered to depend on the virus involved. The present study shows that sensitivity of Houbara to a wide diversity of APV strains is certainly one of the causes of pox disease persistence in captive-breeding projects. Previously infected birds are kept in captivity and closely monitored for possible recurrence. About 6% of birds having been infected by APV develop a second episode of pox infection during their captive life. However, we do not know whether those recurrences are relapses or reinfections, because no data

are available about persistence of APV in the host, duration of immunity or cross-protection between APV strains. This highlights the need to further research to improve the vaccination strategy for pox infections as it has already been discussed (183). We found in the present study that in the UAE, APV isolated from Houbara belong mainly to FWPV clade. Origins of strains infecting Houbara are likely related to local context of sites. In the UAE, numerous poultry farms and private collections of exotic birds of unknown biosecurity level exist and some of them are located quite close to the Houbara captive-breeding project (6 poultry farms are located between 6 and 12 km from the Houbara captive-breeding project). Those sites are also attractive for commensal wild birds (sparrows, pigeons), and we can assume that movements of wild birds can spread pathogens between sites. In the UAE, we also observed that adult Houbara were as sensitive to FWPV-like viruses as the juveniles, while in Morocco, we found that CNPV-like viruses infected almost only juveniles. This sensitivity of Houbara to a wide diversity of APV strains, and especially to FWPV-like viruses, is of particular concern.

Despite an apparent low prevalence and a quasi-null lethality in the study sites, pox disease may have an impact in Houbara captive-breeding projects. Considering the current size of captive flocks (more than 10 000 birds per project), hundreds of birds can be infected every year including birds of high genetic value like founders. In case of outbreaks, this may also have an impact on reinforcement efforts by strongly decreasing the number of birds released in the wild because no bird having been infected will be released. Finally, APV can also impact the breeding performances of captive Houbara (G. Le Loc'h, S. Bertagnoli, M.C. Paul, in preparation).

The present study points to constraints inherent to large-scale conservation breeding projects, which aim at producing enough high-quality individuals. Nevertheless, the shift of scale of such conservation projects allows larger data collection and better understanding infectious diseases epidemiology and physiopathology for which knowledge is still scarce. Thus, efforts should continue to better understand the epidemiology of APV infections in Houbara, including risk factors analyses, cross-protection and vaccination trials and studies on the identification and ecology of vectors and their control.

5. Conclusion

i. Manifestations cliniques

Cette première étude apporte des éléments intéressants sur l'épidémiologie de la variole aviaire chez l'Outarde en captivité, en particulier dans des élevages à grande échelle. Elle montre qu'en dépit de mesures strictes de biosécurité et de la vaccination de tous les oiseaux, la maladie est présente de façon quasi-permanente dans les élevages et présente des fluctuations saisonnières d'incidence conduisant dans certaines circonstances à des pics épizootiques de plusieurs mois. La grande majorité des cas observés sont des formes cutanées de variole aviaire et, bien qu'au Maroc la proportion de ces formes soit statistiquement inférieure (91%) à celle des Émirats Arabes Unis (98%) (Test du chi-deux, $p<0,001$), les lésions observées sont similaires quel que soit le projet. Sur deux autres projets étudiés dans la thèse (ECCH en Ouzbékistan et SKHBC-KZ au Kazakhstan) mais non inclus dans cette étude descriptive, les formes cutanées dominent aussi et la mortalité est très faible. À de rares exceptions près (55,167), cette forme de la maladie est peu létale, ceci étant d'autant plus vrai dans les projets étudiés où la détection et la prise en charge médicale des oiseaux malades est précoce. L'appréciation exacte de la létalité de la variole aviaire est cependant difficile. En effet il est souvent difficile d'attribuer avec certitude la mort d'un oiseau à l'infection par un avipoxvirus. Chez l'Outarde, les traumatismes, les troubles métaboliques et les infections bactériennes sont les principales causes de mortalité (137,161,162). Aussi, il arrive régulièrement que lors d'autopsie, des lésions varioliques puissent être observées en association avec d'autres lésions, rendant difficile la détermination de la cause primaire de la mort. Par ailleurs, des oiseaux varioliques peuvent parfois être euthanasiés pour des raisons éthiques ou de biosécurité. Lors de forme diphtérique, en revanche, la mortalité est généralement plus importante comme cela a pu être observé à Agadir en 2004 (170) ou au RAF-HBC (Qatar) en 2014 (Le Loc'h, données non publiées).

Ces résultats démontrent l'intérêt de maintenir dans une certaine mesure un suivi individuel des oiseaux, malgré la taille importante des élevages. Ainsi des données précises peuvent être collectées et permettre le calcul d'indicateurs de morbidité pertinents. En élevage avicole, la morbidité est plus difficile à évaluer, notamment car la détection précoce des cas et l'examen systématique de tous les individus sont

compliqués. C'est probablement pour cette raison que davantage de données de mortalité existent au détriment des données de morbidité.

ii. Facteurs climatiques

La corrélation entre saisons et incidence de la variole aviaire, mise en évidence dans cette étude, rejoint les observations faites sur des populations d'oiseaux sauvages (64,70,71). Ces observations démontrent une influence importante, mais probablement indirecte, de facteurs climatiques à travers les fluctuations des populations d'insectes vecteurs. De telles fluctuations saisonnières ne sont en général pas observées en élevages avicoles. La vocation de conservation des élevages d'outardes impliquent certaines contraintes qui limitent la prévention des risques d'exposition aux insectes vecteurs. L'élevage d'oiseaux à l'extérieur, dans un environnement le plus naturel possible, et la présence de végétation voire de systèmes d'irrigation, permettant de fournir nourriture et ombrage aux oiseaux, créent des conditions propices au développement et au maintien de populations d'insectes. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dès que les conditions climatiques sont propices aux insectes vecteurs, des cas de variole aviaire sont détectés sur les oiseaux captifs. En revanche, les densités d'oiseaux relativement faibles et la prise en charge médicale rapide des oiseaux maladies sont certainement des facteurs limitant la diffusion du virus et pouvant expliquer que les taux de morbidité restent malgré tout relativement faibles la plupart du temps. Bien que tous les auteurs s'accordent pour dire que la transmission mécanique par les insectes est importante (20,64,66), peu d'études portant sur l'identification des vecteurs, leur écologie et les interactions virus-vecteurs et vecteurs-hôtes ont été réalisées (72) ; alors que ce type d'études a été largement réalisé pour certains arbovirus des oiseaux comme le virus du Nil occidental (186–188). Malgré ce manque d'information, certaines mesures peuvent être recommandées pour limiter les populations d'insectes vecteurs : assèchement des gîtes larvaires, limitation de la végétation exotique environnante, utilisation de filets imprégnés d'insecticides, cette dernière mesure ayant déjà fait ses preuves (73).

iii. Espèce et captivité

Outre l'influence du climat et des insectes, cette étude permet d'identifier d'autres facteurs de risque potentiels, notamment l'espèce et l'âge. Ainsi l'Outarde asiatique semble plus sensible que l'espèce africaine. Il faut cependant nuancer cette

conclusion car l'espèce asiatique au Maroc a pu être exposée à des souches virales vis-à-vis desquelles elle était naïve. Or, il est reconnu que l'introduction de souches virales « exotiques » au sein de populations naïves conduit à des taux d'infection importants (74,94) et que la translocation d'individus hors de leur aire de répartition naturelle constitue un risque d'exposition à des maladies infectieuses (181). Pour mieux comprendre les différentes sensibilités mais également pour apprécier si la variole aviaire est un problème qui est apparu avec le développement et l'intensification des élevages d'outardes, il serait souhaitable de mieux connaître la prévalence de l'infection chez les populations sauvages. Jusqu'alors seul un cas d'oiseau sauvage séropositif pour des anticorps anti-avipoxvirus mais ne présentant aucun signe de variole aviaire a été rapporté dans la littérature (168). Aucune étude dédiée n'a cependant été menée. Pour ce faire, la recherche de séroconversion vis-à-vis d'une infection variolique semble intéressante, le préliminaire indispensable étant le développement d'un test sérologique, si possible quantitatif. Divers tests sérologiques ont été développés dans le cadre d'études scientifiques mais aucun n'a été commercialisé (19,20,57,80,106,107).

iv. Age et statut vaccinal

L'âge semble être aussi, dans certaines circonstances, un facteur de risque. Au Maroc les juvéniles sont beaucoup plus infectés que les adultes chez les deux espèces d'Outarde. En revanche, au Émirats Arabes Unis, les adultes sont autant infectés que les juvéniles. Cette différence semble liée aux souches virales incriminées et probablement aussi au statut vaccinal des oiseaux. On peut en effet se demander si l'apparition de cas de variole aviaire chez les adultes aux Émirats Arabes Unis n'est pas simplement due au fait que les oiseaux ne sont pas protégés contre les infections par les virus FWPV-like. Une autre hypothèse pourrait être un retard d'acquisition d'une immunité naturelle par les oiseaux durant leur croissance. En effet, aux Émirats Arabes Unis, les juvéniles comme les adultes sont maintenus plus longtemps en bâtiments qu'au Maroc et sont donc moins fréquemment exposés aux insectes vecteurs. L'infection des adultes est préoccupante car les performances de reproduction peuvent être davantage impactées que lorsqu'il s'agit de juvéniles. Il est revanche plus difficile de comprendre la situation marocaine. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : la primo-vaccination des juvéniles à 30 et 60 jours ne serait pas efficace (présence d'anticorps maternels, protocole inadapté ?) ; la vaccination ne serait efficace à aucun âge et les juvéniles

développeraient une immunité lors d'infection spontanée (seule une partie se manifestant par la maladie) les protégeant ensuite à l'âge adulte ; les adultes qui sont en grande majorité en cage individuelle et sur litière artificielle seraient moins exposés aux vecteurs que les juvéniles qui, pour la grande majorité[7], sont élevés sur sol naturel avec présence de végétation (…) ou à proximité de zones végétalisées. Pour répondre à ces questions, une analyse plus approfondie des facteurs de risque, permettant notamment d'identifier les conditions zootechniques et physiologiques favorable à l'infection, et l'étude du statut immunitaire lors d'infection variolique sont deux pistes intéressantes.

[7] Au Maroc, sur la période d'étude, environ 90% de la production de poussins de l'espèce africaine a été destinée au renforcement des populations sauvages.

B. Impact de la variole aviaire sur les performances de l'Outarde houbara en élevage

1. Contexte

La variole aviaire est connue depuis longtemps pour avoir un impact économique non négligeable en élevage avicole. Les oiseaux infectés présentent généralement une émaciation et un retard de croissance entraînant des diminutions de la production d'œufs et de la fertilité. Les lésions cutanées aux pattes peuvent gêner la locomotion et les lésions sur les paupières peuvent provoquer une cécité, empêchant dans ces deux cas l'oiseau d'avoir accès à la nourriture. Des lésions diphtériques peuvent aussi obstruer partiellement les voies digestives et respiratoires hautes et perturber ainsi la déglutition ou la ventilation (20). Plus rarement, l'impact économique est directement dû à la mortalité importante (55). Chez d'autres espèces, comme les canaris, ce sont d'ailleurs les morts elles-mêmes qui posent de sérieux problèmes aux éleveurs (66,86). L'impact de la maladie sur l'avifaune sauvage a aussi été étudié, aux échelles individuelle et populationnelle. Ainsi la variole aviaire est reconnue comme étant une des causes de déclin de plusieurs espèces de passereaux insulaires (72,74,80,94), et plus récemment il a été montré qu'elle pouvait influencer négativement la dynamique des populations de mésanges charbonnières en Angleterre (97). Au niveau de l'individu, l'infection peut modifier la réponse anti-prédateur et rendre ainsi l'oiseau plus vulnérable (95), ou augmenter la mortalité (97,175). Enfin un impact sur les performances de reproduction a parfois été observé en diminuant la capacité des mâles à s'accoupler (96) ou des parents à élever leurs jeunes (97). Il faut noter que parmi ces différentes observations, beaucoup ne sont pas attribuables directement aux lésions mais sont des effets systémiques de l'infection. Dans les projets de conservation, les rares études qui rapportent un l'impact de la variole aviaire, par exemple sur des faucons pèlerins en Allemagne (23) ou sur des outardes houbara dans les pays du Golfe, font surtout état des morts associées à la maladie (163,167), mais de possibles effets sur les performances d'élevage (croissance, reproduction) n'ont jamais encore été évalués.

2. Problématique

La première étude de cette thèse a permis de montrer que la variole aviaire est présente de façon quasi-permanente dans les élevages et présente des fluctuations saisonnières d'incidence conduisant dans certaines circonstances à des pics

épizootiques de plusieurs mois. La mortalité associée à la variole aviaire même si elle est difficile à estimer avec précision est très faible et ne constitue pas une préoccupation, en comparaison avec d'autres causes de mortalité identifiées, comme les traumatismes ou certains affections métaboliques (137,161,162). En revanche on sait que les oiseaux, lorsqu'ils présentent des lésions varioliques, sont isolés et traités individuellement et peuvent être retirés des protocoles de relâchés, ce qui peut perturber éventuellement les programmes de renforcement des populations sauvages. De même la vaccination appliquée à tous les oiseaux représente pour les élevages un coût financier non négligeable (environ 2 € par oiseau et par vaccination), et un coût logistique conséquent puisque vacciner 100 oiseaux contre la variole aviaire requiert environ 2,5 heure-homme. Les effets directs de la maladie sur les oiseaux ne sont pas bien connus dans les projets de conservation que nous avons étudiés où : (i) la mortalité due à la variole aviaire est négligeable, (ii) les formes cutanées de la maladie sont très majoritaires et (iii) tous les oiseaux sont traités individuellement afin d'éviter le développement de lésions trop débilitantes. Il semblait donc intéressant d'évaluer si la variole aviaire avait un effet sur les outardes dans ces élevages. La gestion et la collecte de données effectuée pour chaque oiseau captif permettait d'envisager une telle étude. La seconde partie de la thèse a donc tenté d'apporter des éléments de réponse à cette question en mesurant l'impact de la maladie sur certaines performances d'élevage de l'Outarde, et plus particulièrement en évaluant au cours de deux épizooties de variole aviaire au Maroc les effets de la maladie sur les parades et les pontes des oiseaux lors de leur première année de mise à la reproduction.

3. Démarche expérimentale

i. Choix effectués

Nous avons décidé de réaliser ce travail sur des populations d'oiseaux élevées à ECWP car ce projet a hébergé les deux espèces d'Outarde de 2006 à 2012 et elles y ont toutes les deux subies des pics épizootiques de variole aviaire, comme nous l'a montré la première étude de la thèse. Nous nous sommes appuyés pour ces analyses sur les données collectées périodiquement dans le cadre de l'application des protocoles d'élevage à ECWP, ce qui signifie qu'aucun protocole particulier n'a été mis en place pour cette étude. Ainsi nous avons dû dans un premier temps apprécier les données disponibles et leur qualité afin de voir quelles analyses étaient envisageables.

À ECWP, la variole aviaire concerne très majoritairement les oiseaux âgés de moins d'un an et plus particulièrement ceux âgés de deux à neufs mois (cf. Figure 11, p46). Les deux performances qu'il semblait donc intéressant de considérer étaient la croissance et les résultats de reproduction durant la première année de mise à la reproduction. Toutefois, les résultats de reproduction étant la clé de la réussite d'un élevage conservatoire, nous avons décidé de focaliser cette étude sur leur analyse. La maturité des outardes en captivité est atteinte pleinement à l'âge de quatre ans et à l'âge d'un an, seule une partie des mâles et une faible proportion de femelles deviennent matures (20% en moyenne). Pour cette raison, nous avons choisi des performances reflétant de manière globale la maturité des oiseaux : nombre de parades pour les mâles et nombre d'œufs pondus pour les femelles.

Nous avons voulu évaluer l'impact de la variole aviaire sur les deux espèces d'Outarde et avons choisi de travailler pour chacune d'elle sur une cohorte qui avait présenté un pic épizootique au cours de sa première année de mise à la reproduction. Ce choix se base sur le postulat qu'un effet de la variole aviaire serait plus facilement détectable à ces périodes où les taux de morbidité ont été les plus élevés. En nous référant à la première étude de cette thèse, nous avons donc décidé d'analyser les performances des outardes africaines nées durant le printemps 2009 et des outardes asiatiques nées durant le printemps 2010 (cf. Figure 13, p55).

ii. Matériel et méthodes

(a) Populations et période d'étude

Quatre populations ont été étudiées : les mâles et les femelles d'outardes africaines nées en 2009 et les mâles et les femelles d'outardes asiatiques nées en 2010. À partir des résultats de reproduction en captivité enregistrés depuis plusieurs années à ECWP, la première saison de mise à la reproduction a été définie comme la période allant du mois janvier (inclus) au mois de juillet (inclus) de l'année suivant l'année de naissance des oiseaux. Comme l'âge des oiseaux au sein de chaque population présentait une certaine variabilité, nous avons ensuite redéfini cette période en fonction de l'âge des oiseaux. La première saison de mise à la reproduction, appelée par la suite « saison », a donc finalement été définie pour chaque oiseau comme la période allant de l'âge de 9 mois révolus à l'âge de 14 mois révolus. Dans un premier temps, tous les individus nés avec un statut de futur reproducteur et répondant aux critères choisis ont

été sélectionnés pour l'analyse. Dans un second temps, les oiseaux morts, transférés sur un autre projet ou ayant été réformés avant la fin de la saison ont été écartés, de même que les individus pour lesquels certaines données étaient manquantes (Tableau 6).

Tableau 6. Caractéristiques des quatre populations étudiées.

Population	Espèce	Cohorte	Sexe	Individus sélectionnés	Recrutement[1]	Parade / Œufs[2]	Variole aviaire[3]
U09M	*C. undulata*	2009	mâle	730	79,6%	11,7	9,7%
U09F	*C. undulata*	2009	femelle	689	13,9%	3,9	7,1%
M10M	*C. macqueenii*	2010	mâle	634	94.5%	8,3	3,8%
M10F	*C. macqueenii*	2010	femelle	744	32,5%	6,9	7,3%

[1] Proportion d'oiseaux ayant paradé ou pondu. Cela correspond à la présence / absence de parades ou d'œufs.
[2] Nombre moyen de parades ou d'œufs pour les oiseaux ayant paradé ou pondu.
[3] Proportion d'oiseaux ayant eu au moins un cas de variole aviaire entre l'âge de 6 et 14 mois.

(b) Variables dépendantes : performances de reproduction

Chaque oiseau captif est quotidiennement observé par des techniciens d'élevage et ce tout au long de l'année. À partir du mois de décembre et jusqu'en août, les mâles sont observés au moins trois fois par jour tous les jours et les parades sont notées. Pour les femelles, la présence d'œuf dans la cage et recherchée tôt le matin (la ponte est alors considérée comme s'étant produite la veille) puis encore au moins deux fois au cours de la journée. Quand un œuf a été pondu, il est immédiatement collecté pour être incubé artificiellement. La collecte systématique des œufs induit chez la femelle des pontes de remplacement. Pour chaque oiseau, les pontes et les parades sont ensuite enregistrées une à une (une saisie par jour de parade et une saisie par œuf) dans des protocoles dédiés de la base compilant toutes les données d'élevage et vétérinaires. Les parades et les pontes enregistrées pendant la première saison de mise à la reproduction ont été extraites de la base et dénombrées pour chaque individu des populations étudiées. Le nombre de parades ou d'œufs produits par chaque oiseau a constitué la variable dépendante sur laquelle nous avons voulu quantifier l'effet de la variole aviaire.

(c) Variables explicatives : variole aviaire et variables confondantes.

Les variables explicatives qui ont été sélectionnées et intégrées aux analyses ont été définies et extraites pour la saison de chaque oiseau mais également pour la période des trois mois précédents la saison. Cette période, que nous appelons par la suite « présaison », s'étale donc entre l'âge de six mois révolus et l'âge de neuf mois révolus.

Certaines variables ont été analysées séparément pour ces deux périodes car la présaison et la saison sont très différentes d'un point de vue physiologique et zootechniques : en présaison, oiseau immature, élevé en groupe et recevant une alimentation de croissance ; en saison, oiseau potentiellement mature, élevé en cage ou batterie individuelle et recevant une alimentation « reproducteur ».

Toutes les données d'élevage et vétérinaires sont enregistrées sur des formulaires papiers puis saisies dans la base de données informatique d'ECWP, comme cela a été précédemment décrit pour les cas de variole aviaire (cf. Chapitre II :A.3.ii, p43). L'ensemble des données analysées dans cette étude ont été extraites de cette base avec Microsoft Access et, à l'aide de plusieurs requêtes, chaque donnée a été examinée pour détecter différents type d'erreurs (erreurs d'écriture, doublons, non correspondances des dates, données aberrantes…). Lorsque cela était possible les données ont été corrigées à partir des formulaires papiers. Un soin particulier a été porté à la correction des données de variole aviaire.

Deux variables décrivant la variole aviaire et qui pouvaient chacune avoir un effet différent sur les pontes et les parades ont été définies : (var1) présence ou absence de variole aviaire sur l'oiseau pendant la présaison ; (var2) présence ou absence de variole aviaire sur l'oiseau pendant la saison. En travaillant sur des populations constituées d'une seule cohorte, nous n'avons pas eu à prendre en compte un effet année (climat, modifications des protocoles…). En revanche, malgré une certaine standardisation des techniques d'élevage, une variabilité existe même entre les oiseaux d'une cohorte. Par exemple, durant la présaison, la proportion d'un sexe dans un groupe de six oiseaux peut prendre toutes les valeurs possibles. Un certain nombre de variables confondantes a donc été intégré à l'analyse. Elles se répartissent en trois catégories :

- Variables zootechniques : ce sont les variables qui reflètent un effet des conditions d'élevage. À ce titre, la date de naissance reflète notamment les conditions climatiques puisqu'en fonction de sa date de naissance un oiseau n'aura pas « vécu » sa saison au même moment de l'année ;
- Variables de santé : les variables décrivant la variole aviaire font partie de cette catégorie. Nous avons aussi évalué si les autres causes de morbidité pouvaient influencer les performances de reproduction ;

- Variables de croissance : ce sont les poids et les gains de poids. Les poids ont été mesurés à trois âges : à l'éclosion (1 jour), à la fin de la période de démarrage (12 jours), et à la fin de la croissance (230 jours)[8].

Après extraction et codage de toutes les données, la distribution de chaque variable a été examinée. Certaines variables ont alors été exclues car présentant une distribution très déséquilibrée (par exemple, pour la variable décrivant le type de cage, seul un oiseau de la population M10M a été en batterie en présaison, tous les autres oiseaux ayant été en cage) ou étant très corrélées à d'autres variables (par exemple, la taille moyenne du groupe en saison et à la proportion de temps passé en groupe en saison). D'autres variables ont été recodées (par exemple, le nombre de changements de cages subit par un oiseau a été recodé en une variable binaire : présence / absence de changement de cage). Finalement 20 variables explicatives ont été retenues pour l'analyse statistique (Tableau 7).

(d) Analyse statistique

Les données étudiées ici sont des données de comptage. Une première exploration de la variable dépendante pour chaque population a permis de constater qu'un nombre important d'oiseaux n'a pas paradé ou pas pondu (Tableau 6). Cet excès de zéro par rapport à la distribution de Poisson classiquement utilisée pour les données de comptage a dû être pris en compte dans l'analyse. La démarche a alors consisté à analyser les données en deux temps :

- Performance présente ou absente (présence / absence de parades ou d'œufs). L'absence de parade ou d'œuf peut alors être interprétée comme une absence de maturité sexuelle ;
- Compte (intensité) de la performance : nombre de parades ou d'œufs produits. La performance peut alors être interprétée comme le degré de maturité sexuelle.

[8] En fait la croissance continue au-delà de cet âge mais beaucoup plus lentement. L'âge de 230 jours a été choisi car, après analyse, c'est autour de cet âge que les poids disponibles sur la base de données étaient les plus concentrés.

Tableau 7. Liste des variables explicatives utilisées dans l'analyse.

Catégorie	Variable	Description et modalités	Type
Zootechnique	brank	Rang de naissance, calculé en soustrayant à la date de naissance de chaque oiseau la date de naissance du premier oiseau éclos	Continue
Zootechnique	site	Site occupé majoritairement en présaison et en saison : enjil, missour, enjil&missour	Catégorielle
Zootechnique	cage	Type de cage occupé majoritairement en présaison et en saison : cage, batterie, batterie&cage	Catégorielle
Zootechnique	dg1	Temps passé en groupe en présaison : 100% du temps en groupe ou moins de 100% du temps en groupe	Catégorielle
Zootechnique	dg2[1]	Temps passé en groupe en saison : 0% du temps en groupe ou plus de 0% du temps en groupe	Catégorielle
Zootechnique	tg1	Taille moyenne du groupe en présaison	Continue
Zootechnique	propm1	Proportion moyenne de mâles dans le groupe en présaison	Continue
Zootechnique	dpc1	Changements de cage subis en présaison : oui, non	Binaire
Zootechnique	dpc2	Changements de cage subis en saison : oui, non	Binaire
Zootechnique	sent[2]	Statut sentinelle : oui, non	Binaire
Santé	mal1	Malade (hors variole aviaire) en présaison : oui, non	Binaire
Santé	mal2	Malade (hors variole aviaire) en saison : oui, non	Binaire
Santé	var1	Malade (variole aviaire) en présaison : oui, non	Binaire
Santé	var2	Malade (variole aviaire) en saison : oui, non	Binaire
Croissance	p1	Log_{10} du poids à 1 jour d'âge	Continue
Croissance	p12	Log_{10} du poids à 12 jours d'âge	Continue
Croissance	p230	Log_{10} du poids à 230 jours d'âge	Continue
Croissance	gp1-12	Log_{10} du gain de poids relatif entre 1 et 12 jours d'âge	Continue
Croissance	gp12-230	Log_{10} du gain de poids relatif entre 12 et 230 jours d'âge	Continue
Croissance	gp1-230	Log_{10} du gain de poids relatif entre 1 et 230 jours d'âge	Continue

[1] Pour la population U09F, les modalités sont 100% du temps en groupe ou moins de 100% du temps en groupe.
[2] Les oiseaux ayant un statut sentinelle sont capturés et manipulés plus fréquemment pour divers prélèvements.

Considérant cette double composante de la performance étudiée et partant du principe que l'absence de parade ou d'œuf ne correspondait pas à une absence de détection de la part des observateurs mais a une réelle absence de la performance, nous avons appliqué à nos données un modèle hurdle (189). Ce type de modèle permet dans un premier temps d'analyser la présence ou l'absence de la variable (par la suite nous appelons cette partie du modèle, la partie zéro) puis dans un second temps d'analyser les données de comptage sur les variables présentes (soit une distribution tronquée en

s'affranchissant des valeurs nulles ; par la suite nous appelons cette partie, la partie compte). Ce modèle diffère des modèles *zero-inflated* qui considèrent que l'excès de zéros peut provenir soit de l'absence de la variable, soit de sa non-détection. Afin de paramétrer correctement le modèle hurdle, nous avons testé différents modèles vides (n'intégrant aucune variable explicative) en utilisant une distribution binomiale pour la partie zéro et en utilisant successivement des distributions de Poisson, quasi-Poisson et binomiale négative pour la partie compte. Après avoir comparé les modèles par leur AIC (critère d'information d'Akaike) et les distributions observées aux distributions calculées par chaque modèle, le modèle utilisant une distribution binomiale négative pour la partie compte a été sélectionné.

Le modèle utilisé par analyser les données a donc été un modèle hurdle paramétré avec une distribution binomiale et une fonction de lien logit pour la partie zéro, et une distribution binomiale négative pour la partie compte. L'obtention du modèle expliquant le plus fidèlement la distribution des performances de reproduction a été effectuée en utilisant une approche automatique de sélection pas-à-pas des variables (approche *stepwise*) s'appuyant sur la comparaison des AIC de chaque modèle à partir d'un modèle initial intégrant toutes les variables. Les variables var1 et var2 ont été forcées dans le modèle et la sélection des variables a été faite indépendamment pour les deux parties du modèle.

Le programme R (190) et les packages pscl (191), MASS (192) et lmtest (193) ont été utilisés pour réaliser toutes les analyses.

4. Résultats

i. Description des variables

L'examen des performances de reproduction de chaque population (Figure 15) a permis d'une part de confirmer qu'un excès de zéros était présent, notamment chez les femelles, et d'autre part de voir que les données étaient sur-dispersées (variance très supérieure à la moyenne), justifiant la nécessité d'utiliser un modèle hurdle et une distribution binomiale négative plutôt qu'une distribution de Poisson dans la partie compte du modèle.

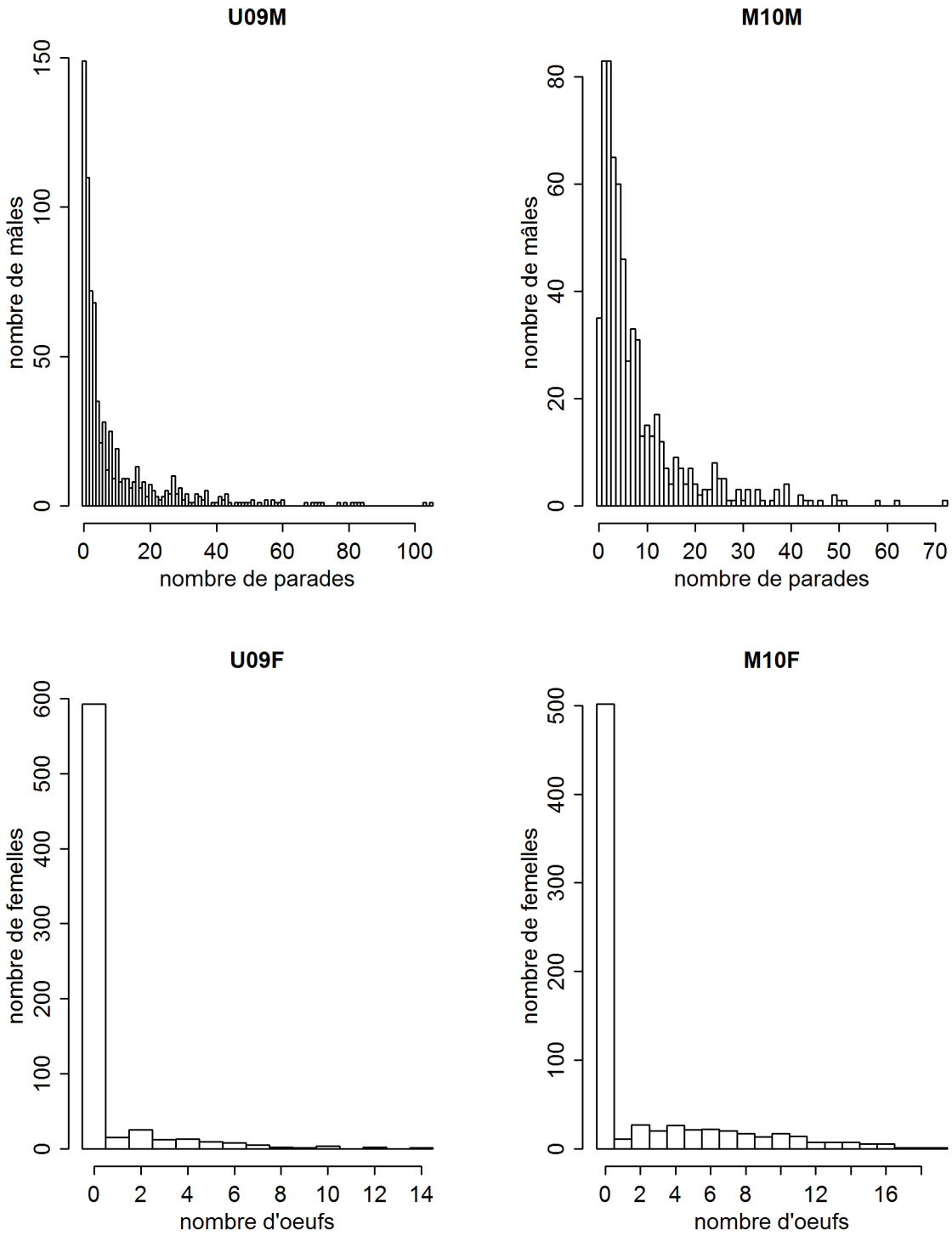

Figure 15. Distribution des parades et des pontes pour chaque population.

Les deux composantes des performances de reproduction (présence / absence et compte) ont été observées pour chaque variable explicative introduite dans le modèle. Pour les variables explorant l'effet de la variole aviaire, cette analyse descriptive a permis de dégager des premières tendances visibles sur le Tableau 8 et la Figure 16.

Tableau 8. Proportion d'oiseaux ayant paradé ou pondu dans chaque population et pour les deux modalités des variables var1 et var2.

	var1		**var2**	
	non	oui	non	oui
U09M	79% (527/669)	89% (54/61)	80% (567/712)	78% (14/18)
U09F	13% (87/645)	20% (9/44)	14% (93/681)	38% (3/8)
M10M	94% (580/614)	95% (19/20)	95% (595/629)	80% (4/5)
M10F	32% (222/693)	39% (20/51)	33% (240/731)	15% (2/13)

ii. Analyse statistique

La sélection du meilleur modèle par l'AIC a permis de ne garder qu'un nombre réduit de variables pour expliquer au mieux la distribution de chaque performance de reproduction. Afin de vérifier si la sélection du modèle n'avait pas été biaisée du fait que les variables var1 et var2 aient été forcées dans le modèle, nous avons appliqué une seconde fois la procédure de sélection du modèle en ne forçant cette fois aucune variable. Les résultats ont montré que dans les deux cas les modèles obtenus contenaient les mêmes variables (plus ou moins var1 et var2) et le test du rapport de vraisemblance n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux modèles. Les modèles aves les variables var1 et var2 ont donc été retenus comme modèles finaux. L'ajustement des modèles obtenus aux données a été vérifié avec un test de Pearson. Les résultats ont montré un bon ajustement des modèles pour les populations de femelles, U09F et M10F, ($p=0,5$) mais une adéquation médiocre pour les populations de mâles, U09M et M10M, ($p=0,03$ et $p=0,01$). Les modèles finaux obtenus montrent que les distributions des performances de reproduction sont expliquées par des variables zootechniques, de santé et de croissance (Tableau 9). La variole aviaire, qu'elle survienne avant la reproduction (présaison) ou pendant la reproduction (saison), est associée à une faible probabilité de recrutement (présence / absence de parades ou d'œufs) et a un effet négatif sur le nombre de parades ou d'œufs produits, sauf en présaison pour la population M10F où elle augmente la probabilité de recrutement. Ces effets sont toutefois faibles et non significatifs sur les populations de mâles U09M et M10M et la population de femelles U09F. Chez les femelles de la population M10F, une augmentation significative de la proportion d'oiseaux qui pondent et à l'inverse une réduction significative du nombre d'œufs pondus sont observées lorsque la variole aviaire survient en présaison.

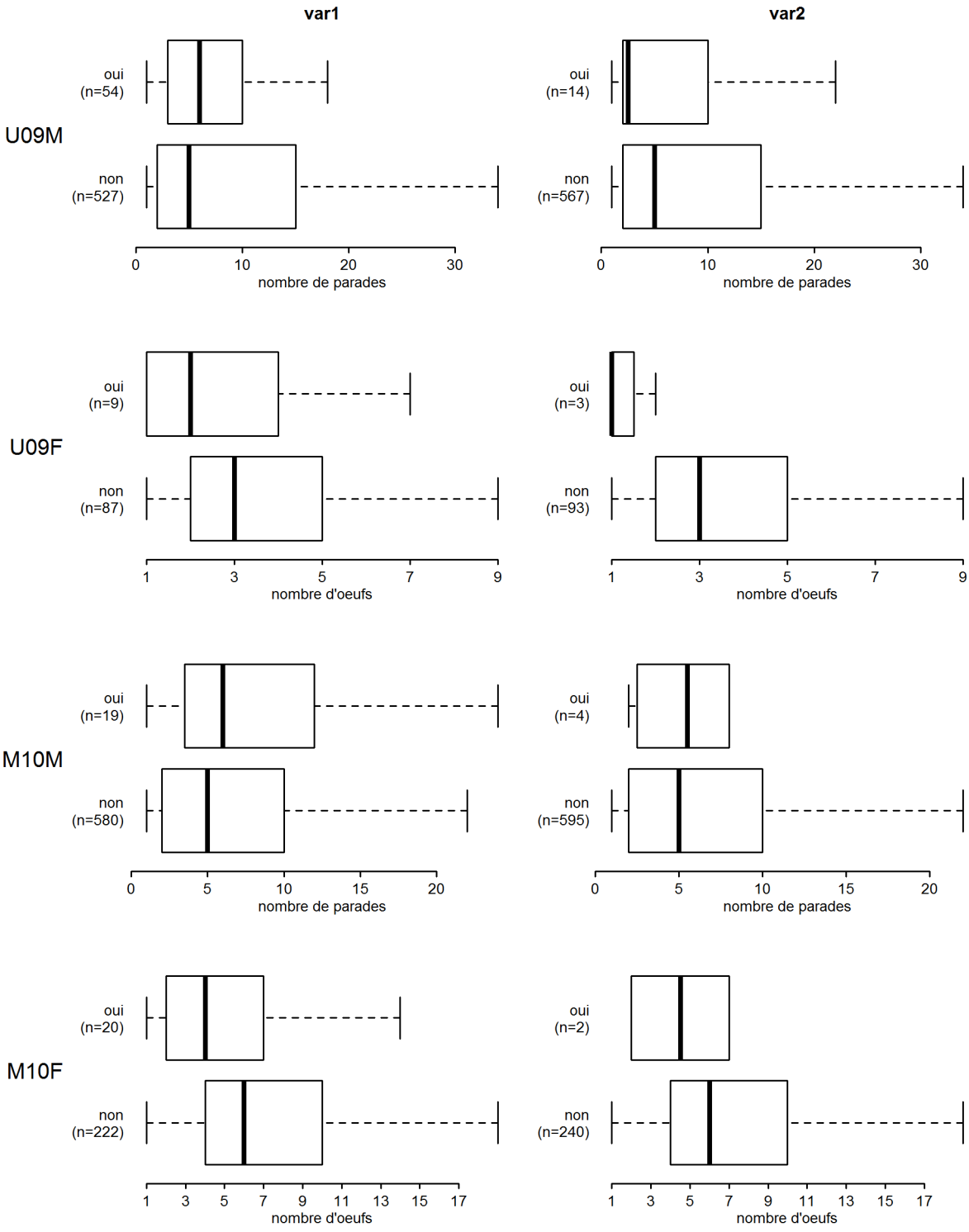

Figure 16. Boîtes à moustache des performances pour les variables var1 et var2.

Pour chaque population et chacune des variables var1 et var2, les boîtes représentent les performances des oiseaux ayant paradé ou ayant pondu pour les deux modalités de la variable. Les valeurs extrêmes ne sont pas représentées.

Tableau 9. Coefficient des variables sélectionnées dans le modèle final pour chaque population.

Variable	U09M		U09F		M10M		M10F	
	Zéro	Compte	Zéro	Compte	Zéro	Compte	Zéro	Compte
brank	-0,03* (0,01)	-0,03* (0,01)			-0,02 (0,01)	-0,02* (0,01)	0,01* (0,01)	
site (missour)	-4,23* (1,20)	-0,16 (0,25)	0,04 (0,34)		na	na	na	na
site (enjil&missour)	-3,95* (1,15)	-0,56* (0,26)	-2,34* (0,52)					
cage (cage)	-2,81* (1,26)		-1.00 (0,55)		na	na	-1,66* (0,40)	-0,43* (0,14)
cage (batterie&cage)	na	na	na	na	na	na	0,07 (0,46)	-0,17 (0,15)
dg1 (100%)		1,12* (0,28)		0,85* (0,31)			0,55* (0,20)	
dg2 (0%)	-3,84* (1,07)		na	na		-0,30 (0,17)		-0,24 (0,16)
dg2 (100%)	na	na	-2,11* (0,34)	-0,64* (0,23)	na	na	na	na
tg1	-0,51* (0,15)	-0,35* (0,08)						
propm1	-1,49* (0,62)		-1,15 (0,68)					
dpc1 (oui)								0,27 (0,16)
dpc2 (oui)		-1,04* (0,29)			-1,99 (1,11)			
sent (oui)	1,53 (1,01)			1,26* (0,50)				
mal1 (oui)		0,45 (0,31)	-1,11 (0,77)					
mal2 (oui)						0,40 (0,26)		-0,29 (0,17)
var1 (oui)	-0,29 (0,49)	-0,01 (0,23)	-0,15 (0,44)	-0,17 (0,29)	-0,05 (1,08)	-0,10 (0,28)	1,31* (0,36)	-0,39* (0,20)
var2 (oui)	-0,44 (068)	-0,60 (0,41)	-0,12 (0,95)	-1,90 (1,04)	-1,58 (1,25)	-0,92 (0,62)	-1,68 (0,86)	-0,23 (0,52)
p1			-5,94 (3,18)	-38,43 (19,87)	-126,90 (88,05)		10,07* (2,78)	
p12		-2,09 (1,39)	16,11* (3,69)	41,55* (20,47)	827,52* (319,78)	-2,21* (1,04)	-2,68 (1,74)	
p230		6,29* (1,36)			-703,03* (281,03)	2,49* (1,11)		
gp1-12		2,36* (0,94)		-24,20 (13,07)	-85,98 (61,24)	1,47* (0,69)		
gp12-230			10,45* (2,73)	3,16 (1,82)	653,03* (259,89)			
gp1-230	4,59* (1,74)						10,70* (1,94)	

Les coefficients ne sont indiqués que pour les variables qui ont incluses dans le modèle final. Les astérisques indiquent si ces coefficients sont significatifs avec une probabilité $p<0,05$. Les erreurs standards sont indiquées entre parenthèses. Les valeurs « na » indiquent que ces modalités n'existent pas dans ces populations.

5. Discussion et conclusion

À travers cette étude nous avons voulu évaluer si, dans le contexte des élevages conservatoires étudiés, la variole aviaire avait un effet sur les résultats de reproduction des outardes. La taille des élevages actuels ne permet pas, avec de simples observations de terrain, d'avoir une appréciation des impacts des maladies infectieuses sur les oiseaux. Au contraire, le suivi et la collecte de données pour chaque individu offre une opportunité unique de quantifier de tels effets. Les résultats de notre étude montrent que pour les deux cohortes, étudiées toutes deux au Maroc pendant des pics épizootiques, la variole aviaire n'a pas d'effet significatif sur la parade de mâles et un faible effet sur la ponte des femelles. L'effet sur les femelles n'est significatif que pour la population M10F lorsque la maladie se manifeste avant la saison de reproduction, entre les âges de six et neuf mois.

Au Maroc, où nous avons mené l'étude, la morbidité due à la variole aviaire est faible chez les adultes et plus élevée chez les juvéniles. Ceci a justifié notre choix de travailler sur les oiseaux durant leur première année de mise à la reproduction. Pour les femelles, nous avons choisi d'étudier la production d'œufs plutôt que d'autres résultats de reproduction (fertilité, production de poussins…) parce que davantage de paramètres auraient dû être pris en considération (qualité du sperme utilisé pour l'insémination, qualité de l'insémination, paramètres d'incubation…), compliquant alors l'interprétation des résultats. Pour les mâles, la parade a été étudiée car il s'agit d'un indicateur fiable de la qualité reproductive (194), utilisé par les femelles dans la nature pour sélectionner les individus avec lesquels elles vont s'accoupler. Chez l'Outarde, comme pour les autres espèces à lek, les mâles n'interviennent dans la reproduction qu'au moment de l'accouplement et la parade reflète la qualité de l'individu et notamment son statut immunitaire (194). Pourtant, on peut se demander si l'absence systématique d'effet de la variole aviaire dans notre étude peut être liée au choix de la parade comme indicateur de la performance de reproduction. Bien que cette variable soit intéressante à étudier, il est possible que les oiseaux réussissent à masquer les effets de l'infection sur la parade dans les conditions offertes par la captivité. Indépendamment du caractère sexuel de la parade, l'Outarde peut aussi avoir conservé en captivité la capacité à cacher une atteinte de son état général pour se protéger des prédations, comme le font de nombreuses espèces proies (195). D'ailleurs, les observations en élevage rapportent régulièrement la découverte d'oiseaux atteints d'affections chroniques à un stade avancé et pour lesquels

aucune manifestation clinique n'avait été observée auparavant. L'étude d'autres performances de reproduction moins directement soumise à une pression de sélection, comme la qualité du sperme, pourrait par conséquent se montrer intéressante, de même que l'étude de modifications physiologiques (variation de paramètres sanguins, par exemple).

Pour les femelles, l'association observée entre la présence de la variole aviaire en présaison et une plus forte probabilité de recrutement des oiseaux de la population M10F est étonnante. L'explication la plus plausible est que cet effet ne soit pas dû à la maladie elle-même mais à la façon dont elle est gérée. Les captures et traitements plusieurs jours de suite des oiseaux malades pourraient renforcer l'imprégnation et réduire le stress lié aux conditions de captivité (196), permettant ainsi à davantage d'oiseaux de s'exprimer (de pondre) pendant la saison de reproduction. Malgré cela, la maladie a tout de même un impact négatif sur le nombre d'œufs pondus. La raison pour laquelle des effets significatifs ne sont notés que sur cette population n'est pas claire mais pourrait être simplement due à un manque de robustesse de l'analyse, notamment à cause du faible nombre d'oiseaux infectés par les avipoxvirus. Bien que nous ayons travaillé sur des périodes où les taux de morbidité étaient les plus élevés, la variole aviaire a surtout été rapportée au Maroc chez les jeunes oiseaux. Ainsi, la morbidité est assez faible en présaison (six à neuf mois d'âge) et faible en saison (oiseaux âgés de plus de neuf mois), ne dépassant pas 2,5% à cette période (population U09M). Pour confirmer les effets observés il serait donc pertinent de généraliser l'analyse à un plus grand nombre d'oiseaux, sur plusieurs années. Aux Émirats Arabes Unis, où la variole aviaire affecte autant les adultes que les juvéniles, il serait possible d'évaluer les impacts de la maladie sur des oiseaux matures. De même, la recherche d'effets sur les juvéniles (sur la croissance par exemple) serait intéressante. Il faut aussi considérer une particularité des élevages conservatoires qui peut rendre difficile l'interprétation de ce type d'étude. Il s'agit de la grande variabilité interindividuelle inhérente à la gestion génétique de ces projets (conservation d'une grande diversité génétique), qui peut conduire à une certaine variabilité des réactions face aux infections.

Malgré cela, il est quand même possible interpréter les résultats obtenus. Tout d'abord, les conditions de captivité par opposition aux conditions sauvages, peuvent en partie expliquer l'absence ou le peu d'effet de la variole aviaire sur les performances de reproduction. Il a en effet été prouvé que l'effet d'un agent infectieux sur la reproduction

des certaines espèces d'oiseaux dépendait de la disponibilité des ressources naturelles. Ainsi des gobemouches à colliers (*Ficedula albicollis*) infectés par des plasmodiums réussissent à avoir des succès de reproduction identiques à ceux d'oiseaux non infectés, en décalant leur saison de reproduction pour se reproduire à un moment où davantage de ressources sont disponibles et où ils peuvent plus facilement supporter un investissement reproductif (197). Au sein des élevages conservatoires d'outardes, les oiseaux juvéniles sont maintenus par groupe de six individus maximum afin de limiter au maximum la compétition et ils sont hébergés en cage individuelle lorsqu'ils sont adultes. La nourriture et l'eau sont distribuées la plupart du temps *ad libitum*. Ces conditions artificielles, en garantissant un accès sans effort et sans compétition aux ressources alimentaires, limitent certainement les effets que peut avoir toute affection sur les performances des oiseaux.

Aucune étude n'avait jusqu'alors été menée pour apprécier les effets de la variole aviaire sur la reproduction d'oiseaux captifs, particulièrement en élevage conservatoire. Seules de rares études ont montré que la maladie pouvait avoir un impact sur les résultats de reproduction de populations d'oiseaux sauvages (96,97). Les effets d'autres agents infectieux sur la reproduction de populations d'oiseaux sauvages ont été étudiés, et souvent un effet négatif a été observé (198,199). Toutefois, et contrairement à ce qui était attendu, l'absence d'impact ou même un impact positif de l'infection ont parfois été rapportés, et ce pour des agents parasitaires et viraux (197,200,201). Différentes explications ont été avancées. Certains travaux n'ont étudié que le portage de l'agent infectieux ou des preuves de contact avec l'agent infectieux par sérologies sans s'intéresser strictement aux oiseaux présentant une infection clinique. Dans ces cas, il est possible que l'absence de forme clinique ou la présence d'infections sub-cliniques uniquement suffise à expliquer l'absence d'effet (200). Dans d'autres cas, il peut s'agir non pas d'un réel effet positif de l'infection mais plutôt d'une plus grande sensibilité des individus les plus performants. Les individus qui ont de meilleurs résultats de reproduction investissent davantage dans la reproduction au détriment du maintien d'une immunité efficace (198,201).

L'absence d'effets de la variole aviaire en saison de reproduction peut aussi s'expliquer par l'efficacité de la prise en charge médicale des oiseaux et rejoint d'une certaine manière la première explication donnée ci-dessus. Grâce à l'observation quotidienne des oiseaux et le contact proche entre personnel et oiseaux,

particulièrement pour les individus reproducteurs, les lésions sont détectées précocement, lorsqu'elles sont encore petites, et chaque oiseau malade est alors isolé et traité jusqu'à guérison. Il est rare d'observer des oiseaux présentant de grosses lésions débilitantes. On peut donc supposer, qu'au détriment d'une prise en charge logistiquement et humainement contraignante, le traitement rapide et efficace de chaque oiseau malade stoppe précocement le développement de la maladie et prévient les répercussions sur la physiologie des oiseaux. Les résultats obtenus ici vont dans ce sens et cette dernière explication semble la plus à même de les expliquer. À ce titre, il serait intéressant d'évaluer l'impact que la variole aviaire peut avoir sur les oiseaux destinés à être relâchés, pour lesquels la pression d'observation est moins intense (afin d'éviter une imprégnation des oiseaux), et chez lesquels les lésions sont souvent détectées plus tardivement.

En conclusion, cette étude nous a permis de montrer que, même dans des circonstances d'épizootie, la variole aviaire n'avait pas ou très peu d'effets sur les résultats de reproduction des outardes en captivité. La principale explication avancée est que la détection précoce des cas de variole aviaire et l'intervention systématique sur tout oiseau malade casse le cycle de la maladie. Cela montre la nécessité, malgré la taille importante des élevages conservatoires d'outardes, de continuer à utiliser en partie une gestion individuelle. Ici nous n'avons étudié que l'effet de la forme clinique de l'infection par les avipoxvirus mais il faudrait également évaluer si des infections, même sub-cliniques, pourraient avoir un effet sur les oiseaux. Cela est d'autant plus intéressant que nous avons émis l'hypothèse précédemment que la proportion d'oiseaux infectés pourrait être nettement plus importante que la proportion d'oiseaux malades. Enfin nous savons que la variole aviaire chez l'Outarde peut être causée par des virus FWPV-like et CNPV-like. Bien que les manifestations cliniques semblent identiques quelques soient les souches, la prise en charge précoce des oiseaux malades masque l'évolution naturelle de la maladie et ne permet pas d'en différencier les conséquences cliniques. Il semble donc pertinent de mieux préciser la diversité des souches infectant l'Outarde et d'étudier leurs effets respectifs sur les oiseaux.

C. Diversité et évolution des avipoxvirus

1. Contexte

Les premières descriptions de cas de variole aviaire vers le milieu du 19e siècle ont été faites sur de la volaille domestique (61,62) et des lésions attribuables au même virus ont été rapportées dès le début du 20ème siècle sur des pigeons et des canaris. La question s'est alors posée de l'existence de différentes souches virales pouvant présenter des spécificités d'hôtes. Les premiers travaux qui ont essayé de répondre à ces questions ont utilisé des infections expérimentales de différentes espèces d'oiseaux avec plusieurs virus, isolés sur des espèces distinctes, et ont permis d'affirmer qu'une même espèce hôte présentait des sensibilités différentes suivant les virus utilisés et qu'un même virus n'avait pas le même pouvoir pathogène suivant l'espèce hôte infectée (202). À partir de ces résultats, quatre grands groupes d'avipoxvirus ont été distingués : les fowlpox virus, les pigeonpox virus, les turkeypox virus et les canarypox virus (59). Par la suite, d'autres infections expérimentales effectuées sur des espèces sauvages ou exotiques ont montré que la distinction n'était pas si aisée et que davantage de souches existaient probablement (38,39). Des études portant sur le profil antigénique de différents virus ont ensuite permis d'affiner la distinction entre souches (203). Ce n'est pourtant qu'avec l'apparition de techniques moléculaires que la phylogénie des avipoxvirus a pu être précisée (1,2) et que des études d'épidémiologie moléculaire ont commencé à être réalisées. L'étude du génome des avipoxvirus est ainsi devenu un moyen efficace d'étudier l'épidémiologie de la variole aviaire, en permettant de comprendre l'apparition et la persistance d'épizooties dans certaines populations d'oiseaux (49,94,98,204) et d'expliquer les échecs vaccinaux parfois observés en élevage (17,56).

2. Problématique et objectifs

Chez l'Outarde, les caractéristiques des avipoxvirus capables d'infecter et de provoquer des lésions est mal connue. Les seules informations disponibles proviennent de deux études au cours desquelles des réactions croisées entre les virus isolés et différents sérums anti-avipoxvirus ont été testées. Dans un cas, aucune réaction n'a été obtenue avec des sérums anti-fowlpox, pigeonpox, canarypox et sparrowpox virus (167) alors que dans l'autre cas une réaction a été obtenue avec un sérum anti-canarypox virus (157), suggérant une proximité de cette souche avec les virus CNPV-like. Ce résultat est

concordant avec les deux seules séquences disponibles sur GenBank (44), qui se positionnent dans le sous-clade B1 (virus CNPV-like).

Les manifestations cliniques de la variole aviaire, rapportées dans la littérature chez l'Outarde, sont assez variables. La présence de papules et masses croûteuses sur les pattes, le bec et les paupières est souvent notée lors de forme cutanée (155,169) mais une forme atypique avec présence de lésions prolifératives n'intéressant que la troisième paupière et la conjonctive a également été observée (167). Dans d'autres cas des lésions diphtériques dans la cavité orale et l'appareil respiratoire supérieur, parfois associées à des lésions cutanées, peuvent prédominer comme cela a été observé en 2014 dans un élevage au RAF-HBC (Qatar) (Le Loc'h, données non publiées). Enfin, dans certains cas comme à Agadir en 2004 (170), les trois formes de la maladie peuvent évoluées simultanément. Bien que les différences de contextes sanitaires et zootechniques puissent en partie expliquer cette variabilité des manifestations cliniques, on peut aussi s'interroger sur l'intervention de différentes souches virales lors de ces épisodes.

La première étude de cette thèse qui visait à apporter des éléments simples sur l'épidémiologie de la variole aviaire dans des élevages conservatoires d'outardes a justement montré que des virus CNPV-like comme des virus FWPV-like pouvaient être responsables d'infection chez les outardes, sans toutefois préciser la nature et la diversité des souches impliquées. La persistance des infections, malgré l'utilisation systématique de la vaccination, nous a également conduit à nous interroger sur la protection conférée par la souche utilisée (souche canarypox virus KP) et donc sur la nature des souches responsables de la maladie. Cette troisième partie de la thèse a donc eu pour objectif d'étudier la diversité et la distribution des avipoxvirus responsables d'infections cliniques chez l'Outarde ainsi que l'évolution de ces virus, ceci afin de mieux comprendre les échecs vaccinaux observés, de proposer des ajustements à la stratégie sanitaire et d'apprécier l'exposition des élevages à des contaminations extérieures.

3. Démarche expérimentale

i. Prélèvements

Cette étude s'est appuyée sur le travail quotidien des techniciens avicoles et des équipes vétérinaires, qui lors du contrôle de chaque oiseau peuvent être amenés à diagnostiquer des cas de variole aviaire. Comme mentionné précédemment l'effort de

recherche de la maladie n'a pas été intensifié (cf. p43). En revanche, le prélèvement des lésions était fait avec des modalités différentes selon les projets. Une demande a donc été faite de prélever le plus systématiquement possible les lésions selon un protocole établi, distribué sur l'ensemble des projets à partir de juin 2011 (Figure 17). On peut donc supposer, qu'à partir de cette date, l'effort de prélèvement a été augmenté.

REN_RD_CP_GLL_110604_PoxEpidMolec_Protocol_CollecteCas-01en.doc

SAMPLING AND STORAGE OF POX LESION

PRINCIPLES

- Try to sample at least one lesion for every cases;
- The lesion should be sampled before any treatment;
- If possible, sample the largest and the most certain lesion;
- Sample the entire lesion or at least some dead and live tissues of the lesion (for example, don't sample only the crust).

SAMPLING

- Wear a latex glove (not necessary sterile glove);
- With the gloved hand and a compress, take the entire lesion;
- Put directely the lesion (or the compress if the lesion is to small to be separated from the compress) in a sterile sample bottle and close it.

IDENTIFICATION OF THE SAMPLE

- Write on the lid of the sample bottle the ring of the bird;
- Write on the side of the sample bottle:
  - The bird ring number;
  - The sampling date;
  - The lesion number (number written on the pox sheet).

CONSERVATION OF THE SAMPLE

- The day of sampling, put the sample bottle in a freezer (-80°C if possible, alternatively -20°C);
- Register the sample in the archive file.

Figure 17. Protocole de collecte des lésions de variole aviaire.

Au Maroc et aux Émirats Arabes Unis, d'autres espèces que l'Outarde houbara sont élevées, en plus petit nombre, également à des fins de conservation.

- ECWP : Ganga unibande (*Pterocles orientalis*) et d'Œdicnème criard (*Burhinus oedicnemus*) ;
- NARC : Outarde canepetière (*Tetrax tetrax*), Outarde arabe (*Ardeotis arabs*) et Outarde kori (*Adreotis kori*).

La gestion médicale de ces espèces est identique à celles des outardes houbara et si un cas de variole aviaire est diagnostiqué, les lésions varioliques doivent être prélevées. Par ailleurs un suivi sanitaire de l'avifaune sauvage est mis en place sur des moineaux domestiques capturés une fois par mois sur chaque site d'ECWP (Enjil et Missour) et là encore, si une lésion de variole aviaire est observée, elle doit être prélevée. Outre les lésions prélevées sur les outardes, des lésions issues d'autres espèces ainsi que la souche vaccinale utilisée (souche canarypox virus KP, Poulvac P Canary, Pfizer) ont donc aussi été étudiées, ceci afin de permettre une meilleure compréhension de la circulation des souches virales.

Dans la première partie de cette étude, portant sur la diversité des avipoxvirus chez l'Outarde, certaines séquences n'ont pas été incluses car ne provenant pas d'outardes houbara ou étant issues de lésions récupérées à la fin du travail de thèse. Par contre toutes les séquences (Tableau 10) ont été utilisées dans la seconde partie de cette étude portant sur l'évolution des avipoxvirus et les résultats intéressants, tirés de leur analyse, seront discutés dans la conclusion de cette partie.

Tableau 10. Lésions collectées et étudiées.

	Lésions incluses dans l'étude de la diversité des avipoxvirus	**Lésions incluses dans l'étude de l'évolution des avipoxvirus**
Maroc	100	118
Outarde houbara africaine	*52*	*55*
Outarde houbara asiatique	*48*	*55*
Œdicnème criard	*0*	*7*
Moineau domestique[1]	*0*	*1*
Émirats Arabes Unis[2]	57	63
Qatar[2]	0	13
Kazakhstan[2]	0	4
Ouzbékistan[2]	12	12

[1] Oiseau sauvage.
[2] Pour ces projets, toutes les lésions ont été prélevées sur des outardes houbara asiatiques.

ii. PCR, séquençage et analyses bio-informatiques

Parmi les 210 lésions étudiées, l'ADN a été amplifié à partir de 168 lésions (80%). Il faut noter que l'amplification à partir de lésions diphtériques (50%) a été statistiquement moins efficace qu'à partir de lésions cutanées (89%) (Test du chi-deux, $p<0,001$). Les échecs d'amplification à partir de lésions diphtériques peuvent être dus à

des erreurs de diagnostic. Les formes diphtériques de variole aviaire, même si elles sont relativement caractéristiques, peuvent parfois être confondues avec d'autres maladies (infections à *Pseudomonas* spp., trichomonose, candidose…). Plus probablement, nous supposons que ces échecs sont causés par des inhibiteurs des ADN polymérases présents dans les lésions diphtériques qui sont souvent surinfectées. Le fait que nous ayons eu davantage de succès pour les amplifications après avoir dilué les éluats issus des extractions d'ADN des lésions va dans ce sens.

La grande majorité des lésions ont été stockées au congélateur, à -20 °C ou -80 °C, avant d'être traitées. De l'ADN a aussi pu être extrait et amplifié à partir de lésions conservées dans du formol tamponné à 10% depuis plusieurs années, ou conservées +4 °C pendant plusieurs mois. Lors des différentes étapes d'extraction et d'amplification, divers témoins négatifs (témoin d'extraction, témoin de contamination du mix de PCR) et positifs (souche canarypox virus KP utilisée sur les outardes et souche vaccinale fowlpox virus disponible au laboratoire) ont été intégrés.

Pour étudier la diversité des avipoxvirus chez l'Outarde, nous avons décidé dans un premier temps de fonder notre analyse sur le locus P4b[9], dont un grand nombre de séquences étaient déjà disponibles sur GenBank (44). Mais il nous a semblé intéressant de pouvoir confirmer les résultats obtenus avec l'analyse d'un autre locus. Le locus fpv140, qui est amplifié à l'aide des amorces M2904 et M2912 (1), présentait à ce titre un intérêt puisque qu'il avait déjà été étudié et qu'il permettait d'apporter dans certains sous-clades, une meilleure discrimination que P4b (45,46,205). Ce locus comprend trois à quatre ORF dont une à deux complètes suivant le clade du virus (Figure 18). Pour le locus fpv140, les extrémités des amplicons ont été séquencées avec les amorces M2904 et M2912 par méthode Sanger sur environ 900 nucléotides, puis des amorces internes ont été dessinées afin de séquencer le reste des amplicons, tout en garantissant un recouvrement d'au moins 100 nucléotides entre deux séquences. Pour étudier l'évolution des avipoxvirus, nous avons travaillé à partir de l'ensemble des séquences des loci P4b, fpv140 et DNA pol obtenues sur les élevages conservatoires d'outardes, et disponibles sur GenBank (44).

[9] Voir Chapitre I :A.2 (p7) pour plus d'informations sur les loci étudiés.

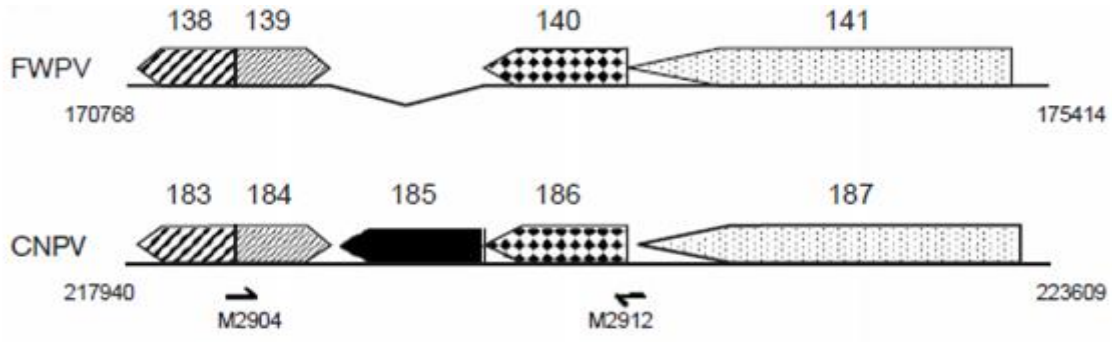

Figure 18. Structure du locus fpv140, d'après Jarmin *et al.* 2006 (1).

Après une première analyse des loci P4b et fpv140, nous avons essayé pour certains isolats (un représentant de chaque groupe de séquences) de détecter une possible intégration de séquences rétrovirales en amplifiant le gène de l'enveloppe du REV à l'aide d'amorces déjà publiées (25). Il a en effet été montré que l'amplification de ce gène donnait une bonne indication de la présence d'une séquence rétrovirale complète dans le génome d'un avipoxvirus et que cette intégration ne s'était faite que chez certains fowlpox virus (18).

Une fois obtenues, les chromatogrammes ont tous été visuellement inspectés et les séquences corrigées si nécessaire. Lorsqu'une séquence était de trop mauvaise qualité, elle a été ré-amplifiée puis re-séquencée. L'alignement des séquences du locus fpv140 (1,9 à 2,8 kpb) entre les virus FWPV-like et CNPV-like n'était pas satisfaisant à cause de l'absence de l'ORF CNPV185 pour les virus FWPV-like. Nous avons donc décidé de travailler séparément sur chaque ORF de ce locus (*FPV139*/*CNPV184*, *FPV140*/*CNPV186* et *FPV141*/*CNPV187*). Les résultats étant très similaires entre les séquences partielles des gènes *FPV139*/*CNPV184*, *FPV141*/*CNPV187* et les séquences complètes du gène *FPV140*/*CNPV186*, nous n'avons travaillé que sur ce dernier gène par la suite. Les analyses phylogénétiques nous ont montré que certains isolats ne se positionnaient pas dans le même clade suivant la séquence obtenue. Nous avons donc voulu explorer de possibles coïnfections en développant des amorces spécifiques à certains clades. Une fois des coïnfections exclues, nous avons également évalué d'éventuelles recombinaisons sur les séquences concaténées, ceci ayant été déjà fait sur les avipoxvirus (2) et ne posant à priori pas de problème, leur génome étant constitué d'un unique brin d'ADN.

4. Article 2

Cet article a été publié dans la revue *Veterinary Research* sous la référence :

Le Loc'h G, Ducatez MF, Camus-Bouclainville C, Guérin J-L, Bertagnoli S. Diversity of avipoxviruses in captive-bred Houbara bustard. Vet Res. 2014;45(1):98.

Diversity of avipoxviruses in captive-bred Houbara bustard

Guillaume Le Loc'h[1,2,3], Mariette F. Ducatez[2,3], Christelle Camus-Bouclainville[3,2], Jean-Luc Guérin[3,2] and Stéphane Bertagnoli[3,2]

[1]RENECO Wildlife Consultants LLC, Abu Dhabi, United Arab Emirates

[2]INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

[3]Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

Abstract

Implementation of conservation breeding programs is a key step to ensuring the sustainability of many endangered species. Infectious diseases can be serious threats for the success of such initiatives especially since knowledge on pathogens affecting those species is usually scarce. Houbara bustard species (*Chlamydotis undulata* and *Chlamydotis macqueenii*), whose populations have declined over the last decades, have been captive-bred for conservation purposes for more than 15 years. Avipoxviruses are of the highest concern for these species in captivity. Pox lesions were collected from breeding projects in North Africa, the Middle East and Central Asia for 6 years in order to study the diversity of avipoxviruses responsible for clinical infections in Houbara bustard. Molecular and phylogenetic analyses of 113 and 75 DNA sequences for P4b and fpv140 loci respectively, revealed an unexpected wide diversity of viruses affecting Houbara bustard even at a project scale: 17 genotypes equally distributed between fowlpox virus-like and canarypox virus-like have been identified in the present study. This suggests multiple and repeated introductions of virus and questions host specificity and control strategy of avipoxviruses. We also show that the observed high virus burden and co-evolution of diverse avipoxvirus strains at endemic levels may be responsible for the emergence of novel recombinant strains.

Introduction

Avipoxviruses (APV) are large enveloped, double stranded DNA viruses able to naturally infect more than 232 species from 23 orders (63). They belong to the genus *Avipoxvirus*, subfamily *Chordopoxvirinae* and family *Poxviridae*. To date, 10 APV species have been defined by the International Committee on Taxonomy of Viruses (37). Phylogenetic analyses of APV have previously been based on a couple of genes. An amplification product of 578 bp from the *fpv167* gene, orthologous of vaccinia virus A3L gene encoding a virion core protein 4b, has been widely used since this gene is highly conserved among poxviruses (3). Other genes have been used in order to validate or improve findings based on *fpv167*. The fpv140 locus (*fpv139*, *fpv140* and *fpv141* genes), has also been used (1) and the phylogenetic analyses based on *fpv140*, orthologous of vaccinia virus H3L gene encoding a virion envelope protein p35, have provided improved strain discrimination within some subclades (45,46,205). Phylogenetic analyses have all shown the same distribution of APV into 3 clades: fowlpox virus-like (FWPV-like, clade A), canarypox virus-like (CNPV-like, clade B), and psittacinepox virus-like (clade C).

APV infections can cause significant economic losses in domestic poultry, due to decreased egg production, reduced growth, blindness and increased mortality (20). In wild birds, the infection can compromise survival and breeding success by decreasing the ability to escape predators (95), to fledge and rear chicks (97), by impairing the pairing success (96) or by increasing mortality (175). Recently, emergence of APV infections in great tits in Europe and especially in the UK has been described and could represent a threat for the species (76,91). The impact of the disease can be dramatic for endangered species, especially for island species when APV are introduced in naïve populations as described in Hawaii (71), the Galapagos Islands (49) or Canary islands (79). The disease is also a concern for the success of conservation programs of endangered species, such as peregrine falcons in Germany (23) or Houbara bustard species (hereafter “Houbara”) in the United Arab Emirates (UAE) and Morocco (163,167).

The African Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*) and the Asian Houbara bustard (*Chlamydotis macqueenii*) inhabit semi-arid areas in North Africa, the Middle East and Central Asia. In the last decades, their populations drastically declined due to over-hunting, habitat degradation and poaching (184) leading the species to be listed as

"Vulnerable" by the International Union for Conservation of Nature (IUCN 2012). For more than 15 years, captive-breeding programs of the Houbara have been implemented in North Africa, the Middle East and Central Asia. Their goal is to increase the size of wild populations through release of captive-born individuals, which should substantially decrease extinction risk. APV infections are known to compromise the success of Houbara captive-breeding programs by increasing mortality (163,167). Persistent presence of infections is observed in captive flocks with morbidity rates of 2-3% in juvenile birds (≤1 year) despite prophylactic programs (G. Le Loc'h, unpublished data) but very little information is available about the APV strains circulating in Houbara.

The present study was aimed at assessing APV diversity within a species as well as virus circulation within captive-breeding programs. Molecular and phylogenetic analyses of APV in Houbara highlight that a large pathogen diversity and burden is possible in an apparent unfavorable environment.

Materials and methods

Animal samples

The study was conducted from 2008 through 2013 in 3 Houbara captive-breeding projects: the Emirates Center for Wildlife Propagation in Morocco, the National Avian Research Center and the Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center in the UAE and the Emirates Centre for the Conservation of Houbara in Uzbekistan. Birds housed in these projects were either *C. macqueenii* alone (UAE and Uzbekistan) or *C. macqueenii* and *C. undulata* (Morocco). Pox lesions were detected during routine check-up as part of veterinary management of birds. When typical lesions of APV infections, either cutaneous (nodular lesions on nonfeathered areas) or diphtheritic (yellowish lesions on the mucous membranes of the mouth, esophagus, or trachea), were observed (20), they were aseptically removed, transferred into a sterile pot and stored at −80°C until analysis. In total, 169 lesions were sampled (Table 11): 52 in *C. undulata* and 117 in *C. macqueenii*, mainly on juvenile birds (≤1 year; n=143, 85%). DNA was extracted from 25 mg of frozen tissue samples with the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

PCR, electrophoresis, and sequencing

PCR primers previously described were used to amplify P4b (42) and fpv140 loci (1). PCR were performed with the Illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Reaction volume was 25 µL and contained 3 µL of the target DNA, 1 µL of each primer (10 µmol/L), 20 µL of water and 1 re-solubilized bead (DNA polymerase, dNTP and reaction buffer). Cycling conditions for P4b amplification consisted of an initial denaturation for 5 min at 95°C followed by 35 cycles of denaturation (95°C, 40 s), annealing (60°C, 40 s) and extension (72°C, 1 min), and ended by a final extension for 10 min at 72°C. For amplification of fpv140, an initial denaturation (95°C, 5 min) was followed by 35 cycles of denaturation (95°C, 40 s), annealing (52°C, 40 s) and extension (72°C, 2 min), and ended by a final extension for 10 min at 72°C.

Table 11. Distribution of lesions collected in Houbara bustard captive-breeding projects from 2008 through 2013.

	Morocco	**United Arab Emirates**	**Uzbekistan**
2008	7	-	-
2009	6	-	-
2010	21	1	-
2011	49	4	-
2012	11	7	12
2013	6	45	-
	100	57	12

PCR amplicons (5 µL) were analyzed on 1.2% (P4b) or 1% (fpv140) agarose gels with TBE and SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, USA). PCR products were purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel), eluted in 30 µL of water and subsequently sequenced using the amplification primers and internal primers on an ABI 3130 XL automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) at the Plateau de Génomique GeT-Purpan, UDEAR UMR 5165 CNRS/UPS, CHU PURPAN, Toulouse, France. In order to extend the reads of fpv140 sequences, the following internal primers were used: FPV140_01F (5'-ATCCTGCGGCTGAACAGTAT-3'), FPV140_02F (5'-TTATCCTAGATTTTATGGATGATTTTG-3'), FPV140_02R (5'-

TTCTGCTAAGTTGCCGGAAT-3'), FPV140_03F (5'GACGACATCATTCTGATTTCCTTA-3'), FPV140_03R (5'-AAAAATTCTATCGCCAATCACA-3'), FPV140_04R (5'-AACACATACCAAATTGCTAAAAGA-3'), FPV140_06F (5'-TGTACACATTTATCCATAAACTCTCCT-3'), FPV140_08F (5'-GAATAGCAGTATCCAGATTCGCT-3'), FPV140_08R (5'-CTGTTGCAAGAGACGGCTTT-3'), FPV140-09R (5'-GCTAACCATGTGAGTCTGTGG-3') and FPV140_10R (5'-TGCAGGCTTACATGTACAGAAG-3').

Phylogenetic and recombination analyses

After manual editing and excluding primers with BioEdit 7.2.5, P4b and fpv140, DNA sequences were aligned with sequences available on GenBank using ClustalX 2.1. All available sequences on GenBank were initially used, then, one unique sequence of each group was kept for phylogenetic analyses. APV strains collected during the present study were named with the following nomenclature: APV clade (as determined by phylogenetic analysis of P4b: FWPV, CNPV and PSPV) / host species / origin / strain number / collection year. For example, CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/072/2011 is a Canarypox virus-like strain number 072 collected from a *Chlamydotis macqueenii* in the UAE in 2011. GenBank accession numbers are available in Table 12. Phylogenetic trees were generated using MEGA 5.2.1 by neighbor-joining (NJ) with the Kimura 2-parameters model and reliability of trees was tested through 1000 bootstrap replicates. After identification of clades and subclades, within and between subclades mean genetic distances were calculated with the same algorithm.

A recombination analysis was performed with RDP v3.44 in order to detect potential recombination events for CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009, which grouped differently when analyzing P4b and *fpv140*. Concatenated sequences of fpv140 (2750 to 2878 bp) and P4b (487 to 490 bp) loci were treated as linear by RDP, GeneConv, BootScan, MaxChi, Chimaeara, SiScan and 3Seq methods. Settings were adjusted to detect events with a highest acceptable *p* value equal to 0.0001.

In order to exclude a mix of different sequences in CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009, which could explain differences of positioning in phylogenetic trees, primers specific to either B1 (FPV140_03F and FPV140_03R) or B2 subclades (FPV140_02F, and FPV140_02R), and targeting the fpv140 locus were used. PCR were

performed on CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 and one additional specimen of subclades B1 and B2 were used as positive controls.

Table 12. GenBank accession numbers of strains isolated and used in this study.

Strains	GenBank accession numbers	
	P4b locus	**fpv140 locus**
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/072/2011	LK021648	LK021667
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/006/2011	LK021649	LK021668
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010	LK021650	LK021669
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/023/2011	LK021651	LK021670
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/031/2010	LK021652	LK021671
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/036/2010	LK021653	LK021672
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/083/2011	LK021654	LK021673
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/097/2012	LK021655	LK021674
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/UZ/102/2012	LK021656	LK021675
CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/UZ/103/2012	LK021657	LK021676
CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009	LK021658	LK021677
CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/010/2010	LK021659	LK021678
CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011	LK021660	LK021679
CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/077/2009	LK021661	LK021680
FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/066/2012	LK021662	LK021681
FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/070/2011	LK021663	LK021682
FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/119/2013	LK021664	LK021683
FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/150/2013	LK021665	LK021684
FWPV/*Chlamydotis undulata*/MA/024/2011	LK021666	LK021685

Results

Phylogeny

Out of the 169 samples, 139 DNA sequences were successfully amplified with at least one set of primers. Discrimination between FWPV-like viruses and CNPV-like viruses based on fpv140 loci fragment size shows a slightly higher proportion of CNPV-like viruses (n=63, 55%) than FWPV-like viruses (n=51, 45%).

Thereafter, 113 and 75 DNA sequences were obtained for P4b and fpv140, respectively. P4b sequences were trimmed to a 426 bp length fragment, which was used to carry out phylogenetic analysis. From fpv140 sequences, the 3 open reading frames

(ORF) corresponding to the 3 orthologous genes shared by FWPV-like viruses and CNPV-like viruses (*fpv139*/CNPV184, *fpv140*/CNPV186 and *fpv141*/CNPV187) were used to build independent phylogenetic trees.

The NJ tree based on P4b DNA sequences (Figure 19) provided clear distinction between known APV clades and subclades as previously described (1,2). The strains identified in the present study clustered in 11 genotypes belonging to clades A and B. Most of the strains of clade A grouped either in subclade A2 (n=30, genotype represented by FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/066/2012) with 100% identity with sequences obtained from a wide diversity of wild and domestic species, or in subclade A1 (n=24, genotype represented by FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/070/2011) with 100% identity with sequences from domestic Galliformes (e.g. *Gallus gallus*). FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/150/2013 grouped in subclade A3 and was identical to sequences from Columbiformes (e.g. *Columba palumbus*) and a great bustard (*Otis tarda*) in Spain. The 8 genotypes of clade B grouped in 3 subclades: the previously described subclades B1 (n=38) and B2 (n=19), and a putative new subclade B4 (n=1). Six genotypes grouped in subclade B1, which comprised sequences from a wide diversity of species, mainly Passeriformes. The predominating genotype (n=28, represented by CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010) shared 100% identity with sequences from great tits (*Parus major*) in Europe and house sparrows (*Passer domesticus*) in Morocco. The genotype represented by CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/072/2011 (n=2) was identical to a sequence from an African Houbara in the UAE. Only one genotype (n=19, represented by CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011) grouped in subclade B2 was identical to sequences from house sparrows in Morocco. Phylogenetic analysis shows a putative new subclade, B4, which comprised only one strain from an Asian Houbara in Morocco, CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/083/2011 (Figure 19). The closest sequence (90% identity) was isolated from an American robin (*Turdus migratorius*) in the United States and clustered in subclade B3. The minimal genetic distance between subclade B4 and other B subclades was 10.8% (Table 13).

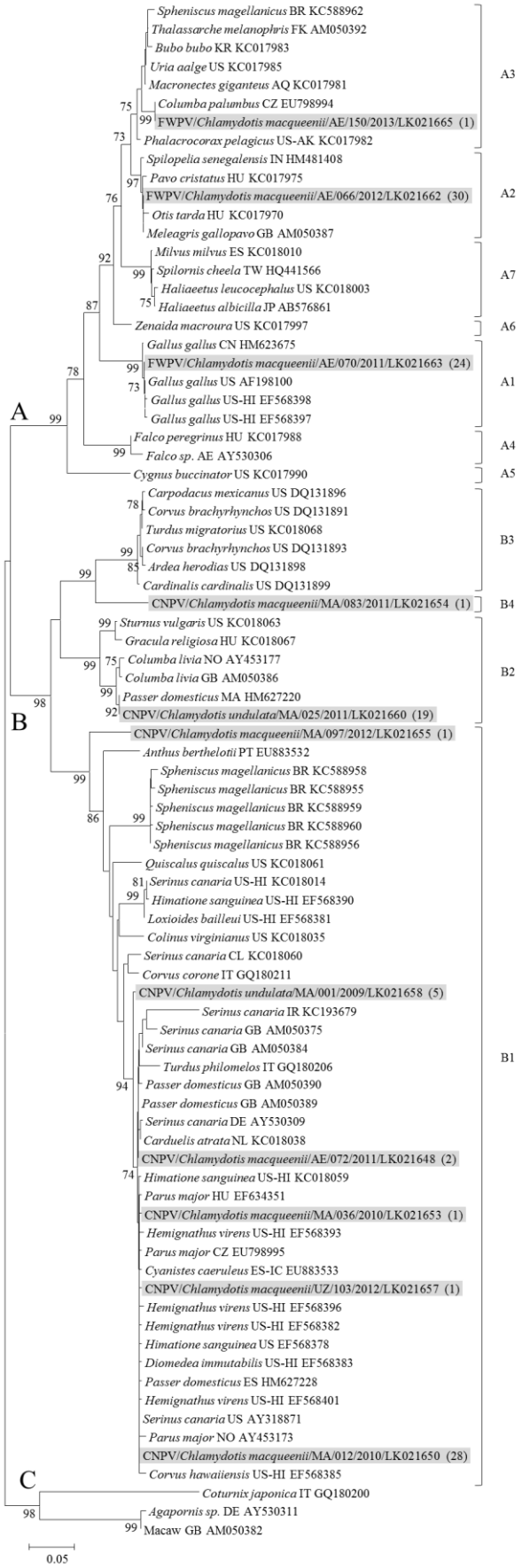

Figure 19. Neighbor-joining phylogenetic tree of P4b DNA sequences.

The neighbor-joining phylogenetic tree was constructed with the Kimura 2-parameters model. Bootstrap values (1000 replicates) >70% are shown. The 113 sequences identified in the present study grouped in 11 genotypes represented by strains are highlighted in grey. The numbers in brackets correspond to the numbers of strains identified in the present study, which have an identical P4b DNA sequence of 426 bp. Sequences obtained from GenBank are named as follows: host species / origin / accession number. Strains subclades are indicated on the right hand side of the tree.

Table 13. Within and between subclade mean genetic distances for P4b sequences.

	Between subclade distances (%)											Within subclade distances (%)
	A1	**A2**	**A3**	**A4**	**A5**	**A6**	**A7**	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**	
A1												0.3
A2	10.3											0.6
A3	9.3	3.2										1.4
A4	12.3	11.7	12.4									1.2
A5	14.8	13.7	12.3	16.3								-
A6	8.9	5.9	4.9	11.4	11.4							-
A7	10.5	6.7	5.2	13.7	11.9	6.1						0.7
B1	29.6	30.1	31.1	28.7	27.5	28.6	31.3					4.8
B2	27.6	25.7	25.5	24.3	28.2	25	28.6	17.9				2.7
B3	27.9	25.4	25.4	26.9	25.1	24	25.3	20.4	15.8			0.6
B4	28.2	26.2	26.3	25.7	27.5	26.5	29.1	21.1	15.4	10.8		-
C	30.4	32.3	32.1	33.5	31.9	29.8	32.2	32.5	30.8	34.5	31.1	19.4

Distances were calculated by neighbor-joining with the Kimura 2-parameter model.

The complete *fpv140* gene sequence (933–1020 bp) was used to build an NJ tree (Figure 20). Its analysis provided the clades/subclades classification as previously described for clade A (1,45) and new information for clade B. The 75 strains identified in the present study clustered in 17 genotypes, 5 belonging to clade A and 12 belonging to clade B. Among strains which grouped in subclade A2 as per phylogeny based on P4b (FWPV/*Chlamydotis macqueenii*/AE/066/2012), some remained in subclade A2 (sequences from domestic turkeys – *Meleagris gallopavo*), and others grouped in subclade A3 (mainly sequences from Columbiformes). In clade B, CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 and CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/097/2012, which grouped in subclade B1 with P4b, were positioned differently. CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 grouped in subclade B2 while CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/097/2012, which did not share more than 76.2% identity with other sequences, formed a putative new subclade. CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/083/2011 grouped in a putative new subclade B4 as identified with the phylogeny based on the P4b gene (Figure 20).

The analysis of the NJ trees built with *fpv139* and *fpv141* DNA sequences (data not shown) provided essentially the same information as obtained with *fpv140*.

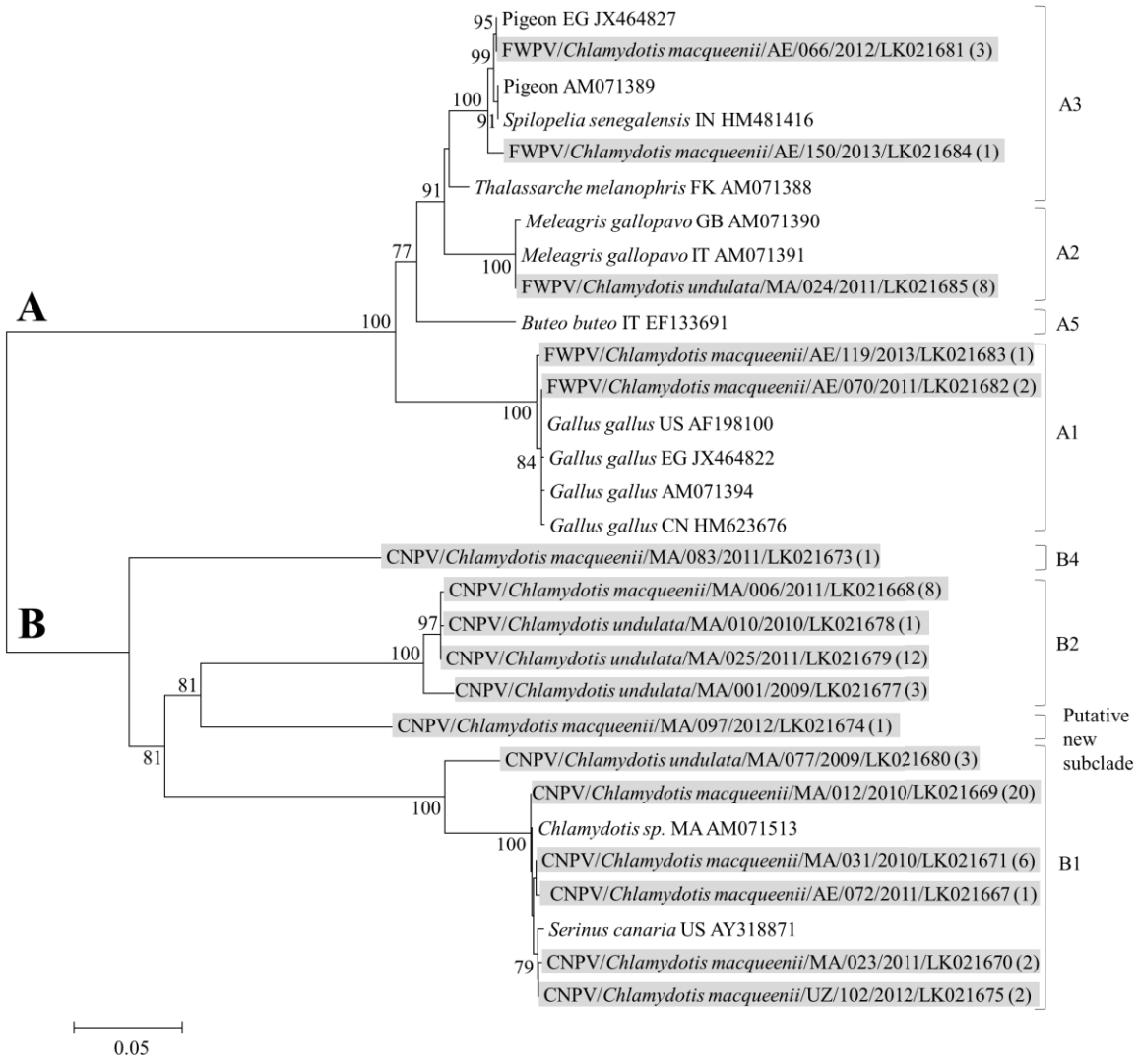

Figure 20. Neighbor-joining phylogenetic tree of fpv140 DNA sequences.

Neighbor-joining phylogenetic tree was constructed with the Kimura 2-parameters model. Bootstrap values (1000 replicates) >70% are shown. The 75 sequences identified in the present study grouped in 17 genotypes are represented by strains highlighted in grey. The numbers in brackets correspond to the numbers of strains identified in the present study, which have an identical *fpv140* DNA sequence. Sequences obtained from GenBank are named as follows: host species / origin / accession number. Strains subclades are indicated on the right hand side of the tree.

Identification of recombination events

Recombination analysis was performed from concatenated DNA sequences of fpv140 and P4b loci from CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009, CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010 (subclade B1) and CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011 (subclade B2). Concatenated sequence sizes ranged from 3255

to 3386 bp. The 7 methods used show evidence of recombination between genotypes represented by CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010 and CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011, with a significant *p* value (p<0.0001, Figure 21). The recombination points were positioned intra-locus at position 208 of the fpv140 locus (in *fpv139* gene) and inter-loci: between the fpv140 and P4b loci. CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 was closer to CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011 between those 2 points while it was closer to CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010 outside of those points.

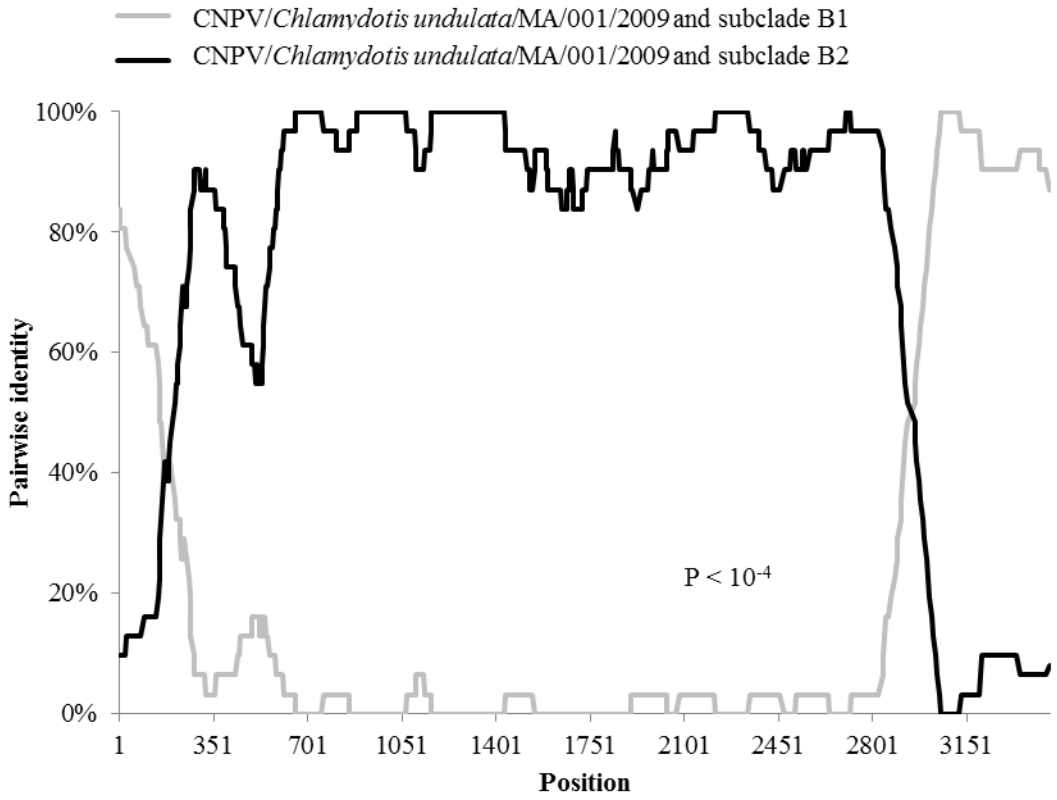

Figure 21. Evidence of recombination between CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 and subclades B1 and B2 strains.

Evidence of recombination was calculated by the RDP method from concatenated sequences of fpv140 and P4b loci and with *p* value <0.0001. The percent nucleotide similarity between CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 and subclade B1 (represented by CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010) and between CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 and subclade B2 (represented by CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011) is represented by a grey and a black line, respectively.

To exclude a mix of sequences in CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009, a PCR was carried out on its DNA showing an amplification product with subclade B2

specific primers but no amplification product with subclade B1 specific primers (Figure 22).

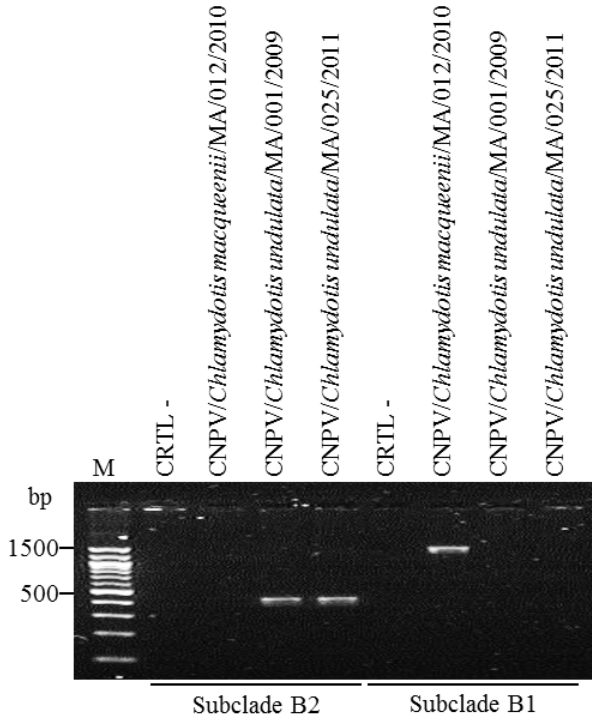

Figure 22. PCR amplification of an internal segment of the fpv140 locus for discrimination between subclades B1 and B2.

Lane M, 100 pb DNA size marker; CRTL-, negative control. CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010 and CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011 cluster in subclades B1 and B2, respectively. Subclades B1 and B2 amplification product sizes: 1526 and 448 bp, respectively.

Geographic distribution

Out of the 113 P4b sequences obtained in the present study, 57 were collected in Morocco, 46 in the UAE and 10 in Uzbekistan (Figure 23). Sequences of several subclades were obtained on each site with differences among projects. CNPV-like viruses were predominant in Morocco with 74% of the strains grouping in clade B (47% and 25% in subclades B1 and B2, respectively). FWPV-like viruses were mainly represented by strains of subclade A2 (25%). In the UAE, 87% of the strains were FWPV-like viruses, grouping in subclades A1 and A2 for 50% and 35% of the viruses, respectively. Only CNPV-like viruses were identified in Uzbekistan with 70% of the strains grouping in subclade B1. Strains of subclades A3 and B4 were identified in only one site, the UAE and Morocco, respectively.

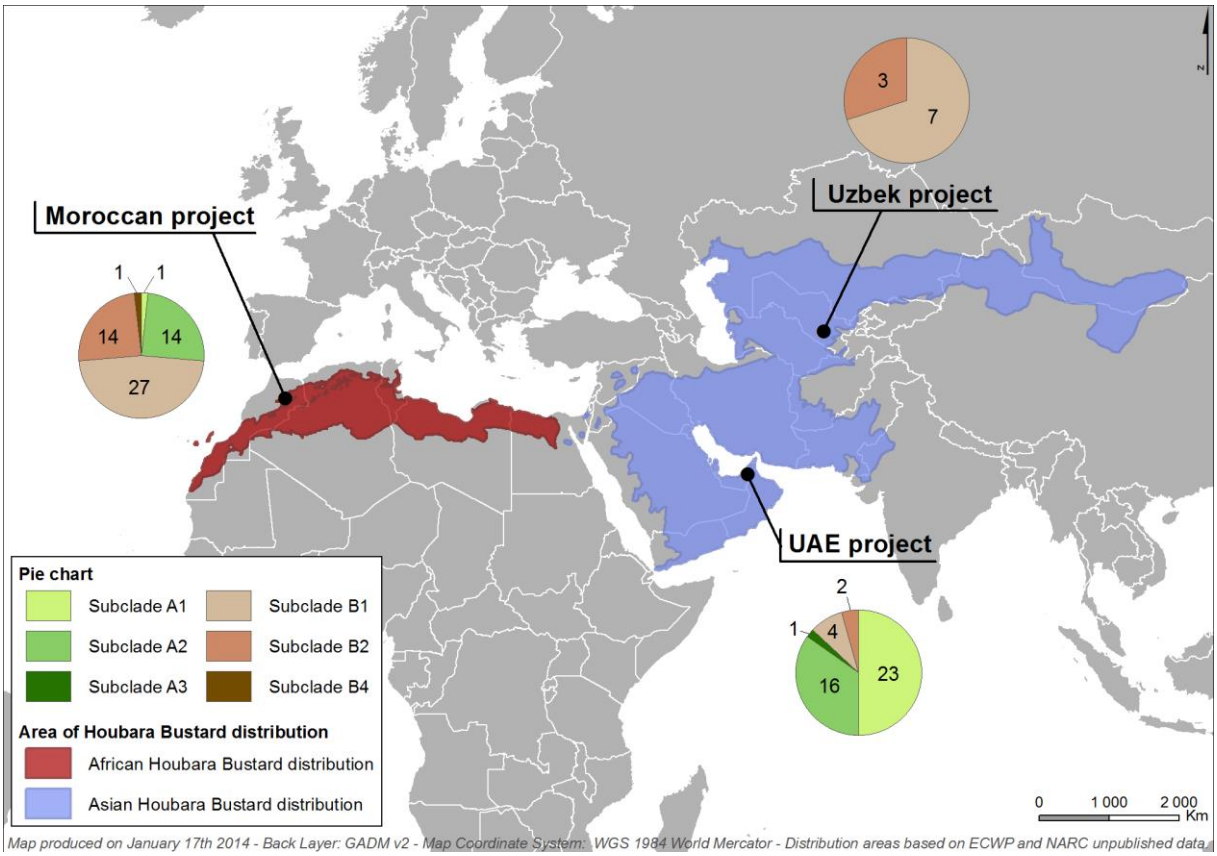

Figure 23. Distribution of strains collected in Houbara bustards in 3 breeding projects.

The 3 breeding projects cover the natural distribution of African Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*) and Asian Houbara bustard (*Chlamydotis macqueenii*). The numbers in pie charts correspond to the number of strains grouping in P4b subclades.

Discussion

APV infections in Houbara have been poorly studied and only 2 DNA sequences from these species are published in GenBank. This study contributes to a better comprehension of the disease in Houbara by providing 113 sequences for P4b and 75 sequences for fpv140, collected over 6 years in 3 different countries, which cover the natural distribution of Houbara. Virus isolates have been obtained for a few representative strains (FWPV and CNVP-like viruses: at least 1 isolate per subclade, data not shown).

The NJ phylogenetic tree built from P4b DNA sequences was very similar to those already published (1,2,45) for clade A and distinguished 7 subclades, while CNVP-like sequences from Houbara provided more details in clade B. The use of a second locus gave a better resolution within and between some subclades. The fpv140 locus encompasses an entire ORF (*fpv140* gene) ranging from 933 to 1020 bp and despite

reports of difficulties to amplify the gene (47), its amplification was successful for 84% of Houbara strains for which a P4b gene sequence had been obtained. The number of APV sequences available has more than doubled thanks to the 75 sequences generated here.

A putative new subclade (B4) was identified from an Asian Houbara in Morocco in 2011 (CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/083/2011). Its minimal genetic distance with other B subclades (10.8%) was higher than some between A subclade genetic distances (3.2% to 16.3%, Table 13), which justified considering it as a new subclade. CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/083/2011 seemed to share the same ancestor as subclade B3 isolates, all originating from the USA.

Subclade B1, whose diversity is the highest as compared with other subclades, is usually subdivided into 2 clusters (98). More recently, a third cluster was described for APV isolates from Magellanic penguins (206). With Houbara sequences, especially CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/001/2009 and CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/097/2012, diversity within subclade B1 increased and distinction of clusters becomes questionable. Also, it questions the definition of this group of virus as a unique subclade since the intra-B1 genetic distance (4.8%) is higher than the genetic distance between subclades A2 and A3 (3.2%).

This is the first time that so many sequences are isolated from a single species (*n* = 84 for *C. macqueenii*; *n* = 29 for *C. undulata*), thus providing a better understanding of the epidemiology of APV for each species. The diversity of APV isolated in Houbara is surprising. Published sequences from Houbara suggested that they are usually infected by CNPV-like viruses (166). In this study, we show that Houbara viruses grouped in 11 different genotypes and 6 different subclades when looking at P4b (17 genotypes, 7 subclades with *fpv140*) and almost half of them grouped with FWPV-like viruses. Classically, APV are considered to be host species or order specific and taxonomy was based on this concept. This has been recently questioned by many authors (1,2,45,46) since some taxa like *Columbidae* and *Accipitridae* can be infected by a wide diversity of strains, however with different sensitivity depending on the virus involved. This apparent diversity could be explained by some infections occurring as accidental events, especially in zoological collections where many species are housed closely, and it is suggested that such an infection could not lead to sustainable epornitics (2). However, in the present study, all genotypes identified were responsible for clinical infections in

Houbara and lead to nodular lesions on legs, beaks or eyelids without any evidence of phenotype-genotype relationship. CNPV-like viruses as well as FWPV-like viruses were also identified from diphtheritic lesions and could be responsible for outbreaks in Houbara captive-breeding projects as observed in Morocco in 2009 or in the UAE in 2013 with outbreaks of CNPV-like viruses and FWPV-like viruses respectively (G. Le Loc'h, unpublished data). This suggests that the taxonomy of APV may be reviewed and questions host specificity of APV.

The wide diversity of strains affecting Houbara has also been observed within a single breeding project and for a single year since strains of 5 clades were collected in Morocco in 2011 and strains of 4 clades were collected in the UAE in 2013. Previous studies have shown little diversity of strains in geographic areas of the same scale, within one species (206) as well as among different species (87). This has been explained either by the quick spread of a competent virus in immunologically naïve birds (87) or by a limited number of introductions of strains in insular populations (94,98,204) The high diversity observed in this study within a single breeding station suggests that multiple and repeated introductions of virus occurred. The origin of introductions can be hypothesized through observation of phylogenetic trees. The gene *fpv140* provides a better resolution than the P4b locus for FWP-like viruses since each subclade used to be linked to a host species or order. Moreover the advantage of using *fpv140* for virus typing could be attributable to the surface nature of the encoded H3L orthologue ORF. Subclade A1 viruses were exclusively collected from domestic chickens and Houbara strains clustering in this subclade all originated from the UAE where poultry farms surround breeding stations. The same observation can be made for subclade A3 in which most strains were collected from Columbiformes. Most of the Houbara strains grouping in subclade A3 originated from the UAE where large populations of doves and pigeons live around the breeding stations. On the contrary, subclade A2 viruses were all collected from domestic turkeys and subclade A2 Houbara strains originated mainly from Morocco, where backyard turkeys are found in villages surrounding breeding stations. Origins of CNPV-like viruses collected in this study are more difficult to precise since the host-subclade relationship in clade B is less evident. However some viruses collected from Houbara in Morocco were identical for P4b to viruses originating from Moroccan house sparrows in subclade B1 as well as in subclade B2.

The multiple origin of viruses affecting Houbara questions the role of the species in the APV epidemiological cycle. It could be assumed that this species is especially sensitive to APV viruses regardless of their origin. Management of captive-breeding projects can also provide some clues to understanding our observation. Most of the rearing process takes place in outdoor aviaries (207), where the birds are housed in small groups, allowing potential contact with wild birds and insect vectors. Moreover, although projects are located in quite hostile and isolated landscapes (semi-desert or desert), they are usually built with all accommodations needed to ensure a certain autonomy (alfalfa fields to feed the Houbara, gardens for staff, etc.). Those artificial oases are especially attractive for wild fauna and can concentrate relatively large populations of wild birds and insects. In addition, some projects such as the ones in Morocco are located along migratory pathways. In contrast, due to a high conservation value of each Houbara and despite flock size of thousands of birds in each project, every bird is managed individually and carefully controlled with a high biosecurity level. While this management prevents quick and massive spread of pathogens, it may allow a higher diversity of virus strains entering and co-evolving at an endemic level in the breeding stations by breaking the epidemiological cycle of APV.

This observation questions the prophylactic strategy to control APV infection. Sensitivity of Houbara, as other birds' species, to different APV strains appears higher than expected. Frequent viral challenge even in an apparent unfavorable environment, as shown by the multiple introductions of APV in Houbara breeding stations, is also surprising. This makes the association of different prophylactic measures such as classical biosecurity, prevention of wild bird concentration, control of insect vector populations and vaccination, necessary. Vaccination alone is questionable regarding the wide diversity of strains affecting Houbara and the poorly known cross-protection among APV. Previous studies give contradictory conclusions about APV cross-immunity. While most of them show no cross-protection between clades (25,39) and even inside the same clade (208), a more recent study provides evidence of cross-protection between FWPV-like viruses and CNPV-like viruses in experimentally infected zebra finches (108). In FWPV-like viruses, the absence of cross-protection has been shown to be linked to the presence of the integrated reticuloendotheliosis virus (REV) sequence in the FWPV genome (208). In Houbara strains, REV was only detected in the FWPV subclade A1 viruses (data not shown). The latter studies suggest that cross-protection

could be related to APV strains but also to host species. Further investigations are warranted to improve our understanding of the determinism of host specificity and pathogenicity among different APV strains.

The presence of several different strains within the same population at the same moment is favorable to the emergence of recombinant strains as already shown in orthopoxviruses (52) and is suspected for APV (2). In Morocco, strains belonging to subclades B1 and B2 as well as a potential recombinant strain were isolated within the same breeding station in November 2009 and again in July 2011 (G. Le Loc'h, unpublished data), highlighting the high viral load in the field. The analyses confirmed the hypothesis of recombination observed on phylogenetic trees by showing intra and inter-loci recombination events. Interestingly, the parent strains from both subclades B1 and B2 (group of isolates CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/012/2010 and CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/025/2011, respectively) are the only ones isolated in the 3 Houbara breeding projects and their P4b sequences are identical to those of strains isolated from house sparrows in Morocco (103). Moreover, the P4b sequence of the subclade B1 parent is identical to a strain distributed worldwide and that has been more especially isolated from great tits in Europe and associated with the emergence of APV infections in this species (76,91). It can be hypothesized that this is a unique B1 strain that may have the ability to effectively and sustainably infect a wide diversity of avian hosts. However, whole genome sequences would be necessary to conclude on the unicity of the strain. Understanding APV evolution requires better knowledge of viral genomes. Up to now, the genomes of only 4 APV species have been fully sequenced: those of *Fowlpox virus* (9), *Pigeonpox virus*, *Penguinpox virus* (11), and *Canarypox virus* (10), 288 kbp and 365 kbp long, respectively. Their analyses have shown large genomic rearrangements and suggest significant genomic diversity among APV. Effort should be made to obtain complete genome sequences of several APV in order to better understand their host adaptability and their pathogenicity.

5. Article 3

Cet article a été soumis dans la revue *Infection, Genetics and Evolution*.

Time scale evolution of avipoxviruses

Guillaume Le Loc'h[1,2,3], Stéphane Bertagnoli[2,3], Mariette F. Ducatez[3,2]

[1]RENECO Wildlife Consultants LLC, Abu Dhabi, United Arab Emirates

[2]Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

[3]INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

Abstract

Avipoxviruses are divided into three clades: canarypox-like viruses, fowlpox-like viruses, and psittacinepox-like viruses. Several molecular clock and demographic models available in the BEAST package were compared on three avipoxvirus genes (P4b, cnpv186 and DNA polymerase genes), which enabled to determine that avipoxviruses evolved at a rate of 2 to 8 x 10^{-5} substitution/site/year, in the range of poxviruses previously reported evolution rates. In addition, the date of mean time of divergence of avipoxviruses from a common ancestor was extrapolated to be about 10,000 to 30,000 years ago, at the same period as modern poxvirus species. Our findings will facilitate epidemiological investigations on avipoxviruses' spread, origin and circulation.

Introduction

The *Poxviridae* virus family is divided into two subfamilies: the *Chordopoxvirinae* (containing vertebrate viruses) and the *Entomopoxvirinae* (containing insect viruses). The *Chordopoxvirinae* is then divided into ten genera: nine mammalian genera and the *Avipoxvirus* genus, subject of the present study (31,37). Based on basic genomic analyses (restriction fragment length polymorphism), avipoxviruses (APV) are currently divided into ten virus species (37) but more recent phylogenetic studies identified three major clades: canarypox-like viruses, fowlpox-like viruses, and psittacinepox-like viruses (1).

Classically, APV were considered to be host species- or order- specific. Genus taxonomy have been based on this concept until recent studies showed that *Otididae*, *Columbidae* and *Accipitridae* can be infected by a large diversity of strains (1,2,46,183). The age of divergence between the three APV main clades has not been estimated. So far,

only three genes have been widely studied: *fpv094*/*cnpv121* (locus P4b, hereafter "P4b"), f*pv140*/*cnpv186* (hereafter "cnpv186") and *fpv167*/*cnpv240* (hereafter "DNA polymerase") (1,2,183). Besides, only four APV have been fully sequenced: one Fowlpox virus (9), one Pigeonpox virus, one Penguinpox virus (11), and one Canarypox virus (10). Their analyses have shown large genomic rearrangements and suggest significant genomic diversity among APV.

Codivergence between DNA (and in some cases RNA) viruses and their hosts is considered as a main evolution path and should thus be associated with low mutation rates (209–211). Although this codivergence seems likely in the case of papillomaviruses (millions of years of association, (212)), it is less probable or for the least more recent in the case of newly emerging viruses (e.g. the *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* evolution in (213)). The literature suggests that a scarce sampling time interval (as compared to the real evolution timescale) bias the calculations.

The aim of the present preliminary study was to assess substitution rate and time to most recent common ancestor (TMRCA) of APV using the current available data, and to compare the results with data available for other poxviruses and to reach hypotheses on their spread and circulation.

Materials and Methods

Virus data sets

All available DNA sequences of APV *fpv094*/*cnpv121* (locus P4b, hereafter "P4b"), f*pv140*/*cnpv186* (hereafter "cnpv186") and *fpv167*/*cnpv240* (hereafter "DNA polymerase") genes were retrieved from GenBank/EMBL databases. The sampling date (at least year, month and day when available) was collected for each sequence; in case no information was available, the 1st of July of the year of sequence publication was then considered as sample collection date. Only the oldest sequence was kept when identical sequences were available. Table 14 summarizes the details of included APV sequences. For each gene, DNA sequences were translated to amino acid (aa) sequences and aligned. Following this the DNA sequences were aligned accordingly (the alignment was partitioned into codon positions) and corrected manually. The sequence of the APV pigeon/CAPM V-101/CZE/1965 P4b gene (accession number: GU982736) was removed

due to many deletions resulting in non-functional short proteins; the P4b sequences of APV isolates from Hawaii EL1.1H1900, APAP16.2H03, and HAAMB.07H02 (accession numbers EF568402 to EF568404) were also removed because they were too short (116 bp). ClustalX 2.1 and Bioedit 7.2.5 were used for sequence alignments and editing, respectively. Recombinant sequences were excluded after analysis with the Recombinant Identification Program (RIP) (www.hiv.lanl.gov). Overall, we analyzed 81 P4b gene sequences (partial open reading frame, ORF) from specimens collected between 1865 and 2014; 31 cnpv186 genes (complete ORF) from specimens collected between 1965 and 2014; and 47 DNA polymerase genes (partial ORF) from specimens collected between 1980 and 2014 (Table 14).

Table 14. Avipoxvirus sequences selected for the molecular clock analyses.

Gene	Virus clade*	Strain/Sequence accession number	Sampling date	Estimated date
P4b	CNPV	Leptotila rufaxilla/PE/1865/HM627226	1865	1-Jul-1865
		Passer domesticus/ES/1911/HM627228	1911	1-Jul-1911
		Parus major/NO/1972/AY453173	20-Apr-1972	20-Apr-1972
		Sturnus vulgaris/US/1984/KC018063	1984	1-Jul-1984
		Serinus canaria/IT/1985/GQ180203	Dec 1985	15-Dec-1985
		Junco hyemalis hyemalis/US/1986/KC018022	1986	1-Jul-1986
		Quiscalus major/US/1989/KC018062	1989	1-Jul-1989
		Turdus philomelos/IT/1992/GQ180206	Feb 1992	15-Feb-1992
		Colinus virginianus ridgwayi/US/1993/KC018035	1993	1-Jul-1993
		Columba livia/NO/1996/AY453177	1996	1-Jul-1996
		Himatione sanguinea/US-HI/1996/KC018059	1996	1-Jul-1996
		Hemignathus virens/US-HI/1998/EF568393	1998	1-Jul-1998
		Hemignathus virens/US-HI/1998/EF568396	1998	1-Jul-1998
		Serinus canaria/DE/2001/AY530309	2001	1-Jul-2001
		Loxioides bailleui/US-HI/2002/EF568381	2002	1-Jul-2002
		Himatione sanguinea/US-HI/2002/EF568390	2002	1-Jul-2002
		Corvus brachyrhynchos/US/2003/DQ131891	2003	1-Jul-2003
		Corvus brachyrhynchos/US/2003/DQ131893	2003	1-Jul-2003
		Mimus polyglottos/US/2003/DQ131895	2003	1-Jul-2003
		Carpodacus mexicanus/US/2003/DQ131896	2003	1-Jul-2003
		Cardinalis cardinalis/US/2003/DQ131899	2003	1-Jul-2003
		Himatione sanguinea/US-HI/2003/EF568378	2003	1-Jul-2003
		Corvus hawaiiensis/US-HI/2003/EF568385	2003	1-Jul-2003
		Carduelis atrata/NL/2003/KC018038	2003	1-Jul-2003
		Ardea herodias/US/2004/DQ131898	2004	1-Jul-2004
		Hemignathus virens/US-HI/2004/EF568382	2004	1-Jul-2004
		Diomedea immutabilis/US-HI/2004/EF568383	2004	1-Jul-2004
		Serinus canaria/GB/2005/AM050375	<2006	1-Jul-2005
		Serinus canaria/GB/2005/AM050384	<2006	1-Jul-2005

	Columba livia/GB/2005/AM050386	<2006	1-Jul-2005
	Passer domesticus/GB/2005/AM050390	<2006	1-Jul-2005
	Hemignathus virens/US-HI/2005/EF568401	2005	1-Jul-2005
	Turdus migratorius/US/2005/KC018068	2005	1-Jul-2005
	Anthus berthelotii/PT/2006/EU883532	24-Sep-2006	24-Sep-2006
	Cyanistes caeruleus/ES-IC/2006/EU883533	10-Oct-2006	10-Oct-2006
	Corvus corone/IT/2007/GQ180211	Jun 2007	15-Jun-2007
	Parus major/HU/2007/EF634351	2007	1-Jul-2007
	Parus major/CZ/2008/EU798995	<2009	1-Jul-2008
	Serinus canaria/CL/2008/KC018060	2008	1-Jul-2008
	Chlamydotis undulata/MA/2009/LK021658	30-Jul-2009	30-Jul-2009
	Chlamydotis macqueenii/MA/2010/LK021653	6-Jul-2010	6-Jul-2010
	Serinus canaria/IR/2010/KC193679	10-Oct-2010	10-Oct-2010
	Erithacus rubecula/ES/2011/KF385499	20-Jul-2011	20-Jul-2011
	Chlamydotis macqueenii/MA/2011/LK021654	15-Oct-2011	15-Oct-2011
	Chlamydotis macqueenii/MA/2012/LK021655	1-Mar-2012	1-Mar-2012
	Chlamydotis macqueenii/UZ/2012/LK021657	10-Jun-2012	10-Jun-2012
	Spheniscus magellanicus/BR/2012/KC588955	1-Jul-2012	1-Jul-2012
	Spheniscus magellanicus/BR/2012/KC588956	1-Jul-2012	1-Jul-2012
	Spheniscus magellanicus/BR/2012/KC588958	1-Nov-2012	1-Nov-2012
	Spheniscus magellanicus/BR/2012/KC588959	1-Nov-2012	1-Nov-2012
	Spheniscus magellanicus/BR/2012/KC588960	1-Nov-2012	1-Nov-2012
	Burhinus oedicnemus/MA/2013/LN795883	5-Feb-2013	5-Feb-2013
	Spheniscus magellanicus/BR/2013/KF516679	15-Feb-2013	15-Feb-2013
	Chlamydotis macqueenii/AE/2014/LN795884	4-May-2014	4-May-2014
FWPV	Fringilla coelebs/ES/1936/HM627225	1936	1-Jul-1936
	Perdrix perdrix/IT/1978/GQ180201	Dec 1978	15-Dec-1978
	Columba livia/US/1980/KC018001	1980	1-Jul-1980
	Phoebastria immutabilis/US/1983/KC017986	1983	1-Jul-1983
	Buteo jamaicensis/US/1985/KC018006	1985	1-Jul-1985
	Phalacrocorax pelagicus/US-AK/1989/KC017982	1989	1-Jul-1989
	Cygnus buccinator/US/1989/KC017995	1989	1-Jul-1989
	Uria aalge/US/1991/KC017985	1991	1-Jul-1991
	Gallus gallus domesticus/US-HI/1993/EF568397	1993	1-Jul-1993
	Gallus gallus domesticus/US-HI/1993/EF568398	1993	1-Jul-1993
	Milvus milvus/ES/2000/KC018010	2000	1-Jul-2000
	Falco peregrinus/DE/2001/KF956002	26-Feb-2001	26-Feb-2001
	Falco/AE/2002/AY530306	2002	1-Jul-2002
	Haliaeetus albicilla/DE/2002/KF956003	19-Aug-2002	19-Aug-2002
	Otis tarda/HU/2003/KC017970	2003	1-Jul-2003
	Otis tarda/ES/2003/KC017974	2003	1-Jul-2003
	Pavo cristatus/HU/2003/KC017975	2003	1-Jul-2003
	Haliaeetus albicilla/IT/2004/AB576861	2004	1-Jul-2004
	Spilornis cheela/TW/2008/HQ441566	13-Jan-2008	13-Jan-2008
	Spilopelia senegalensis/IN/2009/HM481408	Jan 2009	15-Jan-2009

		Calypte anna/US/2009/JX418296	2009	1-Jul-2009
		Gallus gallus domesticus/CN/2010/HM623675	<2011	1-Jul-2010
		Spheniscus magellanicus/BR/2013/KC588962	1-Jan-2013	1-Jan-2013
		Anas platyrhynchos domesticus/CN/2013/KJ192189	23-Dec-2013	23-Dec-2013
	PSPV (?)	Coturnix japonica/IT/1963/GQ180200	1963	1-Jul-1963
	PSPV	Amazona ochrocephala/US/1980/KC018069	1980	1-Jul-1980
		Agapornis/DE/2003/AY530311	<2004	1-Jul-2003
cnpv186	CNPV	Serinus canaria/GB/2005/AM071512	<2006	1-Jul-2005
		Chlamydotis undulata/MA/2009/LK021677	30-Jul-2009	30-Jul-2009
		Chlamydotis undulata/MA/2009/LN795880	13-Nov-2009	13-Nov-2009
		Chlamydotis undulata/MA/2009/LN795881	14-Nov-2009	14-Nov-2009
		Chlamydotis undulata/MA/2009/LK021680	17-Nov-2009	17-Nov-2009
		Chlamydotis undulata/MA/2010/LK021678	21-Jun-2010	21-Jun-2010
		Chlamydotis macqueenii/MA/2010/LK021671	28-Jun-2010	28-Jun-2010
		Chlamydotis undulata/MA/2010/LN795879	1-Jul-2010	1-Jul-2010
		Chlamydotis macqueenii/AE/2011/LK021667	14-May-2011	14-May-2011
		Chlamydotis undulata/MA/2011/LN795878	24-Jun-2011	24-Jun-2011
		Chlamydotis macqueenii/MA/2011/LK021673	15-Oct-2011	15-Oct-2011
		Chlamydotis macqueenii/MA/2012/LK021674	1-Mar-2012	1-Mar-2012
		Chlamydotis macqueenii/UZ/2012/LN795877	10-Jun-2012	10-Jun-2012
		Parus major/DE/2013/KF955997	<2014	1-Jul-2013
		Chlamydotis macqueenii/AE/2014/LN795875	4-May-2014	4-May-2014
		Chlamydotis macqueenii/KZ/2014/LN795876	27-Jul-2014	27-Jul-2014
	FWPV	1965/LN795882	1965	1-Jul-1965
		Falco peregrinus/DE/2001/KF955998	26-Feb-2001	26-Feb-2001
		Haliaeetus albicilla/DE/2002/KF955999	19-Aug-2002	19-Aug-2002
		Grus grus/DE/2004/KF955996	24-Mar-2004	24-Mar-2004
		Pigeon/2005/AM071389	<2006	1-Jul-2005
		Meleagris gallopavo/GB/2005/AM071390	<2006	1-Jul-2005
		Gallus gallus domesticus GB/2005/AM071393	<2006	1-Jul-2005
		Gallus gallus domesticus/2005/AM071394	<2006	1-Jul-2005
		Buteo buteo/IT/2005/EF133691	Sep 2005	15-Sep-2005
		Spilopelia senegalensis/IN/2009/HM481416	Jan 2009	15-Jan-2009
		Gallus gallus domesticus/CN/2010/HM623676	<2011	1-Jul-2010
		Gallus gallus domesticus/EG/2011/JX464822	Jun 2011	15-Jun-2011
		Columba livia/ZA/2011/KJ801920	2011	1-Jul-2011
		Chlamydotis macqueenii/AE/2013/LK021684	10-Feb-2013	10-Feb-2013
		Chlamydotis macqueenii/AE/2013/LK021683	31-Mar-2013	31-Mar-2013
DNApol	CNPV	Uria aalge/US/1980/KC017931	1980	1-Jul-1980
		Sturnus vulgaris/US/1984/KC017954	1984	1-Jul-1984
		Leucosticte tephrocotis/US/1985/KC017959	1985	1-Jul-1985
		Junco hyemalis hyemalis/US/1986/KC017936	1986	1-Jul-1986
		Junco hyemalis hyemalis/US/1986/KC017927	1986	1-Jul-1986
		Carpodacus mexicanus/US-HI/1987/KC017877	1987	1-Jul-1987
		Quiscalus major/US/1989/KC017922	1989	1-Jul-1989

	Grus canadensis/US/1992/KC017958	1992	1-Jul-1992
	Colinus virginianus ridgwayi/US/1993/KC017941	1993	1-Jul-1993
	Pica hudsonia/US/1997/KC017951	1997	1-Jul-1997
	Corvus brachyrhynchos/US/1999/KC017956	1999	1-Jul-1999
	Corvus brachyrhynchos/US/1999/KC017945	1999	1-Jul-1999
	Circus cyaneus/ES/2000/KC017897	2000	1-Jul-2000
	Carduelis atrata/NL/2003/KC017952	2003	1-Jul-2003
	Turdus migratorius/US/2005/KC017923	2005	1-Jul-2005
	Otis tarda/HU/2005/KC017864	2005	1-Jul-2005
	Parus major/HU/2007/KC017862	2007	1-Jul-2007
	Pyrrhula pyrrhula/BE/2008/KC017957	2008	1-Jul-2008
	Camarhynchus pallidus/EC/2008/KC017949	2008	1-Jul-2008
	Mimus parvulus/EC/2008/KC017947	2008	1-Jul-2008
	Geospiza fortis/EC/2008/KC017946	2008	1-Jul-2008
	Serinus canaria/CL/2008/KC017884	2008	1-Jul-2008
	Chlamydotis undulata/MA/2009/LN795874	30-Jul-2009	30-Jul-2009
FWPV	Columba livia/US/1980/KC017929	1980	1-Jul-1980
	Haliaeetus leucocephalus/US-AK/1981/KC017900	1981	1-Jul-1981
	Phoebastria immutabilis/US/1983/KC017904	1983	1-Jul-1983
	Buteo jamaicensis/US/1985/KC017914	1985	1-Jul-1985
	1987/M31638	1987	1-Jul-1987
	Zenaida macroura/US/1987/KC017912	1987	1-Jul-1987
	Spheniscus demersus/SA/1988/KJ859677	1988	1-Jul-1988
	Cygnus buccinator/US/1989/KC017909	1989	1-Jul-1989
	Phalacrocorax pelagicus/US-AK/1989/KC017899	1989	1-Jul-1989
	Aix sponsa/US/1991/KC017910	1991	1-Jul-1991
	Uria aalge/US/1991/KC017902	1991	1-Jul-1991
	Branta canadensis/US/1992/KC017913	1992	1-Jul-1992
	Haliaeetus leucocephalus/US/1993/KC017932	1993	1-Jul-1993
	Columba livia/US-HI/1994/KC017868	1994	1-Jul-1994
	Milvus milvus/ES/2000/KC017896	2000	1-Jul-2000
	Hieraaetus pennatus/ES/2000/KC017891	2000	1-Jul-2000
	Buteo buteo/HU/2000/KC017861	2000	1-Jul-2000
	Aquila heliaca/HU/2000/KC017852	2000	1-Jul-2000
	Otis tarda/ES/2003/KC017890	2003	1-Jul-2003
	Gallus gallus domesticus/HU/2003/KC017850	2003	1-Jul-2003
	Polytelis swainsonii/CL/2004/KC017883	2004	1-Jul-2004
	Falco peregrinus/HU/2005/KC017858	2005	1-Jul-2005
	Columba livia/HU/2005/KC017856	2005	1-Jul-2005
	Spheniscus magellanicus/AR/2007/KC017905	2007	1-Jul-2007
	Anas platyrhynchos domesticus/CN/2013/KM281933	23-Dec-2013	23-Dec-2013
	Domestic mallard duck/CN/2014/KM281932	2-Jan-2014	2-Jan-2014
PSPV	Amazona ochrocephala/US/1980/KC017925	1980	1-Jul-1980

*CNPV: canarypox-like viruses, FWPV: fowlpox-like viruses, PSPV: psittacinepox-like viruses, (?): non confirmed clade classification; <: before.

Evolutionary analyses

Phylogenies taking sampling time into account were estimated using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) inference methods available in the BEAST package (v.1.4.8, (214)). The analyses were run using the Tamura and Nei 1993 model (TN93) with gamma-distributed rate: the best fitting nucleotide substitution model estimated by means of hierarchical likelihood ratio approach using Mega v 6.06. We used empirical base frequencies and three partitions into codon positions. Different combinations of demographic models and clock models were compared as suggested (214): constant size or extended Bayesian skyline plot models, strict or relaxed (lognormal or exponential) clocks. At least 200 million MCMC iterations were run for each gene and each demographic models / clock models combination. Subsampling was performed every 10,000 generations to decrease autocorrelation between model parameter samples. The estimation of parameters and divergence time were carried out using Tracer (http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer). A correct mixing of MCMC was verified by effective sampling size (ESS) calculations available in Tracer. The best fitting model was also assessed using "Model Comparison" available in Tracer and choosing the lowest Akaike's information criterion (AICM) value. The dN/dS ratios (ω) were calculated using the single-likelihood ancestor (SLAC) method available in the HyPhy package available on the http://www.datamonkey.org/ server (215,216).

Results

Phylogenetic trees based on three APV genes (P4b, cnpv186, and DNA polymerase) DNA sequences were constructed and all confirmed the common classification in the genus: canarypox-like viruses, fowlpox-like viruses, and psittacinepox-like viruses (Figure 24). To assess both substitution rate per site per year and TMRCA, different combinations of demographic models and clock models were compared: constant size or extended Bayesian skyline plot models, strict or relaxed (lognormal or exponential) clocks. The lowest AICM values were obtained with a relaxed exponential clock and the extended Bayesian skyline plot model for both cnpv186 and the DNA polymerase genes (AICM values of 11,673.74 ± 0.11 standard error (SE) and 7,316.26 ± 0.12 SE for cnpv186 and DNA polymerase genes, respectively, Table 15). For the P4b gene, the AICM value was slightly lower with a strict clock and the Extended

Bayesian Skyline Plot model than with a relaxed exponential clock and the extended Bayesian skyline plot model (AICM values of 8,492.42 ± 0.21 SE and 8,493.49 ± 0.44 SE, respectively) but we decided to use the same combination for our three genes for consistency: a relaxed exponential clock and the extended Bayesian skyline plot model (Table 15).

Our molecular clock analyses showed that APV diverged from a common ancestor approximately 10 to 30 thousand years ago: 8,682 (95% Highest Posterior Density (HPD): 950-60,718), 10,891 (95% HPD: 963-93,707), and 29,259 (95% HPD: 1,871-197,714) years ago for DNA polymerase, cnpv186, and P4b, respectively (Figure 24). Interestingly, fowlpox-like viruses and psittacinepox-like viruses shared a more recent common ancestor than canarypox-like viruses: they diverged 5 to 16 thousand years ago (5,034 (95% HPD: 625-34,636) years ago for DNA polymerase, 16,012 (95% HPD: 1,208-117,230) years ago for P4b, no psittacinepox-like viruses sequence are available for cnpv186, Figure 24).

When considering APV collected the same year in the same location such as *Chlamydotis undulata*/MA/2009/LK021680, *Chlamydotis undulata*/MA/2009/-LN795880, and *Chlamydotis undulata*/MA/2009/LN795881, all three isolated on houbara bustards in Morocco in 2009, the cnpv186 phylogeny and molecular clock analysis (Figure 24B) enabled to conclude to clear independent introductions of viruses and rule out the hypothesis of virus spread and evolution within the site. *Chlamydotis undulata*/MA/2009/LN795881 interestingly clustered in sub-clade B2 (sequence identical to *Chlamydotis undulata*/ MA/2011/LK021679 described in (183)) whereas *Chlamydotis undulata*/MA/2009/LN795880 (sequence identical to *Chlamydotis undulata*/MA/2011/LK021670 described in (183)) and *Chlamydotis undulata*/MA/2009/LK021680 clustered in a distinct sub-clade (B1). The two sub-clades showed a divergence 3,455 (95% HPD: 222-27,041) years ago which is not compatible with an on-site evolution of the virus.

Selection pressure analyses showed that P4b, cnpv186 and DNA polymerase genes were under purifying selection with ω values (dN/dS) of 0.067 (with a 95% confidence interval (CI) of 0.057-0.078), 0.200 (95% CI: 0.183-0.219), and 0.065 (95% CI: 0.055-0.076) for P4b, cnpv186 and DNA polymerase genes, respectively. No positively selected site was found in any of the three genes studied.

Table 15. Mean and 95% HPD of the Bayesian posterior estimates of substitution rate and TMRCA for avipoxviruses.

Gene	Clock model[1]	Demographic model[2]	Mean rate (subst/site/year)	Substitution rate, 95% HPD	TMRCA[3] (ybp)	TMRCA[3], 95% HPD	AICM[4] ± SE
P4b	SC	CS	3.76E-05	2.99E-06 - 7.45E-05	10,133	2,849 - 34,025	8,516.62 ± 0.09
		EBSP	1.77E-05	1.59E-08 - 3.07E-05	20,246	4,754 - 105,117	8,492.42 ± 0.21
	LRC	CS	4.16E-05	1.85E-06 - 9.05E-05	11,087	2,086 - 48,467	8,540.54 ± 0.30
		EBSP	1.81E-05	3.82E-07 - 3.38E-05	23,382	3,551 - 110,916	8,561.01 ± 0.51
	ERC	CS	4.57E-05	2.27E-08 - 1.04E-04	11,315	1,761 - 59,744	8,502.61 ± 0.28
		EBSP	***1.83E-05***	***2.96E-08 - 4.17E-05***	***29,258***	***1,861 - 197,714***	***8,493.49 ± 0.49***
cnpv186	SC	CS	2.76E-05	5.99E-09 - 6.46E-05	20,107	3,705 - 163,817	11,706.96 ± 0.07
		EBSP	2.69E-05	1.51E-10 - 6.53E-05	22,008	2,824 - 155,499	11,698.32 ± 0.04
	LRC	CS	5.31E-05	2.44E-09 - 1.41E-04	11,446	783 - 96,743	11,680.38 ± 0.08
		EBSP	4.02E-05	3.32E-08 - 1.06E-04	15,247	841 - 110,873	11,676.37 ± 0.07
	ERC	CS	7.94E-05	4.46E-09 - 2.22E-04	7,792	595 - 75,721	11,677.74 ± 0.06
		EBSP	***5.99E-05***	***4.85E-08 - 1.67E-04***	***10,891***	***963 - 93,707***	***11,673.74 ± 0.11***
DNApol	SC	CS	4.90E-05	2.93E-08 - 1.06E-04	9,962	2,052 - 65,073	7,338.44 ± 0.10
		EBSP	5.34E-05	3.64E-09 - 1.07E-04	9,332	2,503 - 44,110	7,327.55 ± 0.08
	LRC	CS	7.12E-05	9.90E-08 - 1.69E-04	8,369	911 - 58,310	7,340.27 ± 0.14
		EBSP	6.04E-05	4.05E-08 - 1.35E-04	9,711	1,438 - 59,555	7,346.87 ± 0.13
	ERC	CS	8.34E-05	1.48E-08 - 2.00E-04	7,331	772 - 56,547	7,323.73 ± 0.11
		EBSP	***7.59E-05***	***2.62E-09 - 1.85E-04***	***8,682***	***950 - 60,718***	***7,316.26 ± 0.12***

[1]SC: strict clock, LRC: lognormal relaxed clock, ERC: exponential relaxed clock; [2]CS: constant size, EBSP: extended Bayesian skyline plot; [3]TMRCA: time to most recent common ancestor (ybp: years before present); [4]AICM: Akaike's information criterion, SE: standard error; in bold italic font: selected models.

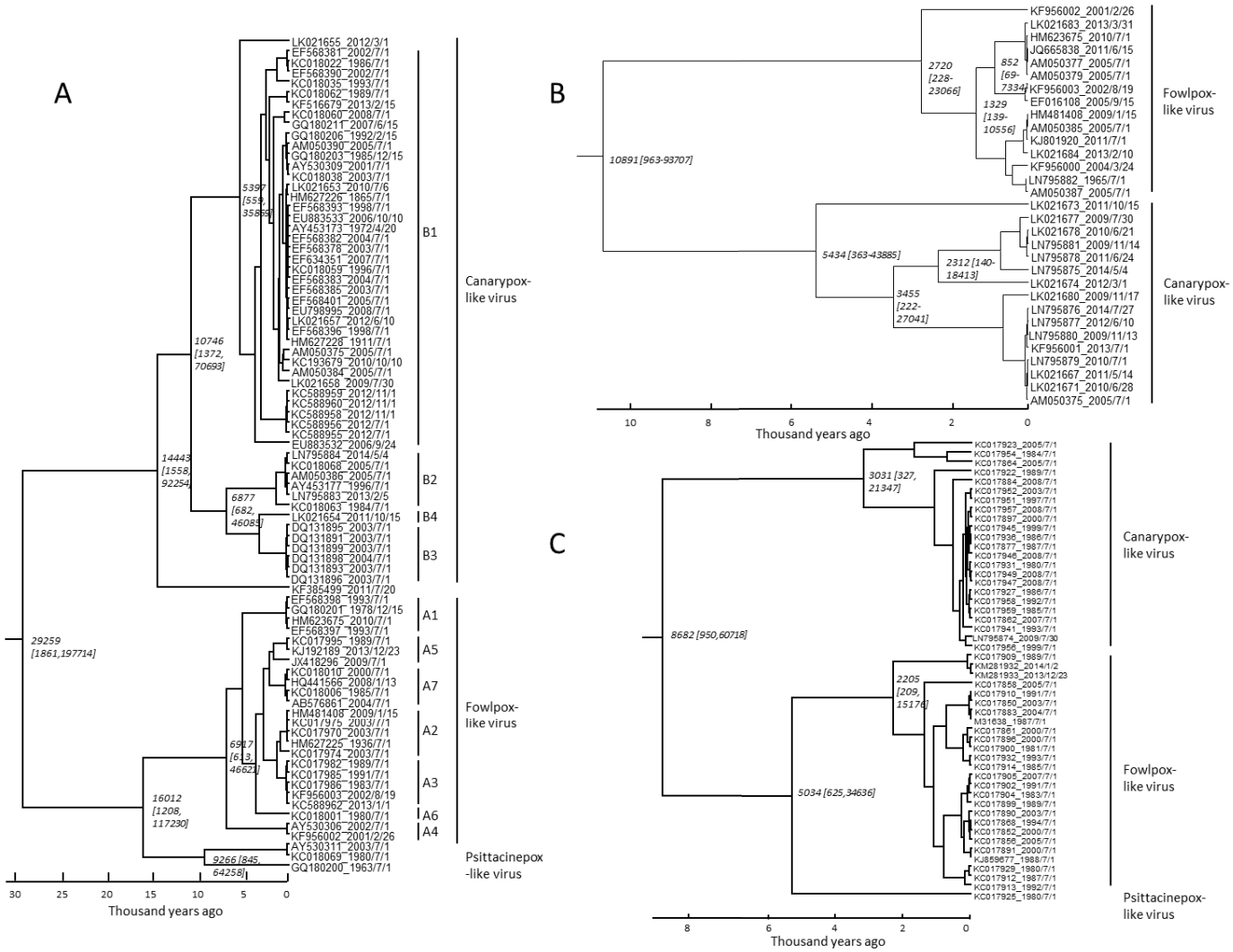

Figure 24. Phylogenetic trees analyzing all available avipoxvirus sequences of the (A) P4b, (B) cnpv186, and (C) DNA polymerase genes.

Numbers at main tree nodes represent the age of the nodes in years with their [95% HPD]. “Accession number_estimated collection date” are indicated on the tree and can be linked to full strains names on Table 14. Sub-clades as described in (183) are indicated on (A).

Discussion

The present study aimed at assessing the substitution rate of APV and at estimating their TMRCA. We compared several clock and demographic models available in the BEAST package and found that APV evolved at a rate of 2 to 8 x 10^{-5} substitution/site/year. The date of mean time of divergence of APV from a common ancestor was extrapolated to be about 10,000 to 30,000 years ago.

We observed a threefold difference between substitution rates and TMRCA of P4b on the one hand and cnpv186 and DNA polymerase on the other hand (Table 15). DNA polymerase encodes a polymerase protein, cnpv186 an immunodominant protein, and P4b a core protein (10). The slower evolution rate of P4b is therefore somewhat surprising: while viable DNA polymerase and cnpv186 mutants may be more difficult to generate, one could expect more flexibility on a core protein. The selection pressure may however be lower on P4b than on its counterparts. Esposito et al. showed that the genes coding for host range and virulence proteins vary the most for *Smallpox Virus* compared to genes involved in virus replication, suggesting that these genes are most targeted by selection pressure (217). But the large confidence intervals (95% HPD) associated with the values we found (within the range of what had been calculated in previous studies) does not show a statistically significant difference (Table 15). Therefore, it is not possible to draw any conclusion.

McLysaght et al. tested poxvirus genes for selection acting on the evolution of genes by looking at synonymous and nonsynonymous mutations. They observed positive selection for genes involved in virulence or for gene candidates for host–pathogen interaction (218). Indeed, positive selection of viruses could also contribute to an increase of substitution rate, which can be observed either for viruses inducing a strong host immune response or for those which have been the object of vaccination or intervention campaigns (34). While the houbara bustards we focus on in our projects in Morocco, the United Arab Emirates, Kazakhstan and Uzbekistan are vaccinated annually (183), APV vaccination is not systematic worldwide, thus making selection pressure assessment difficult. Our selection pressure analyses demonstrated a purifying selection of the three APV genes we studied with ω values ranging between 0.065 and 0.200, suggesting that a non-synonymous mutation has only 6–20% as much chance as a

synonymous mutation of being fixed in the population. This finding might correlate with relatively weak vaccination/intervention pressure.

Li et al. worked on *Smallpox Virus* evolution and linked sequence data and the first description of smallpox in humans (4th century AD in China; suspicions of smallpox as early as 1,122 BC). Their dating was based on time-structured sequence data (207–231 years before present (ybp) using strict and relaxed clocks, respectively; these values were discarded for obvious discrepancy with historical and epidemiological data), or with calibration with historical records of smallpox infection (1,400–6,300 ybp) (219). However, the latter method proved erroneous as epidemiological records may not correlate with real origin of a pathogen (220,221). The absence of ancient epidemiological data on APV prevented us from including any historical calibration in our analyses.

Several research teams have in the past warned evolutionary biologists studying DNA viruses about the biases associated with the use of heterochronous phylogenetic modeling designed for faster evolving RNA pathogens (34). In addition, it was shown that molecular evolution is artificially accelerated on short timescales (222). Indeed our datasets contain very recent sequences only (from 1865 to now) compared to the TMCRA of APV. Hence our results should be considered with caution. But Babkin and Shchelkunov estimated that *Poxviridae* evolve at a rate of $0.9–1.2\times10^{-6}$ substitutions/site/year. They calculated the ancestors of poxviruses, orthopoxviruses, and modern poxvirus species dated approximately 500,000, 300,000, and 14,000 years, respectively (32). The evolution rate of APV estimated in the present study is therefore within the range of what was observed for poxviruses. The divergence between APV clades (canarypox-like viruses, fowlpox-like viruses, and psittacinepox-like viruses) is as old as the divergence among modern poxvirus species. Our results therefore suggest that APV may keep their “Genus” classification and not become a sub-family as proposed in the past (1), even if taxonomic classifications could not be based solely on the time of divergence. In addition, when Firth et al. tried to account for the specificity of double stranded DNA genomes in evolution calculations, their most robust virus model (with the different clock and demographic models tested) was *Variola virus*, suggesting that heterochronous phylogenetic modeling may be used for poxviruses evolution calculations (34).

In conclusion, the present study based on three genes showed that APV evolve at a rate of 2 to 8 x 10^{-5} substitution/site/year and that the date of mean time of divergence of APV from a common ancestor is about 10,000 to 30,000 years ago. This new finding should facilitate future epidemiological investigations on virus spread, origin and circulation.

6. Conclusion

i. Diversité et origine des souches virales

L'étude des souches d'avipoxvirus infectant l'Outarde apporte des éléments très intéressants pour comprendre l'exposition des élevages aux risques infectieux. La diversité des souches observée à l'échelle de chaque projet et même sur une période courte est en effet très surprenante. Au total[10], ce sont 11 génotypes pour le locus P4b (séquence de 426 nucléotides), 19 pour le gène *FPV140*/*CNPV186* et 31 pour le locus fpv140 qui ont été identifiés sur des outardes exclusivement. Compte tenu des mesures sanitaires existantes et surtout de l'isolement apparent des projets, notamment au Maroc et en Ouzbékistan, nous nous attendions à un nombre restreint d'introductions mais à une circulation assez importante des virus au sein des élevages. En effet, le contact potentiellement important avec les insectes vecteurs et les interactions homme/oiseau assez fréquentes, à cause de la gestion individuelle des oiseaux, sont des facteurs qui peuvent favoriser les transmissions d'agents infectieux au sein des élevages. Les résultats de cette étude semblent prouver le contraire puisqu'un grand nombre de souches virales sont introduites dans les élevages.

L'origine des avipoxvirus identifiés semble être multiple et liée aux contextes locaux (Figure 25). Certains sont proches de virus habituellement isolés sur des passeriformes sauvages. D'ailleurs, le seul avipoxvirus isolé sur un moineau domestique à Enjil (ECWP, Maroc) est identique, pour les loci P4b et fpv140, à certains virus isolés sur des outardes au Maroc seulement (souche CNPV/*Chlamydotis undulata*-/MA/025/2011, Figure 19 et Figure 20). D'autres virus ; identifiés lors de cette étude ; sont proches de virus retrouvés habituellement sur les galliformes et les columbiformes. À ce titre, le gène *FPV140*/*CNPV186* permet une meilleure distinction des virus FWPV-like selon leurs espèces hôtes « classiques ». Au Maroc, on peut se demander si les techniciens, qui pour la plupart possèdent des volailles chez eux, notamment des dindes, ne pourraient pas jouer le rôle de vecteurs. En effet, parmi les virus FWPV-like identifiés à ECWP, beaucoup sont proches de virus isolés sur des dindes. Sur les œdicnèmes criards élevés à ECWP, une seule souche a pour l'instant été identifiée sur trois oiseaux

[10] Sont également comptées les séquences qui n'avaient pas pu être incluses dans l'article *Diversity of avipoxviruses in captive-bred Houbara bustard*.

et elle se positionne dans le sous-clade B2 mais est distincte des souches identifiées sur les outardes du même projet.

Aux Émirats Arabes Unis la diversité des espèces sauvages présentes sur les sites du NARC et du SKHBC-AD est plus importante et, outre un certain nombre de passeriformes, divers columbiformes et galliformes, comme des francolins gris (*Francolinus pondicerianus*), sont abondamment observés.

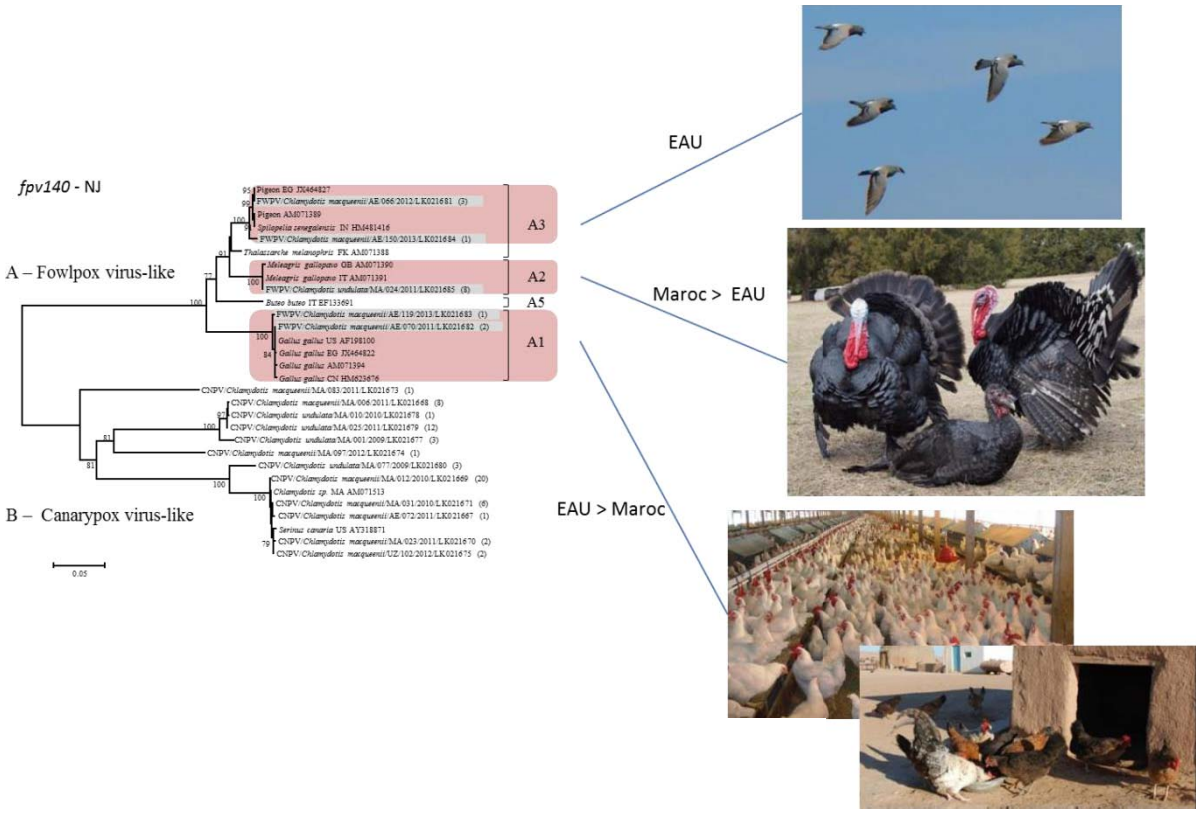

Figure 25. Origine possible des virus FWPV-like isolés chez l'Outarde houbara.

L'arbre phylogénétique a été construit à partir du gène *FPV140*/*CNPV186*. Les séquences surlignées en gris sont celles isolées chez des outardes dans le cadre de l'étude. Les photos illustrent les espèces hôtes chez lesquels les virus des sous-clades A1, A2 et A3 sont classiquement isolés. Les légendes sur les traits reliant les photos aux sous-clades indiquent dans quels pays des séquences de ces sous-clades ont été isolées sur des outardes.

En Ouzbékistan, seuls des virus CNPV-like ont été isolés, tout comme au Kazakhstan où les quatre souches se positionnent toutes dans le sous-clade B1 pour les deux loci étudiés. Cependant, peu de lésions ont été collectées sur ces projets et il est possible que davantage de souches circulent. Au Qatar, malgré le peu de lésions analysées (n=13), des virus des sous-clades A3 et A4 (virus FWPV-like) et du sous-clade B1 (virus CNPV-like) ont été identifiés. Comme ces oiseaux ont été importés depuis les

projets NARC et SKHBC-AD, et malgré un contrôle médical strict avant leur déplacement, on ne peut pas exclure qu'une partie des virus ait également été importée.

ii. Coïnfection, recombinaison et spécificité d'hôte

La grande diversité de virus identifiés lors de cette étude montre donc que de nombreuses introductions peuvent avoir lieu au même endroit et au même moment. Même si aucune coïnfection n'a pu être mise en évidence, il est relativement probable que de tels évènements se produisent et puissent conduire dans certains cas à des recombinaisons. Ce phénomène est connu pour être un processus évolutif chez les poxvirus et peut conduire à l'émergence de souches virulentes (50–52). Pour le moment, la souche potentiellement recombinante détectée au Maroc n'a été identifiée que sur cinq oiseaux, entre 2009 et 2011 et a été associée à quatre formes cutanées et une forme diphtérique de variole aviaire. Il n'est donc pas encore possible de savoir si cette souche est réellement mieux adaptée à l'Outarde que celles dont elle est issue, mais il serait intéressant de maintenir une surveillance moléculaire sur les cas de variole aviaire afin de détecter l'émergence éventuelle de souches mutantes. Les résultats de cette étude démontrent aussi que la circulation des avipoxvirus à l'intérieur des élevages est relativement faible, probablement grâce à la détection et la prise en charge précoce des oiseaux malades, qui cassent le cycle épidémiologique du virus. On peut supposer que, si les contaminations entre outardes étaient importantes, une souche disséminerait rapidement et pourrait masquer la présence d'autres souches. Ce cas de figure a déjà été observé dans un centre de sauvegarde de la faune sauvage en Virginie (États Unis d'Amérique) où malgré la présence d'une grande variété d'espèces d'oiseaux, la diversité des avipoxvirus était très faible, tous appartenant au même sous-clade (87). Ces deux situations opposées (grande diversité virale sur une seule espèce hôte / faible diversité virale chez un nombre important d'espèces hôtes) pose la question de la spécificité d'hôte des avipoxvirus et on peut s'interroger sur l'importance relative de la sensibilité de l'hôte par rapport au rôle joué par les contextes épidémiologique et sanitaire.

Cette étude permet aussi d'apporter des éléments de réponses à la question des échecs vaccinaux soulevée par la première étude de cette thèse (cf. Chapitre II :A, p41). Aux Émirats Arabes Unis, nous savions déjà que la majorité des souches isolées sont des virus FWPV-like. Au Maroc, où la plupart des infections sont causées par des virus CNPV-like, les échecs vaccinaux pourraient aussi être dus à une absence de protection conférée

par la souche vaccinale. La souche vaccinale utilisée sur les outardes appartient au sous-clade B1 or, au Maroc, seules 47% des souches isolées appartiennent à ce sous-clade et aucune souche sur aucun projet ne lui est totalement identique pour les loci P4b et fpv140. Les protections croisées entre avipoxvirus sont mal connues et les études parfois contradictoires. Une des rares études s'étant intéressée à la vaccination avec une souche de canarypox virus a montré expérimentalement que la souche vaccinale utilisée, appartenant au sous-clade B1, induisait une protection vis-à-vis d'une infection avec une souche génétiquement très proche mais échouait à induire une protection lors d'infection par une souche plus différente appartenant tout de même au sous-clade B1 (112). Néanmoins, cette absence possible de protection croisée ne permet pas d'expliquer pourquoi au Maroc les juvéniles sont beaucoup plus infectés que les adultes (cf. Chapitre II :A, p41). La grande diversité des souches identifiées montre que la pression infectieuse sur les oiseaux est importante, d'autant plus s'ils sont élevés en cages ou volières extérieures et donc en contact fréquent avec des insectes vecteurs. Les taux d'infection des juvéniles pourraient être plus importants que les taux de morbidité ne le montrent. Ces arguments sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les juvéniles développeraient une immunité naturelle qui les protégerait ensuite à l'âge adulte. L'étude du statut immunitaire des oiseaux permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

D. Infections expérimentales

1. Contexte

Depuis la mise en évidence des premiers cas de variole aviaire, de nombreux modèles d'infection expérimentale ont été développés afin d'acquérir davantage de connaissances sur la maladie. Ce type d'étude a d'abord été utilisé à des fins diagnostiques, pour valider et quantifier la virulence de souches isolées à partir de cas cliniques, souvent en complément de l'isolement sur œufs embryonnés (25,39,59,223–225). En infectant différentes espèces hôtes taxonomiquement éloignées, des auteurs ont aussi essayé de caractériser la pathogénicité d'un certain nombre de souches, d'élaborer les premières classifications parmi les avipoxvirus et de définir leur spectre d'hôtes (38,202).

Avec l'avènement des techniques de phylogénie moléculaire, le recours aux infections expérimentales a diminué. Pourtant il s'agit d'un outil précieux pour valider les résultats moléculaires et les confronter à la réalité de l'infection *in vivo*. Par exemple, les conséquences de l'intégration de séquences rétrovirales dans le génome de certains fowlpox virus ont été mesurées en comparant les expressions cliniques et les réponses immunitaires induites par des souches intégrant ou non ces séquences (19,56). De même, l'immunisation, puis l'infection d'oiseaux avec différents virus, est le seul moyen d'évaluer les vaccinations et les protections croisées entre souches (53,54,169,226). Les génomes des avipoxvirus ne sont en effet pas encore assez largement connus et compris pour appréhender les mécanismes moléculaires qui caractérisent l'adaptation d'une souche à un hôte particulier, ainsi que les relations antigéniques entre souches. Ces mécanismes ne sont d'ailleurs que partiellement connus chez d'autres poxvirus comme les orthopoxvirus (31,60,61). Quelques études ont évalué les protections croisées entre souches et leurs résultats ne peuvent pas s'expliquer avec les connaissances moléculaires que nous avons actuellement de ces virus. Par exemple, des amakihis familiers immunisés avec une souche du sous-clade B1 n'ont pas été protégés lors d'infection avec une souche du même sous-clade mais génétiquement différente (112) alors que dans une autre étude, des diamants mandarins (*Taeniopygia guttata*) vaccinés avec une souche FWPV-like ont été protégés lors d'infection avec une souche CNPV-like (108).

La compréhension des mécanismes de l'infection par les avipoxvirus a aussi justifié divers travaux expérimentaux. Quelques-uns se sont intéressés à reproduire un mode d'inoculation conduisant à des manifestations cliniques proches de celles rencontrées spontanément ou reproduisant la contamination par des insectes vecteurs. Outre la scarification de zones cutanées aptères ou la transfixion du patagium, largement utilisées (19,39,56,226), ont également été testées la ponction des coussinets plantaires (98,108) et les inoculations par voie intraveineuse, intramusculaire, intratrachéale et oculaire (59,102,223,227). Enfin, d'autres études expérimentales, en permettant par exemple de préciser la nature des réponses immunitaires humorale et cellulaire lors d'infection par un avipoxvirus (19,56,57,228), essaient d'apporter des éléments de compréhension de l'épidémiologie de la variole aviaire.

2. Problématique et objectifs

Les différents résultats obtenus jusqu'alors dans cette thèse se sont appuyés sur des données et les prélèvements de terrain effectués dans les divers élevages d'outardes étudiés. Ils ont permis de préciser l'épidémiologie et les impacts de la variole aviaire et de mieux comprendre la circulation des souches virales parmi les oiseaux captifs et à l'interface élevage / extérieur. De nombreuses questions ont également été posées par ces études. Certaines, comme la nature des facteurs de risque de la variole aviaire chez l'Outarde ou le rôle des insectes vecteurs, pourront trouver leur réponse à travers de nouvelles analyses des données collectées. Cependant, même dans ces cas, des hypothèses persisteront, démontrant l'intérêt préalable d'acquérir des connaissances plus précises sur l'infection des outardes par les avipoxvirus. La liste suivante présente certains points majeurs pour lesquels un manque de connaissance existe :

- Temporalité de l'infection : temps d'incubation, durée de l'expression clinique, persistance de l'infection, portage asymptomatique… ;
- Impact de l'infection sur la physiologie et les performances zootechniques des oiseaux ;
- Sensibilité et immunité de l'Outarde vis-à-vis de différentes souches virales.

Pour cela, la réalisation d'infections expérimentales chez l'Outarde pourrait être d'un grand secours. Jusqu'à récemment, il n'était concevable de réaliser sur des outardes captives que des études ne portant pas atteinte à la santé des oiseaux, comme des études

vaccinales (229–231). Des infections expérimentales n'étaient en revanche pas envisageables pour des raisons éthiques (espèces menacées) et à cause de la grande valeur de chaque individu captif. D'autres espèces devaient donc être utilisées pour étudier les agents infectieux de l'Outarde (169). Considérant désormais la grande taille des effectifs captifs (plus de 40000 poussins produits en 2014 par les projets ECWP, NARC et SKHBC-AD) et l'encadrement sanitaire strict des élevages, il semble raisonnable de pouvoir proposer, dans un cadre scientifique et éthique strict, la réalisation d'infections expérimentale sur de petits effectifs d'oiseaux captifs. À partir de la bibliographie disponible et des connaissances acquises à travers les résultats de notre thèse, l'objectif de cette dernière partie a donc été la mise en place d'un modèle expérimental de variole aviaire chez l'Outarde, préliminaire à toute étude plus poussée. Plus précisément, nous avons mené deux séries d'infections tout d'abord pour valider les conditions permettant de reproduire expérimentalement une forme naturelle de variole aviaire chez l'Outarde, puis pour évaluer certaines caractéristiques simple de l'infection : temps d'incubation, durée et évolution spontanée des lésions, impact sur les poids et consommations, recherche de virémies et de modifications de paramètres hématologiques.

3. Démarche expérimentale

L'étude a été menée à ECWP car c'est le projet sur lequel l'hébergement et le suivi d'oiseaux expérimentaux étaient les plus simples. Aucun cadre réglementaire n'existe pour l'expérimentation animale au Maroc. En revanche, le projet ECWP est détenteur d'une autorisation d'exercice de l'activité avicole (attestation n° 01-16/VV et OAC/2007/E et AC/Ou/Rp du 18/05/2007), conformément à la loi 49-99 du 13 juin 2002 relative à la protection sanitaire des élevages avicole, et est donc soumis, à ce titre, à un contrôle régulier de la part des autorités sanitaires.

i. Choix de la souche

Il a été décidé de ne tester dans un premier temps qu'une seule souche virale. La souche choisie devait répondre à plusieurs critères :

- La forme cutanée de variole aviaire étant la plus observée sur les outardes, la souche devait avoir été isolée à partir de lésions cutanées ;
- Souche identifiée sur les deux espèces d'Outarde et si possible au Maroc ;

- Appartenance au clade le plus fréquemment identifié chez l'Outarde, soit le clade B (virus CNPV-like) qui a été identifié sur tous les projets et est majoritaire au Maroc ;
- Proximité avec des souches sauvages. À ce titre, un seul avipoxvirus a été identifié sur un oiseau sauvage (un moineau domestique) au Maroc et il appartient au sous-clade B2 dans lequel on retrouve 24% des virus identifiés sur les outardes au Maroc ;
- Souche se développant sur culture cellulaire et dont la croissance pouvait être évaluée ;
- Disponibilité du matériel biologique, c'est-à-dire souche issue d'une lésion importante permettant plusieurs isolements successifs si possible.

Le choix s'est ainsi porté sur la souche CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/007/2011 identifiée sur le site de Missour au Maroc en 2011 à partir d'une lésion cutanée d'une outarde africaine d'un an. Lors de la première série d'infections en 2013 nous avons utilisé le virus semi-purifié sur coussin de sucrose à 36% après deux passages sur cellules QT6 (cellules tumorales de caille). Toutefois, la quantification du virus après la semi-purification a montré que l'inoculum était très peu concentré (sous le seuil de détection de la PCR quantitative utilisée). Lors de la seconde série d'infections, réalisées en 2014, nous avons décidé d'utiliser directement un broyat de la lésion sauvage comme inoculum, afin d'éviter une possible atténuation du virus après plusieurs passages sur cultures cellulaires et pour ne pas avoir recours à une étape de semi-purification virale pour laquelle nous suspections un très faible rendement.

ii. Choix des oiseaux

L'espèce africaine d'Outarde a été choisie, étant la seule élevée à ECWP au moment de l'étude. L'étude épidémiologique descriptive de notre thèse a montré que, chez cette espèce, les oiseaux juvéniles, particulièrement avant l'âge de neuf mois, étaient beaucoup plus infectés que les adultes (cf. Figure 11, p46). Nous avons donc travaillé sur cette catégorie d'oiseaux. Bien que les cas de variole aviaire surviennent au sein des élevages sur des oiseaux généralement vaccinés, nous avons décidé de ne pas vacciner les oiseaux expérimentaux contre la variole aviaire afin d'éviter toute interaction entre immunité acquise et infection. La condition que les oiseaux n'aient

aucun antécédent médical a aussi été posée. Les oiseaux expérimentaux ont été choisis parmi les oiseaux destinés à être donnés aux fauconniers (oiseaux dont les génotypes sont surreprésentés dans la population captive). Pour éviter un biais lié à l'âge, ils ont été sélectionnés à partir d'un lot de poussins éclos le même jour. Afin de limiter au maximum le stress dû aux conditions expérimentales, les oiseaux ont été élevés dès l'éclosion selon le protocole destiné aux futurs reproducteurs (imprégnation, manipulations fréquentes, élevage en cage ou batterie).

iii. Choix du mode opératoire

Nous avons décidé de reproduire expérimentalement une forme cutanée de variole aviaire, celle-ci étant beaucoup plus souvent observée chez les outardes captives (cf. p61). Les études qui ont utilisé des voies d'inoculation autres que cutanées n'ont jamais réussi à reproduire une forme cutanée simple de la maladie : soit des lésions cutanées et diphtériques multiples ont été induites, associées à des létalités importantes (59,102), soit aucune lésion cutanée n'a pu être provoquée (223,227,228). Nous avons donc choisi d'inoculer le virus par voie cutanée et plus précisément par voie intradermique afin de mimer au mieux l'inoculation du virus par un insecte piqueur. Lors de la première série d'infections, nous avons comparé deux voies cutanées : la scarification et la ponction. Nous n'avons utilisé que cette dernière lors de la seconde série d'infections. Le virus a été inoculé au niveau des pattes, qui est la localisation la plus fréquente des lésions chez les outardes de nos projets (environ 50%, cf. p48). En 2013, les infections avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale ont été réalisées sur la face latérale de la jambe, juste au-dessus de l'articulation inter-tarsienne. Cependant, à cette localisation la vascularisation importante et le tissu sous-cutané assez abondant rendent difficile une inoculation intradermique stricte. En 2014, les infections avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion ont été réalisées sous l'articulation inter-tarsienne où la peau est presque directement apposée sur le tarsométatarse.

iv. Matériel et méthodes

(a) Virus

La souche CNPV/*Chlamydotis undulata*/MA/007/2011, isolée au Maroc en juin 2011 à partir d'une lésion cutanée d'une outarde africaine naturellement infectée (bague U10M05909), a été utilisée pour toutes les infections expérimentales. La caractérisation

moléculaire de cette souche avait déjà été réalisée dans le cadre de l'étude de la diversité des avipoxvirus infectant l'Outarde et elle est similaire pour les loci P4b et fpv140 à la souche CNPV/*Chlamydotis macqueenii*/MA/006/2011 (cf. Chapitre II :C.4, p87). Un fragment de lésion a été broyé au mortier avec du sable de Fontainebleau dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionné de pénicilline (400 U/mL), de streptomycine (400 µg/mL), d'amphotéricine B (250 µg/mL). Après centrifugation à 500 g pendant 10 min, le surnageant a été prélevé et congelé à -20 °C. Une partie de ce surnageant, dilué au 1/10ème, a été utilisé pour infecter des cellules QT6. Les cellules ont été inoculées dès qu'un tapis monocellulaire présentant 80% de confluence était observé. Après adsorption de l'inoculum pendant deux heures, du milieu de culture composé de DMEM additionné de pénicilline (400 U/mL), de streptomycine (400 µg/mL), d'amphotéricine B (250 µg/mL) et de 2% de sérum de veau fœtal a été ajouté. Les flasques ont été maintenues à 37°C et quotidiennement observées. Seule une atteinte cellulaire diffuse liée au développement viral a été observée, mais l'identification d'effets cytopathiques qui permettraient de quantifier ce développement n'a pas été possible. Le développement du virus sur ces cellules a donc été estimé par PCR quantitative. Sept jours après l'inoculation, les flasques ont été congelées / décongelées trois fois puis leur contenu a été gratté, récolté et utilisé pour effectuer une seconde inoculation selon le même protocole. Après le second passage, la suspension de cellules récoltée a été centrifugée à 300 g et 4 °C pendant 10 min. Le surnageant collecté a à nouveau été centrifugé à 300 g et 4 °C pendant 10 min puis ce second surnageant a été ultracentrifugé à 160000 g et 4 °C pendant deux heures et le culot a été repris dans du TL10 (Tris pH 8,6 1 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L) et conservé à 4 °C. Ce culot a ensuite été semi-purifié par ultracentrifugation sur coussin de sucrose à 36% à 160000 g et 4 °C pendant deux heures puis repris dans du DMEM et conservé à 4 °C pour être ensuite utilisé comme inoculum lors de la première série d'infection.

(b) Oiseaux et infections

Au moins une semaine avant le début des infections, tous les oiseaux ont été installés en batterie individuelle dans une pièce close à l'ambiance contrôlée et dont l'accès se fait par des vestiaires avec application des mesures de biosécurité standards à ECWP (changement de vêtements et de chaussures, lavage et désinfection des mains). Au moment de leur installation, les oiseaux ont été pesés et minutieusement inspectés

afin de déceler toute anomalie, dont la présence de lésions pouvant évoquer la variole aviaire. Aucune lésion de ce type n'a été observée et seules quelques petites plaies d'abrasion ont été notées sur les poignets et les cires. Pendant toute la durée de l'étude, la ration alimentaire a été distribuée sur une base quotidienne comme suit : granulé « outarde » distribué *ad libitum*, 20 g de luzerne fraîche et 5-10 g de vers de farine. L'eau a été distribuée *ad libitum*.

La première partie de l'étude, menée en 2013 avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale, a consisté en l'infection de 24 oiseaux âgés de 90 jours : 18 ont été infectés avec l'inoculum et 6 avec du DMEM seul. Les inoculations ont été réalisées aux deux pattes, sur la face latérale de la jambe, juste au-dessus de l'articulation inter-tarsienne. Une goutte d'environ 20 µL d'inoculum a été déposée sur la peau puis, pour la patte gauche, une scarification a été réalisée avec une aiguille de 25 gauges en « entraînant » la goutte. Sur la patte droite, cinq ponctions successives ont été réalisées à travers la goutte avec une aiguille du même diamètre. Dans les deux cas, il a été permis à la goutte d'adsorber pendant 30 s, puis l'excédent a été essuyé avec une compresse afin d'éviter la dissémination du virus sur d'autres parties de l'oiseau ou dans l'environnement. La seconde partie de l'étude, menée en 2014 avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion et dilué au 1/10ème, a consisté en l'infection de 12 oiseaux âgés de 69 jours : 9 ont été infectés avec l'inoculum et 3 ont été infectés avec du DMEM. Les inoculations des deux pattes, sur la face latérale du métatarse environ deux centimètres sous l'articulation inter-tarsienne ont été réalisées par ponction comme la première fois à l'exception du nombre de ponctions (dix au lieu de cinq).

(c) Suivi des oiseaux

Les oiseaux ont été suivis pendant trois mois complets à partir de la date d'inoculation. Les quantités de granulés consommés ont été calculées quotidiennement et les oiseaux ont été pesés au moins une fois par semaine pendant toute la durée de l'étude. Tous les jours, les oiseaux ont été observés à distance afin de détecter d'éventuelles anomalies puis capturés pour un examen minutieux de la cavité orale, des paupières, du bec et des pattes. Lorsqu'une lésion a été détectée, celle-ci a été mesurée et décrite afin de pouvoir suivre son évolution. Certaines lésions ont été prélevées pour analyses moléculaires et histologiques. Après avoir anesthésié l'oiseau, la lésion a été

excisée de manière aseptique et une partie a été immédiatement congelée à -20 °C. Le reste de la lésion a été stocké dans du formol 10% tamponné.

Lors des infections de 2013, des prises de sang ont été réalisées tous les trois jours pendant les deux premières semaines post-inoculation puis une fois par semaine. Lors des infections de 2014, les prises de sang ont été réalisées une fois par semaine. À chaque prise de sang, environ 5 mL de sang ont été prélevés à la veine jugulaire droite à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 21 gauges. Après retrait de l'aiguille le sang a été immédiatement transféré dans des tubes de prélèvement traités le jour même ou stockés, suivant les analyses prévues (Tableau 16). Les sérums et plasma ont été récupérés après centrifugation à 4500 g pendant 5 min. Pour neufs oiseaux infectés en 2013 les leucocytes ont également étaient séparés des autres fractions sanguines à l'aide du kit Ficoll-Plaque (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), en suivant les instructions du fabricant.

Tableau 16. Analyses réalisées à partir des prélèvements sanguins lors des deux séries d'infections expérimentales.

Inoculum	Tube EDTA	Tube hépariné	Tube sec
Semi-purification virale (2013)	-	2 mL. Plasma extrait pour stockage et leucocytes extraits pour recherche de virémie par PCR quantitative[1].	3 mL. Sérum extrait pour stockage.
Broyat de lésion (2014)	1 mL. Numération formule sanguine.	1mL. Plasma extrait pour électrophorèse des protéines.	3 mL. Sérum extrait pour stockage.

[1] Les leucocytes n'ont été extraits que sur neufs oiseaux infectés et jusqu'à sept semaines post-inoculation.

(d) PCR quantitative

L'ADN des inoculums, des leucocytes et des lésions ont été extraits avec le kit One-4-ALL Genomic DNA Miniprep (Bio Basic, Markam, Canada) en suivant les instructions du fabricant. Pour les leucocytes, l'ADN des deux fractions présentes dans les tubes (culot et surnageant) a été extrait séparément. L'ADN viral des inoculums, des lésions et des leucocytes a été amplifié par PCR quantitative.

Une PCR quantitative a été développée en utilisant une chimie SYBR-green. Des amorces ont été dessinées pour amplifier une séquences de 162 nucléotides de l'ORF *CNPV185* (locus fpv140) commune à tous les avipoxvirus d'outardes du sous-clade B2

(Figure 20, p 96) : C185_01F (5'-GGTGTTAACGTTAGGTCATCACA-3') et C185_01R (5'-AGCATTACTTAGCGCATATCCT-3').

Après avoir été amplifié par PCR à partir de l'inoculum avec les amorces C185_01F et C185_01R, un amplicon a été cloné avec le kit StrataClone PCR Cloning (Agilent Technologies, La Jolla, USA) en suivant les instructions du fabricant. Trois clones, pour lesquels l'intégration de l'amplicon a été confirmée par PCR, ont été repiqués dans du milieu LB (Luria broth) additionné d'ampicilline (50 µg/mL). Après douze heures d'incubation à 37 °C, les plasmides ont été extraits avec le kit Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel, Düren, Germany) en suivant les instructions du fabricant puis dosés sur fluoromètre QuBit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Une gamme de plasmides allant de 10^8 à 10^2 plasmides/2 µL par dilution au $1/10^{ème}$ a ensuite été préparée.

La mise en place de la PCR quantitative a été validée en testant la gamme préparée et en incluant deux témoins négatifs (eau) et un témoin positif (ADN extrait de l'inoculum). Chaque échantillon a été passé en duplicata. Les réactions ont été réalisées en utilisant le kit LigthCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany) sur un thermocycleur en temps réel LigthCycler 480 (Roche). Brièvement, 0,2µL de chaque amorce (10 µmol/L) ont été mélangés à 5 µL de Master Mix et 2,6 µL d'eau, et 2 µL d'ADN cible ont été ajoutés. Les conditions de réaction ont consisté en une dénaturation initiale de 10 min à 95°C suivie de 40 cycles composés d'une dénaturation de 15 s à 95 °C et d'une étape commune d'hybridation et d'élongation de 40 s à 60 °C. Les courbes de dissociation ont ensuite été obtenues en appliquant aux amplicons un gradient de température de 65 °C à 97 °C. Par la suite, les PCR quantitatives ont été réalisées en incluant systématiquement au moins un témoin d'extraction, un témoin de contamination du mix de PCR et la gamme de plasmides. Tous les échantillons ont été dupliqués.

(e) Hématologie et électrophorèse des protéines plasmatiques

Dans les deux heures qui ont suivi les prélèvements sanguins, les numérations formules sanguine ont été effectuées. La formule leucocytaire a été réalisée en comptant et identifiant 100 leucocytes sur un frottis sanguin coloré avec le colorant de Wright et Giemsa selon les protocoles publiés (232). La numération leucocytaire a été faite indirectement en comptant sur cellule de Malassez les granulocytes éosinophiles et

hétérophiles colorés avec un colorant pour les granulocytes éosinophiles de mammifères (LMR 5004, Labo-Moderne, Paris, France). À partir de la formule leucocytaire et de la numération indirecte, les concentrations de chaque type cellulaire ont été calculées. Les valeurs de l'hématocrite ont également été mesurées après centrifugation.

La séparation des protéines plasmatique a été effectuée à partir de 10 µL de plasma déposés sur gel Hydragel β1-β2 (Sebia, Norcross, USA) et analysés avec un automate d'électrophorèse de protéines Hydrasis 2 (Sebia). L'identification des fractions protéiques et le découpage des courbes obtenues a été fait visuellement et en suivant les recommandations de la littérature (233). La concentration des protéines plasmatiques a été mesurée au réfractomètre.

(f) Histologie

Après fixation dans du formol 10% tamponné, les lésions ont été incluses en blocs de paraffine, puis des sections de 4 µm colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ont été observées au microscope.

(g) Analyses statistiques

Les poids, croissances, consommations, hématocrites et concentrations absolues et relatives des différentes leucocytes et fractions protéiques ont été analysées afin de déterminer si le traitement (infecté - contrôle) avait un effet sur l'un de ces paramètres. Les données ayant été collectées sur chaque individu de manière répétées au cours du temps (Tableau 17), nous avons appliqué un modèle linéaire mixte à nos données. Les effets suivants ont été systématiquement testés :

- Effets fixes : traitement, temps et l'interaction traitement et temps ;
- Effets aléatoires : individu et interaction individu et temps.

Le meilleur modèle a ensuite été sélectionné après avoir comparé les différents modèles par leur maximum de vraisemblance. Le programme R (190) et les packages lme4 (234) et lmerTest (235) ont été utilisés pour réaliser toutes les analyses.

Tableau 17. Variables sur lesquelles l'effet de l'infection a été testé.

Variable	Données[1]	Répétitions
2013		
Poids (g)	339	15
Gain de poids moyen quotidien relatif (%)	339	15
Consommation (g)	1014	44
2014		
Poids (g)	165	14
Gain de poids moyen quotidien relatif (%)	165	14
Consommation (g)	670	57
Hématocrite (%)	154	13
Leucocytes (₡/µL)	154	13
Formule leucocytaire absolue (₡/µL)[2]	154	13
Formule leucocytaire relative (%)[2]	154	13
Protéines plasmatiques (g/L)	154	13
Ratio albumine / globulines	154	13
Fractions absolues des protéines plasmatiques (g/L)[3]	154	13
Fractions relatives des protéines plasmatiques (%)[3]	154	13

[1] Nombre de données après avoir exclu les données manquantes.
[2] Pour les formules leucocytaires, les types cellulaires suivants ont été analysés : granulocytes basophiles, éosinophiles, hétérophiles, monocytes et lymphocytes.
[3] Les fractions protéiques suivantes ont été analysées : albumine, alpha-1 globulines, alpha-2 globulines, béta-1 globulines, béta-2 globulines, gamma globulines.

4. Résultats

i. Mise en place de la PCR quantitative

Les courbes d'amplification ont été obtenues avec la gamme de plasmides. Elles sont apparues au 10ème cycle pour le point le plus concentré de la gamme (10^8 plasmides) et au 37ème cycle pour le point le moins concentré de la gamme (10^0 plasmides) avec des espacements d'environ 3,3 cycles entre chaque point de la gamme (Figure 26). Pour le point le moins concentré, seul un des échantillons a été amplifié, signifiant probablement que la limite de détection a été atteinte à cette concentration. Le seuil de détection a donc été fixé à 10 copies de génome viral. Aucun témoin négatif n'a montré d'amplification, démontrant notamment l'absence de dimères d'amorces.

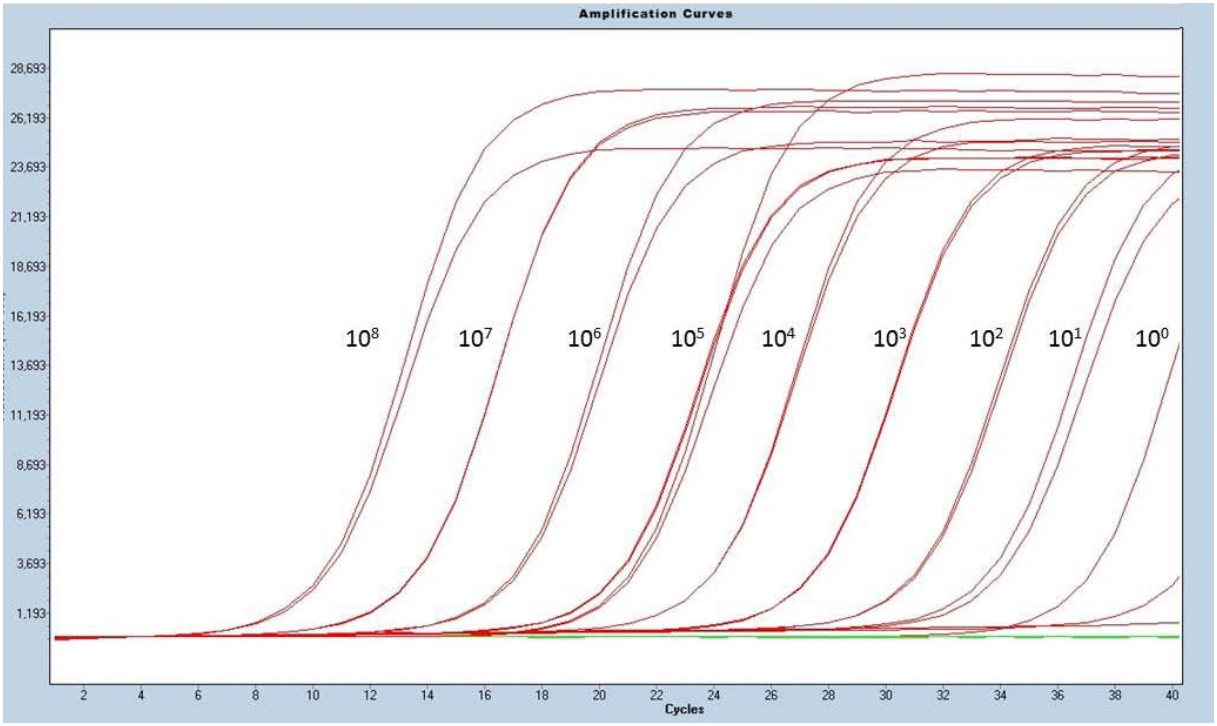

Figure 26. Courbes d'amplification de la gamme de la PCR quantitative ciblant une séquence de l'ORF *CNPV185* des virus du sous-clade B2.

Les nombres indiquent les quantités de plasmide dans chaque point de la gamme. Chaque échantillon a été passé en duplicata. Les courbes d'amplification du témoin positif sont superposées avec celles du point de la gamme contenant 10^5 plasmides.

ii. Infections avec l'inoculum issu d'une semi-purification virale

Après semi-purification le dosage par PCR quantitative de l'inoculum a montré que le titre viral était très faible, à la limite de détection. Seul un des duplicatas a été amplifié et sa concentration en génome viral estimé à 7 x 10^3 copies/mL. Il a quand même été décidé de procéder aux infections expérimentales avec cet inoculum, partant du principe que lors d'infections naturelles, le portage du virus par les insectes vecteurs étant uniquement mécanique, la dose infectieuse pouvait être très faible.

(a) Expression clinique

Aucune lésion de variole aviaire n'a été observée sur les 6 oiseaux contrôles. Parmi les 18 oiseaux infectés, 67% de morbidité a été observée, 12 oiseaux ayant présenté des lésions cutanées au niveau d'au moins un des points d'inoculation, et 19 lésions ont été observées (Tableau 18).

Tableau 18. Lésions induites par l'inoculum issu d'une semi-purification virale.

Oiseau	Stade final de la lésion	Patte	Incubation (jours)	Évolution (jours)	Taille maximale (mm)
U13M12917	masse croûteuse[1]	gauche	30	-	12
	papule	droite	36	38	5
U13M12924	papule[1]	droite	33	37	5
	papule	droite	36	-	5,5
U13M12939	masse croûteuse[1]	droite	16	51	13
U13M12954	papule	droite	42	-	7
U13M12967	papule	gauche	53	17	9
	papule	droite	46	21	5
U13M12980	papule	droite	56	35	5
	papule	gauche	60	31	12
U13M12982	papule[1]	droite	39	-	11
U13M13014	masse croûteuse	droite	19	62	11
U13M13021	papule	droite	63	-	5
	papule	droite	67	-	5
U13M13028	papule	gauche	28	32	7
U13M13032[2]	papule[1]	droite	39	-	5,5
	papule	droite	42	-	3,5
U13M13035	papule	droite	32	42	4,5
	papule[1]	droite	39	-	5

[1] Lésion prélevée (exérèse, aspiration ou écouvillonnage de l'exsudat).
[2] Cet oiseau est mort 56 jours après l'inoculation, suite à une rupture de la veine jugulaire droite.

Toutes les lésions ayant été observées à proximité immédiate (<1 cm) des points d'inoculation, nous avons considéré que les formes de variole aviaire induites étaient localisées aux sites d'infection et que nous pouvions ainsi analyser chaque patte indépendamment, et les comparer. Ainsi, 61% des pattes infectées par ponction (patte droite, n=11) et 22% des pattes infectées par scarification (patte gauche, n=4) ont développé des lésions. La différence d'efficacité entre les deux modes d'inoculation est significative (test du chi-deux, $p<0,05$). Pour analyser les temps d'incubation nous avons considéré la première lésion apparue sur chaque patte. Les temps moyens d'incubation sont de 38 jours pour la patte droite et de 43 jours pour la patte gauche (Figure 27). Pour les lésions qui ont pu être suivies jusqu'à la guérison (n=10), la durée d'évolution moyenne a été de 37 jours et les minimum, médiane et maximum respectivement de 17, 36 et 62 jours.

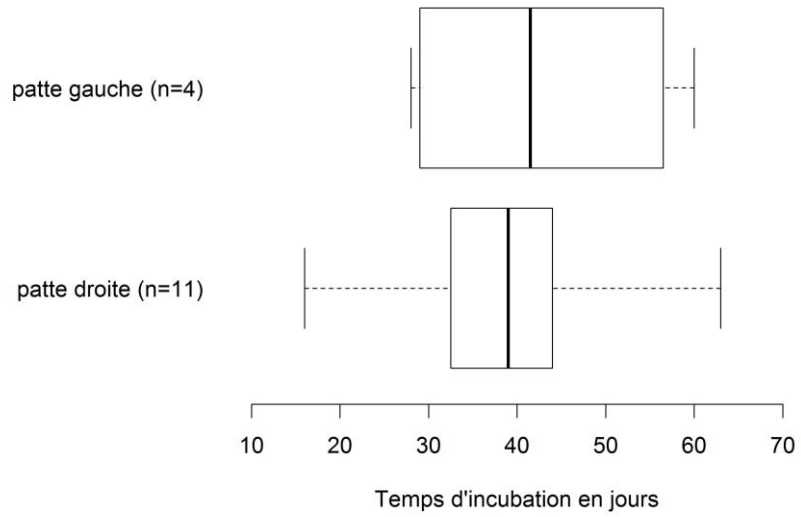

Figure 27. Distribution des temps d'incubation pour chaque patte.

Les moustaches indiquent les minimum et maximum.

Parmi les 19 lésions observées, seules 16% (n=3) ont évolué vers le stade de masse croûteuse (Figure 28) selon le schéma classique (20) : papule ⟶ vésicules ⟶ ulcérations ⟶ masse croûteuse. Elles ont atteint une taille moyenne de 12 mm avant que la croûte ne tombe et ne laisse place à un épithélium neuf. Pour les 16 autres lésions, seules des papules caractérisées par une surélévation locale de la peau et d'une taille moyenne de 6 mm ont été observées. Ces papules ont pris des aspects allant de lésions fermes au toucher et accompagnées d'une inflammation bien visible au niveau de l'épiderme (Figure 28), à des lésions intéressant davantage le tissu sous-cutané, ayant une consistance plus fluctuante et ne montrant pas d'inflammation visible. Toutes ces lésions ont régressé spontanément sans évoluer jusqu'à l'ulcération et la formation de croûtes.

Aucun oiseau n'a montré, pendant les trois mois de l'expérience, de baisse d'activité ou d'atteinte de son état général et les analyses statistiques n'ont pas montré d'effet significatif du traitement sur le poids et la consommation des oiseaux.



Figure 28. Lésions induites par l'inoculum issu d'une semi-purification virale.

Vues de face (1) et de côté (2) de deux papules n'ayant pas évolué vers le stade de masse croûteuse et vues de face (3) et de côté (4) d'une lésion ayant atteint le stade de masse croûteuse.

(b) Virémie

Les leucocytes ont été extraits tous les trois jours durant les deux premières semaines d'infection puis une fois par semaine jusqu'à sept semaines post-infection à partir du sang de neufs oiseaux infectés (soit dix prélèvements par oiseau). Parmi ceux-ci, six ont développé des lésions dont un seul jusqu'au stade de masse croûteuse. Les PCR quantitatives réalisées sur l'ADN extrait des leucocytes n'ont pas permis de détecter d'ADN viral au seuil de détection de 5 copies/µL.

(c) Analyses moléculaires et histologiques des lésions

L'observation microscopique des sections des tissus lésionnels de quatre lésions (trois papules et une masse croûteuse) n'a mise en évidence qu'un processus inflammatoire. Aucun effet cytophatique et aucune inclusion intracytoplasmique éosinophile caractéristique de la variole aviaire n'ont été observés. En revanche, les

amplifications par PCR quantitatives ont mis en évidence de l'ADN viral dans cinq des six lésions prélevées (trois papules et deux masses croûteuses).

À la suite des résultats de cette première série d'infections, une seconde série d'infections a été réalisée en ajustant les paramètres suivants :

- Utilisation d'un broyat de lésion comme inoculum ;
- Généralisation de l'inoculation par ponction / abandon de la scarification ;
- Choix d'un site d'inoculation moins vascularisé ;
- Recherche de modifications hématologiques plutôt que de virémie (absente à priori).

iii. Infections avec l'inoculum issu d'un broyat de lésion

Le dosage par PCR quantitative de l'inoculum, issu d'un broyat de lésion et dilué au 1/10ème (c'est-à-dire tel qu'utilisé pour les infections), a permis d'estimer sa concentration en génome viral à 4 x 10^7 copies/mL.

(a) Expression clinique

Aucune lésion de variole aviaire n'a été observée sur les 3 oiseaux contrôles. Parmi les 9 oiseaux infectés, 78% de morbidité a été observée, 7 oiseaux ayant présenté des lésions cutanées au niveau d'au moins un des points d'inoculation, et 12 lésions ont été observées (Tableau 19). Comme lors de la première série d'infections, elles ont toutes été observées à proximité immédiate (<1 cm) des points d'inoculation et nous avons donc considéré chaque patte indépendamment. Ramené au nombre de pattes, la morbidité est de 50% (12/24). Le temps d'incubation moyen a été de 39 jours et les minimum, médiane et maximum respectivement de 20, 34 et 63 jours.

Parmi les 12 lésions observées, seules 17% (n=2) ont évolué vers le stade de masse croûteuse selon le schéma classique, atteignant une taille de 10 et 31 mm (Figure 29). Elles ont été prélevées et leur exérèse a révélé la présence d'un tissu de granulation sous les masses croûteuses, celles-ci n'étant pas adhérentes aux tissus profonds. Pour les dix autres lésions, seules des papules d'une taille moyenne de 7 mm ont été observées. Elles se sont toutes présentées sous la forme d'une surélévation locale de la peau, ferme au toucher, et accompagnée d'une inflammation bien visible au niveau de l'épiderme. Cinq de ces lésions ont été prélevées, deux étant adhérentes aux tissus profonds. L'une

d'elles a d'ailleurs récidivé après exérèse. Les cinq lésions qui n'ont pas été prélevées ont régressé spontanément sans évoluer jusqu'à l'ulcération et la formation de croûtes.

Tableau 19. Lésions induites par l'inoculum issu d'un broyat de lésion.

Oiseau	Stade final de la lésion	Patte	Incubation (jours)	Taille maximale (mm)
U14M20021	papule[1]	droite	23	9
U14M20023	papule	gauche	24	4
	masse croûteuse[1]	droite	27	10
U14M20027	masse croûteuse[1]	droite	35	31
	papule	gauche	57	5
U14M20032	papule[1]	droite	52	9
	papule	gauche	63	4
U14M20033	papule	gauche	20	7,5
	papule	droite	33	4,5
U14M20034	papule[1]	droite	26	9
U14M20037[2]	papule[1]	droite	51	7
	papule[1]	gauche	56	7

[1] Lésion prélevée par exérèse.
[2] Cet oiseau a été euthanasié 71 jours après l'inoculation, suite à une fracture du tibiotarse gauche.

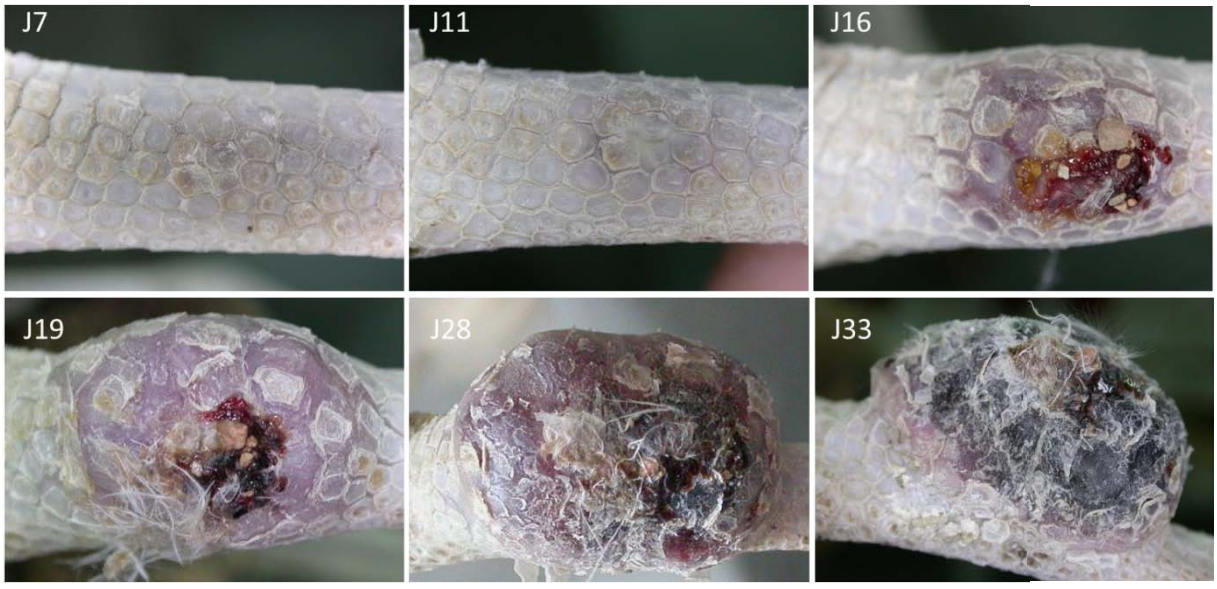

Figure 29. Évolution d'une lésion expérimentale depuis le stade de papule jusqu'au stade de masse croûteuse.

J7 (7 jours post-inoculation) : début de papule avec inflammation ; J11 : augmentation de l'inflammation ; J16 : desquamation de plusieurs écailles et début d'ulcération ; J19 : apparition d'une croûte au centre de la lésion ; J28 : progression de la croûte ; J 33 : stabilisation de l'inflammation et assèchement de la lésion.

(b) Poids et consommations d'aliments

Bien qu'aucune baisse d'activité ou d'atteinte de l'état général n'ait été visuellement observée durant les trois mois de l'étude, des différences de poids et de consommation de granulés ont été notées entre oiseaux infectés et contrôles (Figure 30 et Figure 31). En intégrant dans l'analyse statistique les effets aléatoires dus à la variabilité entre individus au départ puis au cours de l'étude, nous avons montré que l'infection a eu un effet significativement négatif sur les poids et les consommations (Tableau 20).

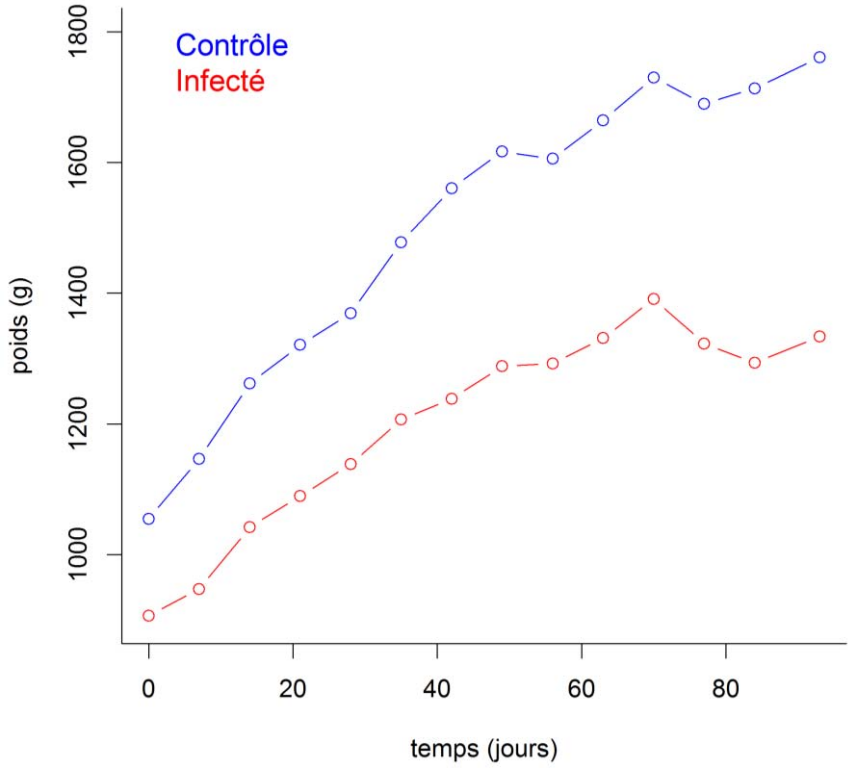

Figure 30. Évolution des poids moyens pour les oiseaux contrôles et infectés à partir du jour de l'inoculation.

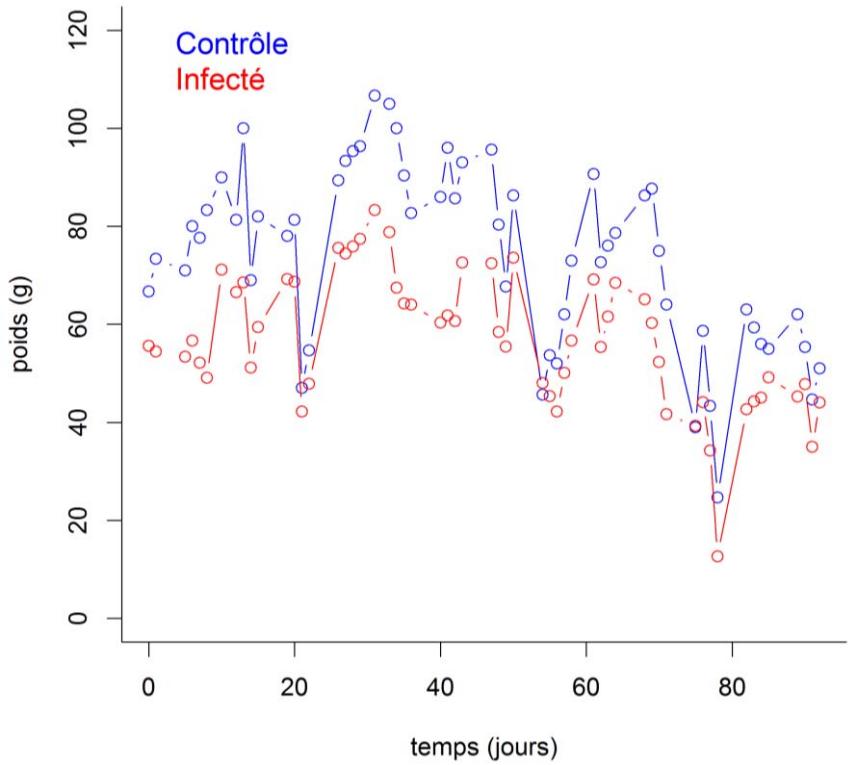

Figure 31. Évolution des consommations moyennes pour les oiseaux contrôles et infectés à partir du jour de l'inoculation.

(c) Paramètres hématologiques

Un effet sur les paramètres hématologiques a été testé de la même manière que pour les poids et consommations d'aliments. Des effets significatifs ont été mesurés sur les concentrations absolues et relatives en granulocytes basophiles et en alpha-2 globulines (Tableau 20).

Tableau 20. Variables sur lesquelles l'infection a eu un effet significatif, et coefficients de ces effets.

Variable	Coefficient	Erreur standard	p
Poids (g)	-191	86	<0,05
Consommation (g)	-22	8	<0,05
Granulocytes basophiles (₡/µL)	51	22	<0,05
Granulocytes basophiles (%)	59,9	28,8	<0,05
Alpha-2 globulines (g/L)	-0,47	0,18	<0,05
Alpha-2 globulines (%)	-1,3	0,5	<0,05

(d) Analyses moléculaires et histologiques des lésions

L'observation microscopique des sections des tissus lésionnels de six lésions (quatre papules et deux masses croûteuses) a surtout mis en évidence des lésions

imputables à des surinfections bactériennes : lésions de dermatite pustuleuse avec présence de micro-abcès, caractérisées au niveau épidermique par une migration et une agrégation de granulocytes hétérophiles et, au niveau dermique, par des infiltrats de cellules mononuclées (macrophages, lymphocytes, plasmocytes) et de granulocytes hétérophiles. Malgré tout, et bien que ces lésions gênent l'observation d'effets cytopathiques, des lésions typiques de variole aviaire ont pu être observées sur quelques tissus lésionnels : gonflement et vacuolisation des cellules, associés à la présence d'inclusions intracytoplasmiques éosinophiles caractéristiques (Figure 32).

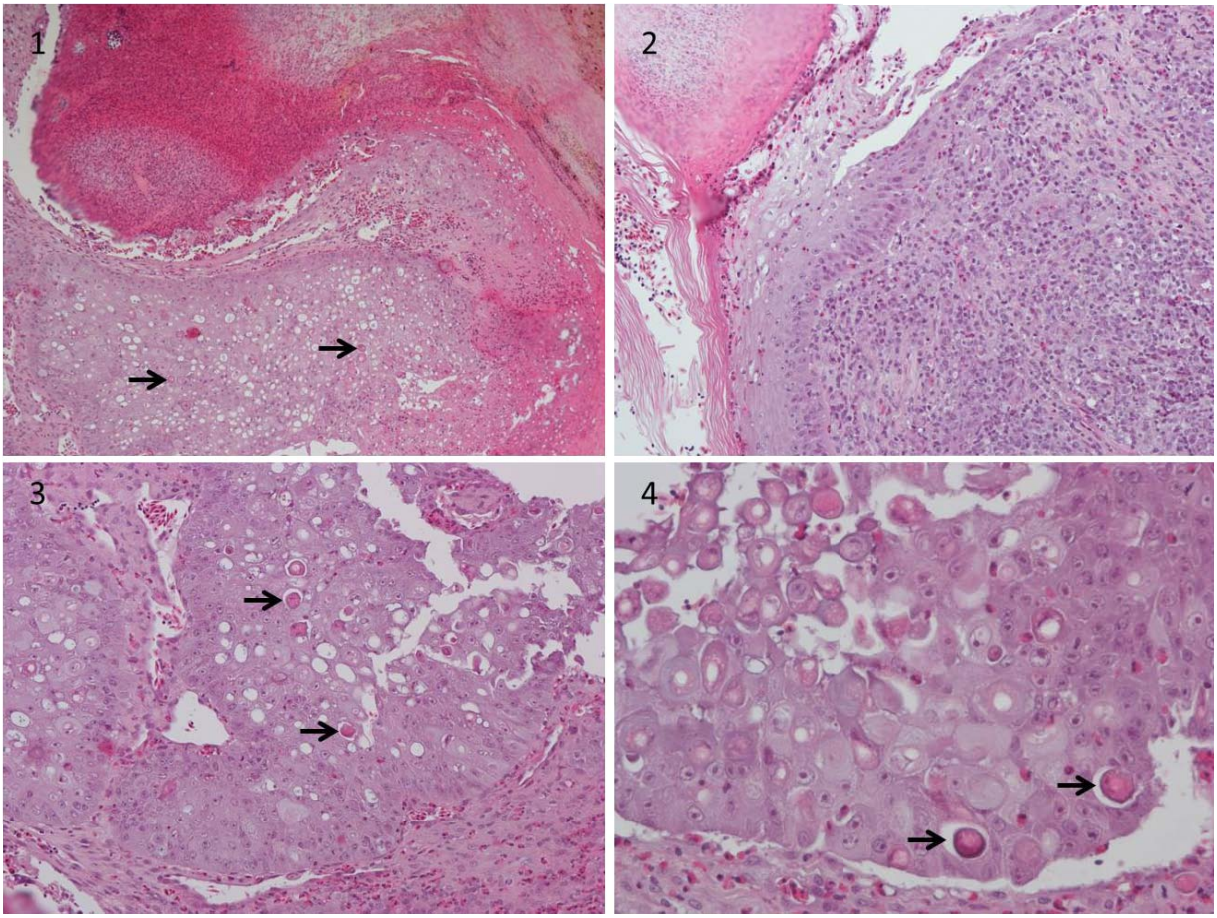

Figure 32. Examen histologique des lésions induites par l'inoculum issu d'un broyat de lésion.

1 (x100) : lésions vésiculaires avec gonflement et vacuolisation épidermique, inclusions intracytoplasmiques éosinophiles dans les kératinocytes et dépôts croûteux et micro-abcès intra-épidermiques ; 2 (x200) : micro-abcès épidermiques avec agrégats de granulocytes hétérophiles et infiltrats dermiques de cellules mononuclées (macrophages, lymphocytes, plasmocytes) et de granulocytes hétérophiles ; 3 (x200) et 4 (x400) : gonflement et vacuolisation des cellules avec inclusions intracytoplasmiques éosinophiles. Les flèches indiquent les inclusions intracytoplasmiques éosinophiles.

Les amplifications par PCR quantitatives ont mis en évidence de l'ADN viral dans les six lésions prélevées (quatre papules et deux masses croûteuses), bien que les titres soient en limite de détection pour trois papules.

À l'issu des trois mois d'expérimentation, les oiseaux ont intégré des volières de réforme et ont continué à être suivi selon les protocoles standard d'ECWP. Plusieurs mois après la fin de l'étude, aucune récidive n'avait été notée sur les oiseaux.

5. Discussion et conclusion

La mise en place d'un modèle expérimental, qui est un préliminaire nécessaire à toute étude plus approfondie, doit répondre à deux objectifs principaux :

- L'infection doit pouvoir induire la maladie, et ce de manière répétable et reproductible ;
- La maladie reproduite expérimentalement doit avoir une expression clinique et épidémiologique proche de(s) forme(s) observée(s) naturellement.

L'étude présentée ici a permis, avec un certain succès, de répondre à ces objectifs et nous a donné l'occasion de préciser certaines caractéristiques de la variole aviaire chez l'Outarde. Des lésions cutanées ont été observées sur 67% (inoculum issu d'une semi-purification virale) et 78% (inoculum issu d'un broyat de lésion) des oiseaux infectés alors qu'aucun oiseau contrôle n'a développé la maladie. Toutefois, seuls 17% et 22% des oiseaux ont développé des lésions caractéristiques d'une forme de variole aviaire observée naturellement chez les outardes.

i. Reproduction de la maladie

Comme mentionné précédemment, plusieurs critères ont orienté le choix de la souche utilisée pour l'inoculum. Il nous semblait plus judicieux de développer un premier modèle en utilisant un virus CNPV-like car, même si des virus FPWV-like peuvent localement être responsables d'une morbidité plus importante sur les outardes (Émirats Arabes Unis), ils ne sont pas retrouvés sur tous les projets de conservation, notamment en Asie centrale. Par ailleurs, les infections par les virus CNPV-like ont été moins étudiées (98,112) que celles causées par des virus FWPV-like, ces derniers étant davantage préoccupants en élevages avicoles (19,53,54,110,228). Notre choix s'est

ensuite orienté vers un virus du sous-clade B2, qui présente un triple intérêt épidémiologique : (i) il s'agit du seul sous-clade identifié à la fois sur des outardes captives (Maroc, Émirats Arabes Unis et Ouzbékistan), sur d'autres espèces captives des mêmes projets de conservation (œdicnèmes criards au Maroc) et sur un oiseau sauvage capturé sur un site d'élevage (un moineau domestique au Maroc) ; (ii) ce sont les virus qui ont le plus souvent été identifiés sur l'avifaune sauvage au Maroc (103) ; (iii) le sous-clade B2 est un des sous-clade parent du virus recombinant identifié au Maroc (cf. Chapitre II :C.4, p87). Suite à ces considérations épidémiologiques, nous avons sélectionné, dans le sous-clade B2, un virus qui avait été responsable de formes cutanées de variole aviaire, pour lequel nous disposions de suffisamment de matériel biologique de départ (lésion) et dont l'isolement sur culture cellulaire était possible et quantifiable, ces dernières caractéristiques n'étant pas systématiques chez les avipoxvirus (23,24,112).

Le choix de la dose infectieuse est un paramètre important à prendre en compte lors d'infection expérimentale. Dans notre étude, les concentrations en génome viral des inoculums ont été estimées à moins de 10^4 copies/mL pour l'inoculum issu d'une semi-purification virale et à 4×10^7 copies/mL pour celui issu d'un broyage de lésion. Les concentrations ont été mesurées par PCR quantitative car les effets cytopathiques produits par le virus n'étaient pas suffisamment nets pour être utilisés pour une quantification. La PCR quantitative présente l'intérêt de pouvoir mesurer plus précisément les concentrations mais ne fournit qu'une estimation indirecte du nombre de particules virales puisqu'elle dose des copies de séquences nucléotidiques. Dans la plupart des études qui se sont intéressées aux avipoxvirus, les inoculums ont été quantifiés en PFU (plaque-forming unit ou pock-forming unit suivant que le titrage a été effectué sur cellules ou CAM) ou en EID50 (fifty percent embryo infective dose). Les titres rapportés vont de 10^5 à 3×10^8 PFU/mL (54,102). Beaucoup de ces travaux s'appuient sur la seule étude qui ait comparé différentes concentrations d'inoculums (111), et considèrent qu'une concentration de 10^5 PFU/mL correspond au minimum infectieux. Cependant, l'étude en question n'a porté que sur des souches vaccinales, donc avirulentes, en évaluant l'apparition d'une prise vaccinale alaire et la protection conférée vis-à-vis d'une infection. Dans une autre étude utilisant une souche virulente, et qui a quantifié en cours d'infection la charge virale au point d'inoculation en la corrélant au stade lésionnel, les lésions apparaissent quand le titre viral dans la lésion dépasse 10^5

PFU/g. On peut aussi s'interroger sur les quantités de virus qui sont réellement administrées lorsque les inoculations utilisent une voie transcutanée ou intradermique. D'ailleurs les volumes administrés sont rarement mentionnés dans les publications. Que ce soit en effet par transfixion du patagium à l'aide d'une aiguille trempée dans l'inoculum, ou par application d'un écouvillon imbibé contre une lésion de scarification, le volume et donc la quantité de virus administrés sont probablement très faibles, en tout cas difficilement quantifiables. Dans notre étude, malgré les concentrations très différentes des deux inoculums, la morbidité est identique (calculée pour chaque patte infectées par ponction : 2013, 61% ; 2014, 50%, test du chi-deux, $p>0,1$) et les manifestations cliniques très similaires. La question de la dose infectieuse se pose aussi quand on connaît le mode de transmission des avipoxvirus. En effet la vectorisation par les insectes, qui semble une des voies majeures de contamination, est uniquement mécanique. On peut donc supposer que les quantités de virus transportées par les vecteurs sont faibles mais suffisent pour provoquer la maladie. Cela est connu pour d'autres virus à vectorisation mécanique, comme celui du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin pour lequel une dose de 20 particules virales peut être suffisante pour provoquer la maladie (236).

L'objectif de notre étude étant de reproduire une forme cutanée de variole aviaire, nous avons uniquement testé des voies d'inoculation cutanées. Trois sont décrites dans la littérature : (i) transfixion du patagium, (ii) scarification d'une zone aptère (barbillon, crête) ou déplumée (cuisse, zone pectorale) et (iii) ponction des coussinets plantaires. Nous n'avons pas voulu utiliser la transfixion du patagium car même si cette voie pouvait fonctionner, elle aurait induit des lésions à une localisation atypique pour les outardes. Dans un premier temps, nous avons donc testé la scarification et la ponction. Bien que cette dernière ait été peu rapportée dans la littérature, elle nous a semblé, dans notre cas, être la voie la plus « naturelle », car les observations de terrain nous ont montré que peu de lésions étaient associées à des plaies (abrasion, picage, traumatisme) sur les outardes.

ii. Expression clinique et modifications physiologiques

La variole aviaire est très majoritairement observée sous sa forme cutanée sur les outardes des projets étudiés, et les observations en élevage rapportent que, dans la plupart des cas, les oiseaux ne présentent qu'une seule lésion cutanée. Aussi, c'est cette

forme que nous voulions reproduire expérimentalement et, en effet, seules des lésions cutanées ont été induites, et ce uniquement aux points d'inoculation. Toutefois, tous les oiseaux n'ont pas développé de lésions et on peut s'interroger sur les causes de ces échecs. Il est largement admis que la sensibilité d'une espèce hôte varie selon les souches, certaines n'étant pas capables d'induire une infection clinique (38). Dans notre cas, il est cependant peu probable que la nature du virus soit en cause puisque la souche est issue d'une lésion cutanée massive prélevée sur une outarde. De plus, lors de la seconde série d'infections, un broyat de lésion a été utilisé directement comme inoculum, excluant ainsi la possibilité que la virulence de la souche ait pu être modifiée. Par contre, la voie d'inoculation a certainement un rôle dans le succès des infections. Nous avons pu le constater en comparant deux voies d'inoculation lors de la première série d'infection, la scarification s'étant montrée significativement moins efficace que la ponction. On peut se demander si la présence de sang au site d'inoculation ne diluerait pas l'inoculum. La peau des outardes étant en effet très fine, il est difficile de réaliser des inoculations strictement cutanées et la plupart du temps, du sang perle empêchant probablement les particules virales de rester suffisamment de temps au contact des cellules épithéliales, ceci étant particulièrement vrai lors de scarification.

Les conditions expérimentales elles-mêmes pourraient être une cause des échecs apparents d'infection de certains oiseaux. Ceux-ci ont en effet été élevés dans des conditions environnementales leur procurant un maximum de confort et dans un cadre sanitaire contrôlé. Cette situation est quelque peu différente des conditions classiques d'élevage dans lesquelles les cas de variole aviaire sont rencontrés. Les oiseaux peuvent alors être soumis à différents facteurs de stress (climatique, autres infections…) qui sont des facteurs de sensibilisation à la maladie (98). De même, nous n'avons pas pu tester chez les oiseaux expérimentaux l'absence préalable d'immunité acquise par manque d'outils adéquats. Mais les sérums collectés le jour de l'infection pourront être ultérieurement analysés pour répondre à cette question. Il serait aussi intéressant d'analyser le reste des sérums collectés au cours de l'étude afin d'évaluer la proportion d'oiseaux qui auraient été infectés sans manifestation clinique, cette situation pouvant exister (111).

Lors de la première série d'infections, la recherche de virémie par PCR quantitative n'a pas été concluante. Parmi les quelques études qui ont recherché la présence de virémie, seule l'une d'elles a mis en évidence, après inoculation

intraveineuse, une virémie très transitoire entre les troisième et septième jours post-inoculation, associée au développement de multiples lésions cutanées (102). L'observation dans notre étude de lésions circonscrites aux points d'inoculation est peu en faveur d'une diffusion du virus dans l'organisme et est donc cohérente avec l'absence de virémie détectée. D'ailleurs Les études expérimentales ayant utilisé des voies d'infection cutanées ont souvent échoué à induire des lésions à distance du point d'inoculation.

Parmi ces lésions, moins de 20% se sont présentées sous une forme similaire à celle observée naturellement (masse croûteuse), les autres s'étant manifestées sous forme de papules de moins d'un centimètre qui ont régressé spontanément en un peu plus d'un mois. Plusieurs études expérimentales ont publié des résultats assez similaires, notamment lors de transfixions du patagium où seules des prises vaccinales alaires ont été observées (sans plus de précision sur leur aspect) (57,228). Afin d'obtenir davantage de lésions « classiques », la méthode d'inoculation a été ajustée lors de la seconde série d'infections. En choisissant un site d'inoculation permettant une inoculation cutanée plus stricte, plus aucune lésion « profonde » n'a été observée bien que la proportion de papules soit restée importante. Des inclusions virales n'ont aussi été observées que dans les lésions de la seconde série d'infections, validant le choix du site d'inoculation. Bien que le mode opératoire puisse être en cause, il se pourrait aussi que des lésions de ce type (papules) soient présentes lors d'infection naturelle mais ne soient pas détectées car trop petites ou non identifiées comme lésions varioliques. Malgré le suivi quotidien de chaque outarde captive, les oiseaux ne sont pas capturés tous les jours et il est réaliste que des lésions comme celle figurant sur la Figure 28 (cf. p135, images 1 et 2) puissent passer inaperçu. On conçoit aussi très bien qu'en élevage avicole, ce type de lésions ne soit jamais rapporté.

L'étude présentée ici a permis de préciser certaines caractéristiques épidémiologiques de la variole aviaire chez l'Outarde. Notamment, nous avons pu évaluer les temps d'incubation de la maladie qui sont en moyenne de 38 à 39 jours dans nos conditions expérimentales. Cette durée est plus élevée que la plupart de celles rapportées par les autres études, situées entre 3 et 10 jours post-inoculation (56,102,108,112,237). Seule une étude, qui est d'ailleurs une des rares à avoir comme nous utilisé la ponction comme voie d'inoculation, rapporte des temps d'incubation proches des nôtres, de 21 à 43 jours (98). Les durées d'évolution des lésions que nous

avons observées concordent davantage avec celles publiées (37 jours en moyenne dans notre cas). Ici encore, on peut se demander si la concentration de l'inoculum peut être une cause de ces temps d'incubation étonnamment longs. Mais comme nous l'avons discuté auparavant, lors d'infection par un insecte vecteur, les doses infectieuses sont probablement faibles. De plus nous obtenons les mêmes temps d'incubation avec deux inoculums de concentration différente. Lorsqu'on s'intéresse uniquement aux cinq lésions typiques de variole aviaire cutanée (masse croûteuse) qui ont été produites dans notre étude, le temps d'incubation moyen est de 25 jours, donc plus de deux fois supérieur aux temps retrouvés dans la littérature. On peut donc penser que ces temps d'incubation sont davantage liés à la souche et à l'espèce hôte et il semble raisonnable de considérer que de tels temps d'incubation puissent être retrouvés lors d'infection naturelle. Ceci a une importance double. Tout d'abord il faut désormais considérer cette donnée pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie. Ainsi l'analyse de facteurs de risques comme le contact avec un oiseau infecté ou malade doit prendre en considération la période et donc la position de chaque individu lorsqu'il a été contaminé et il faudra alors soustraire non pas 4 à 10 jours mais plus de 25 jours à la date de détection des lésions (et même probablement plus si l'on considère que les lésions ne sont détectées que lorsqu'elles atteignent une certaine taille). Ensuite, cette donnée a une importance capitale dans la gestion sanitaire des élevages, par exemple sur l'appréciation des risques ou le choix des durées de quarantaine. On peut ainsi rétrospectivement se demander si des outardes asiatiques importées aux NARC depuis ECWP et qui ont développé des lésions plus d'un mois après leur arrivée n'avaient pas, en fait, été infectées au Maroc.

La mise en place de ce modèle expérimental de variole aviaire a aussi été l'occasion d'évaluer de possibles effets de l'infection sur des paramètres physiologiques des oiseaux. Ainsi nous avons mis en évidence un impact négatif de l'infection sur les poids et les consommations, mais ce uniquement lors de la seconde série d'infections. Un tel effet était attendu, toutefois il est surprenant qu'il se manifeste alors qu'au mieux deux lésions peu débilitantes ont été observées par oiseau infecté. Ce ne sont donc probablement pas les lésions elles-mêmes mais l'infection et ses effets systémiques qui en sont la cause. L'absence d'effet détecté lors de la première série d'infections peut s'expliquer par la morbidité moindre que celle de la seconde série (67% - 78%). L'hypothèse d'un effet de l'infection plutôt que des lésions elle-même est renforcée par

le fait que des modifications de certains paramètres hématologiques ont été observées. Ainsi une basophilie et une diminution des alpha-2 globulines ont été observées chez les oiseaux infectés (relativement aux oiseaux contrôles). Le rôle de granulocytes basophiles n'est pas bien connu chez les oiseaux mais ils sembleraient jouer un rôle dans la réponse immunitaire précoce et un stress important augmenterait leur taux (238). Chez l'Outarde, une basophilie associée à une hétérophilie et une monocytose ont été observées lors d'inflammation chronique (239). L'absence d'effets apparents sur d'autres fractions leucocytaires peut être un artefact dû à la faible taille de l'échantillon étudié. Les alpha-2 globulines, qui sont essentiellement constituées d'alpha-2 macroglobulines, appartiennent aux protéines de la phase précoce de l'inflammation et, à ce titre, leur concentration augmente lors d'inflammation aigüe (240). Les causes pathologiques de leur diminution sont en revanche mal connues, les hépatites chroniques étant décrites comme une cause possible (233). Ces résultats demandent à être confirmés en répétant des infections expérimentales et en évaluant les paramètres hématologiques d'oiseaux naturellement infectés.

iii. Conclusion

Le modèle expérimental de variole aviaire mis en place lors de ce travail constitue une étape importante dans l'étude de la variole aviaire chez l'Outarde et apporte quelques données supplémentaires à la compréhension de son épidémiologie. Si certains résultats peuvent être considérés comme acquis (temps d'incubation, chronologie des lésions), d'autres soulèvent de nouvelles questions. La répétition sur de plus grands effectifs des infections réalisées ici doit donc être la priorité avant de pouvoir tester d'autres méthodes d'infection ou de comparer la virulence de différentes souches. La mise en place d'une étude sérologique serait également une étape clé pour valider différentes hypothèses et notamment pour évaluer les taux d'infections et les comparer aux taux d'expression clinique. L'appréciation de l'impact de la maladie, ou justement de l'infection sur certains paramètres zootechniques, est un enjeu important pour les élevages conservatoires, et les premiers résultats obtenus doivent désormais être confirmés.

Chapitre III : Discussion et perspectives

Cette thèse nous a donné l'opportunité d'explorer les enjeux constitués par les maladies infectieuses dans le contexte d'élevages conservatoires d'espèces menacées. Les différentes analyses réalisées dans cette thèse ont permis d'aborder la problématique particulière de la variole aviaire en l'étudiant sous différents aspects. La première partie de la thèse, consacrée à l'étude de l'épidémiologie de la maladie, nous a permis de quantifier son importance chez les outardes captives et nous a montré que, bien que durablement présente au sein des élevages étudiés, son incidence était modérée, avec des observations épisodiques de pics épizootiques. Nous avons conclu de ces résultats que la gestion sanitaire et les mesures de biosécurité appliquées dans ces élevages de grande taille permettaient de contenir l'infection, sans toute toutefois réussir à l'éradiquer.

Dans ce contexte où la prophylaxie est gérée à une échelle collective mais où la prise en charge médicale des oiseaux continue à être réalisée individuellement, nous avons montré dans la seconde partie de la thèse que la variole aviaire avait des effets très limités sur les performances de reproduction des oiseaux.

La troisième partie de la thèse s'est intéressée à l'agent infectieux lui-même afin d'apporter des éléments de réponses aux questions posées lors des études épidémiologiques. À cette occasion, une diversité étonnamment grande de souches virales responsables d'infections chez l'Outarde a été mise en évidence, et ce même à des échelles géographiques et temporelles réduites. Ces résultats, confirmés par l'étude de l'évolution des avipoxvirus, suggèrent que les introductions d'agents infectieux au sein des élevages sont importantes et multiples. Ceci nous a conduit à faire différentes hypothèses quant à la spécificité d'hôtes des avipoxvirus et aux enjeux sanitaires pour les élevages conservatoires.

Enfin, dans le but de confirmer les analyses réalisées à partir des données collectées sur le terrain et d'étoffer les connaissances sur la maladie chez l'Outarde, nous avons développé dans la quatrième partie de la thèse un modèle expérimental de variole aviaire. Celui-ci nous a permis de préciser des éléments importants de l'épidémiologie des avipoxvirus et s'est montré prometteur pour la réalisation d'études ultérieures. Ces différentes analyses ont soulevé de nouvelles questions et permis de mieux définir les orientations et les perspectives d'études à poursuivre sur les avipoxvirus, la variole

aviaire et les enjeux sanitaires pour les programmes de conservation. À ce titre, l'approche multi-facettes que nous avons utilisée pour étudier les infections par les avipoxvirus chez l'Outarde s'est révélée pertinente pour aborder un problème infectieux dans sa globalité.

A. Taxonomie des avipoxvirus

Les analyses que nous avons réalisées sur la phylogénie et l'évolution des avipoxvirus infectant les outardes ont permis d'étoffer de manière conséquente le nombre de données disponibles et de mieux préciser la diversité et la complexité des virus du genre *Avipoxvirus*. Alors que la division du genre en trois clades (virus FWPV-like virus, virus CNPV-like virus et virus PSPV-like) fait consensus parmi les auteurs (1–3), la distinction entre sous-clades est moins claire et régulièrement, avec la description de nouvelles souches virales, de nouveaux sous-clades sont décrits, notamment parmi les virus FWPV-like (2). Nos résultats ont montré l'existence de nouveaux sous-clades, y compris parmi les virus CNPV-like (sous-clade B4). *A contrario*, l'augmentation du nombre de souches disponibles remet parfois en question la distinction de certains sous-clades et c'est d'ailleurs le constat que nous avons fait pour le sous-clade B1 (clade des virus CNPV-like) puisque la diversité au sein de ce sous-clade, une fois les souches d'outardes incluses, s'est révélée plus importante qu'entre certains sous-clades des virus FWPV-like. La justification de ces choix taxonomiques reste cependant délicate et aucun critère objectif n'a jamais été proposé pour définir un clade ou sous-clade chez les poxvirus. D'ailleurs, la notion de clade (et *a fortiori* de sous-clade) viral n'est pas définie par l'ICTV (241) qui considère ce niveau comme inférieur à celui d'espèce (242), cette dernière étant définie comme « une classe polythétique de virus constituant une lignée réplicative occupant une niche écologique particulière ». L'ICTV rapporte l'existence de dix espèces au sein du genre *Avipoxvirus*, mais la plupart de ces espèces ont été décrites dans les années 1970-1980 (37), bien avant l'utilisation du typage moléculaire. Les divers éléments évoqués précédemment ne sont pas suffisants pour rejeter définitivement la définition de ces espèces, mais suggèrent une révision taxonomique des avipoxvirus.

Jusqu'alors, la phylogénie des avipoxvirus a été fondée sur le locus P4b, qui cible un gène codant pour une protéine du core viral jouant un rôle dans la multiplication virale. Ce gène est donc peu soumis à une pression de sélection. Dans notre étude, nous

avons justement voulu comparer la phylogénie et les taux d'évolution obtenus pour le locus P4b avec ceux obtenus avec un gène (*FPV140*/*CNPVFV186)* codant pour une protéine immunodominante et donc soumise à une pression de sélection certainement plus importante. Cette comparaison n'était jusqu'alors pas possible, car trop peu de séquences étaient disponibles pour ce dernier gène. Les résultats montrent des taux d'évolution plus rapides pour *FPV140*/CNPV186 et une redistribution de certains virus entre sous-clades ainsi qu'une distinction plus nette entre groupes de virus, les distances intra-groupes étant bien moindres que les distances intergroupes. De même, certains groupes de virus sont plus clairement associés à certaines espèces hôtes et dans le cas des séquences d'outardes, les clusters sont clairement apparus en fonction de l'origine géographique des souches. L'utilisation de régions variables du génome, comme celles incluant des gènes codant pour des facteurs de virulence, pour étudier la phylogénie et l'évolution des poxvirus a été critiquée par certains auteurs (217,218,243). Pourtant, dans notre cas, elle permet d'apporter une crédibilité biologique aux résultats et il semble intéressant de cibler des gènes de virulence quand l'objectif est de faire le lien entre phylogénie et épidémiologie. A l'inverse, l'utilisation de séquences très conservées offre l'avantage de pouvoir être appliquée à tous les avipoxvirus et l'utilisation du locus P4b doit donc rester la méthode de choix pour un premier positionnement phylogénique d'un nouveau virus.

Notre étude a cependant des limites. En effet, même s'il est clair que l'étude de loci biologiquement significatifs a un intérêt, l'utilisation de séquences courtes, couvrant moins de 10% du génome, reste insuffisante pour expliquer les différences biologiques et de virulence entre certains avipoxvirus. Ce n'est pas parce que des gènes sont identiques entre deux virus que ceux-ci sont identiques ou même que leur virulence est la même. Différents exemples illustrent ce constat, l'un des plus significatifs est la très grande proximité entres les séquences de la souche vaccinale utilisée dans les élevages conservatoires étudiés et celles d'un grand nombre de virus isolés à partir de lésions d'outardes : certaines séquences en acides aminés sont identiques pour le locus P4b et ne diffèrent que par un acide aminé pour le gène *FPV140*/*CNPV186*. Cette proximité n'est pas cohérente avec l'insuffisance apparente de protection conférée par la souche vaccinale. Une hypothèse pourrait être que la souche vaccinale, insuffisamment atténuée, ait recombiné avec une souche sauvage, conduisant à l'apparition d'un mutant virulent, cela ayant déjà été montré chez les leporipoxvirus (52). Un autre exemple

observé chez les outardes est l'identité parfaite pour les deux loci étudiés entre la souche responsable d'une épizootie de formes diphtériques sévères au Qatar et des souches responsables de formes cutanées au Maroc et en Ouzbékistan. Ces souches sont également très proches de la souche vaccinale. La description depuis quelques années d'une épizootie de variole aviaire en Angleterre ne concernant que les mésanges charbonnières renforce ce constat (91). Seules les séquences du locus P4b ont été publiées et elles sont identiques à celles d'un grand nombre de souches isolées sur presque tous les continents depuis plus d'un siècle. Or cette épizootie n'étant décrite que depuis quelques années, il est clair que le virus impliqué, qui pourrait probablement être qualifié d'espèce, est différent des souches précédemment identifiées (certaines ayant d'ailleurs été isolées en 1972 sur des mésanges charbonnières sans qu'elles aient été associées à une augmentation de prévalence de la maladie).

L'étude des génomes complets semble par conséquent indispensable à la compréhension de la phylogénie et de la pathogénicité des avipoxvirus. Ainsi la comparaison des génomes d'un virus FWPV-like atténué (FP9) et de son parent sauvage (HP1) a permis d'identifier 50 mutations sur 46 ORF, ce qui au regard du nombre total d'ORF (244 à 260) est relativement faible (12). Récemment, la publication de deux nouveaux génomes de virus FWPV-like a doublé le nombre de génomes disponibles dans ce clade et a montré que la diversité des avipoxvirus avait probablement été sous-estimée (11). Au sein des virus CNPV-like, seul un génome est publié, ce qui est bien insuffisant pour comprendre les particularités de ce clade qui semble plus largement distribué et plus varié que les autres clades. Une perspective indispensable à l'avancée des connaissances serait alors l'obtention de davantage de génomes pour chaque sous-clades afin d'identifier les gènes codant pour des facteurs de virulence et d'adaptation des virus à leurs hôtes. Ce travail, qui n'a pas été présenté ici, a été initié dans le cadre de cette thèse et devra être poursuivi ultérieurement.

B. Écologie des avipoxvirus

Le travail réalisé dans cette thèse sur la diversité des avipoxvirus est original et sans précédent par le nombre d'échantillons traités et par le cadre de l'étude (élevages conservatoires, deux espèces, cinq pays). Le seul travail de grande ampleur qui a déjà été réalisé sur les avipoxvirus (2) a apporté des preuves de la diversité et de la complexité existant au sein du genre *Avipoxvirus* en étudiant de nombreuses souches d'origines

géographiques très variées et isolées dans différents contextes (domestique, captif, sauvage) et sur une grande variété d'espèces hôtes. *A contrario*, les études qui ont porté sur des zones géographiques restreintes (87) ou sur une seule espèce (206) n'avaient, jusqu'à maintenant, mis en évidence qu'un nombre restreint de souches. D'une manière générale, les observations réalisées au sein des élevages d'outardes n'indiquent pas que ces espèces soient particulièrement sensibles aux agents pathogènes aviaires, ni que les expressions cliniques puissent être différentes de celles rapportées sur d'autres espèces aviaires, en tout cas dans un cadre zootechnique contrôlé. Les résultats des infections expérimentales réalisées durant la thèse vont d'ailleurs dans ce sens. Par conséquent, il est peu probable que la diversité mise en évidence dans cette thèse soit due à une sensibilité particulière des outardes aux avipoxvirus. De même, l'environnement immédiat des projets, à l'exception peut-être de celui des Émirats Arabes Unis, est relativement pauvre en avifaune sauvage en comparaison avec des environnements étudiés par d'autres auteurs, comme les forêts hawaïennes (98), et les densités humaines et en élevages avicoles y sont faibles. Aussi, la diversité des avipoxvirus détectée chez les outardes ne semble pas non plus être due à une diversité exceptionnelle dans l'environnement immédiat des élevages. Pourtant, les résultats des analyses épidémiologiques comme ceux portant sur la phylogénie et l'évolution des avipoxvirus nous ont montré que cette grande diversité s'expliquait non pas par une évolution des virus au sein des élevages mais par des introductions répétées de différents virus.

Ainsi, nous pouvons émettre avec une certaine confiance l'hypothèse que les élevages conservatoires d'outardes permettent de révéler une diversité par ailleurs répandue mais jusqu'alors non mise en évidence. Le suivi individuel de plusieurs milliers d'oiseaux permet de collecter un nombre conséquent d'échantillons et de données et offre l'opportunité de mener des études de grandes ampleurs sur un nombre très restreint d'espèces et dans un contexte homogène. Cette approche permet de sortir du cadre du *case report* habituellement rapporté sur la faune sauvage ou de la description d'épizooties ponctuelles en élevage avicole. Dans ce dernier cas de figure, le nombre d'échantillons biologiques analysés (pour les avipoxvirus) est souvent très restreint et on peut supposer que la faible diversité virale détectée n'est qu'un biais d'échantillonnage, même si dans ces contextes de gestion collective, il est possible qu'une souche dominante puisse rapidement se propager et masquer ainsi la

coexistence de souches « mineures ». Ainsi, les élevages d'outardes offrent une opportunité unique d'étudier l'épidémiologie moléculaire d'agents pathogènes aviaires. Des résultats préliminaires montrent que les observations faites pour les avipoxvirus pourraient être extrapolées à d'autres agents pathogènes non viraux, comme par exemple *Salmonella enterica* pour laquelle au moins six sérovars différents ont été isolés sur des outardes aux Émirats Arabes Unis (NARC et SKHBC-AD) entre janvier et juin 2014, sans pour autant qu'ils aient été associés à une morbidité et une mortalité importante (244).

La coexistence de nombreuses souches virales dans un environnement donné semble donc un cas de figure plus fréquent que ce que de précédentes études laissaient présager. Cette conclusion soulève la question des interactions que peuvent avoir ces souches entre elles. L'étude de l'évolution des avipoxvirus n'a pas permis de mettre en évidence d'évolution des souches au sein des élevages d'outardes à l'échelle de chaque séquence étudiée (1 kb maximum). En revanche, en comparant les phylogénies obtenues pour chaque séquence étudiée, nous avons mis en évidence des évènements de recombinaisons au moins pour une souche. Or, d'assez nombreuses études ont montré que les recombinaisons étaient un processus évolutif important des poxvirus (35,36,52,245). Considérant la coexistence de nombreuses souches d'avipoxvirus dans les élevages d'outardes, on conçoit alors que ce processus puisse aussi être important chez les avipoxvirus. Toutefois, cette hypothèse ne pourra être validée que par l'étude des génomes complets, comme nous l'avons précédemment évoqué.

La spécificité d'espèces des avipoxvirus avait déjà été remise en question par certains auteurs (1,47) et les résultats des analyses épidémiologiques et moléculaires de cette thèse apportent des arguments forts dans ce sens. Pour la première fois, nous avons montré qu'une espèce d'oiseau pouvait aussi bien être infectée par des virus CNPV-like que par des virus FWPV-like et que ces deux groupes de virus pouvaient être responsables de formes cliniques identiques et d'épizooties. Nous avons discuté du fait que la diversité des avipoxvirus infectant une espèce hôte ait pu être sous-estimée par le passé, ceci ayant pu être une raison suffisante pour affirmer une spécificité d'hôte stricte des avipoxvirus. Cependant, même si quelques études ont montré que sur le terrain et expérimentalement cette spécificité existait en partie (38,48), nos résultats démontrent que le contexte épidémiologique a un rôle majeur dans la capacité d'un avipoxvirus à infecter une espèce. Nous pouvons donc nuancer la définition de la spécificité d'hôte en

postulant que chaque avipoxvirus est mieux adapté à certaines espèces hôtes, mais qu'il possède malgré tout la capacité à infecter une large diversité d'espèces si les conditions environnementales lui sont propices. Ces conditions peuvent être classées en deux catégories : (i) facteurs affectant le statut immunitaire de l'hôte, (ii) conditions permettant à plusieurs espèces hôtes d'entrer en contact.

Le stress chronique est une cause reconnue d'immunosuppression (246). En captivité, les conditions zootechniques (surdensité, ambiance mal contrôlée…) peuvent être des facteurs de stress (247) qui affectent le statut immunitaire des oiseaux et les rendent plus sensibles aux infections et plus susceptibles d'exprimer cliniquement une infection par un agent normalement avirulent ou peu virulent. Lorsque ce sont des espèces sauvages qui sont maintenues en captivité, la captivité elle-même est un facteur de stress. Une corrélation entre statut immunitaire et sensibilité aux avipoxvirus été mise en évidence dans des populations sauvages de passereaux aux Galápagos (248) et il a été montré que ces deux paramètres étaient eux-mêmes corrélés aux variations anthropiques de l'environnement (92). À ce titre, l'urbanisation a aussi été identifiée comme une possible cause de sensibilisation aux infections par les avipoxvirus (93). Les coïnfections par d'autres agents infectieux, en modulant la réponse immunitaire de l'hôte ou la virulence des autres agents infectieux (249), peuvent faciliter les infections virales. Les coïnfections entre hémoparasites et avipoxvirus ont été étudiées chez certaines espèces de passereaux et des corrélations positives de prévalences entre agents infectieux ont été mises en évidence (74,80,81). Chez les outardes des coïnfections ont très souvent été rapportées lors de variole aviaire (166,170,171) et les infections expérimentales menées durant cette thèse ont montré que des coïnfections bactériennes étaient souvent observées dans les lésions analysées. Par ailleurs, la surveillance épidémiologique réalisée à ECWP a montré un taux relativement important d'infection par des espèces du genre *Haemoproteus*, sans pour l'instant que des manifestations cliniques aient été objectivées et que ces infections aient été corrélées aux cas de variole aviaire.

La mise en contact ou le rapprochement de deux espèces hôtes est la seconde situation qui peut favoriser le franchissement de la barrière d'espèce par les avipoxvirus. À part le cas de figure du système proie-prédateur qui a été avancé pour expliquer que certaines espèces puissent partager des souches virales communes (2), ce rapprochement d'espèces est toujours lié à une intervention humaine. Il peut s'agir du

regroupement en captivité de plusieurs espèces sauvages, cette situation ayant déjà été décrite dans le cas d'une épizootie de variole aviaire (87), de modifications anthropiques (urbanisation, création de points de nourrissage artificiels) favorisant le regroupement d'espèces sauvages (93) ou, comme c'est le cas pour les élevages d'outardes, du rapprochement d'espèces captives et sauvages. A l'état sauvage, les outardes vivent dans des milieux semi-désertiques où l'avifaune sauvage, tout comme les insectes vecteurs, sont peu abondants. On peut donc supposer que les contacts inter-espèces directs et indirects sont très limités. Les élevages, en aménageant des zones d'irrigation, des cultures de luzerne pour nourrir les outardes, des aires récréatives (jardins arborés, pelouses) pour le personnel, créent des conditions attractives pour l'avifaune sauvage et les insectes vecteurs qui s'y concentrent, et augmentent ainsi artificiellement la proximité entre oiseaux captifs et sauvages. Des études préliminaires ont d'ailleurs confirmé que diverses espèces de moustiques étaient présentes dans les élevages, certaines étant relativement abondantes et ce, durant une grande partie de l'année. L'étude des populations d'insectes hématophages, associée à une étude de séroprévalence sur l'avifaune sauvage, devraient être mises en place afin de mieux identifier les réservoirs et les vecteurs en cause.

C. Apport à la gestion sanitaire d'élevages conservatoires

L'ensemble des résultats de cette thèse a permis d'apporter des éléments fondamentaux à la compréhension de l'épidémiologie des avipoxvirus et divers enseignements peuvent en être tirés pour améliorer les stratégies de prophylaxie sanitaire et médicale et d'épidémiosurveillance vis-à-vis de la variole aviaire ; plus généralement, des recommandations peuvent être émises pour l'évaluation et la gestion des risques infectieux dans les programmes de conservation d'espèces menacées.

1. Prophylaxie sanitaire

La stratégie sanitaire et médicale appliquée dans les élevages conservatoires d'outardes consiste à définir des unités épidémiologiques dans les élevages et à les isoler par un certain nombre de barrières sanitaires. L'élevage dans sa globalité est à son tour isolé de « l'extérieur » par des barrières sanitaires. Ces barrières visent essentiellement à maîtriser les flux de personnes, matériels et oiseaux captifs. Jusqu'à maintenant et bien qu'il y ait une prise de conscience du risque potentiel représenté par l'avifaune sauvage et les insectes vecteurs, celui-ci n'avait pas été clairement objectivé, ni totalement pris

en considération. Nos résultats montrent que, dans le cas de la variole aviaire, les introductions de nouveaux virus sont très fréquentes et que l'avifaune sauvage et les insectes en sont certainement grandement responsables. Nous avons aussi montré que la propagation des virus au sein des élevages était relativement faible et que la prophylaxie sanitaire et la prise en charge médicale individuelle, actuellement en place, limitaient les impacts de la maladie sur les performances des oiseaux. Les suivis sanitaires des élevages montrent que ces interprétations peuvent à priori être extrapolées à d'autres agents infectieux (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium* spp.). Ainsi il semble judicieux de redistribuer les efforts de biosécurité en faveur de l'interface élevage / extérieur. Il ne faut pas négliger les barrières entre unités épidémiologiques mais le contexte des élevages (faibles densités, oiseaux élevés seuls ou en petits groupes, élevages extérieurs ou en petits bâtiments) est déjà par lui-même très peu propice à une dissémination rapide d'agents pathogènes entre oiseaux. La gestion de ces barrières internes pourrait donc être ajustée en définissant et contrôlant mieux les flux, tout en réduisant les mesures de nettoyage et désinfection. Le renforcement des barrières à l'interface élevage / extérieur doit être fait avec l'objectif de limiter les densités d'oiseaux sauvages, réduire les populations d'insectes vecteurs et empêcher l'accès des insectes et oiseaux sauvages aux structures d'élevages, tout en maintenant les exigences (élevages extérieurs, préparation au relâcher, production de nourriture fraîche) et l'éthique des projets de conservation. Ainsi, des désinsectisations régulières, l'utilisation de filets imprégnés d'insecticides, la couverture des points d'eau, l'entreposage systématique des déchets organiques dans des containers fermés et leur élimination rapide, la production de luzerne en serres, l'utilisation de grilles ou filets pour empêcher l'accès aux sites de nidification potentiels, l'effarouchement des oiseaux sauvages sont autant de mesures qui peuvent être appliquées.

2. Prophylaxie médicale

Nous avons vu que la spécificité d'espèces des avipoxvirus était une notion très relative et que le contexte épidémiologique avait un rôle majeur sur la capacité d'un virus à infecter une espèce en particulier. Même si des ajustements de la prophylaxie sanitaire sont faits dans les élevages, nous savons désormais qu'un grand nombre d'avipoxvirus peuvent infecter l'Outarde. Or les résultats ont montré que la vaccination actuelle était peu efficace voire inefficace. Nous ne savons pas encore si ces échecs sont

dus systématiquement à une absence de protection croisée ou également à un défaut d'immunité vaccinale, voire à une virulence de la souche vaccinale. Quoiqu'il en soit on peut s'interroger sur l'intérêt de la vaccination telle qu'actuellement appliquée. Le développement d'un test sérologique qui permettrait d'évaluer la mise en place de l'immunité vaccinale et des essais de protections croisées entre différentes souches et vaccins sont les perspectives à envisager pour répondre à ces questions.

En attendant les résultats de ces futures études, la stratégie à adopter pour le moment peut être la suivante : (i) test d'une souche vaccinale fowlpox virus (innocuité et immunisation par visualisation d'une prise vaccinale alaire), (ii) arrêt de la vaccination systématique avec la souche canarypox virus, (iii) renforcement des mesures de surveillance (cf. *infra*) et (iv) vaccination d'urgence et adaptée à la souche en cas d'augmentation anormale de l'incidence. Cette stratégie ne serait applicable que dans les projets où le risque est considéré comme modéré, ces choix se justifiant si on considère que la prophylaxie sanitaire et la gestion médicale en place sont suffisantes pour maîtriser la propagation de l'infection.

3. Prise en charge médicale

La prise en charge médicale individuelle des oiseaux, même si elle est lourde logistiquement et financièrement, semble indispensable au bon contrôle de la variole aviaire et d'autres maladies infectieuses. Elle permet d'éviter que ces maladies n'aient un impact sur les performances des oiseaux. Toutefois, des précautions doivent être prises pour éviter que les manipulations répétées d'oiseaux infectés et potentiellement excréteurs ne deviennent un risque de transmission de l'agent infectieux. Ce risque semble faible pour les avipoxvirus, même s'il faudrait réellement le quantifier en réalisant une analyse des facteurs de risques s'intéressant aux modes de transmission du virus. Pour d'autres agents infectieux il est en revanche plus important et les mesures sanitaires doivent donc être particulièrement bien définies dans ce cadre. La connaissance de l'épidémiologie des agents infectieux (mode de transmission, temps d'incubation, portage asymptomatique…) est indispensable pour bien définir ces mesures. Par exemple, les temps d'incubation mis en évidence lors des infections expérimentales réalisées dans notre étude ont montré qu'en cas de quarantaine, un isolement des oiseaux pendant deux mois serait le minimum requis (pour la variole aviaire).

4. Déplacements d'oiseaux

Ces éléments permettent aussi de préciser les risques associés aux translocations d'oiseaux d'un projet à un autre ou vers un site de relâcher. En s'assurant que les oiseaux ne sont pas susceptibles de développer la maladie et qu'ils ne sont pas porteurs du virus, il est possible d'éviter l'introduction de souches « exotiques ». L'étude du statut immunitaire des oiseaux apporteraient à ce titre des informations précieuses et complémentaires à celles obtenues jusqu'ici.

De même la connaissance de la diversité virale naturelle d'une zone permet d'évaluer le risque qu'il peut y avoir à y introduire une espèce hôte naïve. Nous avons vu que c'est probablement ce cas de figure qui avait été à l'origine des épizooties au Maroc chez les outardes asiatiques mais également chez les outardes africaines, les premières ayant servi d'amplificateur et de réservoir de l'infection pour les secondes à cause de leur plus grande sensibilité aux souches locales.

Ces deux risques (introduction de souches « exotiques » ou introduction d'espèces naïves) nous conduisent à recommander la plus grande prudence quant aux déplacements d'oiseaux, particulièrement pour l'élevage d'espèces dans des zones où elles ne sont pas naturellement présentes.

5. Évaluation des risques et surveillance épidémiologique

Le dernier enseignement majeur qui doit être tiré de l'ensemble des résultats présentés est l'importance d'une surveillance épidémiologique et d'une évaluation des risques appropriées. La prise en charge individuelle des oiseaux offre l'opportunité unique de détecter précocement tout évènement anormal et de pouvoir l'explorer efficacement. Cette surveillance est la seule existante pour la variole aviaire et elle est fondée uniquement sur la détection de signes cliniques chez les oiseaux captifs. Deux axes d'améliorations se dégagent alors : (i) une évaluation des risques fondée sur une surveillance environnementale, (ii) une surveillance moléculaire des souches circulant autour et dans les élevages.

Dans le cas de la variole aviaire, l'évaluation des risques va concerner l'avifaune sauvage, les élevages d'oiseaux et les oiseaux domestiques environnants et des outardes sentinelles (non vaccinées). L'utilisation d'outardes sentinelles existe depuis plusieurs années à ECWP et au NARC mais elle n'était jusqu'alors pas adaptée à cet objectif (échantillonnage trop faible, positionnement des oiseaux mal défini…). L'évaluation des

risques doit s'appuyer sur l'évaluation de la prévalence de la variole aviaire sur les oiseaux sauvages et domestiques (détection de lésions) et la recherche d'une séroconversion vis-à-vis des avipoxvirus chez les oiseaux sauvages, domestiques et sentinelles. La surveillance moléculaire doit s'appuyer sur un typage régulier des souches virales isolées en utilisant le locus P4b et sur un travail de fond d'étude des génomes afin de surveiller de possibles recombinaisons et l'émergence de souches particulièrement virulentes.

D. Conclusion

Cette thèse qui s'inscrit dans le cadre général de l'acquisition de connaissances sur la biologie de l'Outarde en captivité a permis d'aborder un problème infectieux concret concernant les élevages conservatoires d'espèces menacées. Nous avons montré l'intérêt et la nécessité d'aborder ce type de problématique sous différents aspects : étude du contexte épidémiologique, étude de l'agent infectieux et étude de l'interaction hôte-agent pathogène ; ainsi que l'opportunité unique qu'offraient ces élevages conservatoires pour étudier l'épidémiologie moléculaire d'agents pathogènes aviaires. Sans avoir toutefois répondu à l'ensemble des questions posées par la variole aviaire chez l'Outarde, nous avons montré que les enjeux infectieux pour les projets de conservation sont complexes notamment par l'interaction obligatoire qui existe entre environnement et élevage. Des réponses et des applications concrètes ont été apportées et la nécessité a été soulignée de poursuivre différentes thématiques de recherche : facteurs de risque et modes de transmission des avipoxvirus, études des génomes complets, immunité et protections croisées.

Bibliographie

1. Jarmin S, Manvell R, Gough RE, Laidlaw SM, Skinner MA. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. J Gen Virol. 2006;87:2191–201.
2. Gyuranecz M, Foster JT, Dan A, Ip HS, Egstad KF, Parker PG, et al. Worldwide phylogenetic relationship of avian poxviruses. J Virol. 2013;87(9):4938–51.
3. Lüschow D, Hoffmann T, Hafez H. Differentiation of Avian Poxvirus Strains on the Basis of Nucleotide Sequences of 4b Gene Fragment. Avian Dis. 2004;48(3):453–62.
4. Moss B. *Poxviridae*. Fields virology. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. p. 2129–59.
5. Condit RC, Moussatche N, Traktman P. In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. Adv Virus Res. 2006;66:31–124.
6. Boulanger D, Smith T, Skinner MA. Morphogenesis and release of fowlpox virus. J Gen Virol. 2000;81(Pt 3):675–87.
7. Mockett APA, Southee DJ, Tomley FM, Deuter A. Fowlpox virus: its structural proteins and immunogens and the detection of viral-specific antibodies by ELISA. Avian Pathol. 1987;16(3):493–504.
8. Boulanger D, Green P, Jones B, Henriquet G, Hunt LG, Laidlaw SM, et al. Identification and characterization of three immunodominant structural proteins of fowlpox virus. J Virol. 2002;76(19):9844–55.
9. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. The Genome of Fowlpox Virus. J Virol. 2000;74(8):3815–31.
10. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. The Genome of Canarypox Virus. J Virol. 2004;78(1):353–66.
11. Offerman K, Carulei O, van der Walt AP, Douglass N, Williamson A-L. The complete genome sequences of poxviruses isolated from a penguin and a pigeon in South Africa and comparison to other sequenced avipoxviruses. BMC Genomics. 2014;15(1):463.
12. Laidlaw SM, Skinner MA. Comparison of the genome sequence of FP9, an attenuated, tissue culture-adapted European strain of Fowlpox virus, with those of virulent American and European viruses. J Gen Virol. 2004;85:305–22.
13. Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. J Virol. 2003 Jul 1;77(13):7590–600.
14. Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. Poxviruses: past, present and future. Virus Res. 2006 Apr;117(1):105–18.
15. Gubser C, Hué S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. J Gen Virol. 2004;85:105–17.
16. Hertig C, Coupar BEH, Gould AR, Boyle DB. Field and Vaccine Strains of Fowlpox Virus Carry Integrated Sequences from the Avian Retrovirus, Reticuloendotheliosis Virus. Virology. 1997 Sep;235(2):367–76.
17. Singh P, Schnitzlein WM, Tripathy DN. Reticuloendotheliosis Virus Sequences within the Genomes of Field Strains of Fowlpox Virus Display Variability. J Virol. 2003;77(10):5855–62.

18. Kim TJ, Tripathy DN. Reticuloendotheliosis virus integration in the fowl poxvirus genome: not a recent event. Avian Dis. 2001;45(3):663–9.
19. Wang J, Meers J, Spradbrowb PB, Robinson WF. Evaluation of immune effects of fowlpox vaccine strains and field isolates. Vet Microbiol. 2006;116:106–19.
20. Tripathy DN, Reed WM. Pox. Diseases of poultry. 13th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons; 2013. p. 333–50.
21. Weli SC, Tryland M. Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. Virol J. 2011;8(49):1–15.
22. Gelenczei EF, Lasher HN. Comparative studies of cell-culture-propagated avian pox viruses in chickens and turkeys. Avian Dis. 1968 Feb;12(1):142–50.
23. Krone O, Essbauer S, Wibbelt G, Isa G, Rudolph M, Gough RE. Avipoxvirus infection in peregrine falcons (*Falco peregrinus*) from a reintroduction programme in Germany. Vet Rec. 2004;154:110–3.
24. Tripathy DN, Schnitzlein WM, Morris PJ, Janssen DL, Zuba JK, Massey G, et al. Characterization of poxviruses from forest birds in Hawaii. J Wildl Dis. 2000;36(2):225–30.
25. Kim T, Schnitzlein WM, McAloose D, Pessier AP, Tripathy DN. Characterization of an avianpox virus isolated from an Andean condor (*Vultur gryphus*). Vet Microbiol. 2003;96:237–46.
26. Weli SC, Nilssen Ø, Traavik T. Avipoxvirus multiplication in a mammalian cell line. Virus Res. 2005 Apr;109(1):39–49.
27. Stannard LM, Marais D, Kow D, Dumbell KR. Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin. J Gen Virol. 1998;79:1637–46.
28. Graham BS, Crowe, James E., Ledgerwood JE. Immunization Against Viral Diseases. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. p. 374–413.
29. Boyle DB. Genus Avipoxvirus. In: Andrew A. Mercer AS a. OW, editor. Poxviruses. Basel/Switzerland; 2007. p. 217–51.
30. Bratke KA, McLysaght A, Rothenburg S. A survey of host range genes in poxvirus genomes. Infect Genet Evol. 2013 Mar;14:406–25.
31. Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. Infect Genet Evol. 2014 Jan;21:15–40.
32. Babkin IV, Shchelkunov SN. Time scale of Poxvirus evolution. Mol Biol. 2006 Jan;40(1):16–9.
33. Kerr PJ, Ghedin E, DePasse JV, Fitch A, Cattadori IM, Hudson PJ, et al. Evolutionary History and Attenuation of Myxoma Virus on Two Continents. Levin BR, editor. PLoS Pathog. 2012 Oct 4;8(10):e1002950.
34. Firth C, Kitchen A, Shapiro B, Suchard MA, Holmes EC, Rambaut A. Using Time-Structured Data to Estimate Evolutionary Rates of Double-Stranded DNA Viruses. Mol Biol Evol. 2010 Sep 1;27(9):2038–51.
35. Hendrickson RC, Wang C, Hatcher EL, Lefkowitz EJ. Orthopoxvirus Genome Evolution: The Role of Gene Loss. Viruses. 2010 Sep 15;2(9):1933–67.
36. Hatcher EL, Hendrickson RC, Lefkowitz EJ. Identification of Nucleotide-Level Changes Impacting Gene Content and Genome Evolution in Orthopoxviruses. J Virol. 2014 Dec 1;88(23):13651–68.

37. Virus Taxonomy: 2013 Release [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses. [cited 2014 Dec 2]. Available from: http://ictvonline.org/
38. Kirmse P. Host Specificity and Pathogenicity of Pox Viruses from Wild Birds. Bull Wildl Dis Assoc. 1969;5:376–86.
39. Boosinger TR, Winterfield RW, Feldman DS, Dhillon AS. Psittacine pox virus: virus isolation and identification, transmission, and cross-challenge studies in parrots and chickens. Avian Dis. 1982;26(2):437–44.
40. Annuar BO, Mackenzie JS, Lalor PA. Isolation and Characterization of Avipoxvirus from Wild Birds in Western Australia. Arch Virol. 1983;76:217–29.
41. Binns MM, Boursnell MEG, Tomley FM, Campbell J. Analysis of the fowlpoxvirus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. Virology. 1989 May;170(1):288–91.
42. Lee LH, Lee KH. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. J Virol Methods. 1997;63:113–9.
43. Weli SC, Traavik T, Tryland M, Coucheron DH, Nilssen O. Analysis and comparison of the 4b core protein gene of avipoxviruses from wild birds: Evidence for interspecies spatial phylogenetic variation. Arch Virol. 2004;149:2035–46.
44. GenBank [Internet]. National Center for Biotechnology Information. [cited 2014 Nov 28]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
45. Offerman K, Carulei O, Gous TA, Douglass N, Williamson A-L. Phylogenetic and histological variation in avipoxviruses isolated in South Africa. J Gen Virol. 2013 Oct 1;94(Pt_10):2338–51.
46. Abdallah FM, Hassanin O. Detection and molecular characterization of avipoxviruses isolated from different avian species in Egypt. Virus Genes. 2013 Feb;46(1):63–70.
47. Manarolla G, Pisoni G, Sironi G, Rampin T. Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. Vet Microbiol. 2010;140:1–8.
48. Mondal SP, Lucio-Martinez B, Buckles EL. Molecular Characterization of a Poxvirus Isolated from an American Flamingo (*Phoeniconais ruber ruber*). Avian Dis. 2008;52(3):520–5.
49. Thiel T, Whiteman NK, Tirape A, Baquero MI, Cedeno V, Walsh T, et al. Characterization of Canarypox-like Viruses Infecting Endemic Birds in the Galapagos Islands. J Wildl Dis. 2005;41(2):342–53.
50. Upton C, Macen JL, Maranchuk RA, Delange AM, McFadden G. Tumorigenic poxviruses: Fine analysis of the recombination junctions in malignant rabbit fibroma virus, a recombinant between shope fibroma virus and myxoma virus. Virology. 1988 Sep;166(1):229–39.
51. Gershon PD, Paul Kitching R, Hammond JM, Black DN. Poxvirus Genetic Recombination during Natural Virus Transmission. J Gen Virol. 1989 Feb 1;70(2):485–9.
52. Camus-Bouclainville C, Gretillat M, Py R, Gelfi J, Guérin JL, Bertagnoli S. Genome Sequence of SG33 Strain and Recombination between Wild-Type and Vaccine Myxoma Viruses. Emerg Infect Dis. 2011;17(4):633–8.
53. Fatunmbi OO, Reed WM. Evaluation of a Commercial Quail Pox Vaccine (Bio-Pox Q) for the Control of "Variant" Fowl Poxvirus Infections. Avian Dis. 1996;40(4):792–7.

54. Fatunmbi OO, Reed WM. Evaluation of a commercial modified live virus fowl pox vaccine for the control of "variant" fowl poxvirus infections. Avian Dis. 1996;40(3):582–7.
55. Zhao K, He W, Xie S, Song D, Lu H, Pan W, et al. Highly Pathogenic Fowlpox Virus in Cutaneously Infected Chickens, China. Emerg Infect Dis. 2014 Jul;20(7):1208–10.
56. Singh P, Kim JH, Tripathy DN. Re-emerging fowlpox: Evaluation of isolates from vaccinated flocks. Avian Pathol. 2000;29(5):449–55.
57. Kim T, Tripathy DN. Evaluation of Pathogenicity of Avian Poxvirus Isolates from Endangered Hawaiian Wild Birds in Chickens. Avian Dis. 2006;50:288–91.
58. Weli SC, Okeke MI, Tryland M, Nilssen O, Traavik T. Characterization of avipoxviruses from wild birds in Norway. Can J Vet Res. 2004;68:140–5.
59. Giddens WE, Swango LJ, Henderson JD, Lewis RA, Farner DS, Carlos A, et al. Canary pox in sparrows and canaries (Fringillidae) and in weavers (Ploceidae). Pathology and host specificity of the virus. Vet Pathol. 1971;8(3):260–80.
60. Perkus ME, Goebel SJ, Davis SW, Johnson GP, Limbach K, Norton EK, et al. Vaccinia virus host range genes. Virology. 1990 Nov;179(1):276–86.
61. Sonnberg S, Fleming SB, Mercer AA. Phylogenetic analysis of the large family of poxvirus ankyrin-repeat proteins reveals orthologue groups within and across chordopoxvirus genera. J Gen Virol. 2011;92(Pt 11):2596–607.
62. Bollinger O. Ueber Epithelioma contagiosum beim Haushuhn und die sogenannten Pocken des Geflügels. Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med. 1873;58:349–61.
63. Bolte AL, Meurer J, Kaleta EF. Avian host spectrum of avipoxviruses. Avian Pathol. 1999;28:415–32.
64. Van Riper C, Forrester DJ. Avian pox. Infectious diseases of wild birds. Ames, Iowa: Blackwell Pub; 2007. p. 131–76.
65. Metz AL, Hatcher L, Newman JA, Halvorson DA. Venereal Pox in Breeder Turkeys in Minnesota. Avian Dis. 1985 Jul;29(3):850.
66. Ritchie BW. *Poxviridae*. Avian viruses: function and control. Lake Worth, Fla: Wingers Pub; 1995. p. 285–311.
67. Kligler IJ, Muckenfuss RS, Rivers TM. Transmission of Fowl-pox by Mosquitoes. J Exp Med. 1929;49(4):649–60.
68. DaMassa AJ. The Role of *Culex tarsalis* in the Transmission of Fowl Pox Virus. Avian Dis. 1966;10(1):57–66.
69. Akey BL, Nayar JK, Forrester DJ. Avian Pox in Florida Wild Turkeys: Culex nigripalpus and Wyeomyia vanduzeei as Experimental Vectors. J Wildl Dis. 1981;17(4):597–9.
70. Wright EJ, Nayar JK, Forrester DJ. Interactive effects of turkeypox virus and *Plasmodium hermani* on turkey poults. J Wildl Dis. 2005;41(1):141–8.
71. Van Riper C, Van Riper SG, Hansen WR. Epizootiology and effect of avian pox on hawaiian forest birds. The Auk. 2002;119(4):929–42.
72. Aruch S, Atkinson CT, Savage AF, LaPointe DA. Prevalence and distribution of pox-like lesions, avian malaria, and mosquito vectors in Kipahulu valley, Haleakala National Park, Hawaii, USA. J Wildl Dis. 2007;43(4):567–75.

73. Khan A, Yousaf A, Khan MZ, Siddique M, Gul ST, Mahmood F. Cutaneous form of pox infection among captive peafowl (*Pavo cristatus*) chicks. Avian Pathol. 2009;38(1):65–70.
74. Atkinson CT, Lease JK, Dusek RJ, Samuel MD. Prevalence of pox-like lesions and malaria in forest bird communities on Leeward Manua Loa Volcano, Hawaii. The Condor. 2005;107:537–46.
75. Tsai SS, Chang TC, Yang SF, Chi YC, Cher RS, Chien MS, et al. Unusual lesions associated with avian poxvirus infection in rosy-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). Avian Pathol. 1997 Mar;26(1):75–82.
76. Lachish S, Lawson B, Cunningham AA, Sheldon BC. Epidemiology of the Emergent Disease Paridae pox in an Intensively Studied Wild Bird Population. PLoS ONE. 2012;7(11):e38316.
77. Illera JC, Emerson BC, Richardson DS. Genetic characterization, distribution and prevalence of avian pox and avian malaria in the Berthelot's pipit (*Anthus berthelotii*) in Macaronesia. Parasitol Res. 2008;103:1435–43.
78. Buenestado F, Gortazar C, Millan J, Hofle U, Villafuerte R. Descriptive study of an avian pox outbreak in wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*) in Spain. Epidemiol Infect. 2004;132:369–74.
79. Smits JE, Tella JL, Carrete M, Serrano D, Lopez G. An Epizootic of Avian Pox in Endemic Short-toed Larks (*Calandrella rufescens*) and Berthelot's Pipits (*Anthus berthelotti*) in the Canary Islands, Spain. Vet Pathol. 2005;42:59–65.
80. Ha HJ, Banda M, Alley MR, Howe L, Gartrell BD. The seroprevalence of avipoxvirus and its association with avian malaria (*Plasmodium* spp.) infection in introduced passerine birds in the southern regions of the North Island of New Zealand. Avian Dis. 2013;57(1):109–15.
81. Spurgin LG, Illera JC, Padilla DP, Richardson D. Biogeographical patterns and co-occurrence of pathogenic infection across island populations of Berthelot's pipit (*Anthus berthelotii*). Oecologia. 2011;11.
82. Hess C, Maegdefrau-Pollan B, Bilic I, Liebhart D, Richter S, Mitsch P, et al. Outbreak of cutaneous form of poxvirus on a commercial turkey farm caused by the species fowlpox. Avian Dis. 2011 Dec;55(4):714–8.
83. Estrella-Tec JE, Gutiérrez-Ruiz EJ, Ramírez-González S, Aranda-Cirerol F, Santos-Ricalde R, Puerto-Nájera JL. Evaluation of a commercial vaccine against avian poxvirus in turkeys kept in the backyard system in the state of Yucatan, Mexico. Avian Pathol. 2013 Sep 27;42(6):536–40.
84. Adebajo MC, Ademola SI, Oluwaseun A. Seroprevalence of Fowl Pox Antibody in Indigenous Chickens in Jos North and South Council Areas of Plateau State, Nigeria: Implication for Vector Vaccine. ISRN Vet Sci. 2012;2012:1–4.
85. Lierz M, Bergmann V, Isa G, Czerny CP, Lueschow D, Mwanzia J, et al. Avipoxvirus Infection in a Collection of Captive Stone Curlews (*Burhinus oedicnemus*). J Avian Med Surg. 2007;21(1):50–5.
86. Shivaprasad HL, Kim T, Tripathy DN, Woolcock PR, Uzal F. Unusual pathology of canary poxvirus infection associated with high mortality in young and adult breeder canaries (*Serinus canaria*). Avian Pathol. 2009;38(4):311–6.
87. Adams CJ, Feldman SH, Sleeman JM. Phylogenetic analysis of avian poxviruses among free-ranging birds of Virginia. Avian Dis. 2005;49:601–5.

88. Davidson WR, Kellogg FE, Doster GL. An epornitic of avian pox in wild bobwhite quail. J Wildl Dis. 1980;16(2):293–8.
89. Kulich P, Roubalova E, Dubska L, Sychra O, Smid B, Literak I. Avipoxvirus in blackcaps (*Sylvia atricapilla*). Avian Pathol. 2008;37(1):101–7.
90. Ellison KS, Hofmeister EK, Ribic CA, Sample DW. Relatively High Prevalence of Pox-Like Lesions in Henslow's Sparrow Among Nine Species of Migratory Grassland Passerines in Wisconsin, USA. J Wildl Dis. 2014 Aug 14;
91. Lawson B, Lachish S, Colvile KM, Durrant C, Peck KM, Toms MP, et al. Emergence of a Novel Avian Pox Disease in British Tit Species. PLoS ONE. 2012;7(11):e40176.
92. Zylberberg M, Lee KA, Klasing KC, Wikelski M. Variation with Land Use of Immune Function and Prevalence of Avian Pox in Galapagos Finches. Conserv Biol. 2013;27(1):103–12.
93. Giraudeau M, Mousel M, Earl S, McGraw K. Parasites in the City: Degree of Urbanization Predicts Poxvirus and Coccidian Infections in House Finches (*Haemorhous mexicanus*). Brown JD, editor. PLoS ONE. 2014 Feb 4;9(2):e86747.
94. Parker PG, Buckles EL, Farrington H, Petren K, Whiteman NK, Ricklefs RE, et al. 110 Years of Avipoxvirus in the Galapagos Islands. Davis T, editor. PLoS ONE. 2011 Jan 13;6(1):e15989.
95. Laiolo P, Serrano D, Tella JL, Carrete M, Lopez G, Navarro C. Distress calls reflect poxvirus infection in lesser short-toed lark Calandrella rufescens. Behav Ecol. 2007 May 1;18(3):507–12.
96. Kleindorfer S, Dudaniec RY. Increasing prevalence of avian poxvirus in Darwin's finches and its effect on male pairing success. J Avian Biol. 2006;37:69–76.
97. Lachish S, Bonsall MB, Lawson B, Cunningham AA, Sheldon BC. Individual and Population-Level Impacts of an Emerging Poxvirus Disease in a Wild Population of Great Tits. PLoS ONE. 2012;7(11):e48545.
98. Jarvi SI, Triglia D, Giannoulis A, Farias M, Bianchi K, Atkinson CT. Diversity, origins and virulence of Avipoxviruses in Hawaiian Forest Birds. Consev Genet. 2008;9:339–48.
99. Kirmse P. Host Specificity and Long Persistence of Pox Infection in the Flicker (*Colaptes auratus*). Bull Wildl Dis Assoc. 1967;3:14–20.
100. Senties-Cue CG, Charlton BR, Woolcock P, Bickford AA, Cooper G, Bland M. Atypical distribution of fowl pox lesions in broilers. Avian Dis. 2010;54(4):1316–8.
101. Hsieh YC, Chen SH, Wang CW, Lee YH, Chung WC, Tsai MC, et al. Unusual pox lesions found in Chinese jungle mynahs (*Acridotheres cristatellus*). Avian Pathol. 2005;34(5):415–7.
102. Minbay A, Kreir JP. An experimental Study of the Pathogenesis of Fowlpox Infection in Chickens. Avian Dis. 1973;17(3):532–9.
103. Perez-Tris J, Williams RA, Abel-Fernandez E, Barreiro J, Conesa JJ, Figuerola J, et al. A multiplex PCR for detection of poxvirus and papillomavirus in cutaneous warts from live birds and museum skins. Avian Dis. 2011;55(4):545–53.
104. Tripathy DN, Hanson LE. A Smear Technique for Staining Elementary Bodies of Fowlpox. Avian Dis. 1976;20(3):609–10.
105. Friend M, Franson JC. Avian pox. Field manual of wildlife diseases general field procedures and diseases of birds [Internet]. Washington, D.C.: U.S. Dept. of the

Interior, U.S. Geological Survey; 1999 [cited 2014 Jan 9]. p. 163–9. Available from: http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/41049695.html

106. Singh P, Kim T, Tripathy DN. Identification and characterization of fowlpox virus strains using monoclonal antibodies. J Vet Diagn Invest. 2003;15:50–4.
107. Isa G, Pfister K, Kaaden OR, Czerny CP. Development of a Monoclonal Blocking ELISA for the Detection of Antibodies Against Fowlpox Virus. J Vet Med B. 2002;49:21–3.
108. Ha HJ, Alley M, Howe L, Gartrell B. Evaluation of the pathogenicity of avipoxvirus strains isolated from wild birds in New Zealand and the efficacy of a fowlpox vaccine in passerines. Vet Microbiol. 2013;165(3-4):268–74.
109. Buscaglia C, Bankowski RA, Miers L. Cell-Culture Virus-Neutralization Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Evaluation of Immunity in Chickens against Fowlpox. Avian Dis. 1985;29(3):672–80.
110. Singh P, Tripathy DN. Fowlpox virus infection causes a lymphoproliferative response in chickens. Viral Immunol. 2003;16(2):223–7.
111. Winterfield RW, Hitchner SB. The response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowl pox viruses. Avian Dis. 1965 May;9(2):237–41.
112. Atkinson CT, Wiegand KC, Triglia D, Jarvi SI. Reversion to virulence and efficacy of an attenuated Canarypox vaccine in Hawai'i 'Amakihi (*Hemignathus virens*). J Zoo Wildl Med. 2012;43(4):808–19.
113. Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, et al. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. Science. 2008 Jun 27;320(5884):1763–8.
114. BirdLife International. Review of the global conservation status of the Asian Houbara Bustard *Chlamydotis macqueenii*. Cambridge, UK: BirdLife International; 2014 p. 45.
115. Broders O, Osborne T, Wink M. A mtDNA phylogeny of bustards (family Otididae) based on nucleotide sequences of the cytochromeb-gene. J Ornithol. 2003 Apr;144(2):176–85.
116. D'Aloia M-A. Studies on the population structure of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* in the Middle East with DNA analysis techniques. Zool Middle East. 2001 Jan;22(1):25–35.
117. Gaucher P, Paillat P, Chappuis C, Saint Jalme M, Lotfikhah F, Wink M. Taxonomy of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* subspecies considered on the basis of sexual display and genetic divergence. Ibis. 1996;138(2):273–82.
118. Gray JE. *Otis macqueenii*. Harswickes Illus Indian Zool. 1832;2.
119. Jacquin. *Psophia undulata*. Beytr Gesch Vogel. 1784;24(9).
120. Rotshild W, Hartert E. On a new bustard from the Palearctic region. Nov Zool. 1894;1(689).
121. Cramp S, Simmons K, editors. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa: the birds of the Western Palearctic. Oxford [Eng.] ; New York: Oxford University Press; 1980. 1 p.
122. Osborne PE, Launay F, Gliddon D. Wintering habitat use by houbara bustards *Chlamydotis undulata* in Abu Dhabi and implications for management. Biol Conserv. 1997 Jul;81(1-2):51–6.

123. Saint Jalme M, Van Heezik Y, editors. Propagation of the houbara bustard. London ; New York : New York: Kegan Paul International jointly with the National Wildlife Research Center, National Commission for Wildlife Conservation and Development, Riyadh, Saudi Arabia ; Distributed by Columbia University Press; 1996. 110 p.
124. Tigar BJ, Osborne PE. Invertebrate diet of the Houbara Bustard *Chlamydotis [undulata] macqueenii* in Abu Dhabi from calibrated faecal analysis. Ibis. 2000;142(3):466–75.
125. Nadeem MS, Ali F, Akhtar MS. Diet of Houbara Bustard *Chlamydotis undulata* in Punjab, Pakistan. Forktail. 2004;20:91–3.
126. Bourass K, Zaime A, Qninba A, Benhoussa A, Rguibi Idrissi H, Hingrat Y. Evolution saisonnière du régime alimentaire de l'Outarde houbara nord-africaine, *Chlamydotis undulata undulata*. Bull L'Institut Sci Rabat Sect Sci Vie. 2012;34(1):29–43.
127. Aghainajafi-Zadeh S, Hemami MR, Karami M, Dolman PM. Wintering habitat use by houbara bustard (*Chlamydotis macqueenii*) in steppes of Harat, central Iran. J Arid Environ. 2010 Aug;74(8):912–7.
128. Medina FM. Foraging use of cultivated fields by the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata fuertaventurae* Rothschild and Hartert, 1894 on Fuerteventura (Canary Islands). Bird Conserv Int. 1999 Dec;9(04):373–86.
129. Hingrat Y. Sélection de l'habitat et structure sociale chez l'Outarde houbara. Apports à la conservation d'une population menacée au Maroc. [Thèse de doctorat d'université]. [Paris]: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle; 2005.
130. Hingrat Y, Jalme MS, Ysnel F, Lacroix F, Seabury J, Rautureau P. Relationships between home-range size, sex and season with reference to the mating system of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata undulata*: Mating system of the Houbara Bustard. Ibis. 2004 Feb 19;146(2):314–22.
131. Gaucher P. Breeding biology of the houbara bustard *Chlamydotis undulata undulata* in Algeria. Alauda. 1995;63:291–8.
132. Combreau O, Qiao J, Lawrence M, Gao X, Yao J, Yang W, et al. Breeding success in a Houbara Bustard *Chlamydotis [undulata] macqueenii* population on the eastern fringe of the Jungar Basin, People's Republic of China: Breeding success in Houbara Bustard. Ibis. 2002 Apr 19;144(2):E45–56.
133. Hardouin LA, Robert A, Nevoux M, Gimenez O, Lacroix F, Hingrat Y. Meteorological conditions influence short-term survival and dispersal in a reinforced bird population. Pettorelli N, editor. J Appl Ecol. 2014 Jun;n/a – n/a.
134. Hardouin LA, Nevoux M, Robert A, Gimenez O, Lacroix F, Hingrat Y. Determinants and costs of natal dispersal in a lekking species. Oikos. 2012 Jun;121(6):804–12.
135. Combreau O, Riou S, Judas J, Lawrence M, Launay F. Migratory Pathways and Connectivity in Asian Houbara Bustards: Evidence from 15 Years of Satellite Tracking. PLoS ONE. 2011;6(6):8p.
136. Launay F, Combreau O, Bowardi MA. Annual migration of Houbara Bustard *Chlamydotis undulata macqueenii* from the United Arab Emirates. Bird Conserv Int. 1999 Jun;9(02):155–61.
137. Bailey TA, Nicholls PK, Samour JH, Naldo JL, Wernery U, Howlett JC. Postmortem Findings in Bustards in the United Arab Emirates. Avian Dis. 1996;40(2):296–305.

138. Ouhmama R. Etude du parasitisme intestinal chez l'Outarde houbara (*Chlamydotis undulata*) sauvage au Maroc. Missour, Maroc: ECWP; 2007 p. 55.
139. Jones A, Bailey TA, Nothelfer HB, Gibbons LM, Samour JH, Al Bowardi M, et al. Parasites of wild houbara bustards in the United Arab Emirates. J Helminthol. 1996;70:21–5.
140. Seurat LG. Sur un nouveau parasite de l'Outarde houbara. Nord S d. h. n. d. l. A d., editor. Bull Société Hist Nat Afr Nord. 1914;5:117–9.
141. Riou S, Judas J, Lawrence M, Pole S, Combreau O. A 10-year assessment of Asian Houbara Bustard populations: trends in Kazakhstan reveal important regional differences. Bird Conserv Int. 2011 Jun;21(02):134–41.
142. BirdLife International. Species factsheet: *Chlamydotis undulata* [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 25]. Available from: http://www.birdlife.org
143. Goriup PD. The world status of the Houbara Bustard *Chlamydotis undulata*. Bird Conserv Int. 1997 Dec;7(04):373–97.
144. BirdLife International. *Chlamydotis macqueenii*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3 [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 25]. Available from: www.iucnredlist.org
145. BirdLife International. *Chlamydotis undulata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3 [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 25]. Available from: www.iucnredlist.org
146. Bailey T, Samour JH, Bailey TC. Hunted by Falcons, Protected by Falconry: Can the Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*) Fly into the 21st Century? J Avian Med Surg. 1998;12(3):190–201.
147. Le Cuziat J, Lacroix F, Roche P, Vidal E, Médail F, Orhant N, et al. Landscape and human influences on the distribution of the endangered North African houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) in Eastern Morocco. Anim Conserv. 2005 May;8(2):143–52.
148. Tourenq C, Combreau O, Lawrence M, Pole SB, Spalton A, Xinji G, et al. Alarming houbara bustard population trends in Asia. Biol Conserv. 2005 Jan;121(1):1–8.
149. Combreau O, Launay F, Lawrence M. An assessment of annual mortality rates in adult-sized migrant houbara bustards (*Chlamydotis [undulata] macqueenii*). Anim Conserv. 2001 May;4(2):133–41.
150. International Fund For Houbara Conservation [Internet]. [cited 2014 Nov 25]. Available from: http://www.houbarafund.org/
151. Lacroix F. The Emirates Center for Wildlife Propagation: developing a comprehensive strategy to secure a self-sustaining population of Houbara Bustards in eastern Morocco. Houbara News. 2003;5:2.
152. IUCN/SSC. Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission; 2013. viii +57 p.
153. Rautureau P, Hingrat Y, Lacroix F. Houbara bustard life history parameters. Released vs. recipient population: evaluation of reinforcement success. Chicago, Illinois, United States; 2008.
154. Lesobre L. Structure génétique des populations menacées d'outardes houbara (*Chlamydotis undulata undulata*) au Maroc. Implications à la gestion d'un élevage

conservatoire et au renforcement des populations [Thèse de doctorat d'université]. [Paris]: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle; 2008.

155. Bailey TA, Samour JH, Naldo JL, Howlett JC, Tarik M. Causes of Morbidity in Bustards in the United Arab Emirates. Avian Dis. 1996;40(1):121–9.
156. Bailey TA. Diseases and medical management of houbaras bustards and other otididae. Abu Dhabi, UAE: Tom A. Bailey; 2008. 494 p.
157. Ostrowski S, Dorrestein G, Ancrenaz M, Saint Jalme M. Debilitating Cutaneous Poxvirus Lesions on Two Captive Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*). Avian Dis. 1995;39:907–11.
158. Jones A, Bailey TA, Nicholls PK, Samour JH, Naldo JL. Cestode and Acanthocephalan infections in captive bustards: new host and location records, with data on pathology, control, and preventive medicine. J Zoo Wildl Med. 1996;27(2):201–8.
159. Stiévenart C, Mohammed OB. Current and emerging diseases in a captive flock of adult houbara bustards (*Chlamydotis macqueenii*). WDA Africa and Middle East Third Annual Meeting. 2004.
160. Greth A, Andral B, Gerbermann H, Vassart M, Gerlach H, Launay F. Chlamydiosis in a Captive Group of Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*). Avian Dis. 1993;3:117–20.
161. National Avian Research Center and Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center in Abu Dhabi. Annual report 2013. NARC, Al Aïn, UAE; 2013.
162. Emirates Center for Wildlife Propagation. Annual report 2013. ECWP, Missour, Morocco; 2013.
163. Bailey TA, Silvanose C, Manvell R, Gough RE, Kinne J, Combreau O, et al. Medical dilemmas associated with rehabilitating confiscated houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) after avian pox and paramyxovirus type 1 infection. J Wildl Dis. 2002;38(3):518–32.
164. Khan OA, Shuaib MA, Rhman SSA, Ismail MM, Al Hammad Y, Baky MHA, et al. Isolation and Identification of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus from Houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) and contact falcons. Avian Pathol. 2009;38(1):35–9.
165. Le Loc'h G. *Salmonella* spp. infections in NARC and SKHBC-AD during the breeding season 2012. NARC, Al Aïn, UAE; 2012.
166. Ostrowski S, Ancrenaz M, Saint Jalme M, Greth A. Concurrent avian pox and Newcastle disease infection in a Houbara bustard (*Chlamydotis undulata*). Avian Pathol. 1995;24(3):573–7.
167. Samour JH, Kaaden OR, Wernery U, Bailey TA. An Epornitic of Avian Pox in Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*). J Vet Med B. 1996;43:287–92.
168. Bailey TA, Wernery U, Gough RE, Manvell R, Samour JH. Serological survey for avian viruses in houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*). Vet Rec. 1996;139:238–9.
169. Ostrowski S, Dorrestein GM, Burger L, Hémon S, Saint Jalme M. Cross-Protection Test of an Avian Poxvirus Isolated from Houbara Bustards. Avian Dis. 1996;40(4):762–9.
170. Kinne J, Oliveros S, Joseph S, Manvell R, Wernery U. Severe outbreak of pox in captive Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata undulata*) in Morocco. Wildl Middle East News. 2007;2(3):94–101.

171. Bailey TA, Silvanose C, Naldo JL, Combreau O, Launay F, Wernery U, et al. Health considerations of the rehabilitation of illegally traded houbara bustards *Chlamydotis undulata macqueenii* in the Middle East. Oryx. 2000;34(4):325–34.
172. Wernery U, Basker VJ, Joseph S, Kinne J. An attenuated vaccine protects Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata*) from systemic pox. Wildl Middle East News. 2007;2(3):4p.
173. Combreau O, Smith TR. Release techniques and predation in the introduction of houbara bustards in Saudi Arabia. Biol Conserv. 1998 May;84(2):147–55.
174. Snyder NFR, Derrickson SR, Beissinger SR, Wiley JW, Smith TB, Toone WD, et al. Limitations of Captive Breeding in Endangered Species Recovery. Conserv Biol. 1996 Apr 1;10(2):338–48.
175. Kane OJ, Uhart MM, Rago V, Pereda AJ, Smith JR, Van Buren A, et al. Avian Pox in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). J Wildl Dis. 2012;48(3):790–4.
176. Literak I, Kulich P, Robesova B, Adamik P, Roubalova E. Avipoxvirus in great tits (*Parus major*). Eur J Wildl Res. 2010;56:529–34.
177. International Epidemiological Association. A dictionary of epidemiology. 5th ed. Porta MS, editor. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2008. 289 p.
178. Watkins RE, Eagleson S, Hall RG, Dailey L, Plant AJ. Approaches to the evaluation of outbreak detection methods. BMC Public Health. 2006;6:263.
179. Smith KF, Sax DF, Lafferty KD. Evidence for the Role of Infectious Disease in Species Extinction and Endangerment. Conserv Biol. 2006 Oct;20(5):1349–57.
180. Bengis RG, Kock RA, Fischer J. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. Rev Sci Tech Int Off Epizoot. 2002 Apr;21(1):53–65.
181. Sainsbury AW, Vaughan-Higgins RJ. Analyzing Disease Risks Associated with Translocations. Conserv Biol. 2012 Jun;26(3):442–52.
182. Karesh WB, Cook RA, Bennett EL, Newcomb J. Wildlife trade and global disease emergence. Emerg Infect Dis. 2005 Jul;11(7):1000–2.
183. Le Loc'h G, Ducatez MF, Camus-Bouclainville C, Guérin J-L, Bertagnoli S. Diversity of avipoxviruses in captive-bred Houbara bustard. Vet Res. 2014;45(1):98.
184. Hingrat Y, Saint Jalme M, Ysnel F, Le Nuz E, Lacroix F. Habitat use and mating system of the houbara bustard (*Chlamydotis undulata undulata*) in a semi-desertic area of North Africa: implications for conservation. J Ornithol. 2007;148(1):39–52.
185. Chargé R, Sorci G, Hingrat Y, Lacroix F, Saint Jalme M. Immune-Mediated Change in the Expression of a Sexual Trait Predicts Offspring Survival in the Wild. Etges WJ, editor. PLoS ONE. 2011 Oct 3;6(10):e25305.
186. Darbro JM, Harrington LC. Avian defensive behavior and blood-feeding success of the West Nile vector mosquito, Culex pipiens. Behav Ecol. 2007;18(4):750–7.
187. Simpson JE, Folsom-O'Keefe CM, Childs JE, Simons LE, Andreadis TG, Diuk-Wasser MA. Avian host-selection by *Culex pipiens* in experimental trials. PLoS One. 2009;4(11):e7861.
188. Suom C, Ginsberg HS, Bernick A, Klein C, Buckley PA, Salvatore C, et al. Host-seeking activity and avian host preferences of mosquitoes associated with West Nile virus transmission in the northeastern U.S.A. J Vector Ecol. 2010;35(1):69–74.
189. Zeileis A, Kleiber C, Jackman S. Regression Models for Count Data in R. J Stat Softw. 2008;27(8):1–25.

190. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2009. Available from: http://www.R-project.org
191. Jackman S, Tahk A, Zeileis A, Maimone C, Fearon A. pscl: Classes and Methods for R Developed in the Political Science Computational Laboratory, Stanford University [Internet]. 2015. Available from: http://cran.r-project.org/package=pscl
192. Ripley B, Venables B, Bates D, Hornik K, Gebhardt A, Firth D. MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS [Internet]. 2015. Available from: http://cran.r-project.org/package=MASS
193. Hothorn T, Zeileis A, Farebrother RW, Cumins C, Millo G, Mitchell D. lmtest: Testing Linear Regression Models [Internet]. 2014. Available from: http://cran.r-project.org/package=lmtest
194. Chargé R, Saint Jalme M, Lacroix F, Cadet A, Sorci G. Male health status, signalled by courtship display, reveals ejaculate quality and hatching success in a lekking species. J Anim Ecol. 2010 Apr;79:843–50.
195. Tizard I. Sickness behavior, its mechanisms and significance. Anim Health Res Rev. 2008 Jun;9(01):87–99.
196. Van Heezik Y, Seddon P. Influence of Group Size and Neonatal Handling on Growth Rates, Survival, and Tameness of Juvenile Houbara Bustards. Zoo Biol. 2001;20:423–33.
197. Kulma K, Low M, Bensch S, Qvarnström A. Malaria-Infected Female Collared Flycatchers (*Ficedula albicollis*) Do Not Pay the Cost of Late Breeding. McGraw K, editor. PLoS ONE. 2014 Jan 23;9(1):e85822.
198. Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, Sheldon BC, Qvarnstrom A. Infectious Diseases, Reproductive Effort and the Cost of Reproduction in Birds. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 1994 Nov 29;346(1317):323–31.
199. Marzal A, Lope F de, Navarro C, Moller AP. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. Oecologia. 2005 Feb;142(4):541–5.
200. Nolan PM, Roberts SR, Hill GE. Effects of *Mycoplasma gallisepticum* on reproductive success in house finches. Avian Dis. 2004 Dec;48(4):879–85.
201. Hill GE, Siefferman L, Liu M, Hassan H, Unnasch TR. The Effects of West Nile Virus on the Reproductive Success and Overwinter Survival of Eastern Bluebirds in Alabama. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2010 Mar;10(2):159–63.
202. Irons V. Cross-species transmission studies with different strains of bird-pox. Am J Epidemiol. 1934 Sep 1;20(2):329–51.
203. Ghildyal N, Schnitzlein WM, Tripathy DN. Genetic and antigenic differences between fwolpox and quailpox viruses. Arch Virol. 1989;106:85–92.
204. Ha HJ, Howe L, Alley M, Gartrell B. The phylogenetic analysis of avipoxvirus in New Zealand. Vet Microbiol. 2011;150:80–7.
205. Rampin T, Pisoni G, Manarolla G, Gallazzi D, Sironi G. Epornitic of avian pox in common buzzards (*Buteo buteo*): virus isolation and molecular biological characterization. Avian Pathol. 2007;36(2):161–5.
206. Niemeyer C, Favero CM, Kolesnikovas CKM, Bhering RCC, Brandão P, Catão-Dias JL. Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins

(*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. Avian Pathol. 2013 Oct 1;42(6):546–51.

207. Chargé R, Sorci G, Hingrat Y, Lacroix F, Saint Jalme M. Immune-mediated change in the expression of a sexual trait predicts offspring survival in the wild. PloS One. 2011;6(10):e25305.
208. Tadese T, Reed C. Detection of specific reticuloendotheliosis virus sequence and protein from REV-integrated fowlpox virus strains. J Virol Methods. 2003;110:99–104.
209. Holmes EC. The phylogeography of human viruses. Mol Ecol. 2004 Apr;13(4):745–56.
210. Holmes EC, Drummond AJ. The evolutionary genetics of viral emergence. Curr Top Microbiol Immunol. 2007;315:51–66.
211. Villarreal LP, DeFilippis VR. A hypothesis for DNA viruses as the origin of eukaryotic replication proteins. J Virol. 2000 Aug;74(15):7079–84.
212. Bernard H-U, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. Int J Cancer J Int Cancer. 2006 Mar 1;118(5):1071–6.
213. Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome. Nat Med. 2004 Dec;10(12 Suppl):S88–97.
214. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol Biol. 2007;7(1):214.
215. Kosakovsky Pond SL, Frost SDW. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. Bioinformatics. 2005 May 15;21(10):2531–3.
216. Kosakovsky Pond SL. Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. Mol Biol Evol. 2005 Feb 9;22(5):1208–22.
217. Esposito JJ. Genome Sequence Diversity and Clues to the Evolution of Variola (Smallpox) Virus. Science. 2006 Aug 11;313(5788):807–12.
218. McLysaght A, Baldi PF, Gaut BS. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. Proc Natl Acad Sci. 2003 Dec 23;100(26):15655–60.
219. Li Y, Carroll DS, Gardner SN, Walsh MC, Vitalis EA, Damon IK. On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Oct 2;104(40):15787–92.
220. Hughes AL, Irausquin S, Friedman R. The evolutionary biology of poxviruses. Infect Genet Evol. 2010;10(1):50–9.
221. Shchelkunov SN. How long ago did smallpox virus emerge? Arch Virol. 2009;154(12):1865–71.
222. Ho SYW, Shapiro B, Phillips MJ, Cooper A, Drummond AJ. Evidence for time dependency of molecular rate estimates. Syst Biol. 2007 Jun;56(3):515–22.
223. Al Falluji MM, Tantawi HH, Al-Bana A, Al-Sheikhly S. Pox infection among captive peacocks. J Wildl Dis. 1979;15(4):597–600.
224. Shivaprasad HL, Kim T-J, Woolcock PR, Tripathy DN. Genetic and Antigenic Characterization of a Poxvirus Isolate from Ostriches. Avian Dis. 2002;46(2):429–36.

225. Terasaki T, Kaneko M, Mase M. Avian poxvirus infection in flamingos (*Phoenicopterus roseus*) in a zoo in Japan. Avian Dis. 2010 Jun;54(2):955–7.
226. Hitchner SB. Canary Pox Vaccination with Live Embryo-Attenuated Virus. Avian Dis. 1981 Oct;25(4):874–81.
227. Eleazer TH, Harrell JS, Blalock HG. Transmission Studies Involving a Wet Fowl Pox Isolate. Avian Dis. 1983 Apr;27(2):542–4.
228. Hauck R, Prusas C, Hafez HM, Luschow D. Serologic response against fowl poxvirus and reticuloendotheliosis virus after experimental and natural infections of chickens with fowl poxvirus. Avian Dis. 2009;53(2):205–10.
229. Facon C, Guerin JL, Lacroix F. Assessment of Newcastle disease vaccination program in houbara bustard breeders (*Chlamydotis undulata undulata*). J Wildl Dis. 2005;41(4):768–74.
230. Le Loc'h G, Daudet-Le Loc'h A. Comparison between live and inactivated vaccines against Newcastle Disease in Houbara bustard chicks (*Chlamydotis undulata undulata*). Marrakesh, Morocco; 2009.
231. Bailey TA, Wernery U, Samour JH, Naldo JL. Antibody response of Kori bustards (*Ardeotis kori*) and houbara bustards (*Chlamydotis undulata*) to live and inactivated newcastle disease vaccines. J Zoo Wildl Med. 1998;29(4):441–50.
232. Samour J. Diagnostic Value of Hematology. Clinical avian medicine. Palm Beach, Fla.: Spix Pub.; 2006. p. 587–609.
233. Roman Y. Mise en place de techniques électrophorétiques associées au diagnostic des pathologies d'oiseaux dans les élevages conservatoires [Thèse de doctorat d'université]. [Paris]: Muséum Nationale d'Histoire Naturelle; 2008.
234. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 [Internet]. 2014. Available from: http://cran.r-project.org/package=lme4
235. Kuznetsova A, Bruun Brockhoff P, Bojesen Christensen B. lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models [Internet]. 2014. Available from: http://cran.r-project.org/package=lmerTest
236. Rochon K, Baker RB, Almond GW, Watson DW. Assessment of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) as a Vector of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. J Med Entomol. 2011 Jul 1;48(4):876–83.
237. Pages-Mante A, Majo N, March R, Jover A, Bentue M. Pathology and experimental prophylaxis of avian poxvirus in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). Vet Rec. 2004;155:307–8.
238. Claver JA, Quaglia AIE. Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. J Exot Pet Med. 2009 Apr;18(2):87–97.
239. D'Aloia M-A, Samour JH, Howlett JC, Bailey TA, Naldo JL. Haemopathological Responses to Chronic Inflammation in the Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata macqueenii*). Comp Haematol Int. 1994;4:203–6.
240. Melillo A. Applications of Serum Protein Electrophoresis in Exotic Pet Medicine. Veterinary Clin North Am Exot Anim Pract. 2013 Jan;16(1):211–25.
241. Virus Taxonomy Assignments [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses. [cited 2015 Feb 3]. Available from: http://ictvonline.org/
242. Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 6th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. 2456 p.

243. Babkin IV, Babkina IN. A retrospective study of the orthopoxvirus molecular evolution. Infect Genet Evol. 2012;12(8):1597–604.
244. National Avian Research Center and Sheikh Khalifa Houbara Breeding Center in Abu Dhabi. Semestrial report 2014. NARC, Al Aïn, UAE; 2014.
245. Smithson C, Purdy A, Verster AJ, Upton C. Prediction of Steps in the Evolution of Variola Virus Host Range. Meng X, editor. PLoS ONE. 2014 Mar 13;9(3):e91520.
246. Aapanius V. Stress and Immune Defense. Adv Study Behav. 1998;27:133–53.
247. Gomes AVS, Quinteiro-Filho WM, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Baskeville E, et al. Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases *Salmonella* Enteritidis invasion in broiler chickens. Avian Pathol. 2014 Jan 2;43(1):82–90.
248. Zylberberg M, Lee KA, Klasing KC, Wikelski M. Increasing avian pox prevalence varies by species, and with immune function, in Galápagos finches. Biol Conserv. 2012 Sep;153:72–9.
249. Thomas MB, Watson EL, Valverde-Garcia P. Mixed infections and insect-pathogen interactions. Ecol Lett. 2003 Mar;6(3):183–8.

AUTHOR: Guillaume LE LOC'H

TITLE: Molecular epidemiology of avipoxviruses in the Houbara Bustard

SUPERVISORS: Stéphane BERTAGNOLI and Christelle CAMUS-BOUCLAINVILLE

ABSTRACT

The Houbara Bustard (*Chlamydotis undulata* and *Chlamydotis macqueenii*), whose populations are declining, is captive-bred for conservation purposes in North Africa, Central Asia and the Middle East. Avian pox is regularly reported in captive-bred birds despite systematic vaccination. By using epidemiological and molecular approaches, we showed that the disease, caused by a wide diversity of avipoxviruses in captive-bred houbara bustards, is frequently reported in captive-flocks, and seasonal variations of incidence are observed. Impacts assessment of the disease on breeding performances has shown they are very limited. However, the study of avipoxviruses phylogeny and evolution has demonstrated repeated virus introductions in captive-flock and thus, prove that avipoxviruses are a risk for conservation projects. Finally, an experimental model developed in the Houbara Bustard offers further opportunities of research on avipoxviruses.

KEYWORDS

avipoxvirus, Houbara Bustard, *Chlamydotis undulata*, *Chlamydotis macqueenii*, breeding, conservation, epidemiology, phylogeny

---

LABORATORY

UMR 1225 IHAP, ENVT, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex

AUTEUR : Guillaume LE LOC'H

TITRE : Épidémiologie moléculaire des avipoxvirus chez l'Outarde houbara

DIRECTEURS DE THESE : Stéphane BERTAGNOLI et Christelle CAMUS-BOUCLAINVILLE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 13 avril 2015

RÉSUMÉ

L'Outarde houbara (*Chlamydotis undulata* et *Chlamydotis macqueenii*), dont les populations sont en déclin, fait l'objet d'élevages conservatoires en Afrique du Nord, Asie centrale et Moyen Orient. Des épisodes de variole aviaire y sont régulièrement rapportés malgré une vaccination systématique. En nous appuyant sur une approche épidémiologique et moléculaire, nous avons montré que cette maladie, fréquemment observée dans ces élevages, présente des fluctuations saisonnières et est causée par une grande diversité d'avipoxvirus. L'évaluation de ses impacts sur les performances de reproduction des oiseaux a révélé qu'ils sont minimes. Cependant, l'étude de la phylogénie et de l'évolution de ces virus, en montrant des introductions répétées de virus dans les élevages, a prouvé que les avipoxvirus sont un risque pour les projets de conservation. Enfin, un modèle d'infection expérimentale, développé chez l'Outarde houbara, permet d'envisager de futurs travaux de recherche sur les avipoxvirus.

MOTS-CLÉS

avipoxvirus, Outarde houbara, *Chlamydotis undulata*, *Chlamydotis macqueenii*, élevage, conservation, épidémiologie, phylogénie

---

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

LABORATOIRE

UMR 1225 IHAP, ENVT, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex