



**HAL**  
open science

# Epidémiologie moléculaire des virus influenza aviaires et cartographie du risque au Mali et en Afrique de l'Ouest

Idrissa Nonmon Sanogo

► **To cite this version:**

Idrissa Nonmon Sanogo. Epidémiologie moléculaire des virus influenza aviaires et cartographie du risque au Mali et en Afrique de l'Ouest. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2023. Français. NNT: 2023INPT0079 . tel-04223142

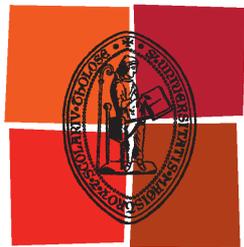
**HAL Id: tel-04223142**

**<https://theses.hal.science/tel-04223142>**

Submitted on 29 Sep 2023

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

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



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Infectiologie, Physio-pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

---

**Présentée et soutenue par :**

M. IDRISSA NONMON SANOGO

le mercredi 30 août 2023

**Titre :**

Epidémiologie moléculaire des virus influenza aviaries et cartographie du  
risque au Mali et en Afrique de l'Ouest

---

**École doctorale :**

Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP)

**Directrices de Thèse :**

MME MARIETTE DUCATEZ

MME CHRISTELLE CAMUS

**Rapporteurs :**

M. ERIC CARDINALE, CIRAD MONTPELLIER

MME BENEDICTE LAMBRECHT, SCIENSANO

**Membre(s) du jury :**

M. CHRISTOPHE PASQUIER, CHU TOULOUSE, Président

M. CLAUDE SAEGERMAN, UNIVERSITE DE LIEGE, Membre

MME CHRISTELLE CAMUS, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

MME MARIETTE DUCATEZ, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

MME SOPHIE MOLIA, CIRAD MONTPELLIER, Membre

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

## Remerciements

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une bourse de doctorat en alternance de l'Ambassade de France au Mali au sein de l'équipe virémie de l'UMR IHAP-ENVT/INRAE. Mes premiers remerciements sont donc adressés à l'Ambassade de France au Mali pour avoir accepté de financer cette thèse et à l'UMR IHAP pour m'avoir accueilli dans les meilleures conditions pour réaliser ce travail de recherche.

Je tiens tout particulièrement à remercier Mariette Ducatez, ma directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance pour la réalisation de cette thèse, pour ses qualités humaines et professionnelles, pour son expertise, pour son soutien tout au long de ce travail et pour m'avoir appris beaucoup sur la culture française.

Je remercie également Christelle Camus ma co-directrice de thèse, pour le partage de son expertise et ses relectures pertinentes.

Je remercie mon co-encadrant au Mali Pr. Ousmane Koita pour tout son accompagnement.

J'adresse également mes sincères remerciements à Bénédicte Lambrecht et à Eric Cardinale qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse : Bénédicte Lambrecht, Eric Cardinale, Sophie Molia, Claude Saegerman, Christophe Pasquier, Stéphane Bertagnoli, Christelle CAMUS et Mariette Ducatez qui a accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi individuel : Claude Saegerman, Stéphane Bertagnoli, Christelle Camus et Mariette Ducatez, pour leurs remarques pertinentes et leurs conseils avisés.

J'adresse mes remerciements à tous les membres des équipes VIRÉMIE et VIRAL avec qui j'ai partagé ces années passées au sein de l'IHAP.

Je remercie Claire Guinat de l'équipe EPIDESIA-IHAP et Simon Dellicour de SpELL-ULB pour leur aide avec les analyses phylogéographiques.

Je souhaite également remercier Sory et Sabine, pour leur accueil chaleureux à Toulouse et pour tous les repas partagés ensemble.

Je remercie Olivier pour sa gentillesse et pour ses nombreuses invitations aux barbecues. J'adresse également mes remerciements à mes collègues de l'Université de Ségou pour leur soutien.

Je remercie également toute ma famille et mes amis pour leur encouragement et leur soutien.

Pour terminer, je remercie mon épouse Amy pour son soutien indéfectible tout au long de cette thèse et pour avoir supporté mes longues périodes d'absence.

Je dédie ce travail à la mémoire de ma mère Aoua Guindo, à ma famille et en particulier à mon épouse Amy et à nos deux enfants Zie et Noura.

# Tables des matières

Tables des matières.....	i
Liste des Figures .....	iii
Liste des Tableaux .....	iii
Liste des abréviations.....	iv
Avant-propos.....	v
I. Introduction.....	1
A. Généralités et historique des virus influenza A.....	1
1. Généralités.....	1
2. Historique.....	2
B. Structure et Biologie des virus influenza A.....	3
1. Morphologie.....	3
2. Structure du génome .....	5
3. Cycle Viral.....	7
C. Classification et spectre d'hôtes des virus influenza A .....	9
1. Classification et nomenclature des VIA.....	9
2. Spectre d'hôtes et transmission des VIA.....	10
D. Evolution et variabilité génétique des VIA .....	13
E. Pathogénie des virus influenza A chez les volailles.....	16
1. Pathotype.....	16
2. Marqueurs moléculaires de virulence et d'adaptation aux mammifères .....	19
F. Virus influenza aviaire chez les volailles et chez l'Homme.....	21
1. Influenza aviaire hautement pathogène chez les volailles.....	21
2. Virus influenza aviaire chez l'homme et implications pour la santé publique..	23
G. Epidémiologie des VIAHP H5N1 et VIAFP H9N2 en Afrique de l'Ouest .....	25
1. VIAHP H5N1 .....	26
2. VIAFP H9N2.....	29
H. Diagnostic et surveillance des VIA.....	32

1. Diagnostic et caractérisation des VIA .....	32
2. Surveillance des VIA.....	36
II. Objectifs, questions de recherche et plan de la thèse.....	38
III. Résultats .....	41
Article 1 .....	42
Article 2 .....	58
Article 3 .....	90
IV. Discussion générale .....	116
V. Conclusions et perspectives .....	126
VI. Références bibliographiques .....	128
VII. Annexes .....	155

## Liste des Figures

Figure 1 : Spectre d'hôtes des virus influenza selon le genre A, B, C et D.....	1
Figure 2 : Virions influenza A (souche H7N9) vus au microscope électronique.....	3
Figure 3 : Schéma d'une particule de VIA .....	4
Figure 4: Ribonucléoprotéine (RNP) des VIA .....	5
Figure 5 : Cycle viral des virus influenza A.....	9
Figure 6 : Spectre d'hôtes et transmission des VIA .....	12
Figure 7: Dérive et cassure antigénique des VIA .....	15
Figure 8 : Infections par les VIAFP et VIAHP .....	18
Figure 9 : Carte administrative de l'Afrique de l'Ouest.....	25
Figure 10 : Foyers d'IAHP officiellement déclarés en Afrique 2021 – 2022.....	28
Figure 11 : Evolution génétique et propagation des virus H9N2 dans le monde .....	31
Figure 12 : Aperçu des approches courantes des tests de diagnostic des VIA .....	34
Figure 13 : Localisation des marchés à volailles au Mali .....	59
Figure 14 : Cadre de l'étude GIS-MCDA .....	91

## Liste des Tableaux

Tableau 1: les 8 segments des VIA et les protéines codées .....	6
Tableau 2 : Motifs du site de clivage et l'IPIV des VIAHP .....	18
Tableau 3 : Principaux marqueurs liés à la virulence et à l'adaptation aux mammifères.	20
Tableau 4 : Caractéristiques des principaux tests de diagnostic des VIA. ....	33

## Liste des abréviations

ACIA	Antigen capture immunoassay
AGID	Agar gel immunodiffusion test
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ARNv	ARN viral
DIVA	Differentiate Infected from Vaccinated Animals
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FP	Faiblement pathogène
HA	Hémagglutinine
HP	Hautement pathogène
IHA	Test d'inhibition de l'hémagglutination
IPIV	Indice de pathogénicité intra-veineuse
M1	Protéine de matrice 1
M2	Protéine de matrice 2
MCDA	Approche multicritère d'aide à la décision associée aux
NA	Neuraminidase
NEP	Nuclear export protein
NGS	Next generation sequencing
NP	Nucléo-protéine
NS1	Non structural protein 1
NS2	Non structural protein 2
OEPS	Exempt d'organismes pathogènes spécifiques
OMSA	Organisation Mondiale de la Santé Animale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Polymérase acide
PB1	Polymérase basique 1
PB2	Polymérase basique 2
PCR	Polymerase chain reaction
RNP	Ribonucléoprotéine
RT-PCR	Reverse transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
SIG	Systèmes d'information géographique
VIA	Virus influenza Aviaires
VIAFP	Virus influenza A faiblement pathogène
VIAHP	Virus influenza A hautement pathogène

## Avant-propos

Ces dernières années, nous constatons une augmentation alarmante de l'émergence de nouveaux agents infectieux au sein des populations humaines et animales. L'exemple le plus récent est le virus SARS-COV-2 qui a été responsable d'une pandémie avec des conséquences économiques et sanitaires majeures sur la quasi-totalité des pays dans le monde.

Les virus influenza A sont responsables de la grippe à la fois chez l'homme et chez les animaux et constituent une préoccupation majeure pour la santé publique. En effet, ces virus ont été à l'origine de plusieurs pandémies avec des taux de mortalité parfois très élevés. Dans le but de prévenir de futures pandémies provoquées par ces virus, il est nécessaire de suivre leur évolution génétique dans le monde afin d'identifier le plus rapidement possible les souches à potentiel pandémique.

L'Afrique de l'Ouest, comparée à d'autres régions du monde, représente une zone dans laquelle il n'y a pas assez d'informations sur la circulation et la diversité génétique des virus influenza aviaires.

Ces travaux de thèse s'intéressent particulièrement aux caractéristiques génétiques et moléculaire des virus influenza de type A circulant chez les oiseaux et à la cartographie des risques d'émergence et de propagation de ces virus en Afrique de l'Ouest. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un vaste projet de surveillance des virus influenza mis en œuvre par l'équipe VIRÉMIE de l'UMR IHAP à Toulouse en collaboration avec des laboratoire de virologie en Afrique subsaharienne.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous réaliserons une revue de la littérature sur les virus influenza aviaires tout en faisant ressortir le contexte spécifique de l'Afrique de l'Ouest. Ensuite, dans la deuxième partie, nous présenterons les résultats de nos travaux. La dernière partie du manuscrit sera consacré à la discussion des principaux résultats et les apports de nos travaux ainsi que les perspectives.

# I. Introduction

## A. Généralités et historique des virus influenza A

### 1. Généralités

Les virus influenza, communément appelés « virus de la grippe », sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité négative et segmenté (7 à 8 segments) appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. Sur la base de leur différence antigénique, ces virus sont divisés en quatre genres : les virus influenza de type A, B, C et D. Ces virus affectent à la fois l'homme et une grande variété d'espèces animales (**figure 1**).

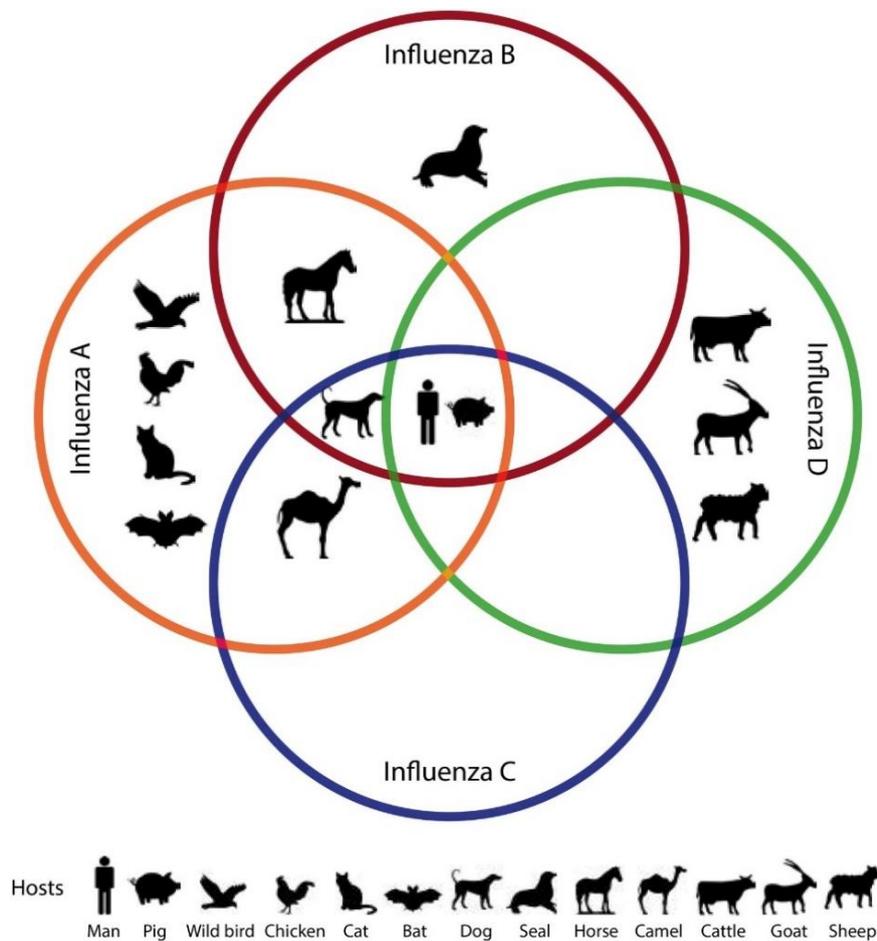


Figure 1 : Spectre d'hôtes des virus influenza selon le genre A, B, C et D

Résumé des cas d'infections humaines et animales par les virus influenza d'après Bailey et al., 2018

Le virus influenza de type A (VIA) est le plus important et le plus répandu dans le monde, pouvant affecter à la fois l'homme et une grande variété d'espèces animales (Suarez, 2016).

Les virus influenza de type B et C circulent principalement chez l'homme et ont été rarement décrits chez d'autres espèces, bien que des cas d'infections aient été rapportés, notamment, chez le chien, le phoque, le porc et le dromadaire (Manuguerra & Hannoun, 1992; Osterhaus et al., 2000; Ran et al., 2015; Salem et al., 2017). Enfin, le virus influenza de type D, récemment découvert en 2011 (Hause et al., 2013), circule principalement chez les animaux avec les bovins considérés comme hôtes principaux (R. Liu et al., 2020; Sanogo et al., 2021). Le reste de ce document se focalisera principalement sur les VIA chez la volaille, responsables de l'influenza aviaire.

## **2. Historique**

Les pandémies causées par les VIA comptent parmi les plus importantes et les plus meurtrières de l'histoire de l'Humanité depuis les temps anciens. Dès 412 avant J.-C., Hippocrate décrivait dans son sixième livre des épidémies une infection très contagieuse des voies respiratoires supérieures dont les signes évoquent une maladie de type grippal (Ghendon, 1994). Depuis lors, de nombreuses pandémies et épidémies de grippe dues aux VIA ont été enregistrées.

On se souvient encore de la pandémie de grippe « espagnole » considérée comme la plus grave et la plus dévastatrice de l'histoire récente de l'humanité. Cette pandémie aurait causé environ 40-50 millions de morts et 500 millions à 1 milliard de personnes infectées, soit un tiers de l'humanité (Lina, 2008). L'agent responsable était un VIA de sous type H1N1 d'origine aviaire. D'autres exemples de pandémies ayant affecté l'humanité ont été décrits dont notamment la grippe asiatique en 1957 (H2N2) et la grippe de Hong Kong en 1968 (H3N2) (Saunders-Hastings & Krewski, 2016).

La toute première description de l'influenza aviaire (IA, ou grippe aviaire) remonte à 1918 en Italie lorsqu'une maladie très contagieuse des volailles associée à une mortalité très élevée a été décrite comme étant la peste aviaire. Mais, ce n'est qu'à partir de 1955 que l'agent responsable a été confirmé comme étant un virus influenza de type A (Lupiani & Reddy, 2009). Par la suite, au milieu des années 1900, le virus a été décrit chez la volaille dans la plupart des pays d'Europe, d'Amérique, d'Afrique et d'Asie (Lupiani & Reddy,

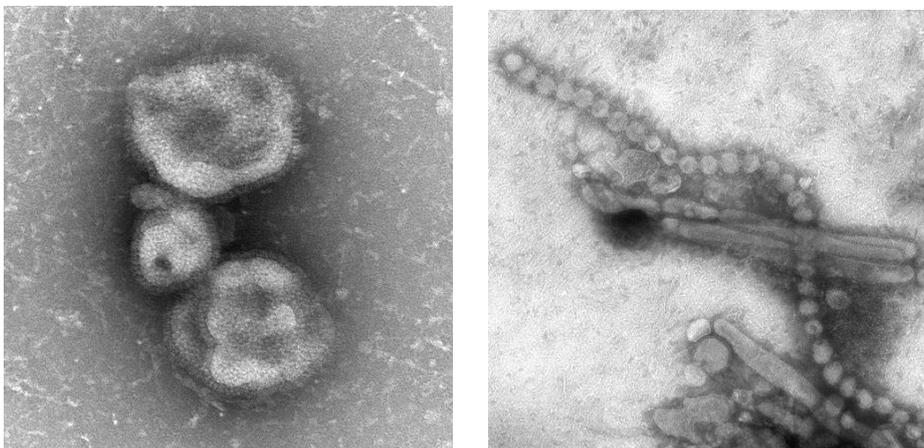
2009). En 1997, des VIA de sous type H5N1 responsables d'épizooties chez les volailles à Hong Kong ont été responsables d'infections humaines entraînant la mort de six personnes (Chan, 2002). Cela a démontré la possibilité pour un VIA circulant principalement chez les oiseaux de passer directement à l'homme et causer une infection grave (K. Subbarao et al., 1998).

De nos jours, les VIA se sont répandus dans le monde et sont devenus endémiques dans la plupart des pays, affectant à la fois l'homme et les animaux.

## **B. Structure et Biologie des virus influenza A**

### **1. Morphologie**

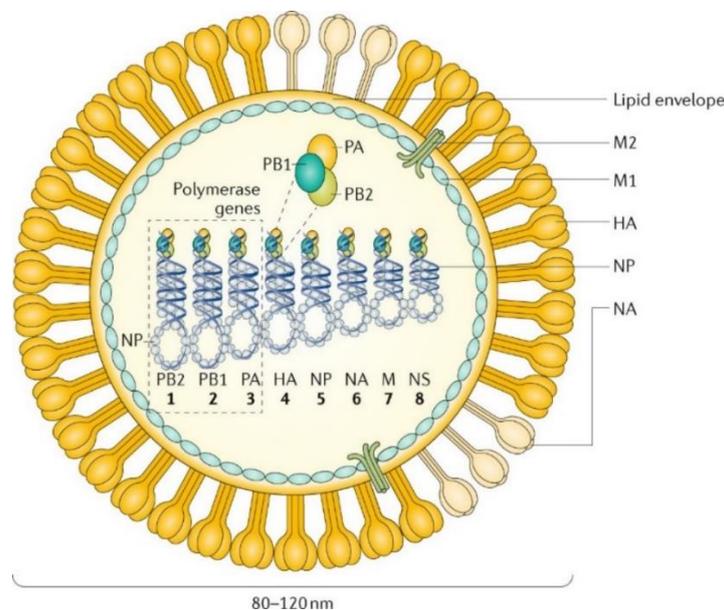
La morphologie des VIA est très variable allant d'une forme sphérique avec un diamètre d'environ 80 – 120 nm à des formes filamenteuses avec une longueur supérieure à 300 nm (**figure 2**). Les formes filamenteuses sont principalement retrouvées dans les isolats cliniques alors que les formes sphériques sont surtout observées après passage des virus en culture cellulaire ou infection des œufs embryonnés (Suarez, 2016).



*Figure 2 : Virions influenza A (souche H7N9) vus au microscope électronique  
a) forme sphérique ; b) forme filamenteuse (source : CDC, 2017)*

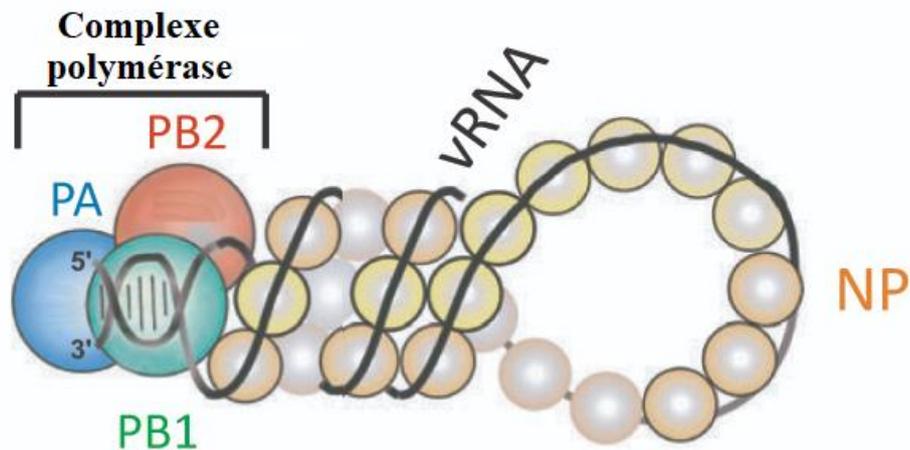
Le virion (ou particule virale) des VIA (**figure 3**) est entouré d'une enveloppe lipidique issue de la membrane cellulaire de l'hôte infecté au cours du processus de bourgeonnement viral. L'enveloppe lipidique comporte deux glycoprotéines : l'hémagglutinine (HA) et la Neuraminidase (NA) et une protéine non glycosylée, appelée protéine de matrice 2 (M2) formant des canaux membranaires permettant le transport d'ions H<sup>+</sup> à travers l'enveloppe virale (Cheung & Poon, 2007).

Sous l'enveloppe virale se trouve une couche de protéines de matrice 1 (M1). HA et NA sont des glycoprotéines de pointe ancrées dans la bicouche lipidique par de courtes séquences d'acides aminés. À l'intérieur du virion, on retrouve la nucléoprotéine (NP) et le complexe polymérase qui est composé de deux polymérases basiques, 1 et 2 (PB1 et PB2), et d'une polymérase acide (PA) (Bouvier & Palese, 2008). Les huit segments d'ARN viraux (ARNv) négatifs sont liés à la NP et aux ARN polymérases du virus de la grippe pour former des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) (**figure 4**) au nombre de 8 (Lamb & Choppin, 1983). Il y a également dans le virion une protéine non structurale 2 (NS2) en faible quantité intervenant dans le transport des RNP vers l'extérieur de la cellule (Yasuda et al., 1993).



*Figure 3 : Schéma d'une particule de VIA*

Représentation schématique d'une particule de VIA avec sa membrane lipidique et ses différentes protéines virales d'après Krammer et al., 2018



*Figure 4: Ribonucléoprotéine (RNP) des VIA*

Schéma représentant une ribonucléoprotéine virale, composée d'un brin d'ARNv (vRNA) associé à la NP et du complexe polymérase constitué des protéines PB1, PB2 et PA qui se lient aux extrémités 3' et 5' de l'ARNv. D'après Chenavas et al., 2013.

## 2. Structure du génome

Le génome des virus influenza A est formé de huit segments (**tableau 1**) avec une taille variant de 890 (segment 8) à 2341 nucléotides (segments 1 et 2) (McCauley & Mahy, 1983; Palese, 1977).

Les différents segments codent au moins pour 17 protéines et sont numérotés par ordre décroissant de leur nombre de nucléotides (tableau 1). Les segments 1, 4, 5 et 6 ne codent que pour une seule protéine : les protéines PB2, HA, NP et NA (Bouvier & Palese, 2008). Le segment 2 code pour la PB1 et également pour la protéine accessoire PB1-F2 qui est une petite protéine de 87 acides aminés dans un cadre de lecture alternatif +1 et la protéine PB1-N40 (W. Chen et al., 2001). Le segment 3 code pour la PA et 3 autres protéines (PA-X, PA-N155 et PA-N182). Le segment 7 code pour les protéines de matrice M1, M2 et M42. Enfin, le segment 8 code pour le NS1 et par l'épissage de l'ARNm pour les NS2/NEP et NS3 (Bouvier & Palese, 2008; Lamb & Choppin, 1983).

Tableau 1: les 8 segments des VIA et les protéines codées

N° du segment	Nombre* (Nucléotides)	Protéine(s) encodées	Nombre* (Acides aminés)	Fonctions de la protéine
1	2341	PB2	759	Sous-unité du complexe polymérase, interagit directement avec PA, reconnaissance de la coiffe des ARNm viraux, action sur le spectre d'hôtes et la virulence des VIA
2	2341	PB1	757	Sous-unité catalytique complexe polymérase, responsable de l'élongation de l'ARN et nécessaire à la fois pour la réplication et la transcription
		PB1-F2	87	Contribution à la pathogenèse virale, activité pro-apoptotique, interaction avec PB1 pour influencer l'activité du complexe polymérase
		PB1-N40	718	Maintient l'équilibre entre l'expression de PB1 et de PB1-F2
3	2233	PA	716	Sous-unité du complexe polymérase, activité protéase, activité d'endonucléase de l'ARN (cap snatching)
		PA-X	252	Module la réponse de l'hôte et la virulence du virus
		PA-N155	568	Non déterminées
		PA-N182	535	Non déterminées
4	1778	HA	550	Glycoprotéine de surface, antigène majeur, responsable de la reconnaissance et de la liaison avec les récepteurs (acides sialiques) des cellules cibles
5	1565	NP	498	Composant majeur du complexe RNP viral et contrôle l'importation nucléaire de l'ARN
6	1413	NA	454	Glycoprotéine de surface, clivage de l'acide sialique, libération du virus des cellules infectées.
7	1027	M1	252	Composant principal de l'enveloppe virale, rôle dans l'assemblage des virions et l'infection, régulation de l'exportation nucléaire de l'ARN
		M2	97	Canal ionique et rôle dans l'assemblage du virus.
		M42	99	Peut compenser la perte de M2
8	890	NS1	230	Protéine antagoniste de l'interféron Régule l'expression des gènes de l'hôte et du virus.
		NS2 (NEP)	121	Exportation des RNP à partir du noyau
		NS3	174	Potentiellement associée à l'adaptation du virus

\*Les nombres en nucléotide et en acides aminés sont ceux du virus influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9).

D'après Bouvier & Palese, 2008; Cheung & Poon, 2007; Vasin et al., 2014

### 3. Cycle Viral

Le cycle viral des VIA (**figure 5**) peut être divisé en trois principales étapes : (1) Attachement, endocytose et décapsidation du virus, (2) Réplication, transcription et traduction, (3) Assemblage, bourgeonnement et libération des virons.

#### a. Attachement, endocytose et décapsidation du virus

Le processus d'infection des VIA est initié lorsque la glycoprotéine de surface HA s'attache à travers son site de liaison au récepteur des cellules cibles. La HA s'assemble en trimères constitués chacun de deux parties, HA1 et HA2, maintenues ensemble par un pont disulfure. La HA1 est la partie globulaire responsable de l'attachement et elle porte également les principaux déterminants antigéniques. La HA2, quant à elle, est une tige allongée qui va permettre à la HA de s'insérer dans l'enveloppe virale (Bouvier & Palese, 2008). Les récepteurs cellulaires auxquels les VIA s'attachent sont constitués d'une molécule d'acide sialique : l'acide N-Acétyl-Neuraminique (Neu5Ac). Cette molécule est liée au galactose par deux principaux types de liaisons : [Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal], et [Neu5Ac( $\alpha$ 2-6)Gal], qui sont très importantes pour la spécificité des VIA (Skehel & Wiley, 2000). Les voies respiratoires de l'homme comportent principalement des acides sialiques  $\alpha$ 2-6 et chez les espèces aviaires les récepteurs cellulaires sont majoritairement des acides sialiques  $\alpha$ 2-3. Ainsi, les virus humains reconnaissent plutôt la liaison en  $\alpha$ (2,6) alors que les VIA aviaires se lient préférentiellement aux récepteurs  $\alpha$ 2-3 (Connor et al., 1994; Ito & Kawaoka, 2000). Cette différence entre les récepteurs cellulaires mammifères et aviaires est considérée comme l'un des principaux facteurs qui rend difficile le franchissement de la barrière d'espèce. Cependant, les porcs ont les deux types de récepteurs et peuvent être infectés à la fois par les virus humains et aviaires, raison pour laquelle cette espèce est considérée comme très importante dans l'épidémiologie des VIA (Samji, 2009). À la suite de la liaison aux récepteurs cellulaires, le virus pénètre à l'intérieur de la cellule hôte par endocytose tout en étant enfermé dans un endosome dont les membranes vont fusionner (à cause d'un pH faible de l'ordre de 5 à 6) et permettre la libération des segments ribonucléoprotéiques viraux dans le cytoplasme (Skehel & Wiley, 2000).

## **b. Réplication, transcription et traduction**

La transcription et la réplication des VIA se font dans le noyau, par conséquent, les segments RNP viraux libérés dans le cytoplasme de la cellule infectée doivent rentrer dans le noyau. Les protéines formant les RNP viraux (PB2, PB1, PA, NP) possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS) pouvant se lier à la machinerie d'importation vers le noyau de la cellule hôte (Boulo et al., 2007). À l'intérieur du noyau, les ARNs viraux, de polarité négative, sont transcrits en ARN messager (ARNm) et répliqués via l'ARN complémentaire (ARNc) qui est de polarité positive (Engelhardt & Fodor, 2006). Les sous-unités de la polymérase virale (PB1, PB2 et PA) et la NP catalysent à la fois la réplication du génome et la transcription. Plusieurs molécules de la cellule hôte interviennent également dans ces opérations. Les ARNm portent une queue polyA (polyadénylés). A la maturation, ils sont exportés vers le cytoplasme pour être traduits. Les ARNs positifs (ou ARNc) qui ne portent pas de queue polyA (non polyadénylés) restent dans le noyau et servent de matrice pour la synthèse d'ARNs viraux négatifs (Watanabe et al., 2010). Les ARNs négatifs du génome viral s'associent avec la protéine NP pour former les ribonucléoprotéines associées au complexe polymérase. Dans le cytoplasme de la cellule, les protéines virales PB2, PB1, PA, NP, NS2 et M1 sont synthétisées dans le cytoplasme et acheminées vers le noyau et les protéines HA, NA et M2 formant l'enveloppe lipidique sont transportées vers la membrane de la cellule hôte (Samji, 2009; Skehel & Wiley, 2000).

## **c. Assemblage, bourgeonnement et libération des virions**

La membrane plasmique de la cellule hôte est utilisée pour former les nouvelles particules virales. Le bourgeonnement est initié par les protéines HA et NA qui sont transportées vers la face interne de la membrane cytoplasmique et forment ainsi des radeaux lipidiques provoquant une altération de la membrane. Ensuite, les protéines NP se lient aux brins d'ARNv de polarité négative pour former les RNP qui vont s'allier à la protéine M1 pour former la matrice. Enfin, une accumulation de M2 entre le virion et la membrane cytoplasmique permet la scission de cette dernière (Nayak et al., 2009; Rossman & Lamb, 2011). Les nouveaux virions, formés à l'issue du processus d'assemblage et de bourgeonnement se détachent alors de la cellule infectée par clivage de la HA par la NA.

Les particules virales ainsi libérées diffusent à travers la couche de mucus pour infecter d'autres cellules et un nouveau cycle recommence.

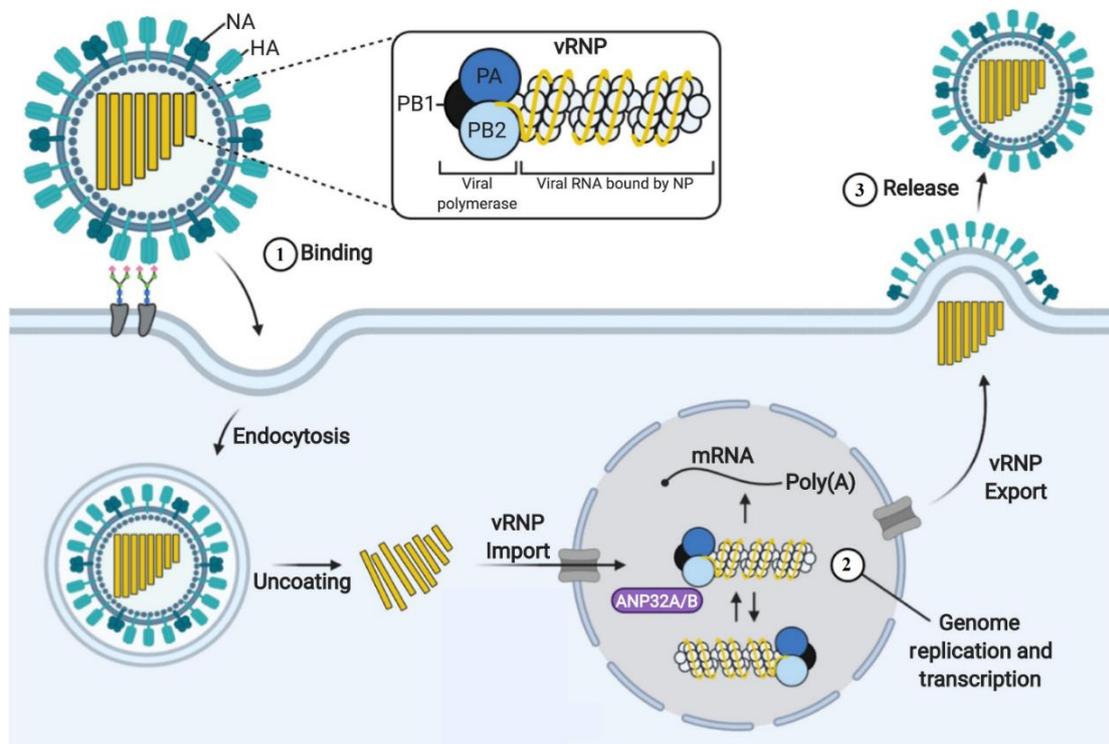


Figure 5 : Cycle viral des virus influenza A

Schéma représentant les principales étapes du cycle viral des virus influenza A. Adapté d'après (Cimini et al., 2021).

## C. Classification et spectre d'hôtes des virus influenza A

### 1. Classification et nomenclature des VIA

Les VIA sont divisés en sous-types en fonction des deux glycoprotéines de surface : la HA et la NA (WHO, 1980). À ce jour, il existe 18 sous-types d'hémagglutinine (H1 à H18) et 11 sous-types de neuraminidase (N1 à N11) (Fouchier et al., 2005; Hinshaw et al., 1982; Röhm et al., 1996; WHO, 1980; Y. Wu et al., 2014). Les sous-types sont ainsi nommés en combinant les numéros de H et de N (ex. H5N1). Les deux derniers sous-types, H17N10 et H18N11 récemment découverts, ont été isolés chez des chauves-souris (Y. Wu et al., 2014). Chez les oiseaux, plus de 140 combinaisons possibles d'HA/NA ont été identifiées (AbuBakar et al., 2023). Les sous-types peuvent être également subdivisés en différents clades (ou groupes) et sous-clades (ou sous-groupes) en fonction des caractéristiques phylogénétiques de leur

gène HA et de leur provenance d'un même ancêtre commun (Donis et al., 2008). La dénomination des VIA se fait selon la nomenclature internationale acceptée par l'OMS (WHO, 1980) et le nom doit contenir les différents éléments ci-dessous dans l'ordre suivant : le type antigénique (A pour les VIA)/ l'espèce hôte chez qui le virus a été collecté, (pas de désignation s'il s'agit de l'Homme)/l'origine géographique/le numéro du spécimen/l'année de collecte/ le sous-type. Par exemple, pour un virus de sous-type H5N1 identifié chez un poulet au Mali en 2020, le virus devra être nommé comme suit : A/chicken/Mali/001/2020(H5N1).

## 2. Spectre d'hôtes et transmission des VIA

Les oiseaux sauvages et aquatiques appartenant à l'ordre des Ansériformes (ex. canards, oies et cygnes) et à celui des Charadriiformes (ex. oiseaux de rivage et mouettes) constituent l'hôte naturel et le principal réservoir des VIA chez lesquels ces virus circulent de manière asymptomatique (Webster et al., 1992). En effet, chez ces animaux, on retrouve l'ensemble des types de HA (H1 à H16) et de NA (N1 à N9) observés habituellement chez les oiseaux (Joseph et al., 2017; Webster et al., 1992).

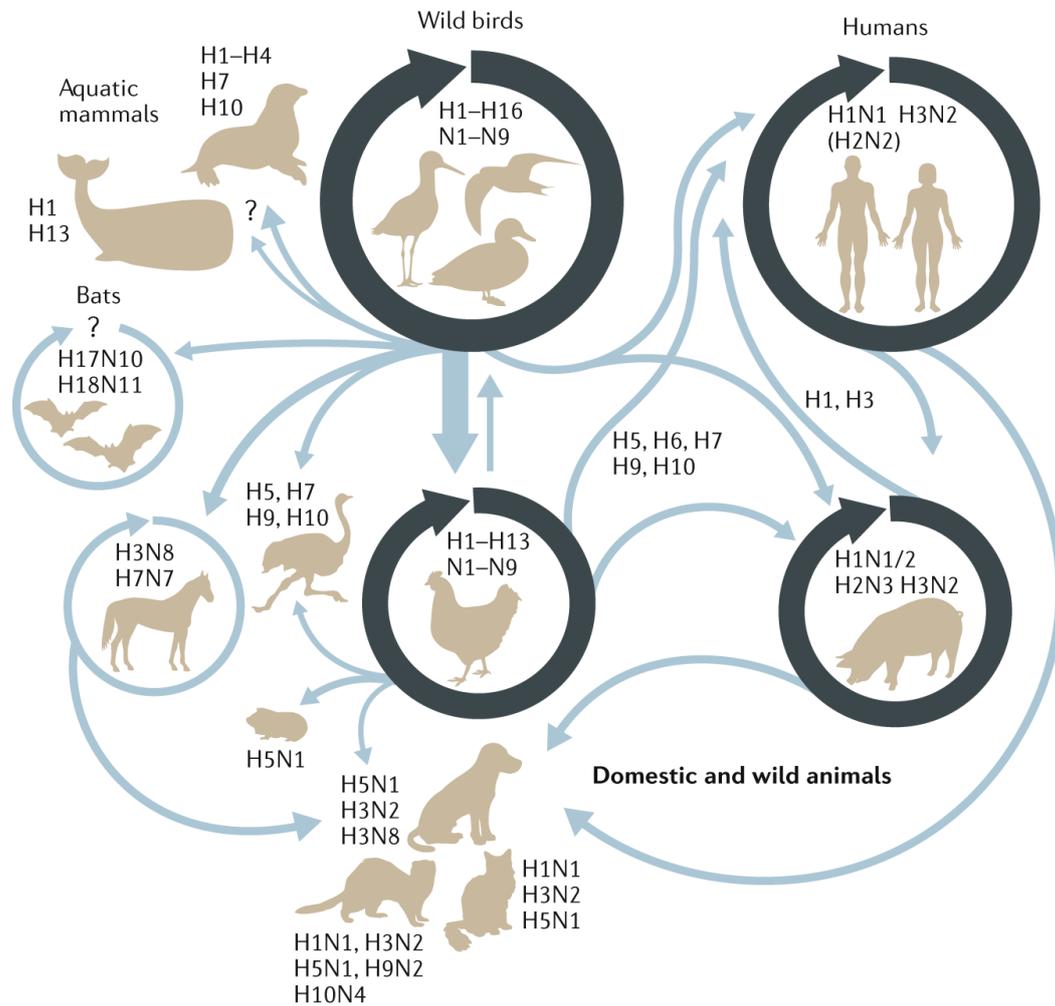
Le spectre d'hôte des VIA est très large (**figure 6**) puisque ces virus ont été identifiés chez plus d'une centaine d'espèces d'oiseaux domestiques et sauvages ainsi que chez diverses espèces de mammifères, notamment l'homme, le cheval, le porc, le chien, le chat et certaines espèces de mammifères marins (Wahlgren, 2011). La plupart des VIA sont adaptés à leur hôte naturel et ne franchissent que très rarement la barrière d'espèces pour infecter de nouveaux hôtes (Webster et al., 1992). En infectant une nouvelle espèce hôte, un VIA parvient souvent à se répliquer et à causer une maladie, mais généralement le virus ne se transmet pas suffisamment bien dans la nouvelle espèce pour provoquer une épidémie (Suarez, 2000). Par exemple, le virus H5N1 apparu à Hong Kong en 1997 chez des poulets a été transmis au moins plusieurs centaines de fois à l'Homme, mais aucun cas de transmission interhumaine n'a été signalé (Mounts et al., 1999). Cependant, cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée puisque plusieurs épidémies suite à l'infection d'une

nouvelle espèce hôte par un VIA ont été décrits dans la littérature. On peut citer en exemple le virus H1N1 classique qui a régulièrement franchi la barrière d'espèce entre le porc et la dinde, causant ainsi plusieurs épizooties chez cette dernière (Aymard et al., 1985; Ficken et al., 1989; Pedroni et al., 2012). Généralement, le franchissement de la barrière d'espèce par un VIA dépend du sous-type et nécessite une interaction étroite entre le nouvel hôte et le virus (Spackman, 2008).

Les facteurs déterminant le spectre d'hôtes des VIA ne sont pas encore complètement élucidés, même si le gène HA est considéré comme étant l'un des principaux facteurs en raison de son rôle dans la reconnaissance et l'attachement des VIA aux récepteurs des cellules hôtes. Bien que tous les sous-types de VIA dans la majorité des combinaisons possibles aient été détectés chez les oiseaux domestiques et sauvages (**figure 6**), certains sous-types de HA semblent être bien adaptés aux mammifères : H1, H2, H3 chez l'Homme, H3 et H7 chez le cheval et H1 et H3 chez le porc. Les mécanismes à l'origine de l'adaptation de ces souches aux mammifères ne sont pas encore bien connus, mais il est possible qu'une caractéristique non encore identifiée leur permettent d'évoluer spécifiquement chez ces espèces (Webster et al., 1992).

Une première exposition d'oiseaux domestiques vivant en liberté aux VIA peut résulter d'un contact direct avec des oiseaux aquatiques infectés ou leur zone d'habitat. Cette exposition peut ne pas entraîner une transmission durable du virus chez les volailles domestiques, particulièrement s'il n'est pas adapté à la nouvelle espèce hôte (Vandegrift et al., 2010). Cependant, dans certaines situations, une transmission sporadique peut survenir, permettant au virus de s'adapter progressivement à la nouvelle espèce hôte et de se maintenir durablement au sein de cette espèce. Par ailleurs, un virus adapté aux volailles domestiques cause rarement des épidémies dans les populations de volailles aquatiques (Suarez, 2016). C'est pourquoi, il est estimé que ces oiseaux ne jouent qu'un rôle très limité, voire nul, dans la dissémination secondaire ou la propagation des VIA adaptés aux volailles domestiques entre les élevages (Sims et al., 2016). L'introduction des VIA dans un élevage de volailles domestiques se fait par contact direct avec des oiseaux infectés issus d'autres élevages ou indirect, soit par l'intermédiaire des mouvements de

personnes ou des mouches ou rongeurs (voie mécanique), soit à travers des équipements ou matériels contaminés, de l'eau, des aliments contaminés ou par aérosol (Sims et al., 2016).



**Figure 6 : Spectre d'hôtes et transmission des VIA**

Schéma représentant le spectre d'hôte et la transmission des principaux VIA. Les VIA (sous-types HA 1 à 16) circulent chez les oiseaux sauvages qui constituent leurs réservoirs. Ces différents sous-types peuvent passer à de nombreuses espèces, parfois à travers un hôte intermédiaire ou parfois par des mutations adaptatives (flèches bleu clair). Certains sous-types prédominent chez certaines espèces (cercles bleu foncé). Les virus H1N1 et H3N2 circulent actuellement chez l'homme, tandis que les virus H2N2 n'est plus détecté. Ces trois sous-types circulent également chez les porcs. Les sous-types H5, H6, H7, H9 et H10 ont causé une infection chez l'homme à la suite d'une exposition à des volailles infectées. Les sous-types H17 et H18 ne circulent que chez les chauves-souris. D'après Long et al., 2018.

## D. Evolution et variabilité génétique des VIA

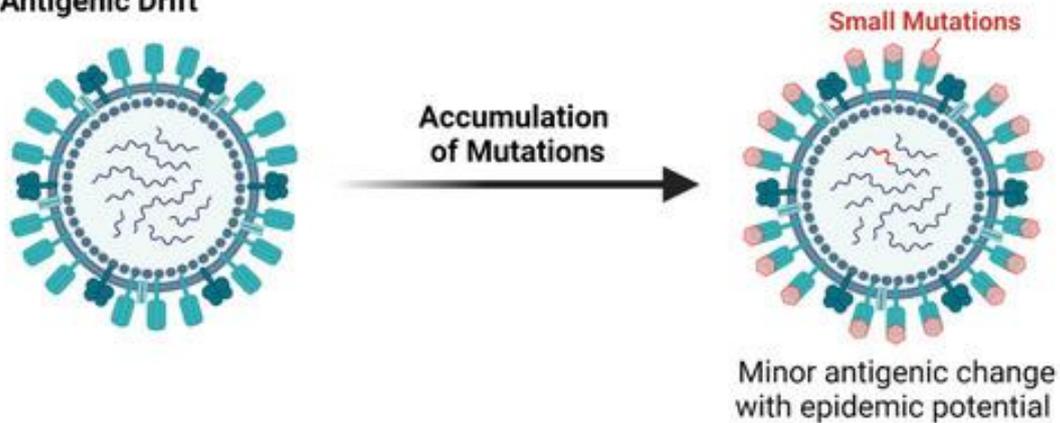
Les VIA sont des virus en constante évolution, ce qui leur permet d'avoir une grande variabilité génétique et antigénique, d'échapper ainsi à la réponse immunitaire de l'hôte et d'entraver la réussite de la vaccination. En effet, les VIA possèdent deux mécanismes principaux (figure 7) qui leur assurent cette diversité antigénique, à savoir : la dérive antigénique (*antigenic drift* en anglais) et la cassure antigénique (réassortiment ou *antigenic shift* en anglais) (Krammer et al., 2018).

La dérive antigénique est un processus par lequel des changements mineurs sont introduits dans les bases nucléotidiques des gènes viraux à travers des mutations ponctuelles dans le génome viral, causant ainsi des modifications au niveau des protéines pour lesquelles ces gènes codent (**figure 7A**) (Kim et al., 2018). En effet, de fréquentes mutations sont introduites dans le génome des VIA suite à des erreurs de transcription à cause de l'absence de mécanismes de relecture associés à l'ARN polymérase ARN-dépendante codée par le virus lors de la réplication (Steinhauer et al., 1992). La plupart de ces mutations conduisent à des modifications mineures des gènes ou protéines viraux, ou à la formation de progénitures virales non viables. Ces mutations délétères sont généralement perdues au cours du processus de sélection visant à obtenir les virus les plus adaptés dans une population (Pybus et al., 2007). Cependant, certaines mutations peuvent se produire au niveau des épitopes des deux glycoprotéines de surface HA et/ou NA (Suarez, 2016). Ainsi, les virus possédant ces mutations sont rapidement ciblés par le système immunitaire de l'hôte, conduisant à une dérive antigénique (Webby & Webster, 2001). Bien que ces mutations puissent concerner les huit segments d'ARN viraux, le taux de mutation le plus élevé est observé au niveau de HA à cause de la pression exercée par les anticorps de l'hôte à la suite d'une exposition antérieure au virus ou d'une vaccination (Suarez, 2016). En effet, les sites antigéniques des VIA ciblés par les anticorps de l'hôte se trouvent sur la tête globulaire de la protéine HA, proches du site de liaison des virus aux récepteurs cellulaires (Wilson et al., 1981). Les anticorps, en se fixant sur les sites antigéniques, bloquent l'attachement des virus aux cellules et par la même occasion l'infection de l'hôte. Des mutations au niveau de ces sites antigéniques permettent ainsi

aux VIA d'échapper à l'action des anticorps. Ces mutations au niveau des sites antigéniques constituent un problème majeur pour la réussite de la vaccination. En effet, la protection vaccinale est principalement assurée par la production d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine HA et, dans une moindre mesure, contre la protéine NA, bien que d'autres protéines virales, notamment la NP, puissent également être ciblées (C.-W. Lee & Suarez, 2005). La dérive antigénique des VIA permet ainsi le remplacement des anciens virus par de nouveaux variants qui diffèrent progressivement de la souche d'origine. C'est pourquoi, chez l'Homme, les souches vaccinales utilisées contre les VIA sont évaluées chaque année afin de déterminer si les souches de virus en circulation sont toujours neutralisées par les anticorps produits par les souches vaccinales ou s'il faut réactualiser le vaccin (Suarez, 2016).

Le second mécanisme assurant une grande variabilité antigénique aux VIA est la cassure antigénique ou réassortiment (**figure 7B**). Contrairement à la dérive antigénique due à des mutations ponctuelles, le réassortiment correspond à des changements majeurs au niveau des sites antigéniques des VIA (Krammer et al., 2018). Il fait suite à un échange d'un ou plusieurs gènes viraux entre deux VIA. L'impact est maximal lorsque HA et/ou NA de deux virus de sous-type différent sont échangés lors d'une co-infection d'un même hôte, pouvant conduire à l'émergence de nouveaux sous-types antigéniquement distincts (Mostafa et al., 2018). Ces nouveaux virus peuvent facilement se propager et occasionner des épizooties importantes, voir des pandémies à cause d'une absence de protection immunitaire de la population hôte (Suarez, 2016). On peut citer en exemple, l'émergence du virus pandémique A(H1N1) de 1918 résultant de la transmission d'un virus aviaire à l'homme ou plus récemment le virus pandémique A(H1N1) de 2009 possédant des segments de virus aviaires, humains et porcins qui ont tous circulé chez le porc avant l'émergence du virus pandémique chez l'Homme (Garten et al., 2009; Kim et al., 2018).

**(A) Antigenic Drift**



**(B) Antigenic Shift**

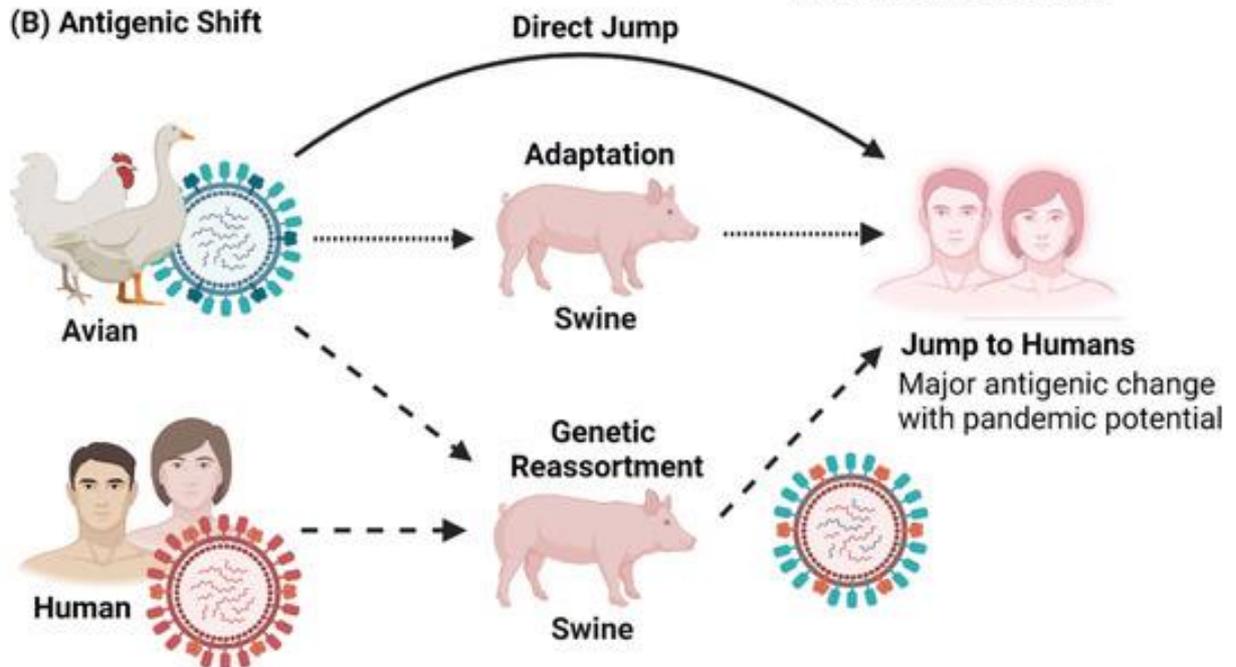


Figure 7: Dérive et cassure antigénique des VIA

Schéma illustrant la dérive et la cassure antigéniques chez les VIA. (A) Dérive antigénique entraînant des modifications antigéniques mineures dues à une accumulation de mutations. (B) Cassure antigénique entraînant des modifications antigéniques majeures par saut direct, adaptation et réassortiment génétique. D'après Yi Yeo et al., 2021.

## E. Pathogénie des virus influenza A chez les volailles

### 1. Pathotype

La plupart des VIA qui circulent chez la volaille domestique, et notamment les poulets et les dindes, le font de manière asymptomatique ou ne provoquent que des maladies bénignes, principalement une infection modérée des voies respiratoires et /ou entériques. Ces virus sont appelés des virus influenza aviaire faiblement pathogène (VIAFP). En général, les VIAFP ne provoquent pas un taux de mortalité élevé dans les troupeaux infectés, même s'ils ont été quelques fois associés à des foyers d'influenza aviaire avec une mortalité assez importante (El Houadfi et al., 2016; Jeevan et al., 2019; Nili & Asasi, 2003). En revanche, d'autres groupes de VIA aviaires sont responsables d'une maladie virale systémique chez les volailles, avec des lésions nécrobiotiques, hémorragiques et inflammatoires, causant une mortalité très élevée dans les élevages. Ces derniers sont qualifiés de virus influenza aviaires hautement pathogène (VIAHP). Les VIAHP peuvent provoquer un taux de mortalité entre 90-100 % dans un troupeau et des épizooties susceptibles d'avoir des impacts très importants sur le secteur avicole (Rovid Spickler, 2006; Suarez, 2016).

Chez les VIA, la glycoprotéine HA est produite sous forme de précurseur, HA0, et doit être clivée en sous-unités HA1 et HA2 par les protéases de l'hôte après le processus de transduction pour être fonctionnelle. En effet, ce clivage de la HA est nécessaire pour que les particules virales deviennent infectieuses (Klenk & Rott, 1988; Wahlgren, 2011). La principale différence entre les VIAFP et les VIAHP se trouvent au niveau du site de clivage de la HA. Les VIAFP possèdent un site de clivage avec un seul acide aminé basique, généralement l'arginine (QRETR/G pour VIAFP de sous-type H5 et NPKTR/G pour H7). Ainsi, les protéines HA des VIAFP ne sont clivées que par les protéases extracellulaires de l'hôte telle que la trypsine ou les protéases de type trypsine (plasmine ou tryptase Clara) et ne peuvent donc se répliquer que dans des tissus où ces enzymes sont présents : dans les voies respiratoires et intestinales (Capua & Alexander, 2009a; Suarez, 2016). Par contre, le site de clivage de la HA des VIAHP est polybasique (**tableau 2**) avec plusieurs acides aminés basiques (arginine et lysine) dû à une insertion ou substitution d'acides aminés et

peut être ainsi clivé par une ou plusieurs protéases ubiquitaires intracellulaires dont la furine (Senne et al., 1996; Stieneke-Grober et al., 1992; Wood et al., 1993), ce qui permet aux VIAHP de pouvoir se répliquer dans tous les tissus et organes de l'hôte (**figure 8**).

Les VIAFP se retrouvent dans tous les sous-types de HA et de NA alors que, jusqu'à présent, seuls certains VIA aviaires des sous-types H5 et H7 se sont révélés hautement pathogènes, causant ainsi chez les espèces sensibles l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) (Capua & Alexander, 2009b). Il est généralement admis que ces souches proviennent de LPAIV H5 et H7, qui après mutations ont pu circuler chez les volailles (Suarez, 2016). Cependant, les facteurs à l'origine de ces mutations des VIAFP en VIAHP ne sont pas totalement élucidés. Dans certaines situations, les mutations se produisent dès l'introduction du virus dans un troupeau à partir d'oiseaux sauvages, et dans d'autres cas, le virus peut circuler pendant de très longues périodes avant de muter. C'est pourquoi, il est quasiment impossible de les prédire. Toutefois, il semble qu'une forte prévalence des VIAFP dans une population augmente le risque d'émergence de souches de VIAHP (Capua & Alexander, 2009a).

Les VIAHP ne causent pas nécessairement une maladie chez toutes les espèces de volailles. En effet, leur virulence et la gravité des symptômes observés chez un hôte peuvent varier en fonction de la souche virale et de l'espèce d'oiseau (Capua & Alexander, 2009b). Par exemple, les canards ne présentaient que très rarement des signes cliniques avant l'émergence du H5N1 en Asie et certains VIAHP de sous-types H5 isolés chez des poulets n'étaient pas virulents (Capua & Alexander, 2009b; Londt et al., 2010). Les oiseaux sauvages ne semblent pas être très sensibles à tous les VIAHP même si des foyers ont été rapportés ces dernières années (Kleyheeg et al., 2017; Lo et al., 2022). Il est important de noter que les VIAHP H5Nx sont actuellement à l'origine de plusieurs vagues épizootiques sans précédent affectant à la fois les espèces d'oiseaux domestiques et sauvages associées à des cas d'infections chez des mammifères dont l'Homme à travers le monde (FAO, 2023).

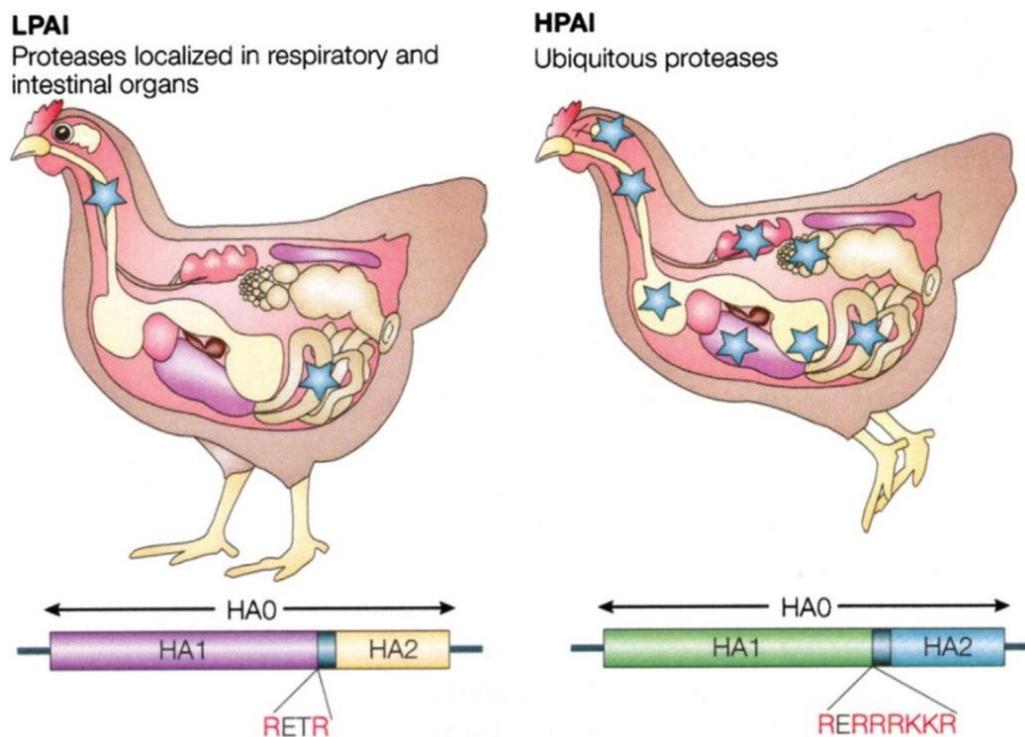


Figure 8 : Infections par les VIAFP et VIAHP

Schéma illustrant l'infection d'un poulet par un VIAFP ou un VIAHP d'après Wahlgren, 2011.

Tableau 2 : Motifs du site de clivage et l'IPIV des VIAHP

VIAHP	Sous-type	Site de clivage HA0	IPIV
A/goose/Guandong/1/96	(H5N1)	PQRRRRKKR/GLF	2,1
A/chicken/Eurasia&Africa/2003	(H5N1)	PQRRRRKKR/GLF	2,1
A/turkey/England/50-92/91	(H5N1)	PQRKRKTR/GLF	3
A/Egyptian goose/South Africa/04	(H5N2)	PQREKRRKKRGLF	2,73
A/chicken/Italy/330/97	(H5N2)	PQRRRKKR/GLF	3
A/chicken/Texas/2004	(H5N2)	PQRKKR/GLF	0
A/turkey/Italy/99	(H7N1)	PEIPKGSRVRR/GLF	3
A/chicken/Canada-BC/2004	(H7N3)	PENPKQAYRKRMTTR/GLF	2,87
A/chicken/Netherlands/2003	(H7N7)	PEIPKRRRR/GLF	2,94
A/chicken/Pakistan/447/94	(H7N3)	PETPKRRKR/GLF	2,86

IPIV : Indice de pathogénicité intraveineuse

Adapté d'après (Capua & Alexander, 2009a)

D'autres régions de la protéine HA comme les sites de glycosylation et notamment celui en position 10-12 sur la HA1 peuvent jouer un rôle dans le phénotype VIAHP. En effet, ce site de glycosylation est très proche du site de clivage de la HA et il a été associé à une variation de la virulence chez les VIA (Deshpande et al., 1987).

Une autre méthode permettant de différencier les phénotypes de VIAFP et VIAHP est le test de pathogénicité intraveineux (indice de pathogénicité intraveineuse, IPIV) qui est

déterminé en inoculant le virus à dix poulets âgés de six semaines, éclos d'œufs issus d'un cheptel exempt d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS). Ces animaux sont ensuite observés pendant une période de 10 jours et les signes cliniques sont notés chez les oiseaux toutes les 24 heures. Chaque oiseau est noté en fonction de son état de santé : la note de 0 si l'oiseau ne présente pas de signes cliniques, la note de 1 s'il est malade, la note de 2 s'il est sévèrement malade et enfin la note de 3 s'il meurt. L'IPIV correspond au score moyen par oiseau et par observation (OIE, 2022b). Un indice de pathogénicité intraveineux (IPIV) supérieur à 1,2 correspond à un VIAHP (**tableau 2**), conformément aux critères adoptés par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA). Cependant, pour les VIA de sous-types H5 et H7, cette méthode peut être remplacée par une analyse moléculaire du site de clivage de la HA pour pouvoir confirmer la présence d'un phénotype VIAHP (OIE, 2022a). Il est important de noter que la classification sur la base des phénotypes VIAHP et VIAFP n'est spécifique qu'au poulet, et dans une certaine mesure aux autres espèces galliformes apparentées. Elle ne permet pas de prédire la pathogénicité potentielle des VIA aviaires chez les mammifères incluant l'homme (Sims et al., 2016).

## 2. Marqueurs moléculaires de virulence et d'adaptation aux mammifères

Des marqueurs moléculaires identifiés sur les segments viraux des VIA aviaires (**tableau 3**) ont été associés à une adaptation de ces virus aux mammifères ou à une augmentation de leur virulence. Lorsque ces virus franchissent la barrière d'espèces en infectant des mammifères, dont l'homme, des mutations génétiques peuvent survenir au niveau du génome pour l'adaptation de ces virus au nouvel hôte (Joseph et al., 2017; Romero-Tejeda & Capua, 2013; Schrauwen & Fouchier, 2019; Suttie et al., 2019). C'est pourquoi, il est important de suivre l'évolution génétique de ces virus afin d'identifier le plus rapidement possible les marqueurs pouvant éventuellement modifier le spectre d'hôtes et la virulence des VIA aviaires dans le but de limiter leur risque pour la santé publique. Les principales mutations qui ont été associées à l'adaptation des VIA aux mammifères et à une virulence accrue sont présentées dans le **tableau 4**.

**Tableau 3 : Principaux marqueurs liés à la virulence et à l'adaptation aux mammifères**

Gènes	Mutation <sup>a</sup>	Sous-types	Effets	Références
<b>HA</b>	T156A	H5N1	Liaison aux récepteurs de type humain $\alpha$ 2-6, transmission chez les cobayes	(Y. Gao et al., 2009)
	D94N N182K/D K189R/T Q192R/H	H5N1	Augmentation de l'affinité du virus pour les récepteurs de type humain type $\alpha$ 2-6	(L. M. Chen et al., 2012; Y. Gao et al., 2009; Peng et al., 2018; Su et al., 2008; Yamada et al., 2006)
	T190V	H9N2	Augmentation de l'affinité du virus pour les liaisons de type humain $\alpha$ 2-6 et réplication dans les cellules de mammifères	(Teng et al., 2016)
	I155T Q226L G228S	H5N1	Augmentation de l'affinité du virus pour les liaisons de type humain $\alpha$ 2-6 ; diminution de l'affinité pour les liaisons de type aviaire $\alpha$ 2-3	(Chrzastek et al., 2018; Chutinimitkul et al., 2010; X. Li et al., 2014)
	Q226L	H9N2	Augmentation de l'affinité du virus pour récepteurs de type $\alpha$ 2-6 ; amélioration de la réplication dans les cellules de mammifères et chez les furets ; transmission du virus par contact chez les furets	(Wan et al., 2008; Wan & Perez, 2007)
<b>PB2</b>	E627K D701N Q591K	H5N1	Augmentation de l'activité de la polymérase et amélioration de la réplication dans les cellules de mammifères ; virulence accrue et transmission du virus par contact chez le cobaye ; virulence accrue chez la souris	(Y. Gao et al., 2009; Z. Li et al., 2005; Shinya et al., 2010; Steel et al., 2009; E. K. Subbarao et al., 1993; Taft et al., 2015)
	M185I	H9N2	Marqueur spécifique aux mammifères	(Zhang et al., 2011)
	S714R	H9N2	Augmentation de l'activité de la polymérase dans les cellules de mammifères	(Sediri et al., 2016)
<b>PB1</b>	D3V N66S	H5N1	Amélioration de la réplication virale et virulence accrue chez la souris	(Elgendy et al., 2017; Schmolke et al., 2011)
	K577E	H9N2		(Kamiki et al., 2018)
<b>PA</b>	T97I	H5N1 H6N1	Augmentation de l'activité de la polymérase dans les cellules de mammifères et Virulence accrue chez la souris	(Cheng et al., 2014; M.-S. Song et al., 2009)
	K356R A515T	H9N2	Augmentation de l'activité de la polymérase et de la réplication virale dans les cellules de mammifères, virulence accrue chez la souris	(Hulse-Post et al., 2007; G. Xu et al., 2016)
<b>NP</b>	E434K	H9N2	Augmentation de l'activité de la polymérase dans les cellules de mammifères	(Sang et al., 2015)
	K470R	H5N1	Augmentation de l'activité de la polymérase et de la réplication virale dans les cellules de mammifères	(L. Chen et al., 2017)
<b>NS1</b>	E372D	H5N1 H9N2	Observée chez les VIA isolés chez l'homme	(G. W. Chen et al., 2006)
	P42S L103F I106M	H5N1	Virulence accrue chez la souris	(Jiao et al., 2008; Spesock et al., 2011)
<b>M1</b>	N30D T215A	H5N1	Virulence accrue chez la souris	(Fan et al., 2009)

<sup>a</sup> Numérotation H5 pour tous les gènes selon A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)

## **F. Virus influenza aviaire chez les volailles et chez l'Homme**

### **1. Influenza aviaire hautement pathogène chez les volailles**

L'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) est causée par une infection par les VIAHP. Elle représente l'une des maladies les plus dangereuses rencontrées chez les volailles. Cette maladie est responsable de nombreux foyers et d'énormes pertes économiques pour le secteur avicole dans le monde, mettant en danger les moyens de subsistance des éleveurs et le commerce international (Petrini & Vallat, 2009). L'IAHP se retrouve sur la liste des maladies à notifier à l'OMSA et doit être déclarée par les services vétérinaires nationaux dès l'apparition de foyers chez les volailles, y compris la faune sauvage (Petrini & Vallat, 2009). L'IAHP provoque divers symptômes chez les oiseaux atteints, notamment les poulets et les dindes. La maladie se caractérise notamment par des troubles nerveux, respiratoires et digestifs, un gonflement de la tête, une diminution du taux de ponte. Dans les formes les plus graves, une mortalité pouvant atteindre 100 %, est observée sans aucun symptôme préalable. Les lésions les plus fréquentes associées à l'IAHP sont les hémorragies et la nécrose au niveau de différents organes (Capua & Terregino, 2009; Suarez, 2016).

Il existe actuellement deux stratégies principales pour le contrôle et la prévention de l'IAHP : la vaccination et l'abattage sanitaire. L'abattage des animaux dans les foyers d'IAHP peut s'avérer très coûteux. Cependant, il représente en général la méthode de choix lors de l'apparition de la maladie dans un élevage. L'abattage sanitaire est généralement associé à des mesures préventives de biosécurité telles que l'interdiction des mouvements de volailles et la mise en place de zones de protection (3 km autour des foyers) et de surveillance (10 km autour des foyers) dans lesquelles des mesures spécifiques de prévention et de contrôle sont appliquées.

Quant à la vaccination, elle est principalement mise en œuvre dans le cadre de la prévention de l'IAHP même si elle s'est révélée efficace en interrompant l'excrétion asymptomatique du virus et sa transmission lors d'une épizootie de H5N1 chez les poulets à Hongkong (Ellis et al., 2004; Vandegrift et al., 2010). La vaccination a le double avantage

de réduire à la fois la sensibilité des oiseaux à la maladie et le clivage du virus. C'est pourquoi, plusieurs pays craignant que l'IHAP ne devienne enzootique mettent en œuvre des programmes de vaccination (Swayne, 2012). Cependant, la mise en œuvre d'une stratégie vaccinale contre l'IAHP se heurte à des défis majeurs. En effet, les coûts associés à la production de vaccins sont très importants et il est très difficile de maintenir les vaccins efficaces contre un virus doté d'une grande capacité de mutation (Vandegrift et al., 2010). De plus, les vaccins actuellement utilisés sont inactivés et nécessitent des coûts élevés en main d'œuvre. Néanmoins, de nouvelles techniques, comme la génétique inverse et les constructions chimériques, sont en cours de développement pour produire rapidement des vaccins efficaces, moins coûteux et pouvant contenir plusieurs souches de VIAHP (Herrera-Ong, 2023; Hoang et al., 2020). De plus, les vaccins à ARN et les vaccins recombinants notamment les vaccins vivants vectorisés par les virus de la maladie de Newcastle et de la variole aviaire ont montré des résultats satisfaisants sur le terrain (Kapczynski et al., 2017; Q. Liu et al., 2015; Suarez & Pantin-Jackwood, 2017).

Un autre défi important posé par la vaccination est qu'elle peut favoriser une circulation silencieuse des VIAHP et contribuer à leur évolution génétique (Iwani et al., 2009). C'est pourquoi, dans le cadre de la prévention et du contrôle de l'IHAP, les stratégies doivent se focaliser sur l'application des mesures de biosécurité et la mise en place d'une surveillance efficace des VIAHP.

La vaccination pose également un problème majeur sur le plan commercial, puisque les pays vaccinant contre les VIA sont généralement considérés comme endémiques et peuvent ainsi perdre leurs marchés d'exportation de volailles ou de leurs produits (Suarez, 2012). En effet, les tests sérologiques conventionnels ne permettent pas de différencier les anticorps produits à la suite d'une vaccination des anticorps produits en réponse à l'infection par les VIA (Hasan et al., 2016). C'est pourquoi le concept DIVA (*differentiate infected from vaccinated animals*) a été proposé avec comme objectif de pouvoir différencier les oiseaux vaccinés et non infectés des animaux vaccinés et infectés (Suarez, 2012).

Plusieurs stratégies DIVA ont été formulées dont la plus courante concerne l'utilisation d'oiseaux sentinelles non vaccinées. Certaines stratégies DIVA portent sur l'utilisation de

vaccins spécifiques comme les vaccins à sous-unités ciblés sur la protéine HA permettant une surveillance sérologique des protéines internes ou des vaccins avec une protéine HA identique à la souche circulant sur le terrain mais ayant un sous-type de neuraminidase hétérologue. Une autre stratégie DIVA consiste à mesurer la réponse sérologique à la protéine NS1 qui est différente entre les oiseaux vaccinés et les oiseaux infectés naturellement (Suarez, 2005).

## **2. Virus influenza aviaire chez l'homme et implications pour la santé publique**

Les VIA aviaires représentent une préoccupation majeure pour la santé publique. En effet, l'émergence et la propagation de ces virus au sein de la population humaine peuvent être à l'origine de pandémies associées à des taux de morbidité et de mortalité très élevés dans le monde (Cox et al., 2016). Toutefois, pour causer une pandémie, les VIA aviaires doivent non seulement franchir la barrière d'espèce mais aussi se maintenir dans la population à travers une transmission interhumaine.

Bien que les franchissements de barrière soit rare, probablement à cause de la spécificité du spectre d'hôtes de ces virus, ils ont été à l'origine de certaines pandémies dans le passé. On peut citer en exemple, les virus H1N1 pandémique de 1918 qui a été révélé par les analyses génétiques comme étant un virus d'origine aviaire qui s'est probablement ensuite adapté aux mammifères dont l'homme (Taubenberger et al., 2005, 2007). Il y a également le virus H2N2 responsable de la grippe asiatique de 1957 issu d'un réassortiment génétique entre les segments de virus aviaires et humains (Lindstrom et al., 2004).

Les VIA possèdent une très grande diversité génétique et il est quasiment impossible de prédire quel sous-type va émerger et à quel moment pour causer une pandémie. Néanmoins, le risque d'émergence d'un virus pandémique semble élevé puisque beaucoup de VIA aviaires (VIAHP H5Nx et VIAFP, H5N2, H6N1, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2 et H10N8) circulant largement chez la volaille ont franchi la barrière d'espèce et causé des infections chez l'homme (Cox et al., 2016; R. Gao et al., 2013; Jallow et al., 2020;

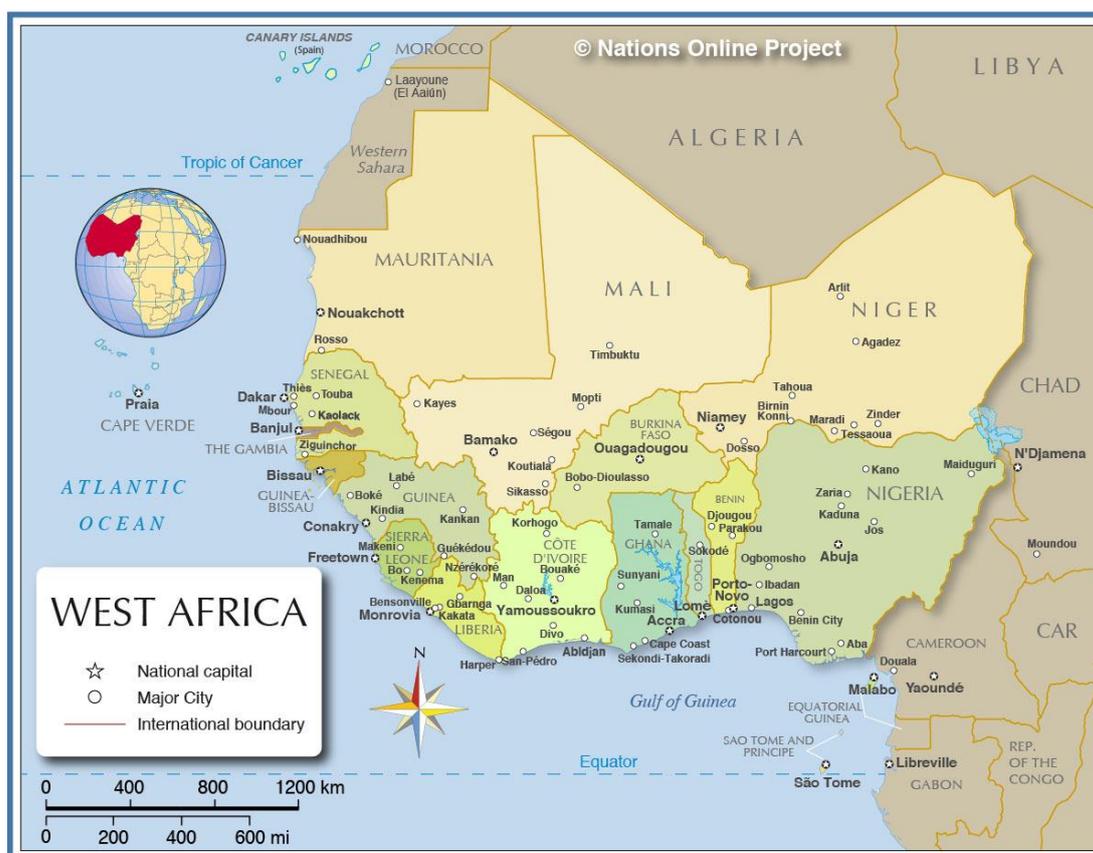
Suarez, 2016; To et al., 2014). En effet, malgré l'isolement du virus H5N1 chez les volailles depuis 1959, ce n'est qu'en 1997 que le risque zoonotique de ce virus a été reconnu, lorsque des cas de maladies chez l'homme associés à une mortalité importante chez les volailles ont été détectés à Hong Kong (Cox et al., 2016; Sims et al., 2003).

Durant les 20 dernières années, plus de 2619 cas d'infection humaine par les VIA aviaires causant 1080 décès (taux de létalité 41,23 %) dans le monde ont été signalés à l'OMS. Trois sous-types, notamment VIAHP H5N1, VIAFP H7N9 et VIAFP H9N2 étaient responsables de la majorité de ces infections (WHO, 2023a). La majorité des cas d'infection humaine causés par les VIA aviaires sont liés soit à un contact étroit avec les volailles soit à une exposition indirecte, particulièrement lors de visites dans les marchés à volailles. Cependant, des cas d'infection humaine ont été signalés sans que l'origine aviaire ne soit établie ou que des foyers ne soient observés chez les volailles (Cox et al., 2016).

Les infections humaines par les VIA aviaires peuvent provoquer un syndrome grippal avec des symptômes bénins au niveau des voies respiratoires supérieures, une maladie modérée, ou même grave avec des complications et l'atteinte des voies respiratoires inférieures pouvant entraîner la mort (Abdel-Ghafar et al., 2008; Beigel et al., 2005).

## G. Epidémiologie des VIAHP H5N1 et VIAFP H9N2 en Afrique de l'Ouest

L'Afrique de l'Ouest (**figure 9**) représente une région couvrant la partie occidentale de l'Afrique subsaharienne. Les pays se retrouvant dans cette région (exceptée la Mauritanie) forment un bloc économique régional appelé la CEDEAO (Communauté Économique des États de l'Afrique de l'Ouest). L'économie des pays d'Afrique de l'Ouest, repose essentiellement sur l'agriculture et l'élevage (Schneider et al., 2010).



*Figure 9 : Carte administrative de l'Afrique de l'Ouest*

Schéma illustrant la carte administrative des pays de l'Afrique de l'Ouest d'après (Nations Online, 2020)

L'élevage joue un rôle important dans l'économie des pays ouest-africains avec une contribution au produit intérieur brut (PIB) agricole pouvant aller jusqu'à 44 %. L'élevage constitue également une source primordiale de protéines alimentaires pour une région où la croissance démographique est très forte (Tondel, 2019). Cependant, le secteur de l'élevage dans cette région est fortement impacté par les maladies animales transfrontalières, comme l'IAHP, qui entraînent d'importantes répercussions sur la

production et la santé des animaux, ainsi que de l'Homme (Grace et al., 2015). En effet, les VIA aviaires, et particulièrement les virus présentant un phénotype hautement pathogène, représentent une menace importante pour le secteur avicole et les moyens de subsistance des éleveurs dans la région (Pavade et al., 2011). Ces virus ont été signalés dans la plupart des pays ouest-africains et les sous-types les plus détectés chez les volailles domestiques sont le VIAHP H5N1 suivi par le VIAFP H9N2 (Kalonda et al., 2020). Toutefois, il n'existe pas assez d'informations sur les caractéristiques génétiques, la circulation et les risques d'émergence de ces virus dans la région. En effet, la surveillance des VIA aviaires dans la plupart des pays de la région est passive et se limite généralement aux VIAHP et à la confirmation de la maladie. Elle ne permet donc pas de disposer d'informations sur les caractéristiques génétiques et antigéniques des VIA aviaires. Quant à la surveillance active, elle est très limitée, voire inexistante et dépend fortement de fonds extérieurs provenant d'organisations comme l'UE, l'USAID, et la Banque mondiale (Pavade et al., 2011).

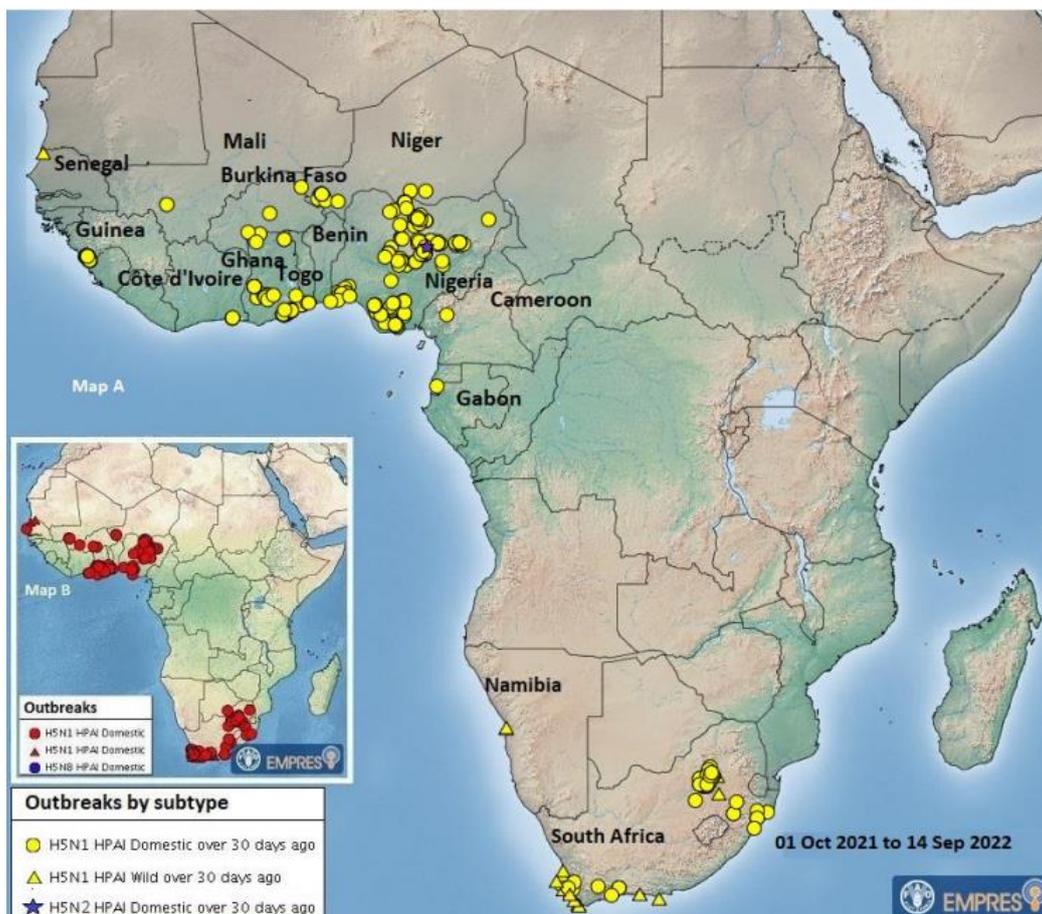
## **1. VIAHP H5N1**

Le VIAHP H5N1 (A/Goose/Guangdong/1/96, GS/GD) a été décrit pour la première fois en 1996 à la suite de foyers d'IAHP avec une mortalité importante associée à des symptômes hémorragiques et neurologiques chez des oies dans la province de Guangdong, en Chine (X. Xu et al., 1999). Plus tard, des VIAHP H5N1 appartenant à la lignée GS/GD ont été responsables de foyers d'influenza aviaire dans les marchés à volaille et de cas d'infections humaines, dont six mortels à Hong Kong (Sims et al., 2003). Initialement, le virus n'était pas très infectieux chez les oiseaux aquatiques domestiques et ne causait pas de maladies (Leigh Perkins & Swayne, 2002; Sonnberg et al., 2013). Cependant, en 2002, il a été responsable d'une mortalité massive chez diverses espèces de canards élevés en captivité et s'est ensuite propagé aux pays voisins en Asie, infectant principalement les volailles, mais aussi sporadiquement les oiseaux sauvages et certains mammifères (Ellis et al., 2010; Sims, 2007). La contamination des oiseaux sauvages (dont certains sont des oiseaux migrateurs) a favorisé la propagation des virus sur de longues distances et leur arrivée sur d'autres continents, notamment l'Afrique, l'Europe et plus récemment l'Amérique du

Nord (Adlhoch et al., 2014; Ducatez et al., 2006; Sonnberg et al., 2013). Le VIAHP H5N1 a probablement été introduit dans les élevages de volailles domestiques par les oiseaux aquatiques migrateurs à la suite de multiples événements de réassortiment entre des VIAFP de plusieurs sous-types (Sonnberg et al., 2013). Aujourd’hui, les virus de la lignée GS/GD ont évolué en plusieurs clades et génotypes en fonction des caractéristiques phylogénétiques de leur gène HA. Selon le système de nomenclature élaboré par le groupe de travail OMS/OMSA/FAO sur l'évolution du H5, il existe au moins une dizaine de clades numérotés de 0 à 9 (Smith & Donis, 2015). La majorité des virus de la lignée GS/GD qui circulaient avant 2008 possédaient une protéine NA de sous-type N1. Cependant, depuis 2008 d’autres sous-types de NA classés dans la lignée GS/GD ont été identifiés, notamment les protéines de types N2, N3, N5, N6 et N8 (Sims & Brown, 2016). Les virus de la lignée GS/GD représentent une préoccupation majeure pour la santé publique à cause de leur large répartition géographique ainsi que leur capacité à infecter une grande variété d’espèces aviaires et de mammifères, dont l’Homme (Sims & Brown, 2016). En effet, les virus H5N1 ou H5Nx GS/GD ont été responsables de plus de 874 cas d’infections humaines dont 458 décès (WHO, 2023b).

La première introduction du virus H5N1 de la lignée GS/GD en Afrique de l’Ouest s’est faite en 2006 au Nigéria avec une souche de clade 2.2 causant plusieurs foyers chez des oiseaux domestiques (Fasina et al., 2009; Fusaro et al., 2010). Plus tard, d’autres incursions dans la sous-région impliquant de nouveaux clades de la lignée GS/GD, notamment le clade 2.3.2.1c en 2015 et 2.3.4.4b en 2016 ont été décrits (Fusaro, Zecchin, Vrancken, Abolnik, Ademun, Alassane, et al., 2019). Ces virus étaient génétiquement proches des virus isolés en Europe et au Moyen Orient indiquant leur origine eurasienne et semblent avoir été introduits dans la région par l’intermédiaire d’oiseaux migrateurs puisque l’Afrique de l’Ouest constitue une zone d’hivernage importante pour ces oiseaux (Fusaro, Zecchin, Vrancken, Abolnik, Ademun, Alassane, et al., 2019; Tassoni et al., 2016). Depuis leur première apparition au Nigéria, les VIAHP H5N1 ont évolués et se sont propagés aux autres pays de la sous-région, à travers principalement le commerce transfrontalier de volailles, causant de multiples foyers d’IAHP chez les oiseaux domestiques et sauvages (FAO, 2022; T. Wu & Perrings, 2018). Bien que le sous-type H5N1 soit responsable de la

majorité des foyers, des cas impliquant d'autres sous-types notamment H5N2, H5N6 et H5N8 ont également été observés (A. T. Laleye et al., 2022). Les virus de clade 2.3.4.4b de la lignée GS/GD continuent de circuler activement en Afrique de l'Ouest et de causer des foyers d'IAHP (**figure 10**). En effet, ces virus ont été associés à la dernière vague épidémiologique d'IAHP qui s'est produite tout récemment entre 2021 et 2022 causant de nombreux foyers dans les pays de la sous-région (FAO, 2023; Lo et al., 2022; Ouoba et al., 2022). Les VIAHP H5Nx du clade 2.3.4.4b ont la capacité d'acquérir de nouveaux segments de génome par réassortiment avec des VIAFP, ce qui les distingue des virus d'autres clades GS/GD, connus pour leur stabilité génotypique (D. H. Lee et al., 2017; Ouoba et al., 2022). Ces virus constituent aujourd'hui une menace importante non seulement pour les industries avicoles, mais aussi pour la santé publique.



*Figure 10 : Foyers d'IAHP officiellement déclarés en Afrique 2021 – 2022*  
*Schéma illustrant les foyers d'IAHP officiellement déclarés (sous-types H5N1, H5N2 et H5N8) en Afrique subsaharienne (1er octobre 2021 – 14 septembre 2022) (FAO, 2022)*

## 2. VIAFP H9N2

Le VIAFP de type H9N2 a été décrit pour la première fois en 1966 chez des dindes dans le nord du Wisconsin (États-Unis) dans un élevage avec de la mortalité limitée, de la toux et des étternuements associés à une diminution importante de la production d'œufs (Homme & Easterday, 1970). Dans les années 1990, le virus est devenu endémique chez les volailles domestiques et s'est largement répandu dans d'autres parties du monde (**figure 11**) (Peacock et al., 2019; Perez & Wit, 2016).

Aujourd'hui, les virus H9N2 sont considérés comme endémiques dans plusieurs régions, notamment, en Asie de l'Est et du Sud, au Moyen-Orient et en Afrique du Nord notamment au Maroc et en Egypte (Nagy et al., 2017; Peacock et al., 2019). Sur la base des caractéristiques phylogénétiques de leur gène HA, les virus H9N2 sont divisés en deux lignées : Eurasienne ou américaine. La lignée eurasiennne est subdivisée en trois sous-lignées : Y280, G1 et coréenne (Mostafa et al., 2018). Les H9N2 de la lignée américaine circulent chez les oiseaux sauvages alors que ceux de la lignée eurasiennne infectent principalement les volailles domestiques (Peacock et al., 2019). Les virus de la lignée eurasiennne ont également été associés à des foyers et circulent de manière endémique dans les marchés à volaille et les élevages commerciaux dans de nombreux pays. Cependant, ces foyers sont généralement associés à d'autres infections secondaires, entraînant parfois une morbidité et une mortalité élevées (Perez & Wit, 2016).

Les marchés à volailles jouent un rôle majeur dans le maintien et la propagation des virus H9N2 surtout dans les pays à faible revenu et ces virus y circulent à des taux prévalence particulièrement élevés (Sulaiman et al., 2021). En effet, les marchés à volaille sont des lieux où sont rassemblées plusieurs espèces d'oiseaux provenant d'origines diverses avec parfois des pratiques de biosécurité et d'hygiène très limitées (Molia et al., 2016).

Les virus H9N2 peuvent parfois circuler chez les volailles en même temps que d'autres sous-types de VIA, notamment les VIAHP de type H5 et H7, masquant ainsi le taux de mortalité élevé lors des épisodes d'IHAP et favorisant une propagation silencieuse des VIAHP dans les élevages (Naguib et al., 2019). Ces virus ont également été responsables

de plusieurs cas d'infections humaines associés à un syndrome grippal dans de nombreux pays, ce qui démonte leur capacité à franchir la barrière d'espèce et d'infecter les mammifères (Peacock et al., 2019; W. Song & Qin, 2020).

En Afrique, le virus H9N2 a d'abord été détecté en Egypte et en Tunisie avant qu'il ne soit décrit dans d'autres pays en Afrique du Nord, notamment le Maroc (El-Zoghby et al., 2012; El Houadfi et al., 2016; Tombari et al., 2011). Depuis son émergence en 2016 au Maroc, le virus H9N2 a été détecté dans la plupart des pays d'Afrique de l'Ouest : Bénin, Burkina Faso, Ghana, Nigéria et Sénégal, où un cas humain a été décrit (Awuni et al., 2019; Fusade-Boyer et al., 2021; Jallow et al., 2020; Sulaiman et al., 2021; Zecchin et al., 2017).

Les virus isolés en Afrique de l'Ouest et du nord appartiennent tous à la lignée G1, et sont apparentés aux virus H9N2 qui circulent au Moyen-Orient (Nagy et al., 2017). En effet, les analyses phylogéographiques ont révélé que les virus H9N2 avaient été introduits au Maroc à partir du Moyen-Orient avant leur dissémination à d'autres pays en Afrique (El Mellouli et al., 2022). Cependant, il n'y a pas assez d'information sur la voie d'introduction de ces virus en Afrique de l'Ouest à partir de l'Afrique du Nord, même si le Maroc est considéré comme leur origine probable à cause de l'importation d'œufs et de poussins d'un jour par plusieurs pays de la région à partir du Maroc (Hassan et al., 2017; Zecchin et al., 2017).

Aujourd'hui les virus H9N2 sont devenus endémiques dans la plupart des pays en Afrique de l'Ouest et circulent largement dans les marchés à volailles chez les oiseaux domestiques (Fusade-Boyer et al., 2021). Cependant, il n'y a actuellement pas de vaccination contre les virus H9N2 en Afrique de l'Ouest et comme cité plus haut, la surveillance active est très limitée dans la région et ne s'intéresse que très rarement aux VIAFP. Compte tenu du potentiel zoonotique des virus H9N2 et de leurs impacts sur le secteur avicole, il est essentiel suivre leur évolution et leur circulation en Afrique de l'Ouest.

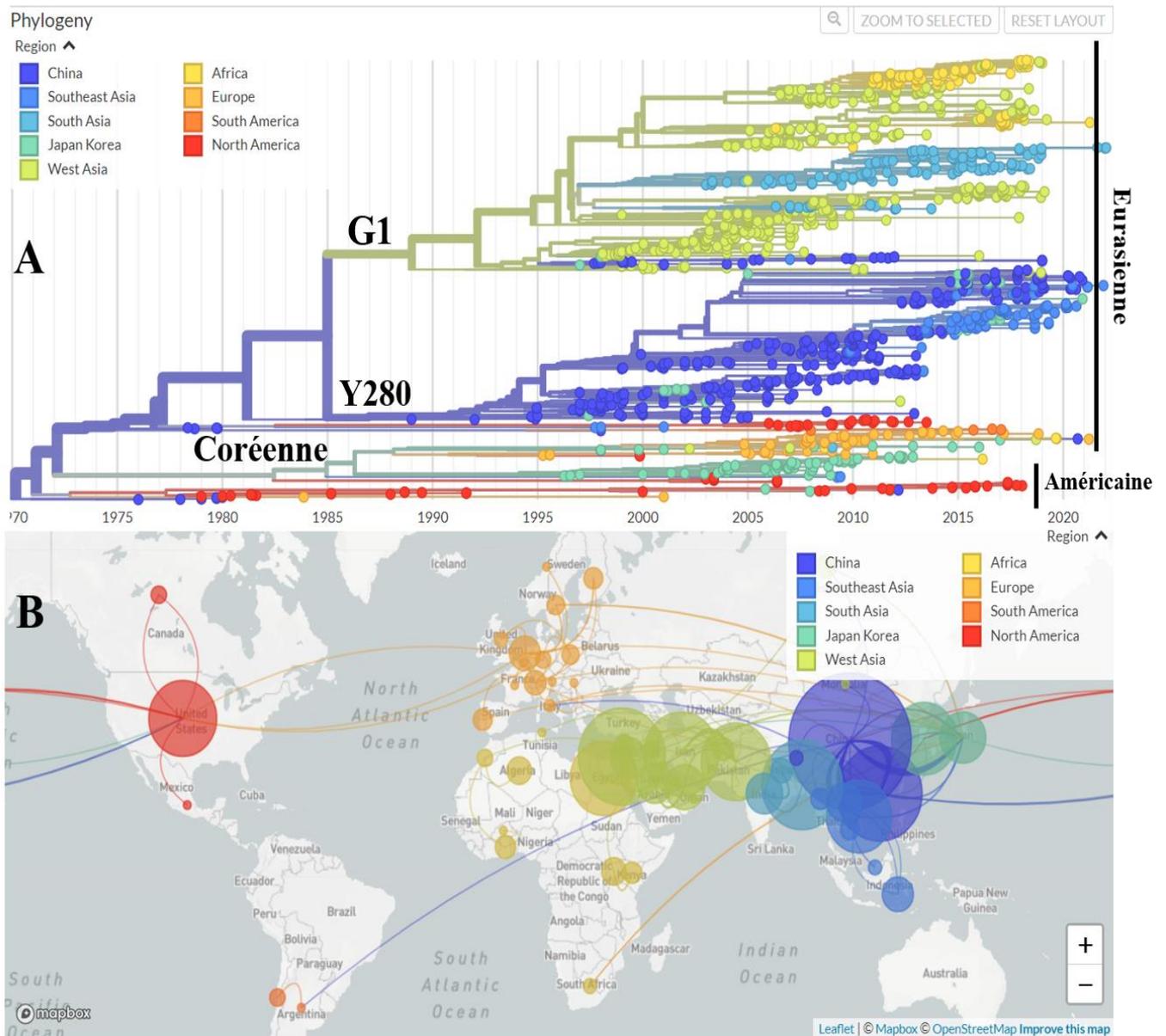


Figure 11 : Evolution génétique et propagation des virus H9N2 dans le monde

Schéma illustrant l'évolution génétique et la distribution géographique des virus H9N2. A. Arbre phylogénétique des virus H9N2. B. Transmission du virus H9N2. Il existe deux lignées principales : Eurasienne et Américaine. Les clades sont colorés par région et les sous-lignées sont indiquées au-dessus de la branche correspondante. On retrouve la lignée G1 en Afrique. D'après (Hadfield et al., 2018).

## H. Diagnostic et surveillance des VIA

### 1. Diagnostic et caractérisation des VIA

Le diagnostic et la surveillance des VIA chez les volailles nécessite le concours d'un laboratoire de virologie puisque les symptômes lors de l'IAHP ne sont pas spécifiques et les VIA peuvent circuler de manière asymptomatique chez les oiseaux. Les activités de diagnostic et de surveillance des VIA s'appuient généralement sur deux principales méthodes (**tableau 4**) : les méthodes pour détecter les VIA (analyses virologiques) et celles pour la détection d'anticorps spécifiques anti-VIA (analyses sérologiques) (Spackman et al., 2016). Le choix de l'une ou de l'autre méthode dépendra des objectifs de l'analyse, des ressources disponibles et du statut sanitaire des animaux. Les analyses virologiques sont mises en œuvre lors d'infections actives par les VIA. Elles permettent l'isolement et la caractérisation de virus afin de déterminer son sous-type et ses caractéristiques génétiques et antigéniques. Les échantillons les plus couramment utilisés pour la détection des VIA sont les écouvillons oropharyngés et cloacaux. Bien que le prélèvement de tissus (poumons, cœur, cerveau et reins) soit recommandé pour le diagnostic de l'IAHP, il s'avère parfois inutile pour la détection des VIAFP. Les analyses sérologiques, quant à elles, sont réalisées pour rechercher dans le sérum des anticorps spécifiques produits suite à une infection causée par les VIA. Elles permettent d'établir la circulation du virus chez l'animal plusieurs semaines, voire plusieurs mois après l'infection.

Vu l'importance des VIA pour le commerce international des volailles et la santé publique, une harmonisation des méthodes de diagnostic et de détection des VIA est mise en œuvre au niveau international par l'OMSA à travers le Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres (OIE, 2022a).

La détection des VIA chez les volailles peut se faire soit par un isolement du virus sur des œufs de poule embryonnés ou sur des cellules soit par un dosage immunologique de capture d'antigène (ACIA). On peut également identifier les ARN viraux par la réaction en chaîne par polymérase en temps réel après transcription inverse (RT-PCR). Généralement, l'ACIA et la RT-PCR sont utilisés pour le criblage des échantillons et

l'isolement du virus pour la confirmation de l'infection virale (Spackman et al., 2016). En effet, la RT-PCR, notamment en temps réel, est une méthode privilégiée pour la surveillance des virus, car elle permet de déterminer rapidement les sous-types de VIA, H5, H7 et H9 (OIE, 2022a).

L'exposition des volailles aux VIA peut-être évaluée à travers la détection des anticorps spécifiques dirigés contre les via soit par la méthode immuno-enzymatique ELISA soit par immunodiffusion en gélose (AGID). Il existe également les tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ou de la neuraminidase (IN) qui permettent de déterminer le sous-type de VIA responsable de l'infection. Les méthodes sérologiques sont relativement peu coûteuses et sont couramment utilisées dans les activités de surveillance pour évaluer l'exposition des élevages aux VIA (figure 9). Actuellement, plusieurs kits commerciaux sont disponibles sur le marché pour les tests ACIA et ELISA.

*Tableau 4 : Caractéristiques des principaux tests de diagnostic des VIA.*

Méthode	Cible	Sensibilité	Spécificité	Durée
<b>Détection des VIA</b>				
<b>Isolement du virus</b>	Virus vivants	Très élevée	Modérée	1 – 2 semaines
<b>ACIA</b>	Protéines virales	Faible	Elevée	15 minutes
<b>RT-PCR</b>	ARN viraux	Très élevée	Très élevée	3 heures
<b>Evaluation de l'exposition aux VIA (réponse immunitaire)</b>				
<b>AGID</b>	Anticorps dirigés contre les protéines NP et M des VIA	Modérée	Elevée	48 heures
<b>ELISA</b>	Anticorps dirigés contre les VIA	Modérée	Modérée	3 heures
<b>IHA</b>	Anticorps dirigés contre un sous-type spécifique d'HA	Elevée	Modérée à élevée	2 heures
<b>IN</b>	Anticorps dirigés contre un sous-type spécifique de NA	Modérée	Modérée à élevée	3 heures

D'après (OIE, 2022a; Spackman et al., 2016)

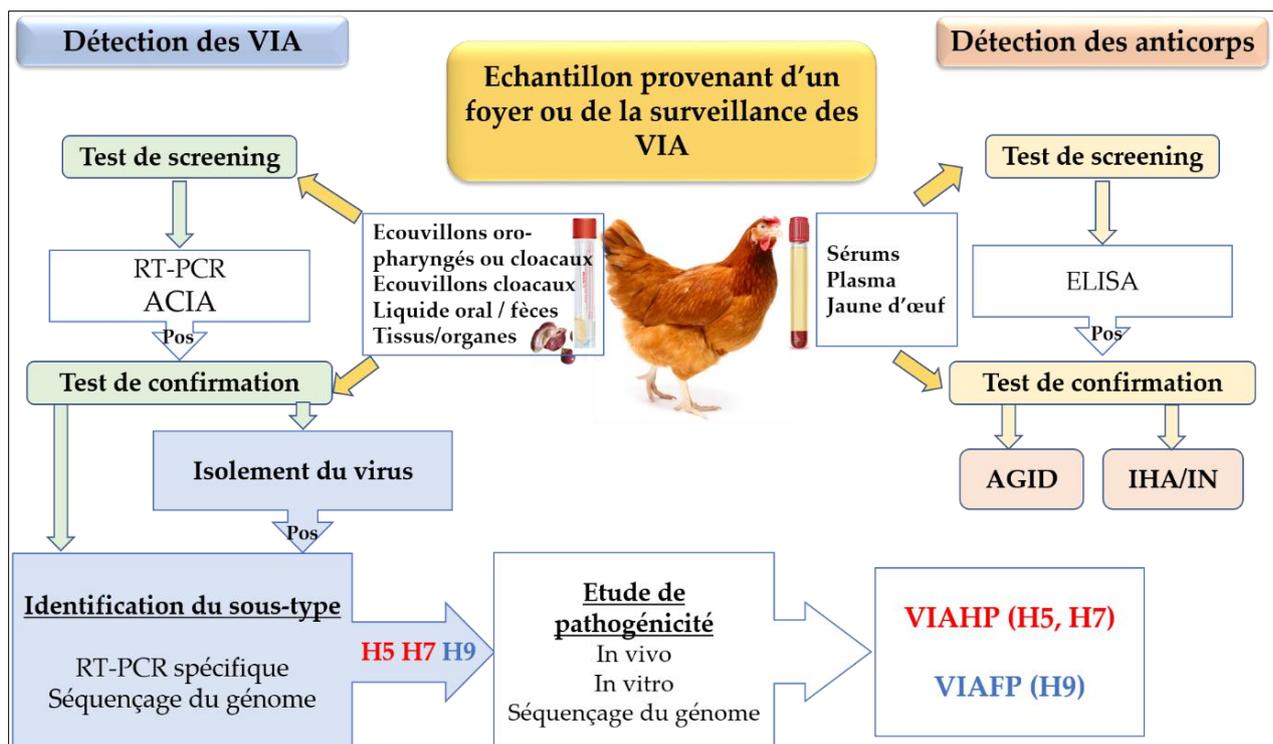


Figure 12 : Aperçu des approches courantes des tests de diagnostic des VIA

Schéma illustrant les différents tests réalisés lors d'une suspicion, d'un foyer ou de la surveillance des VIA notamment des H5, H7 et H9. Le virus peut être détecté à partir d'écouvillons oropharyngés ou cloacaux, de liquide oral ou de tissus à travers le test ACIA (qui doit être confirmé par un autre test) ou directement par RT-PCR ou isolement du virus. Les échantillons positifs peuvent ensuite être caractérisés par une RT-PCR spécifique et/ou par séquençage du génome et, dans certaines situations, des études de pathogénie *in vitro* et *in vivo* sont réalisées. La détection des anticorps dirigés contre les VIA se fait soit par le test ELISA ou AGID. Le sous-type peut ensuite être déterminé par les tests IHA et IN. Adapté d'après (Spackman et al., 2016)

Après l'isolement du virus, on peut déterminer les caractéristiques génétiques et biologiques des VIA à travers leur génome. En effet, à l'aide d'un séquençage du génome, il est possible de déterminer les sous-types HA et NA ainsi que, dans une certaine mesure, le pathotype des VIA. Par exemple, la méthode de séquençage Sanger, largement utilisée depuis de nombreuses années, permet de générer la séquence HA en moins de 36 heures et de vérifier la présence ou non d'un site de clivage polybasique et remplace ainsi certains

tests *in vivo* comme l'IPIV pour la détermination de la pathogénicité du virus (Wang & Taubenberger, 2010). Le séquençage du génome peut également permettre la prédiction d'autres caractéristiques des VIA tels que le tropisme, le spectre d'hôtes, la virulence, le potentiel zoonotique et la sensibilité aux antiviraux à travers une identification de marqueurs moléculaires spécifiques sur les acides aminés des séquences (Suttie et al., 2019). De plus en plus, le séquençage concerne le génome entier depuis l'avènement des méthodes NGS (*next-generation sequencing*) telle que la plateforme illumina MiSeq et permet de fournir des informations détaillées et spécifiques sur les caractéristiques génétiques des virus et de suivre en temps réel leur évolution et leur diversité génétique. Cela peut s'avérer particulièrement intéressant, surtout pour la détermination de l'origine et des mécanismes d'émergence d'un VIA lors d'une première introduction dans une zone (Rutvisuttinunt et al., 2013).

Aujourd'hui, en raison de leur relatif faible coût et de l'amélioration rapide de la technologie, certaines méthodes de séquençage comme les nanopores offrent la possibilité de détecter et de séquencer en même temps les VIA à partir d'échantillons sur le terrain, permettant ainsi de raccourcir considérablement la durée du diagnostic et d'intervenir précocement en cas de foyers (Crossley et al., 2021).

Les séquences générées lors des différentes activités de séquençage sont généralement déposées sur les bases de données publiques, notamment BV-BRC (<https://www.bv-brc.org/>) et GISAID (<https://gisaid.org/>) et peuvent être utilisées dans le cadre d'analyses bioinformatiques telle que les analyses phylogénétiques ou phylogéographiques. En effet, les études de phylogénie et de phylogéographie permettent d'explorer les relations évolutives entre les virus, la répartition géographique des géotypes ainsi que leur temps de divergence et leur dynamique de transmission.

## 2. Surveillance des VIA

Le contrôle des VIA aviaires nécessite l'existence d'un système de surveillance efficace capable de suivre l'évolution génétique des virus et de détecter le plus rapidement possible les virus hautement pathogènes et zoonotiques pouvant représenter une menace importante pour les santés animale et publique. La surveillance en santé animale constitue l'ensemble des activités régulièrement mise en œuvre pour évaluer l'état de santé d'une population donnée dans le but de détecter et contrôler précocement les maladies animales importantes pour l'économie nationale, la sécurité alimentaire et le commerce (FAO, 1999). La surveillance permet également de générer des données contribuant à l'analyse des risques et de justifier la mise en œuvre des mesures sanitaires tels que les restrictions de mouvements et l'abattage. Il existe deux principaux types de surveillance : la surveillance passive et la surveillance active.

La surveillance passive est basée sur l'utilisation secondaire de données régulièrement collectées et générées principalement à d'autres fins. Il peut s'agir d'informations provenant de notifications par les éleveurs, des rapports d'agents de terrain ou les résultats des tests réalisés sur des échantillons soumis au laboratoire (Cameron et al., 2014; Sergeant & Perkins, 2015).

Contrairement à la surveillance passive, la surveillance active se réfère à des situations où les données sur les maladies sont collectées spécifiquement à des fins de surveillance. On peut citer en exemple une étude de la circulation des VIA aviaires chez les volailles dans une région donnée (Cameron et al., 2014; Sergeant & Perkins, 2015). Toutefois, ce système de surveillance bien que très efficace nécessite plus d'efforts et des ressources financières plus importantes, particulièrement dans le cas des maladies ayant une faible prévalence, car le nombre d'échantillons nécessaires pour identifier les animaux infectés sera plus important. La surveillance active est ainsi difficile à mettre en place surtout dans les pays à faible revenu.

Une alternative pour surmonter les obstacles liés à la surveillance active classique est la surveillance basée sur le risque. La surveillance basée sur le risque consiste à orienter les

activités de surveillance vers une partie de la population considérée comme présentant un risque élevé de maladie afin d'accroître l'efficacité de la détection (OIE, 2022b; Salman, 2003). Ce système de surveillance, en plus d'être plus économique peut avoir la même sensibilité de détection que la surveillance classique (Cameron et al., 2014). Néanmoins, la surveillance basée sur le risque implique la disponibilité de données épidémiologiques sur les facteurs de risque associés à la maladie.

Aujourd'hui, avec le développement des systèmes d'information géographique (SIG), il est possible, en s'appuyant sur les facteurs de risque associés à l'apparition d'une maladie, d'élaborer des cartes de risque afin d'identifier les zones qui pourront être prioritaires en termes de surveillance ou d'implémentation de mesures de contrôle pour une maladie donnée.

La surveillance des VIA se fait généralement à deux niveaux : la surveillance chez les volailles domestiques et la surveillance dans les populations d'oiseaux sauvages. Comme cité plus haut, les oiseaux sauvages notamment, les canards, les oies et les cygnes constituent les réservoirs principaux des VIA. Ainsi, la surveillance de l'avifaune sauvage contribue à la détection précoce de l'émergence des VIA et à une compréhension des mécanismes de transmission des VIA entre les oiseaux sauvages et domestiques (Wade et al., 2023). Cette surveillance est ainsi mise en œuvre par des prélèvements chez les oiseaux sauvages qui se trouvent dans les milieux aquatiques ou au bord des rivages.

La surveillance des VIA chez les volailles domestiques se fait au niveau des marchés à volailles, notamment, dans les pays du Sud puisqu'ils constituent des lieux de regroupement de nombreuses espèces d'oiseaux provenant de différentes zones géographiques (Molia et al., 2016; Sulaiman et al., 2021).

## II. Objectifs, questions de recherche et plan de la thèse

Les virus influenza aviaires (VIA) sont des virus zoonotiques qui entraînent d'énormes pertes économiques dans les industries avicoles. Les impacts de ces virus sont encore plus exacerbés dans les régions à faible revenu comme l'Afrique de l'Ouest dans lesquelles les populations dépendent énormément de l'agriculture et de l'élevage. En effet, l'aviculture a connu une croissance importante en Afrique de l'Ouest ces dernières années et les volailles constituent une source de revenus et de protéines pour de nombreux ménages, surtout dans les zones rurales. Malgré leur importance dans les économies nationales des pays de la sous-région, les volailles domestiques sont affectées par plusieurs agents pathogènes dont les VIA qui continuent de provoquer une morbidité et une mortalité élevées dans les élevages.

L'Afrique de l'Ouest est une zone particulièrement à risque pour l'émergence et la propagation des virus influenza A à cause de ses élevages de faible biosécurité et des mouvements importants de volailles entre les pays, généralement sans contrôle vétérinaire. De plus, la région constitue un refuge saisonnier pour plusieurs espèces d'oiseaux aquatiques migrateurs provenant des zones tempérées d'Europe et d'Asie pouvant potentiellement transmettre les VIA aux oiseaux domestiques et sauvages locaux.

Malgré de la mise en évidence de la circulation du VIAHP H5N1 depuis 2006 et du VIAFP H9N2 depuis 2017 en Afrique de l'Ouest, il y a très peu d'information sur la circulation et les caractéristiques génétiques de ces virus dans la Région. En effet, la surveillance des virus influenza aviaire reste très limitée dans la plupart des pays et est essentiellement basée sur de la surveillance passive. La surveillance active est très peu développée et dépend surtout des financements extérieurs.

C'est dans ce contexte particulier que s'inscrivent mes travaux de thèse qui ont pour objectifs d'étudier la circulation et les caractéristiques génétiques des VIA au Mali et en Afrique de l'Ouest et de contribuer à l'amélioration de la surveillance de ces virus à travers la cartographie de leur risque d'émergence et de propagation pouvant servir de base pour

la mise en place d'un système de surveillance programmée à moindre coût et basé sur le risque.

Dans le but d'atteindre nos objectifs, nous avons donc tenté de répondre aux trois questions suivantes en lien avec la circulation des VIA et leur risque d'émergence en Afrique de l'Ouest :

1. Quelles sont les caractéristiques génétiques des virus influenza aviaire H5N1 et H9N2 circulant en Afrique de l'Ouest ?
2. Quelles sont les dynamiques spatio-temporelles et évolutives du virus H9N2 en Afrique de l'Ouest
3. Quelles sont les zones à risque d'apparition des foyers d'influenza aviaire chez les volailles domestiques au Mali ?

Au cours de ces travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés aux sous-types H5N1 et H9N2 en raison de leur large répartition géographique en Afrique de l'Ouest et de leurs impacts potentiels chez l'Homme et chez les oiseaux dans la région.

Pour répondre aux deux premières questions, nous avons, dans une première étude, isolé et caractérisé aux niveaux moléculaire et antigénique le virus HP de sous-type H5N1 au Bénin suite à des foyers d'IAHP dans les élevages. Des analyses phylogénétiques ont également été réalisées sur ces virus afin d'inférer leurs voies d'introduction et les relations évolutives avec les virus isolés dans d'autres pays. Ensuite, dans une seconde étude, nous avons analysé les caractéristiques génétiques et phylogénétiques des virus FP H9N2 collectés dans les marchés à volailles du Mali. Au cours de cette étude, nous avons aussi réalisé des analyses phylogéographiques dans le but de comprendre les mécanismes d'introduction et de propagation des VIAFP H9N2 en Afrique de l'Ouest à partir de l'Afrique du Nord.

Ces deux études ont été menées en collaboration avec des laboratoires situés en Afrique de l'Ouest et ont nécessité des activités de terrain pour la collecte des échantillons.

La dernière question a été traitée par la réalisation d'une étude de cartographie du risque d'apparition des foyers d'influenza aviaire chez les volailles domestiques au Mali.

Afin d'identifier les zones à risque d'émergence de foyers d'influenza aviaire, nous avons implémenté un modèle de cartographie du risque intégrant les données sur les facteurs de risques associés aux VIA et les données géographiques pour identifier les zones à risque d'apparition de foyers au Mali à l'aide de la méthode multicritère d'aide à la décision couplée aux systèmes d'information géographique.

### III. Résultats

Dans cette partie du manuscrit, nous allons présenter les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse. Ces résultats ont fait l'objet de trois articles dont un a été publié dans un journal international à comité de lecture et les deux autres devraient être soumis avant la soutenance. Les trois articles ont été rédigés en anglais et insérés dans le manuscrit les uns après les autres, néanmoins, pour une meilleure clarté, ils sont précédés d'une synthèse en français.

## Article 1

### Virus Influenza aviaire hautement pathogène A(H5N1) Clade 2.3.4.4b chez les volailles, Bénin, 2021

Entre 2021 et 2022, de nombreux foyers d'IAHP causés par le virus HP de sous-type H5N1 clade 2.3.4.4.b sont apparus dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest, notamment au Mali, Nigeria, Niger et Sénégal. Au Bénin, entre les mois d'août et septembre 2021, une mortalité importante a été rapportée chez les volailles dans deux provinces du sud, Ouidah et Seme-Podji. Les données épidémiologiques et cliniques associés à la présence de foyers d'IAHP dans les pays voisins ont conduit à la suspicion des VIA. Ainsi, l'objectif de cette étude était de réaliser des analyses génétiques et antigéniques afin de déterminer l'origine de ce virus ainsi que ses liens avec les virus détectés dans d'autres pays en Afrique de l'Ouest.

Pour confirmer la présence des VIAHP H5N1, nous avons donc collecté 468 échantillons dans les élevages infectés et certains marchés qui ont été analysés par la technique de RT-PCR en temps réel ciblant les gènes H5 et N1 des VIA. Parmi ces échantillons, 11 étaient positifs par RT-PCR. Après culture de ces échantillons sur des œufs embryonnés de poules, nous avons pu isoler cinq virus que nous avons caractérisés par la technique de séquençage du génome complet. Les séquences générées ont été déposées sur la base de données Genbank. Les séquences ont permis des analyses phylogénétiques et de datation moléculaire pour déterminer l'origine de ces virus et d'estimer le temps jusqu'à l'ancêtre commun le plus récent. Nous avons également réalisé des tests d'inhibition de l'hémagglutination dans le but de déterminer le profil antigénique des virus du Bénin vis-à-vis des souches vaccinales recommandées par l'OMS.

L'analyse moléculaire des séquences a démontré que les virus du Bénin portaient le motif polybasique PLREKRRKR/GL qui caractérisent les VIAHP. Ces virus présentaient également une mutation sur le gène PB1 (113V) indiquant la possibilité de se répliquer dans les cellules de mammifères.

Sur le plan des caractéristiques phylogénétiques, les virus du Bénin appartenait au clade 2.3.4.4.b et étaient très proches des virus du Nigéria, qui est un pays frontalier. De plus, les virus du Bénin et du Nigéria provenaient d'un même ancêtre commun qui a circulé vers février 2020, suggérant une possible introduction des virus H5N1 au Bénin à partir du Nigéria, pays dans lequel des foyers d'IAHP ont été initialement rapportés. Nous n'avons pas constaté de réassortiment mais deux groupes génétiques de virus H5N1 semblaient circuler au Bénin. Les virus H5N1 du Bénin étaient également divisés en deux groupes antigéniques.

En conclusion, cette étude nous a permis d'améliorer nos connaissances sur les caractéristiques génétiques et antigéniques du virus H5N1 clade 2.3.4.4.b qui circulent en Afrique de l'Ouest. Les virus du Bénin ont été probablement introduits dans le pays à travers des mouvements de volailles ou de leurs produits qui sont très fréquents entre les pays de la région. Ces virus ont également un potentiel zoonotique démontrant la nécessité de mettre en place un système de surveillance capable de suivre leur évolution et d'identifier le plus rapidement possible les virus pouvant être une menace pour la santé animale et publique.

# Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus in Poultry, Benin, 2021

Idrissa Nonmon Sanogo, Fidelia Djegui, Yao Akpo, Corneille Gnanvi, Gabriel Dupré, Adam Rubrum, Trushar Jeevan, Pamela McKenzie, Richard J. Webby, Mariette F. Ducatez

In August 2021, we detected highly pathogenic avian influenza A(H5N1) clade 2.3.4.4b viruses in poultry in southern Benin. The isolates were genetically similar to H5N1 viruses of clade 2.3.4.4b isolated during the same period in Africa and Europe. We also found evidence for 2 separate introductions of these viruses into Benin.

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) viruses represent a major threat to animal and public health. HPAI A/Goose/Guangdong/1/96-lineage subtype H5N1 viruses first emerged in southern China in 1996, and their descendants have since evolved into different phylogenetic clades causing large outbreaks in poultry and wild birds worldwide (1). Since first being detected in Nigeria in 2006, HPAI H5N1 viruses have been responsible for numerous outbreaks in many countries in Africa, causing high mortality in domestic and wild birds over the past 15 years (2,3).

Beginning in January 2021, outbreaks caused by HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b virus have been reported in many countries in West Africa, including Mali, Nigeria, Niger, and Senegal (3). Clade 2.3.4.4 H5 viruses are of particular concern because of their potential for reassortment and ability to cross the species barrier and infect new hosts, including humans, seals, and foxes (4,5). In addition, increasing infectivity of these HPAI H5 viruses in humans could accelerate their adaptation to human-to-human

transmission, which might increase the possibility for emergence of a novel influenza strain with pandemic potential (6). In August 2021, HPAI H5N1 viruses were detected in poultry in the southern region of Benin. In this study, we carried out genetic and antigenic analyses to investigate the origin of the virus and its relationship with viruses detected in neighboring countries.

## The Study

During August–September 2021, high mortality was reported in chickens from poultry farms in Seme-Podji and Ouidah Provinces in southern Benin. Clinical signs in the affected birds included prostration, respiratory distress, severe diarrhea, depression, and lack of coordination. Based on the epidemiologic status of avian influenza in the region, which involved outbreaks in neighboring countries Nigeria and Niger, and the possibility of infected birds being moved across country borders through legal or illegal trade of poultry, HPAI was suspected.

We collected 468 samples (organ tissues and oropharyngeal swabs) from among poultry at 6 infected farms and poultry markets. We performed one-step real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR) targeting the influenza A virus H5 and N1 genes and detected avian influenza H5N1 virus RNA in 11 samples. We isolated viruses from positive samples in embryonated eggs, then performed molecular characterization by whole-genome sequencing using an Illumina MiSeq system (<https://www.illumina.com>) as described elsewhere (7). We obtained 5 H5N1 virus isolates from which we generated full-genome sequences and designated them A/poultry/Benin/21-A-08-009-O/2021, A/poultry/Benin/21-A-09-031-O/2021, A/poultry/Benin/21-A-09-033-O/2021, A/poultry/Benin/21-A-09-034-O/2021, and A/poultry/Benin/21-A-09-035-O/2021; we deposited all sequences into GenBank (accession nos.

Author affiliations: Université de Ségou, Ségou, Mali (I.N. Sanogo); Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France (I.N. Sanogo, G. Dupré, M.F. Ducatez); Laboratoire de Diagnostic vétérinaire et de Sérosurveillance, Parakou, Benin (F. Djegui); Direction de l'Élevage, Cotonou, Benin (Y. Akpo, C. Gnanvi); St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA (A. Rubrum, T. Jeevan, P. McKenzie, R.J. Webby)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2812.221020>

ON870413–47). The isolates shared a high nucleotide sequence identity of 98.62%–99.91% and amino acid similarity among one another.

To determine the origin of the Benin H5N1 viruses, we performed phylogenetic analysis for all 8 genomic segments from the 5 isolates using the maximum-likelihood method and inferred phylogenetic trees using IQ-TREE version 2.1.2 software (<http://www.iqtree.org>) with automatic model selection and 1,000 nonparametric bootstrap replicates (8). Our analysis revealed that the Benin HPAI H5N1 viruses were closely related to H5N1 viruses isolated in Nigeria in 2021 and, to a lesser extent, to viruses detected in Lesotho in 2021 and Europe in 2020–2021, suggesting a possible transmission route from Nigeria to Benin. The topology of the hemagglutinin (HA) gene tree (Appendix Figure 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/28/12/22-1020-App1.pdf>) indicated that the H5N1 viruses from Benin belonged to clade 2.3.4.4b (9). Phylogenetic trees based on the other gene segments (Appendix Figures 2–8) indicated that no reassortment event had occurred within the Benin H5N1 isolates. However, A/poultry/Benin/21-A-09-031-O/2021 did not cluster with the other HPAI H5N1 from Benin, suggesting 2 independent introductions of the virus into the country.

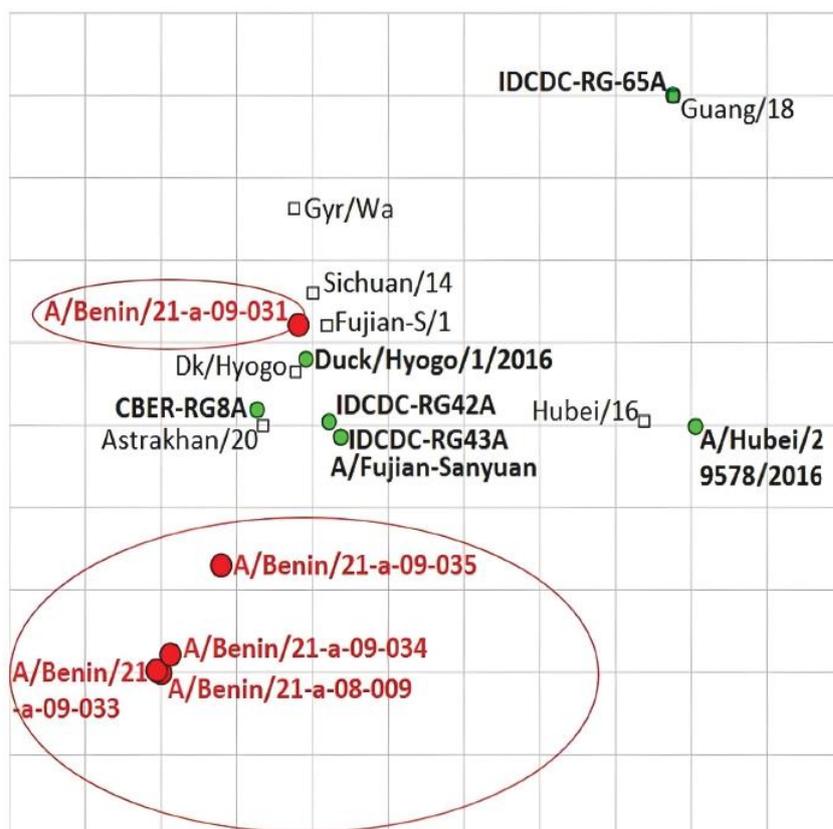
To estimate the time to the most recent common ancestor (tMRCA), we conducted Bayesian Markov Chain Monte Carlo sampling in BEAST version 1.10.4 (<https://beast.community>) (10) under the general time-reversible plus invariant sites plus  $\Gamma$ 4 nucleotide substitution model, using an uncorrelated log-normal relaxed clock and Bayesian Skygrid coalescent prior as described elsewhere (11).

The H5N1 isolates from Benin originated from the same common ancestor as the H5N1 viruses isolated in Nigeria in 2021 (Figure 1); based on the HA maximum clade credibility tree, the average tMRCA of these viruses was estimated as February 2020 (95% highest posterior density interval December 2019–April 2020). The likelihood of 2 independent introductions of the H5N1 viruses into Benin was supported by the tMRCAs estimated for each gene segment (Appendix Table 1), the first involving A/poultry/Benin/21-A-09-031-O/2021, during March–April 2020, and the second involving the other 4 Benin isolates, during July–August 2020.

To study the antigenic profiles of the HPAI H5N1 isolated in Benin, we performed a hemagglutination inhibition (HI) assay against reference ferret postinfection serum (Appendix Table 2), as described elsewhere (12). We used HI results to build an antigenic map (Figure 2) using ACMACS software (<https://acmacs-web.antigenic-cartography.org>). The antigenic map revealed 2 slightly distinct antigenic profiles for Benin H5N1 viruses. A/poultry/Benin/21-A-09-031-O/2021 was antigenically similar to most of the World Health Organization candidate vaccine viruses used in the HI assay, especially to A/Sichuan/26221/2014-like (IDCDC-RG42A) and A/duck/Hyogo/1/2016 (NIID-001). In contrast, the other 4 Benin isolates that clustered together in the phylogenetic trees were 2–3  $\log_2$  away from the candidate viruses, suggesting a good but lower level of cross-reactivity. The most antigenically similar candidate virus to these 4 Benin isolates was A/Astrakhan/3212/2020-like (CBER-RG8A).



**Figure 1.** Maximum clade credibility tree of the hemagglutinin (HA) gene of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) viruses from Benin (red) and reference viruses. Green box highlights viruses sharing the same common ancestor with the Benin isolates. The time to the most common ancestor and the 95% highest posterior density intervals are indicated for the relevant nodes.



**Figure 2.** Antigenic map of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) viruses from Benin based on hemagglutination inhibition data (Appendix Table, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/28/12/22-1020-App1.pdf>). Circles indicate viruses and squares antiserum; red indicates viruses characterized in this study, and green dots indicate reference viruses. The spacing between grid lines is 1 unit of antigenic distance, corresponding to a 2-fold dilution of antiserum in the hemagglutination inhibition assay.

Amino acid sequence analysis showed that the H5N1 viruses from Benin had multiple basic amino acids motif (PLREKRRKR/GLF) at the HA cleavage site, characteristic of HPAI viruses. In addition, we detected a mammalian adaptation mutation in the polymerase basic 1 segment (113V) of the 5 Benin isolates, suggesting potential for these viruses to replicate more efficiently in mammalian cells (13).

### Conclusions

Although several outbreaks occurred in the region, relatively little information was available on the genetic and antigenic diversity of HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b viruses in poultry in West Africa. We characterized 5 HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b viruses from Benin highly similar to viruses detected earlier in neighboring Nigeria. It is therefore likely that the Benin H5N1 viruses originated from the region because of the movement of infected poultry and poultry products across neighboring countries (14). The initial introduction of H5N1 viruses into the wider region might be related to the arrival of migratory birds. In fact, the tMRCA of Benin H5N1 viruses in 2021 corresponded to the period (January–March) when Eur-

asian migratory birds are present in West Africa (15). Furthermore, the relationship between Benin H5N1 isolates and viruses detected earlier in Europe corroborates this hypothesis.

HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b viruses represent a major concern for West Africa and have demonstrated the potential for spreading more widely in the region. Therefore, to monitor virus evolution and promptly identify viruses with increased zoonotic potential, the countries of West Africa require regional collaboration for long-term surveillance and whole-genome sequencing of HPAI viruses in both humans and animals.

### Acknowledgments

We gratefully acknowledge the authors and submitting laboratories for providing the sequences to the GISAID EpiFlu and Influenza Research databases on which this research is partially based.

This study was funded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (CEIRS contract no. HHSN272201400006C). I.N.S is supported by a PhD scholarship from the French Embassy in Mali.

### About the author

Mr. Sanogo is an assistant lecturer at the University of Segou and a PhD student at the UMR Interactions Hôtes Agents pathogènes in Toulouse. His primary research interests include epidemiology and surveillance of animal influenza viruses.

### References

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global AIV with zoonotic potential situation update: 2021 Oct 27 [cited 2022 Mar 15]. <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/global-aiv-with-zoonotic-potential>
2. Ducatez MF, Olinger CM, Owoade AA, Tarnagda Z, Tahita MC, Sow A, et al. Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa. *J Gen Virol*. 2007;88:2297–306. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82939-0>
3. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Sub-Saharan Africa HPAI situation update: 2021 Oct 13 [cited 2022 Mar 15]. <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/sub-saharan-africa-hpai>
4. Nuñez IA, Ross TM. A review of H5Nx avian influenza viruses. *Ther Adv Vaccines Immunother*. 2019;7:2515135518821625. <https://doi.org/10.1177/2515135518821625>
5. Floyd T, Banyard AC, Lean FZX, Byrne AMP, Fullick E, Whittard E, et al. Encephalitis and death in wild mammals at a rehabilitation center after infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2021;27:2856–63. <https://doi.org/10.3201/eid2711.211225>
6. Oliver I, Roberts J, Brown CS, Byrne AMP, Mellon D, Hansen R, et al. A case of avian influenza A(H5N1) in England, January 2022. *Euro Surveill*. 2022;27. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.5.2200061>
7. Barman S, Turner JCM, Hasan MK, Akhtar S, El-Shesheny R, Franks J, et al. Continuing evolution of highly pathogenic H5N1 viruses in Bangladeshi live poultry markets. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8:650–61. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1605845>
8. Minh BQ, Schmidt HA, Chemomor O, Schrepf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol*. 2020;37:1530–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
9. Smith GJD, Donis RO; World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5 Evolution Working Group. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014. *Influenza Other Respir Viruses*. 2015;9:271–6. <https://doi.org/10.1111/irv.12324>
10. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol*. 2018;4:vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
11. Hill V, Baele G. Bayesian estimation of past population dynamics in BEAST 1.10 using the Skygrid coalescent model. *Mol Biol Evol*. 2019;36:2620–8. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz172>
12. Kandeil A, Moatasim Y, El Taweel A, El Sayes M, Rubrum A, Jeevan T, et al. Genetic and antigenic characteristics of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) viruses circulating in domestic poultry in Egypt, 2017–2021. *Microorganisms*. 2022;10:595. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030595>
13. Fusade-Boyer M. Circulation of avian influenza viruses in sub-Saharan Africa and crossing the species barrier [thesis; in French]. Toulouse, France: Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées; 2021.
14. Monne I, Joannis TM, Fusaro A, De Benedictis P, Lombin LH, Ularanu H, et al. Reassortant avian influenza virus (H5N1) in poultry, Nigeria, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:637–40. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071178>
15. Cappelle J, Servan de Almeida R, Fofana B, Dakouo M, Balança G, Gil P, et al. Circulation of avian influenza viruses in wild birds in inner Niger delta, Mali. *Influenza Other Respir Viruses*. 2012;6:240–4. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00314.x>

Address for correspondence: Mariette F. Ducatez, Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP), UMR 1225, ENVT, INRAE, Université de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076, Toulouse, France; email: mariette.ducatez@envt.fr

# Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus in Poultry, Benin, 2021

## Appendix

### Phylogenetic analysis Methods

Phylogenetic analysis was performed for each genome segment. Related sequences were retrieved from the GISAID EpiFlu database (Shu & McCauley, 2017) and Influenza Research Database (Squires et al., 2012). The first 50 blast hits from Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were also added to the dataset. All duplicate sequences were removed using the web-based tool sRNAtoolbox (<https://arn.ugr.es/srnatoolbox>). Final datasets were aligned using Muscle software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) and visualized with Bioedit v7.2.5 (Hall, 2013). The phylogenetic trees were inferred using the maximum likelihood method with best-fit model selection and 1000 nonparametric bootstrap replicates in IQ-TREE v. 2.1.2 (Minh et al., 2020). Trees were visualized using Figtree V1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### References

- Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. Vol. 22, *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2017. p. 30494.
- Squires RB, Noronha J, Hunt V, García-Sastre A, Macken C, Baumgarth N, et al. Influenza Research Database: An integrated bioinformatics resource for influenza research and surveillance. *Influenza Other Respi Viruses*. 2012;6(6):404–16.
- HALL TA. BioEdit 7.2. 5. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. 2013;95:98.
- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol*. 2020 May 1;37(5):1530–4.

**Appendix Table 1. tMRCA of each gene segment of the 2021 Benin H5N1 viruses\***

Segment	A/poultry/Benin/21-A-09-031-O/2021, tMRCA (95% HPD range)†	A/poultry/Benin/21-A-08-009-O/2021, A/poultry/Benin/21-A-09-033-O/2021, A/poultry/Benin/21-A-09-034-O/2021, A/poultry/Benin/21-A-09-035-O/2021, tMRCA (95% HPD range)†
PB2	Apr (Mar–May)	Aug (Aug–Oct)
PB1	Mar (Jan–Jul)	Jul (Mar–Sep)
PA	Apr (Feb–May)	Aug (Jun–Oct)
HA	Mar (Feb–May)	Sep (May–Oct)
NP	Mar (Feb–May)	Jul (Mar–Aug)
NA	Apr (Feb–May)	Jul (Apr–Sep)
M	Aug (May–Oct)	Aug (May–Oct)
NS	Apr (Feb–May)	Aug (May–Oct)

\*PB2, Polymerase basic protein 2; PB1, polymerase basic protein 1; PA, polymerase acidic protein; HA, hemagglutinin; NP, nucleoprotein; NA, neuraminidase; M, matrix protein; NS, nonstructural protein; tMRCA, time to most recent common ancestor; HPD, highest posterior density.

†All dates 2020

**Appendix Table 2. Hemagglutination inhibition assay of clade 2.3.4.4 viruses (with 0.5% turkey red blood cells)**

Virus	Subtype	Clade	Sichuan /14	Fujian-S /1	Astrakhan /20*	Gyr/Wa	Hubei /16	Dk/Hyogo	Guang /18	
Reference antigen										
IDCDC-RG42A (A/Sichuan/26221/2014-like)	H5N6	2.3.4.4a	320	160	160	40	10	640	<10	
A/Fujian-Sanyuan/21099/2017 (CNIC-21099)	H5N6	2.3.4.4b	160	160	160	80	0	320	<10	
CBER-RG8A (A/Astrakhan/3212/2020-like)	H5N6	2.3.4.4b	160	160	320	160	<10	320	<10	
IDCDC-RG43A (A/gyrfalcon/WA/41088-6/2014-like)	H5N6	2.3.4.4c	160	160	160	80	<10	320	<10	
A/Hubei/29578/2016 (CNIC-29578)	H5N6	2.3.4.4d	<10	<10	<10	<10	160	10	10	
A/duck/Hyogo/1/2016 (NIID-001)	H5N6	2.3.4.4e	320	320	320	320	10	640	<10	
IDCDC-RG-65A (A/Guangdong/18SF020/2018-like)	H5N6	2.3.4.4f	<10	<10	<10	<10	10	10	160	
Test antigen										
A/poultry/Benin/21-A-08-009-O/2021	H5N1	2.3.4.4b	<10	10	40†	10	<10	40	<10	
A/poultry/Benin/21-A-09-031-O/2021	H5N1	2.3.4.4b	640	320	320‡	640	<10	640	<10	
A/poultry/Benin/21-A-09-033-O/2021	H5N1	2.3.4.4b	<10	10	40†	10	<10	40	<10	
A/poultry/Benin/21-A-09-034-O/2021	H5N1	2.3.4.4b	<10	10	80§	10	<10	40	<10	
A/poultry/Benin/21-A-09-035-O/2021	H5N1	2.3.4.4b	<10	20	160‡	20	<10	160	<10	

\*Closest candidate viruses

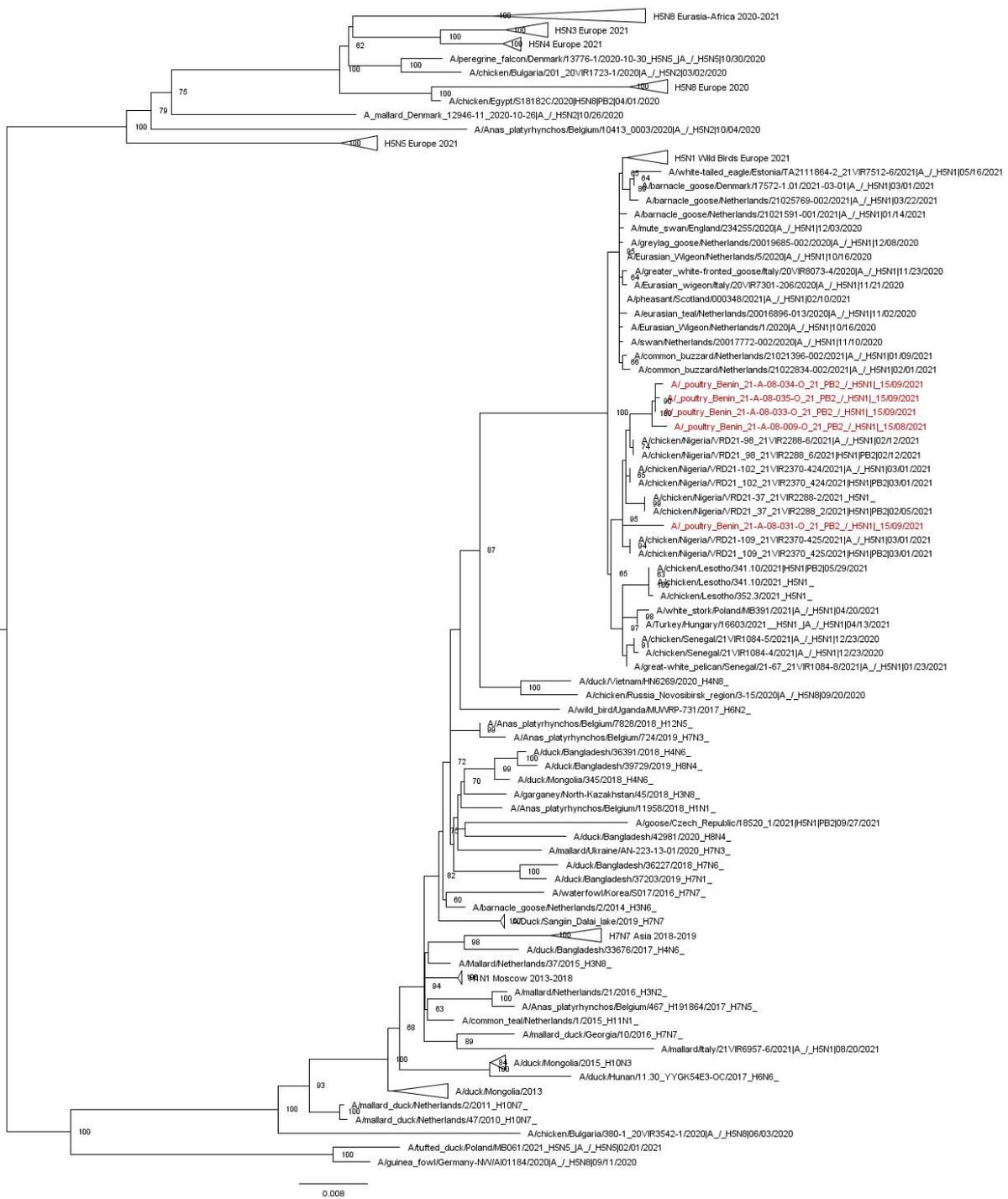
†8 fold

‡≤2 fold

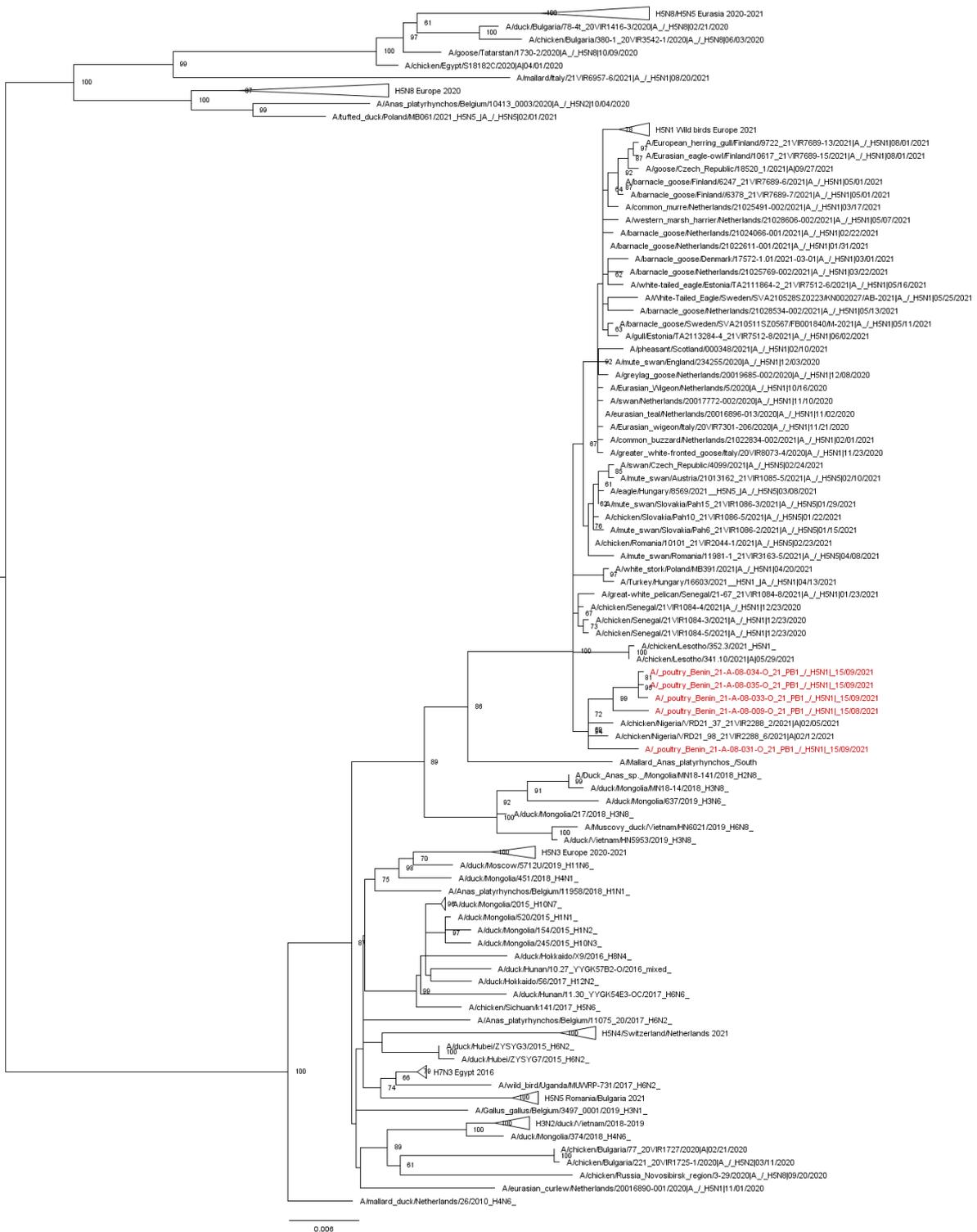
§4 fold



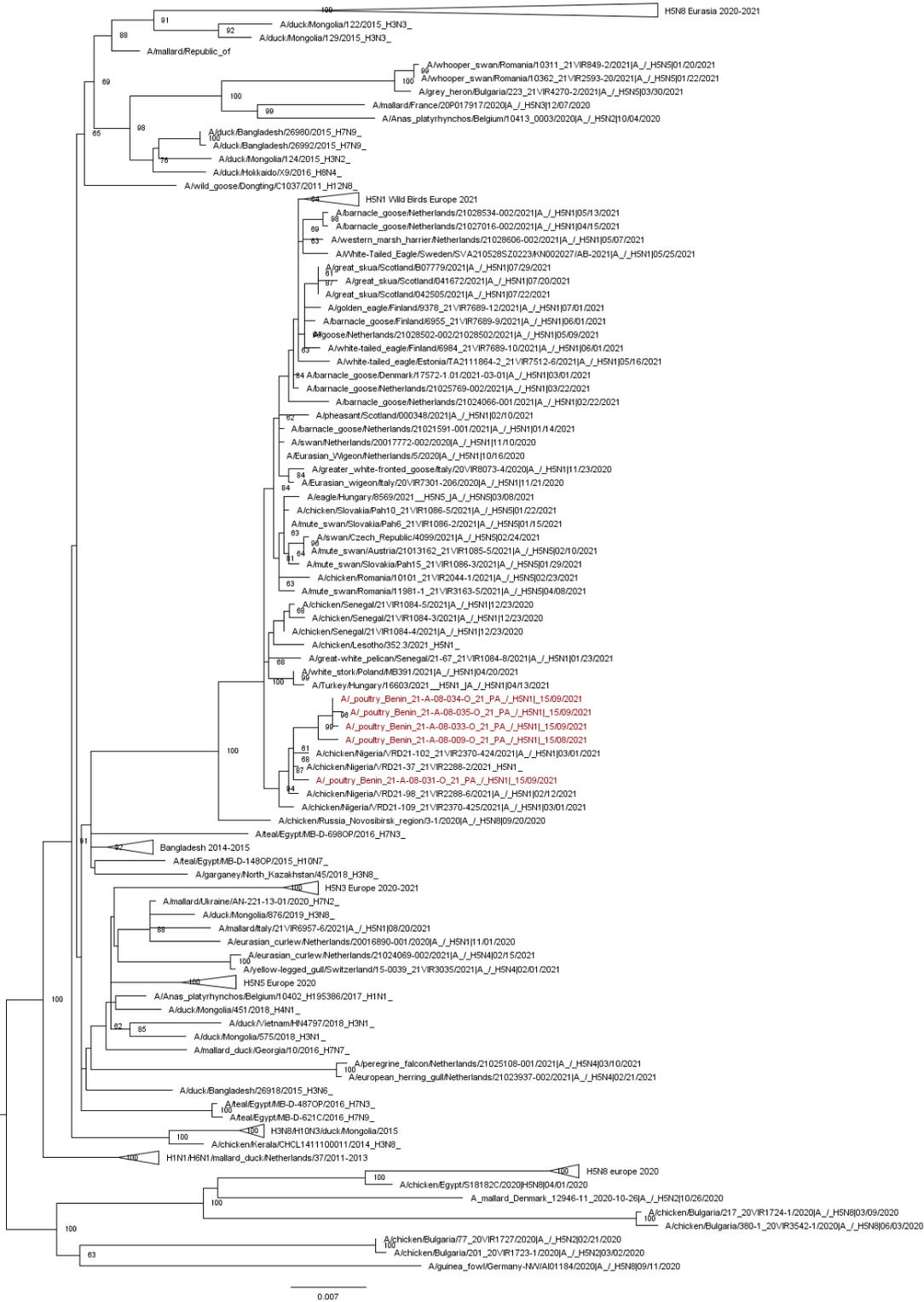
**Appendix Figure 1.** Maximum likelihood phylogenetic tree of the hemagglutinin (HA) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.



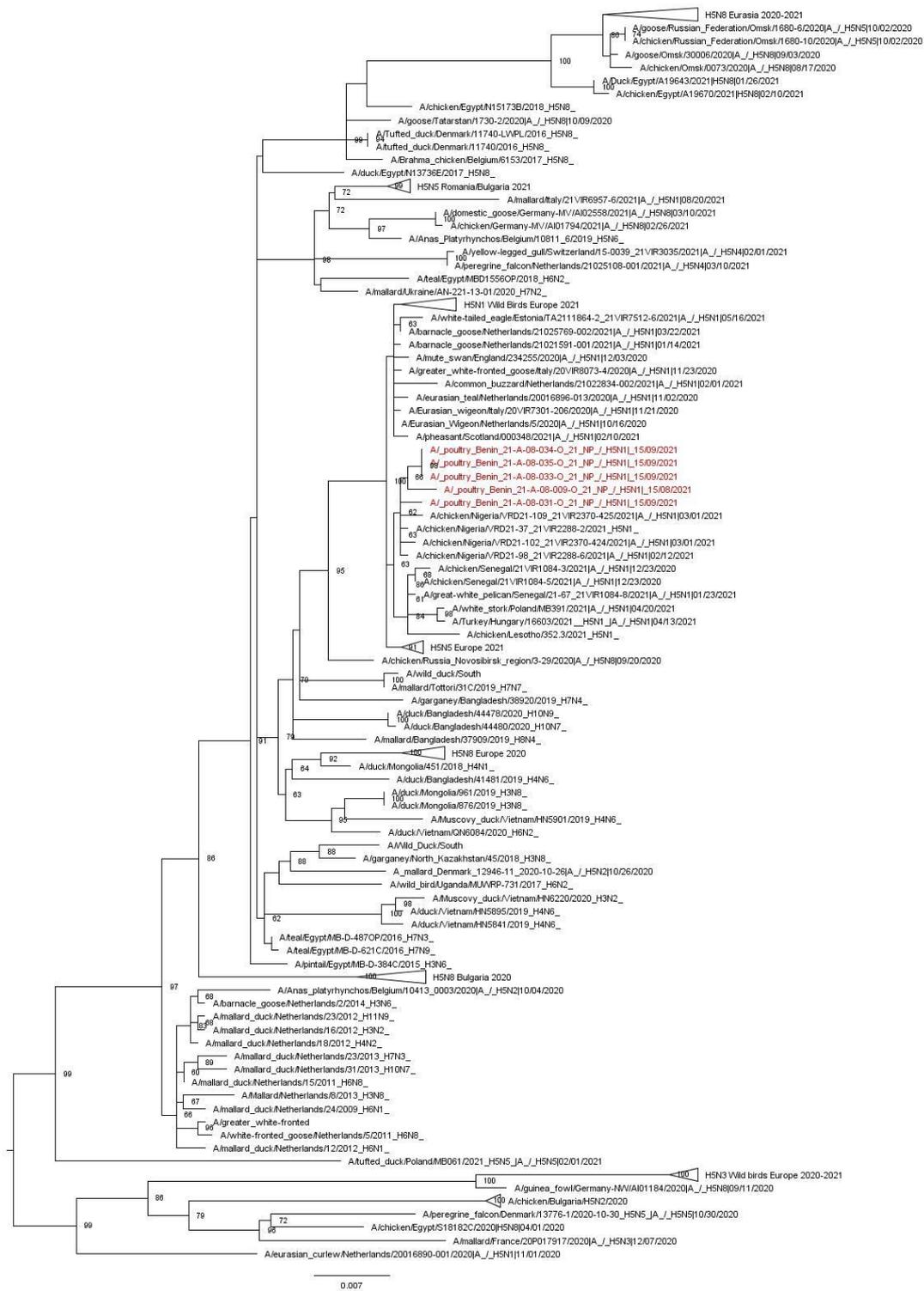
**Appendix Figure 2.** Maximum Likelihood phylogenetic tree of the polymerase basic 2 (PB2) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.



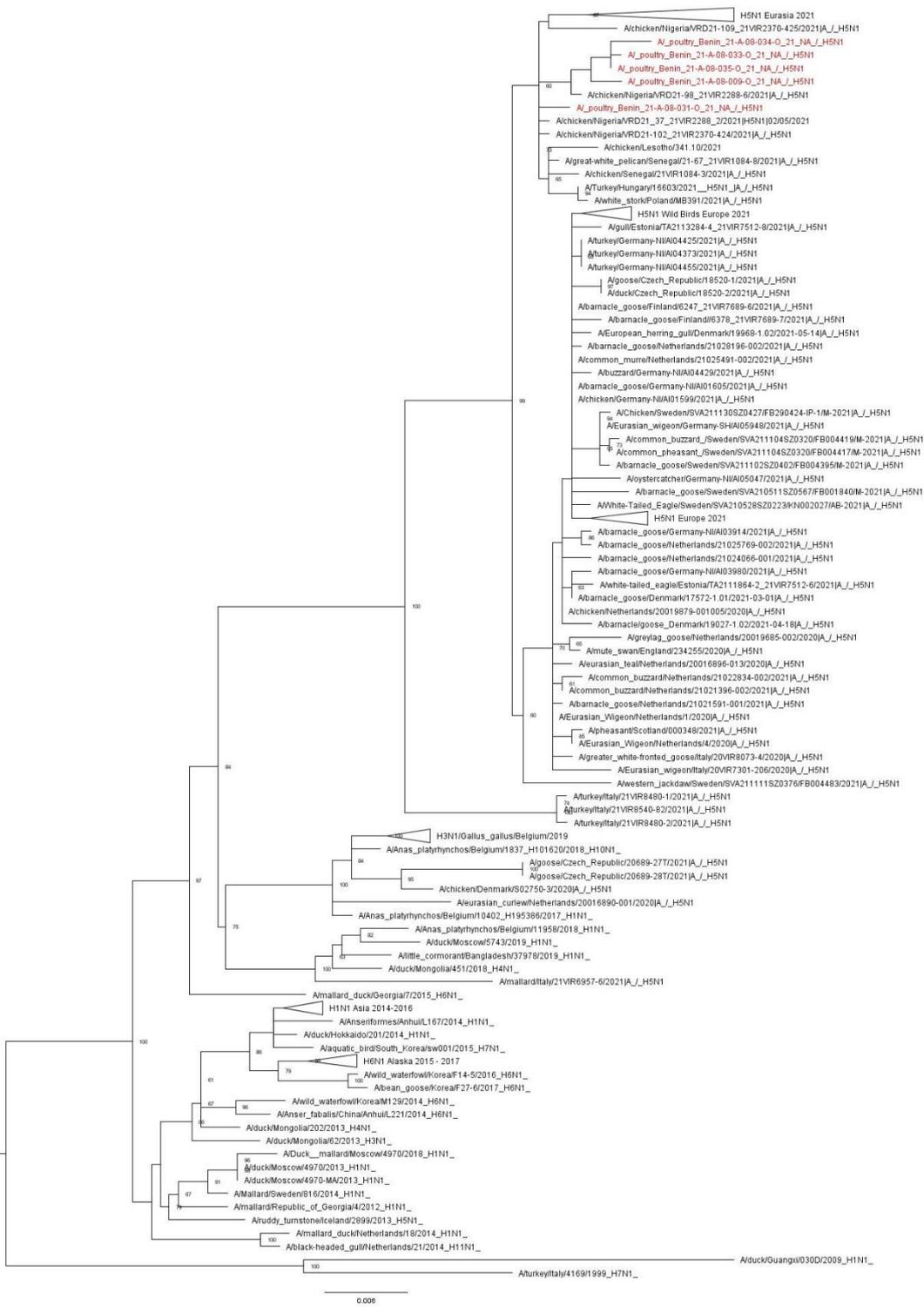
**Appendix Figure 3.** Maximum likelihood phylogenetic tree of the polymerase basic 1 (PB1) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.



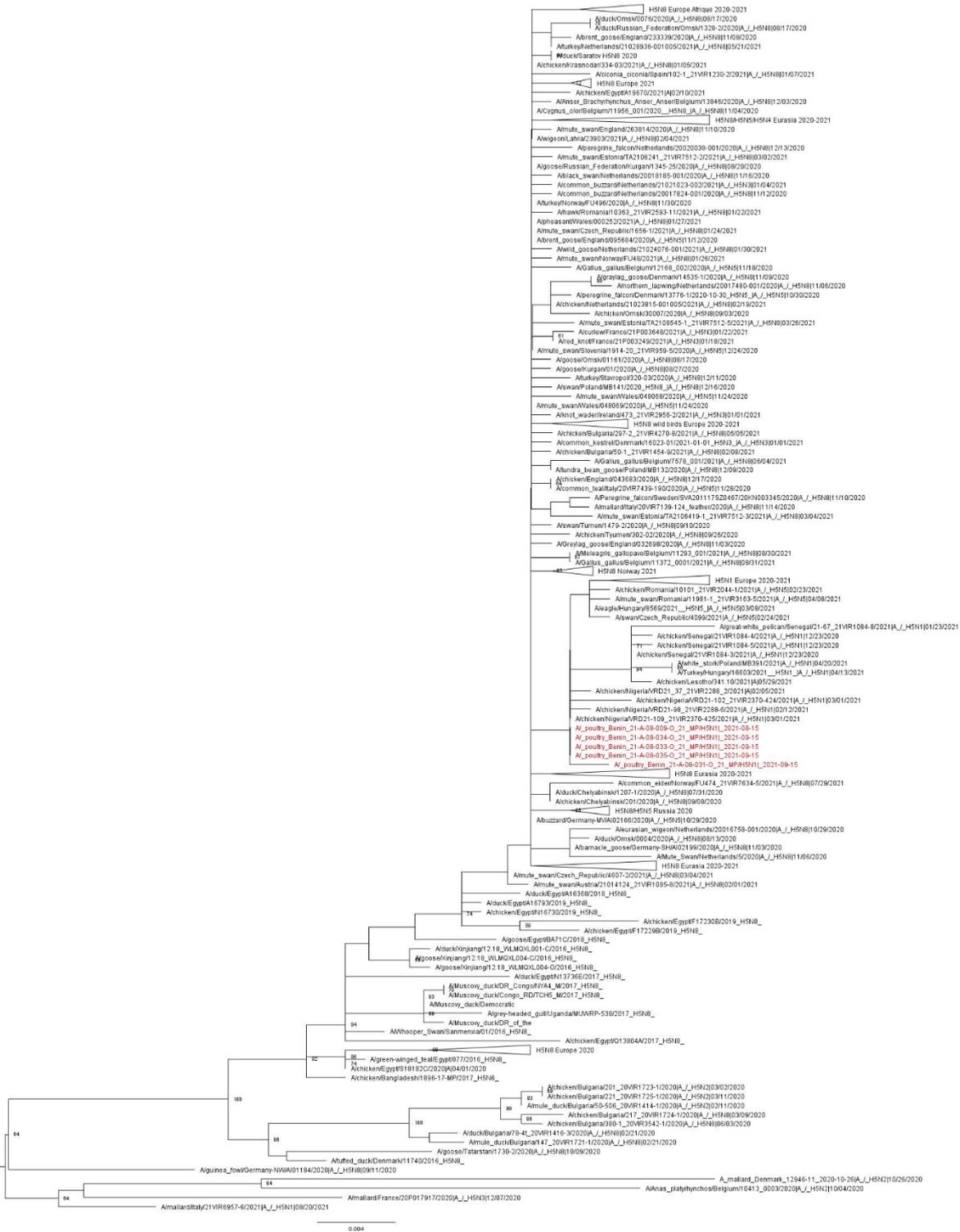
**Appendix Figure 4.** Maximum likelihood phylogenetic tree of the polymerase acidic (PA) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.



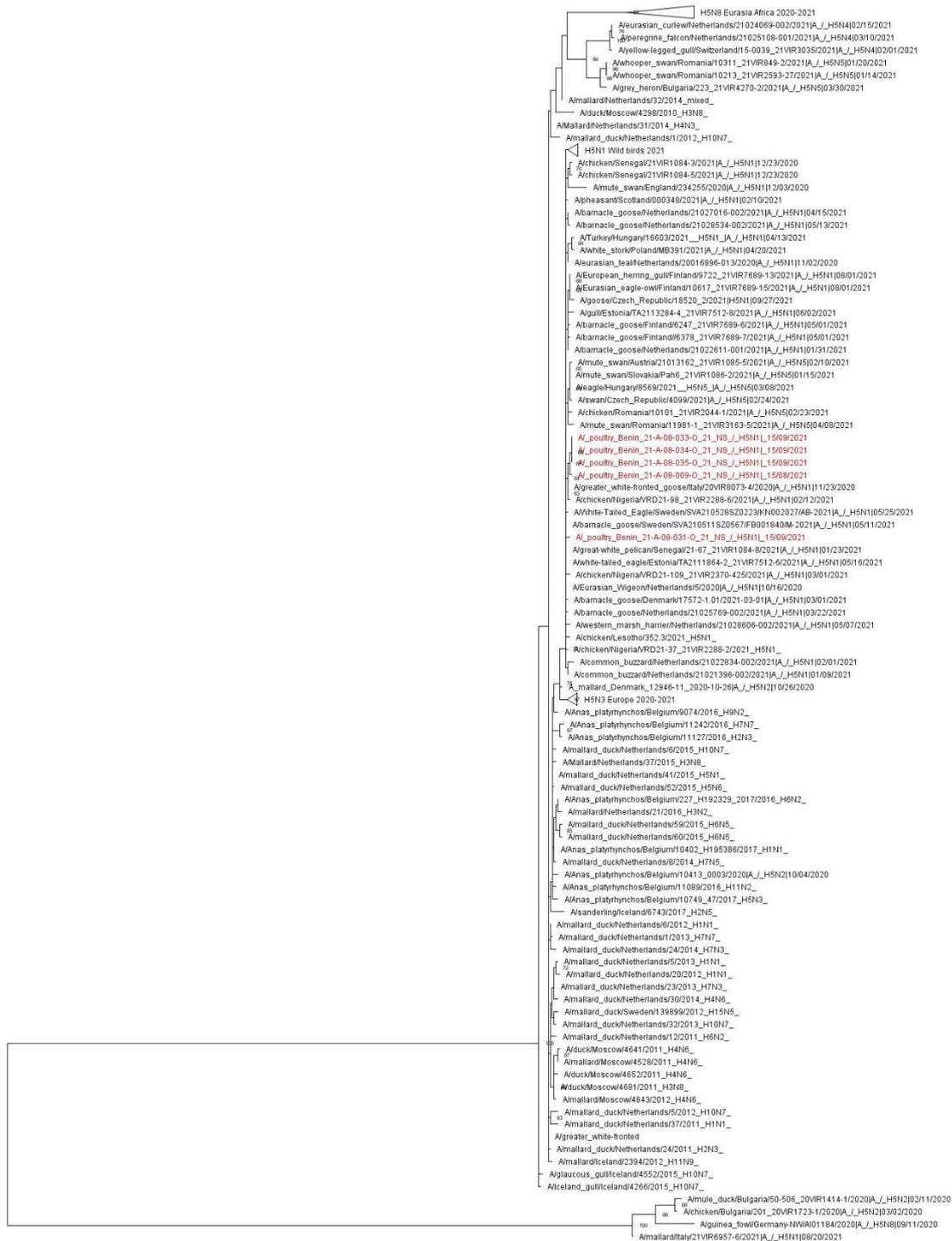
**Appendix Figure 5.** Maximum likelihood phylogenetic tree of the nucleoprotein (NP) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.



**Appendix Figure 6.** Maximum likelihood phylogenetic tree of the neuraminidase (NA) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.



**Appendix Figure 7.** Maximum likelihood phylogenetic tree of the matrix protein (M) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.



**Appendix Figure 7.** Maximum likelihood phylogenetic tree of the matrix protein (NS) gene. H5N1 virus sequences from Benin are indicated in red. Bootstrap values  $\geq 60\%$  are shown near the nodes. Scale bar indicates the average number of nucleotide substitutions per site.

## Article 2

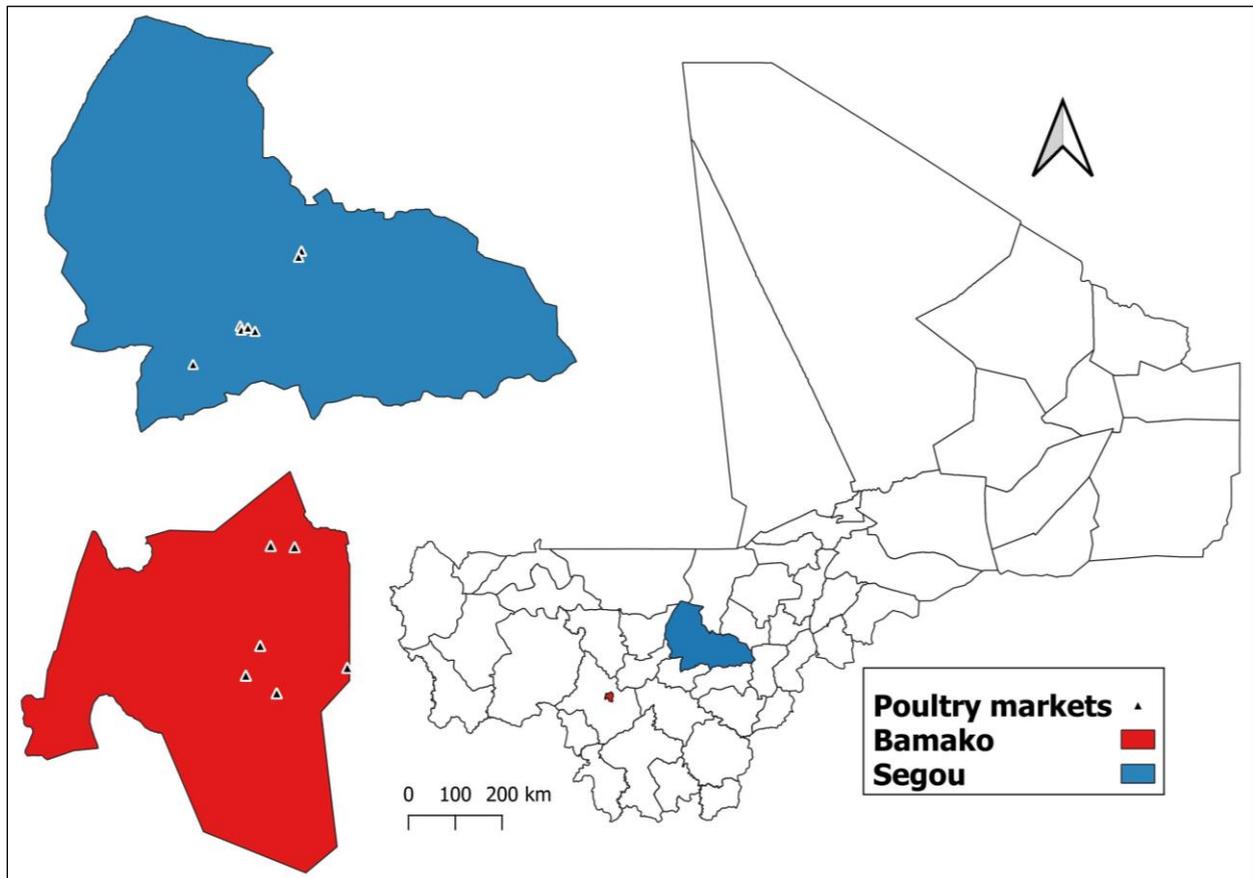
### Propriétés génétiques et profils phylogéographiques du virus H9N2 au Mali et en Afrique de l'Ouest

Le virus H9N2 représente le sous-type de VIA le plus répandu chez les volailles dans le monde et circule de manière endémique dans de nombreux pays. En plus de son impact chez les volailles, le virus H9N2 a été isolé plusieurs fois chez l'homme, démontrant son potentiel zoonotique. En Afrique, le virus H9N2 de la lignée G1 a d'abord été décrit en Afrique du Nord avant sa propagation en Afrique de l'Ouest à partir de 2017, le virus ayant été détecté au Bénin, Togo, Sénégal, Ghana, et Nigéria. Toutefois, les mécanismes d'introduction et de propagation du virus en Afrique de l'Ouest ne sont pas totalement élucidés. Au Mali, la surveillance concerne principalement les VIAHP et les données sur la circulation et les caractéristiques génétiques des VIAFP, notamment le virus H9N2 sont insuffisantes. Les marchés à volailles sont considérés dans la majorité des pays à faible revenu comme jouant un rôle majeur dans l'émergence et la propagation des VIA. Nous avons ainsi entamé une surveillance au niveau des marchés à volaille du Mali afin d'améliorer nos connaissances sur la circulation et les caractéristiques génétiques du virus H9N2.

L'objectif de cette étude était double : tout d'abord, réaliser une caractérisation génétique détaillée du virus H9N2 au Mali, et ensuite, examiner les dynamiques de transmission de ce virus entre l'Afrique du Nord et de l'ouest à travers des analyses phylogéographiques.

De 2021 à 2022, nous avons collecté 200 écouvillons chez des volailles dans 13 marchés au Mali (figure 13). Ces échantillons ont été initialement analysés au laboratoire central vétérinaire de Bamako au Mali et les échantillons positifs (28/200) ont été caractérisés à Toulouse au sein de l'UMR IHAP. Nous avons pu générer les séquences complètes pour 7 échantillons du Mali qui ont été par la suite soumises à des analyses phylogénétiques. Ces séquences ont également été analysées sur le plan moléculaire afin d'identifier de potentiels marqueurs associés soit à une adaptation aux mammifères soit à une augmentation de la virulence ou à la résistance aux antiviraux. Pour comprendre la transmission du virus H9N2 entre l'Afrique du Nord et l'Ouest, une analyse

phylogéographique continue a été réalisée sur l'ensemble des séquences HA disponibles dans les deux régions.



*Figure 13 : Localisation des marchés à volailles au Mali*

Les analyses phylogénétiques ont démontré que les virus H9N2 du Mali appartiennent à la lignée G1 et étaient proches des virus qui circulaient en Afrique de l'Ouest et au Maroc entre 2019 – 2020. Les virus H9N2 du Mali possèdent au niveau de leur site de liaison aux récepteurs les mutations Q226L et I155T associées à une adaptation de ces virus aux récepteurs cellulaires des mammifères. Nous avons également observé au niveau du site de clivage de la HA de deux virus du Mali le motif RSNR/GLF qui n'avait jusqu'à présent

pas été décrit en Afrique. D'autres marqueurs liés à une augmentation de la virulence sur PB1 et M1, à la transmission chez les mammifères sur PB2 et la résistance aux antiviraux sur M2 ont été également identifiés. La reconstruction phylogénétique a révélé un seul évènement de transmission de longue distance en Afrique de l'Ouest vers 2015 provenant probablement du Maroc. Cette introduction pourrait être peut-être due à l'importation d'œufs à couver et de poussins d'un jour du Maroc en Afrique de l'Ouest. Après son introduction en Afrique de l'Ouest, le virus H9N2 s'est propagé dans les différents pays de la région.

Cette étude décrit pour la première fois les caractéristiques génétiques des virus H9N2 au Mali et explore l'introduction et la propagation de ces virus en Afrique de l'Ouest. Elle améliore ainsi nos connaissances sur le potentiel zoonotique et la circulation de ces virus dans la région et contribuera davantage à l'amélioration de leur surveillance.

1 **Genetic insights and phylogeographic patterns of H9N2 avian**  
2 **influenza viruses in Mali and West Africa**

3  
4 **Authors: Idrissa Nonmon Sanogo<sup>1,2</sup>, Claire Guinat<sup>1</sup>, Simon Dellicour<sup>3,4</sup>, Mohamed**  
5 **Diakité<sup>5</sup>, Ousmane A. Koita<sup>6</sup>, Christelle Camus<sup>1</sup>, Mariette Ducatez<sup>1</sup>**

6  
7 **Affiliations:**

8 <sup>1</sup> Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP), UMR 1225, Université de Toulouse, INRAE,  
9 ENVT, Toulouse, France

10 <sup>2</sup> Faculté d'Agronomie et de Médecine Animale (FAMA), Université de Ségou, Ségou, Mali

11 <sup>3</sup> Spatial Epidemiology Lab (SpELL), Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

12 <sup>4</sup> Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute, Laboratory  
13 for Clinical and Epidemiological Virology, KU Leuven, Leuven, Belgium

14 <sup>5</sup> Laboratoire Central Vétérinaire, Bamako Mali

15 <sup>6</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée, Faculté des Sciences et Techniques (FAST),  
16 University of Sciences, Techniques and Technologies of Bamako (USTTB), Bamako E 3206,  
17 Mali niversité de Bamako, Bamako, Mali

18  
19 **Corresponding authors:** [mariette.ducatez@envt.fr](mailto:mariette.ducatez@envt.fr), [idrissa.sanogo@envt.fr](mailto:idrissa.sanogo@envt.fr)

20 **Keywords:** Influenza A Virus, H9N2, phylogeography, Western Africa, Mali

21  
22  
23  
24  
25 *Manuscript in preparation*

31 **Abstract**

32 Avian influenza viruses of the H9N2 subtype become widespread in West Africa since  
33 their first detection in 2017. To better understand the genetic characteristic and  
34 spatiotemporal dynamics of H9N2 virus in the region we carried out the genetic  
35 characterization of H9N2 viruses collected during active surveillance in poultry markets  
36 in Mali between 2021-2022 and performed a phylogeographic analysis to investigate the  
37 dispersal history of H9N2 lineages between northern and western Africa. The Malian  
38 H9N2 virus belonged to the G1 lineage, similar to viruses circulating in western and  
39 northern Africa and they possessed multiple molecular markers associated with increased  
40 zoonotic potential and virulence. Some Malian strains carried at their cleavage site the  
41 RSNR motif observed mainly in human H9N2 only in Asia. Our phylogeographic analysis  
42 revealed a single significant long-distance lineage dispersal event of H9N2 virus to West  
43 Africa that likely originated from Morocco in 2015.

44 Our study highlights the need for ongoing surveillance of H9N2 viruses in poultry in West  
45 Africa to better understand virus evolution and the potential threat to public health.

46

47

48

49

50

51

52

## 53 **Introduction**

54           Low pathogenic avian influenza viruses (LPAIVs), particularly the H9N2 subtype,  
55   pose a significant global threat to both poultry and human health (Peacock et al., 2019;  
56   Pusch & Suarez, 2018). H9N2 viruses have the potential to cross species barriers and infect  
57   various mammalian species, including humans, raising concerns about zoonotic  
58   transmission (Peiris et al., 1999; Qian et al., 2021). Furthermore, H9N2 viruses have been  
59   associated with outbreaks causing high mortality among domestic poultry (El Houadfi et  
60   al., 2016; Jeevan et al., 2019; Perez & Wit, 2016).

61           In Africa, H9N2 virus was first reported in Egypt and Tunisia in 2011 before being  
62   described in other countries in northern Africa (El-Zoghby et al., 2012; Monne et al., 2013;  
63   Tombari et al., 2011). Since its emergence in Morocco in 2016, the virus has rapidly  
64   disseminated across the country and into other regions in Africa (El Houadfi et al., 2016;  
65   Nagy et al., 2017). In Western Africa, the virus was initially detected in 2017 in Burkina  
66   Faso (Zecchin et al., 2017), and subsequently, it has been reported in several countries in  
67   the region such as Senegal (Jallow et al., 2020), Ghana (Awuni et al., 2019; Kotey et al.,  
68   2022), Nigeria (Sulaiman et al., 2021), Benin, and Togo (Fusade-Boyer et al., 2021). Notably,  
69   H9N2 viruses isolated in western Africa so far belong to the G1 lineage and share genetic  
70   relatedness with those circulating in northern Africa and the Middle East (Barberis et al.,  
71   2020; El Houadfi et al., 2016; El Mellouli et al., 2022). However, the extent of geographic  
72   diffusion between northern and western Africa remains poorly understood due to limited  
73   surveillance activities in western Africa, leading to underreporting and underdetection of  
74   H9N2 viruses (Pavade et al., 2011).

75           Despite experiencing the circulation of LPAIVs since 2007 (Molia et al., 2010), Mali  
76 lacks comprehensive studies on the epidemiology and genetic characteristics of these  
77 viruses, particularly H9N2. The country faces a heightened risk of new AIV strains  
78 emergence due to the predominant practice of rearing domestic birds in traditional  
79 farming systems without adequate biosecurity measures (Molia et al., 2015; Traoré  
80 Adama, 2013). This is coupled with the presence of the Inner Delta of the Niger River,  
81 which serves as a significant gathering site for millions of wild birds that may carry AIVs  
82 (Cappelle et al., 2012; Gaidet et al., 2007).

83           Live bird markets (LBMs) in Mali play a substantial role in the emergence and  
84 spread of new AIV strains, as various species of domestic birds from different regions are  
85 brought together (Molia et al., 2016). Risk factors associated with the presence of AIVs,  
86 such as poor sanitary conditions and improper disposal of dead birds, have been reported  
87 in the majority of Malian LBMs (Molia et al., 2016). Therefore, active surveillance in LBMs  
88 is crucial for understanding the genetic characteristics, geographic origins, and dispersal  
89 patterns of the circulating H9N2 viruses in Mali.

90           In this study, we conducted a comprehensive genomic characterization of H9N2  
91 viruses collected from LBMs in Mali in 2022. Additionally, we conducted a  
92 phylogeographic analysis to investigate the dispersal history of H9N2 lineages between  
93 northern and western Africa. Our results indicate a single significant long-distance lineage  
94 dispersal event to western Africa originated from Morocco.

95

96

97 **Methods**

98 *H9N2 genome sequences from Mali*

99           From June 2021 to April 2022, we collected 200 cloacal swabs from apparently  
100 healthy domestic poultry in nine LBMs in Bamako and Segou in Mali. The swabs were  
101 placed into sterile tubes containing 500 µl of phosphate-buffered saline supplemented  
102 with antibiotics (100 IU/ml penicillin: and streptomycin: 100 µg/mL). Samples were  
103 promptly transported to the Central Veterinary Laboratory of Bamako (LCV) and stored  
104 at -80°C until further analysis.

105           Viral RNA was extracted from the swabs using the NucleoSpin RNA extraction  
106 kit (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions. The  
107 extracted RNA samples were tested in pools of five using real-time RT-PCR targeting the  
108 Influenza A matrix (M) gene at the LCV (Fouchier et al., 2000). Positive samples were  
109 applied to Flinders Technology Associates (FTA) cards to inactivate viral infectivity and  
110 preserve nucleic acid integrity. The FTA cards were shipped to the VIRÉMIE laboratory of  
111 UMR IHAP in Toulouse for further analysis. RNA was eluted from FTA cards by placing  
112 six mm-diameter disc fragments, cut from the FTA cards spots, in 200 µl of Tris EDTA (TE)  
113 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 0.1 mM EDTA) following previously described  
114 protocols (Abdelwhab et al., 2011). Viral RNA was extracted from the FTA cards using the  
115 NucleoMag Pathogen kit (Macherey-Nagel, Germany) with an automatic KingFisher Flex  
116 Purification System (Thermo Fisher, Waltham, MA; catalog number: 5400630). The  
117 samples were tested for AIV-specific RNA using a Sybergreen real-time RT-PCR assay

118 targeting the AIV matrix gene (Fouchier et al., 2000). AIV-positive samples were  
119 subsequently tested for the H9 subtype using RT-Qpcr (Monne et al., 2008).

120 The partial HA gene segment of positive samples with virus loads of quantification  
121 cycles (Cq) below 30 were sequenced using Sanger sequencing techniques to select  
122 representative strains for full genome sequencing (data not shown). Selected samples were  
123 then subjected to full genome sequencing using the Illumina MiSeq System (Illumina, San  
124 Diego, CA, USA) following previously described protocols (Barman et al., 2019). The  
125 generated sequences were manually curated with BioEdit v7.2 (Hall et al., 2011).

126

### 127 *Molecular characterization of H9N2 viruses in Mali*

128 To gain insights into the potential determinants of AIVs transmission to  
129 mammalian species and identify molecular markers associated with increased virulence,  
130 an analysis of the deduced amino acid sequences of the Malian isolates was conducted.  
131 Specifically, the HA receptor-binding site (RBS) was examined using the H3 numbering  
132 system (Burke & Smith, 2014) to assess its binding affinity to mammalian-type receptors  
133 (Li et al., 2014; Matrosovich et al., 2001; Wan & Perez, 2007). Furthermore, the numbers  
134 and locations of N-linked glycosylation sites (Asn-Xaa-Ser/Thr) were determined in the  
135 HA segment using the online program NetNGlyc 1.0  
136 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>). These glycosylation sites  
137 have been associated with AIVs antigenic escape from the host's immune responses  
138 (Schulze, 1997). The other gene segments of the Malian H9N2 viruses were examined to

139 identify amino acid mutations associated with increased AIVs virulence and adaptation  
140 in mammalian hosts.

#### 141 *Continuous phylogeographic analysis of H9N2 in northern and western Africa*

142 To obtain a comprehensive dataset, all available African H9N2 genetic sequences  
143 of the HA gene segment for northern and western Africa were retrieved from the GISAID  
144 database, covering the period from January 1, 2011, to February 7, 2022. These sequences  
145 were merged with the newly generated Malian sequences. The alignment of the sequences  
146 was performed using MAFFT v7.49 (Kato & Standley, 2013) and checked using AliView  
147 v1.28 (Larsson, 2014). Based on this alignment, a maximum likelihood phylogenetic  
148 analysis was first performed using the program RAXML-NG (Kozlov et al., 2019) with  
149 1,000 bootstrap replicates to assess branch support. This preliminary phylogenetic  
150 inference aimed to identify phylogenetic clusters of identical sequences sharing the same  
151 geographic coordinates and sampling date. Considering that retaining more than one  
152 sequence per cluster would not contribute significant information to subsequent  
153 phylogeographic analyses, we subsampled the original alignment to randomly select only  
154 one sequence per phylogenetic cluster. As a result, the final dataset of 78 sequences  
155 derived from nine countries in northern and western Africa (Algeria, Benin, Ghana, Mali,  
156 Morocco, Nigeria, Senegal, Togo, and Tunisia), with sampling dates ranging from April 2,  
157 2012, to February 7, 2022 (Supplementary Table S1). To avoid duplication of sampling  
158 coordinates in this final dataset, we randomly sampled data within a circular buffer zone  
159 of 0.25, excluding the sea areas if they fell within the buffer (Dellicour et al., 2020).

160 The continuous phylogeographic analysis was performed using BEAST v1.10.4  
161 (Drummond & Rambaut, 2007) along with the BEAGLE 3 library to improve  
162 computational performance (Ayres et al., 2019). The substitution process was modeled  
163 using the HKY +  $\Gamma$ 4 parametrization (Shapiro et al., 2006), the branch-specific evolutionary  
164 rates were modeled using a relaxed molecular clock with a lognormal distribution  
165 (Drummond et al., 2006), and a skygrid coalescent model was specified as tree topology  
166 prior (Hill & Baele, 2019). We used the relaxed random walk (RRW) diffusion model  
167 (Lemey et al., 2010; Pybus et al., 2012) to perform the continuous phylogeographic  
168 reconstruction, with the among-branch heterogeneity in diffusion velocity modeled with  
169 a gamma distribution. We ran three independent analyses for one billion generations,  
170 sampling every 100,000 generations. Convergence and mixing properties were again  
171 assessed using Tracer v1.7.1 (Rambaut et al., 2018), ensuring that all continuous  
172 parameters were associated with an ESS value >200. After having discarded 10% of  
173 sampled posterior trees as burn-in, we obtained and annotated the MCC tree using  
174 TreeAnnotator 1.10.4 (Suchard et al., 2018). We identified phylogenetic trees that exhibit  
175 multiple long-distance dispersal events by examining the latitudes of branches in the trees,  
176 using a specific latitude cut-off as a threshold corresponding to the South border of  
177 Morocco. Trees with more than one branch starting above the cut-off and ending below it  
178 are considered to have multiple long-distance dispersal events. We used functions  
179 available in the R package 'seraphim' (Dellicour et al., 2016, 2017) to extract spatiotemporal  
180 information embedded within posterior trees and visualize the continuous  
181 phylogeographic reconstructions. We also used the 'spreadStatistics' function of the R  
182 package 'seraphim' to estimate the spatial wavefront distance from the epidemic origin,

183 the weighted lineage dispersal velocity over time, and the weighted diffusion coefficient  
184 (Trovão et al., 2015).

185         Given the sensitivity of phylogeographic analyses to heterogeneous sampling  
186 efforts (Kalkauskas et al., 2021), we investigated the potential impact of different sampling  
187 strategies on the estimation of clock rate and time to the most common recent ancestor  
188 parameters, as well as on the topology of the MCC tree. Two sampling schemes were  
189 employed: (i) random sampling for equivalent representation: sequences were randomly  
190 selected to ensure an equivalent number of sequences from both northern and western  
191 Africa to achieve balanced representation from these two regions, and (ii) random  
192 sampling for reduced biased sampling: sequences were randomly sampled to reduce the  
193 number of sequences from Morocco where high sampling was observed compared to  
194 other countries to mitigate any potential bias arising from uneven sampling effort across  
195 different countries.

196

## 197 **Results**

### 198 *Avian influenza virus identification and whole genome sequences*

199         We screened 200 oropharyngeal samples collected from LBMs by qRT-PCR. 28/200  
200 samples (14 %) tested positive for AIV and specifically for the H9 subtype with Ct values  
201 ranging from 20.7 to 35.4. Seven positive samples (Table 1) were selected for whole  
202 genome sequencing and fully sequenced. The nucleotide sequence identity among the  
203 Malian H9N2 isolates ranged from 95.8 to 100% in the eight gene segments. Sequences

204 generated in this study were submitted to GenBank (accession numbers: OR133241 -  
205 OR133296).

206 **Table 1.** H9N2 Viruses characterized in this study

Sample ID	Collection date	Location	Accession N°
A/chicken/Mali/22-A-01-113/2022	08-01-2022	Ségou	OR133289-96
A/chicken/Mali/22-A-02-123/2022	07-02-2022	Bamako	OR133241-48
A/chicken/Mali/22-A-02-128/2022	07-02-2022	Bamako	OR133249-56
A/chicken/Mali/22-A-02-139/2022	07-02-2022	Bamako	OR133257-64
A/chicken/Mali/22-A-02-143/2022	07-02-2022	Bamako	OR133265-72
A/chicken/Mali/22-A-02-152/2022	07-02-2022	Bamako	OR133273-80
A/chicken/Mali/22-A-02-158/2022	07-02-2022	Bamako	OR133281-88

207

### 208 *Molecular characterization*

209 A detailed analysis of the deduced amino acid sequences of Malian H9N2 viruses  
210 identified several molecular markers associated with mammalian adaptation and  
211 increased virulence in the HA, PB1, PB2, PA, NP, M, and NS1 proteins (**Table 2**). In  
212 particular, all Malian H9N2 viruses carry the Q226L and I155T mutations (H3 numbering)  
213 in the receptor binding site of the HA protein. These mutations are involved in the binding  
214 of AIVs to mammalian receptors (**Table 2**). In addition, the HA protein of five Malian  
215 H9N2 viruses had the RSSR/GLF amino acids motif at the cleavage site, which is  
216 characteristic of LPAIV. Conversely, two Malian H9N2 isolates harbor the RSNR/GLF  
217 motif due to the substitution of S<sup>329</sup>N (H3 numbering). Although the RSNR motif had  
218 previously been reported in various studies on avian H9N2 viruses in Asia, to our  
219 knowledge, this is the first report of this motif in H9N2 viruses from Africa. In regards to  
220 the other proteins of H9N2 viruses, we identified multiple mutations known to be  
221 associated with increased polymerase activity in mammalian cells and increased virulence

222 in mammals (**Table 2**). Specifically, in the NS1 protein, the F<sup>103</sup>L mutation responsible for  
 223 increased replication and virulence in mammals was identified in three Malian strains  
 224 (**Table 2**). In addition, the S<sup>31</sup>N mutation associated with amantadine resistance was  
 225 observed in the M2 protein. Based on the results predicted by NetNGlyc 1.0 software, all  
 226 the Malian H9N2 viruses had seven N-linked glycosylation sites in the HA protein at  
 227 positions (29, 141, 218, 298, 305, 492, and 551).

228 **Table 2.** Amino acids substitutions associated with host-shift and virulence in the Malian  
 229 H9N2 viruses

Gene	Mutation	113	123	128	139	143	152	158	Functions
HA	I155T	T	T	T	T	T	T	T	Binding of AIV to mammalian receptors (Chrzastek et al., 2018; X. Li et al., 2014)
	Q226L	L	L	L	L	L	L	L	Promote AIV affinity for human-type receptors (Matrosovich et al., 2001; Wan & Perez, 2007)
	Cleavage site	RSNR	RSRR	RSNR	RSRR	RSRR	RSRR	RSRR	
PB2	M185I	I	I	I	I	I	I	I	Mammalian host-specific marker (Zhang et al., 2011)
PB1	D3V	V	V	V	V	V	V	V	Polymerase activity and virulence in mammalian cells (Elgendy et al., 2017)
PA	A515T	T	T	T	T	T	T	T	Increased polymerase activity and virulence in mice and ferrets (Hulse-Post et al., 2007)
NP	E372D	D	D	D	D	D	D	D	Found in AIVs isolated from humans (Chen et al., 2006)
M1	N30D	D	D	D	D	D	D	D	Increased virulence in mice (Fan et al., 2009)
	T215A	A	A	A	A	A	A	A	
M2	S31N	N	N	N	N	N	N	N	Amantadine resistance (Wang et al., 2013)
NS1	P42S	S	S	S	S	S	S	S	Increased virulence in mice (Jiao et al., 2008)
	F103L	V	L	V	L	L	I	V	

230

231

232 *Phylogenetic and Phylogeographic analysis*

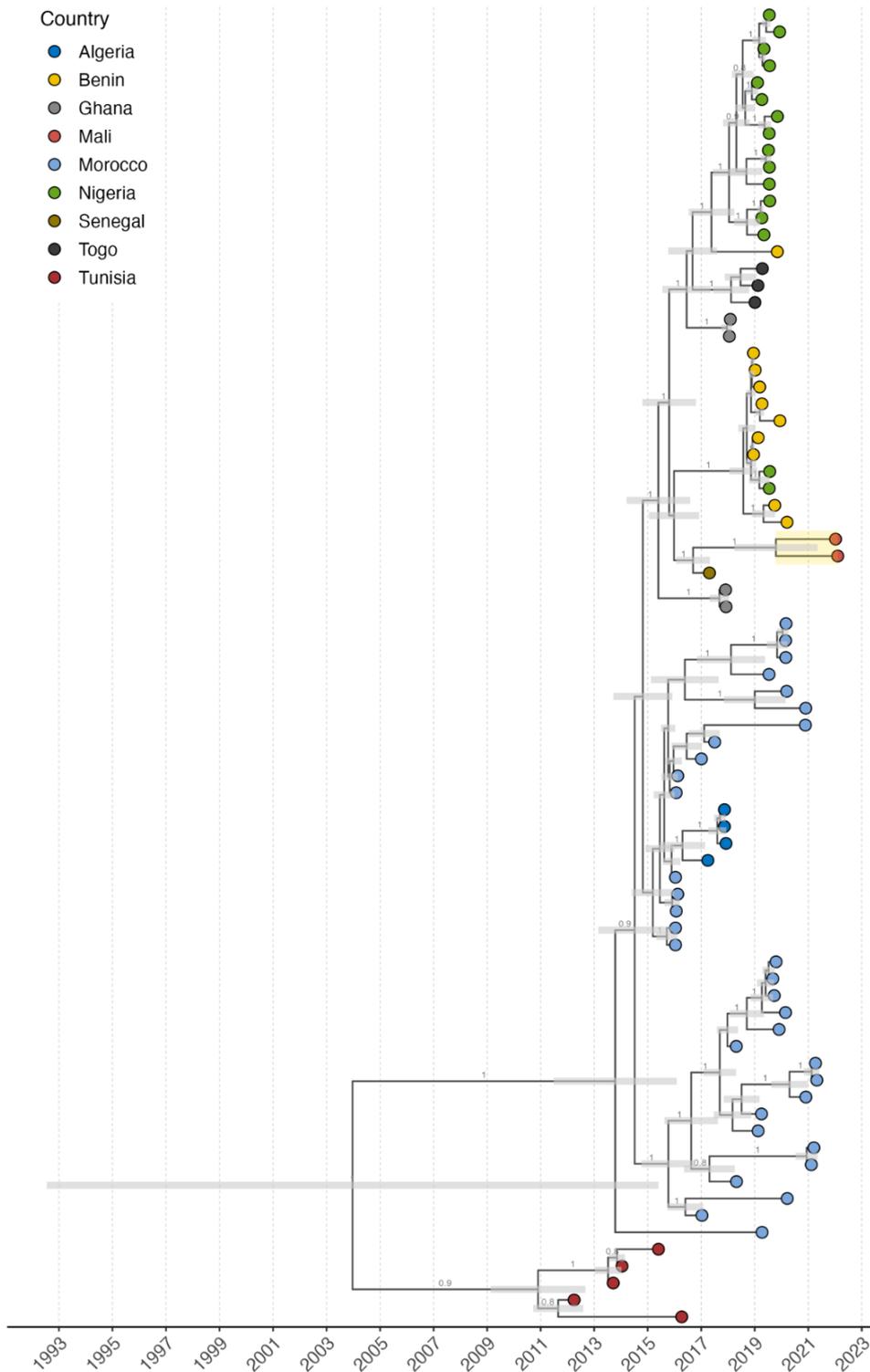
233 The phylogenetic analysis of the HA gene segment (Figure 1) showed that the Malian  
234 H9N2 viruses belong to the H9N2 G1 lineage, and were closely related to viruses isolated  
235 in western Africa and Morocco between 2019 and 2020. The mean tMRCA of the HA gene  
236 segment for Malian H9N2 viruses was estimated around May 2019 (95% HPD: October  
237 2018 – November 2020). The tree topology indicated that the Malian strains had evolved  
238 into two genetically distinct clusters within the country. The tMRCA for the first cluster  
239 was estimated around April 2021 (95% HPD: January 2021 – July 2021) and, for the second  
240 in May 2021 (95% HPD: February 2021 – August 2021).

241 The median evolutionary rate of the H9N2 virus in northern and western Africa  
242 was estimated to be  $3.8 \times 10^{-3}$  substitutions per site per year (95% highest posterior density  
243 HPD:  $2.7 \times 10^{-3}$  –  $35.2 \times 10^{-3}$ ) and the most recent common ancestor was estimated to have  
244 occurred in 2003 (95% HPD: 1989 – 2012).

245 Phylogeographic reconstructions revealed a single significant long-distance  
246 lineage dispersal event that consistently appeared in all posterior trees (**Figure 2**). This  
247 dispersal event likely originated from Morocco, serving as the primary source for the  
248 subsequent expansion phase of H9N2 lineages from northern to western Africa (**Figure 1**).  
249 The long-distance dispersal event was followed by the spread of H9N2 lineages across  
250 various countries in western Africa (**Figures 1 and 2**). The estimations of weighted lineage  
251 dispersal velocity revealed temporal variations in the rate of spread. From 2003 to 2013,  
252 the median weighted lineage dispersal velocity was approximately 92 km/year (95% HPD  
253 30 – 208). However, from 2014 onwards, the dispersal velocity exhibited an increased trend

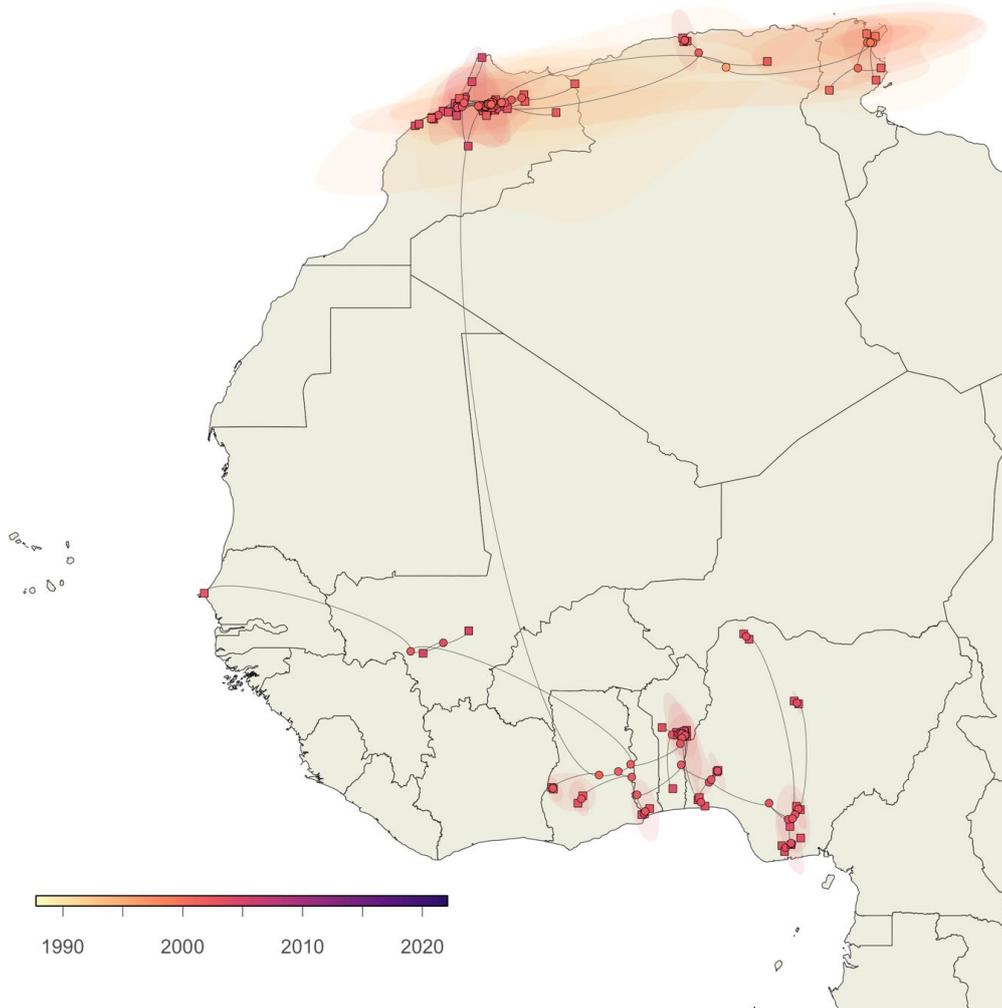
254 over time, with a notable increase up to 685 km/year (95% HPD 7 – 1,789) observed around  
255 2015 (**Figure 2**). This increase corresponds to the expansion phase of the epidemic from  
256 northern to western Africa. Subsequently, between 2017 and 2020, the dispersal velocity  
257 decreased to approximately 150 km/year (95% HPD 107 - 229), followed by a second  
258 notable increase observed in 2021, reaching up to 607 km/year (95% HPD 200 - 905). The  
259 observed temporal changes in weighted lineage dispersal velocity were further supported  
260 by our analysis of the spatial wavefront distance from the epidemic origin. This analysis  
261 showed an approximate 1,000 km increase in the distance covered by lineages around 2015  
262 (**Figure 2**). Additionally, the median weighted diffusion coefficient was 35,084 km<sup>2</sup>/year  
263 (95% HPD 23,962 – 49,492).

264 The sensitivity analysis revealed that the choice of sampling schemes had minimal  
265 impact on the estimation of the evolutionary rate and the time of the most common recent  
266 ancestor (tMRCA). The median rate of evolutionary change ranged from  $3.8 \times 10^{-3}$  to  $4.2 \times 10^{-3}$   
267 substitutions per site and per year, with overlapping 95% HPD intervals across all  
268 sampling schemes (**Figure S1**). Similarly, the estimated median tMRCA only varied  
269 slightly across the different sampling schemes, ranging from 2003 to 2005, which  
270 represents a relatively short time scale related to the studied period. The single significant  
271 long-distance lineage dispersal event originating from Morocco was observed in all  
272 posterior trees in the reduced sampling scheme and 98.5% (985 out of 1,000) of posterior  
273 trees in the equivalent sampling scheme (**Figure S2**). Again, this suggests that the choice  
274 of sampling schemes had a limited influence on this particular observation.

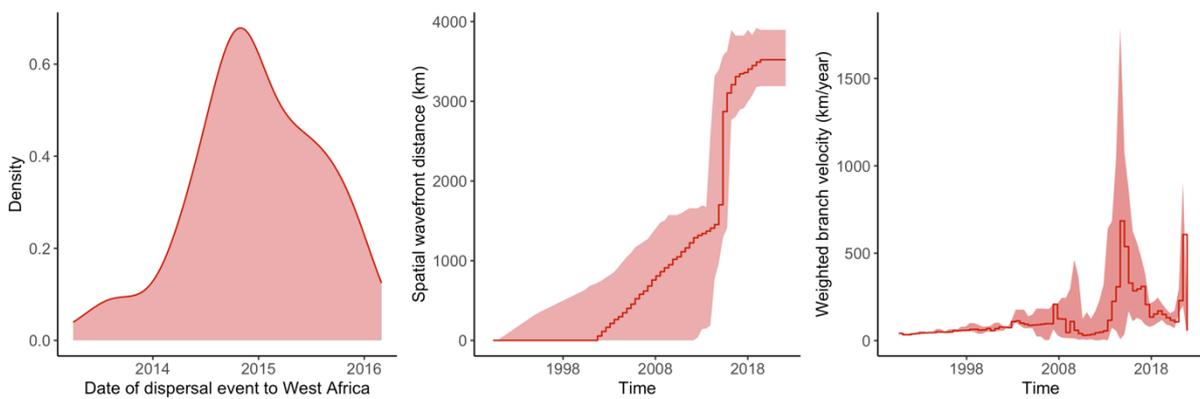


275

276 **Figure 1.** Maximum clade credibility tree estimated from H9N2 genome sequences collected  
 277 from nine countries in northern and western Africa (Algeria, Benin, Ghana, Mali, Morocco,  
 278 Nigeria, Senegal, Togo, and Tunisia) from April 2, 2012 to February 7, 2022. Tip node colors  
 279 indicate the country of sampling. Bars at internal nodes represent the 95% highest posterior  
 280 density intervals of the node date. Numbers at internal branches show the clade posterior  
 281 probabilities above 0.75. The highlighted area in yellow shows the Malian sequences.



283



284

285 **Figure 2.** Continuous phylogeographic reconstruction of the dispersal history of H9N2 lineages in  
 286 northern and western Africa. We here map the maximum clade credibility (MCC) tree and 80%  
 287 highest posterior density regions reflecting the uncertainty related to the Bayesian phylogeographic  
 288 inference. Nodes shaped as circles and squares indicate internal and tip nodes, respectively, and are  
 289 colored according to their time of occurrence. This figure also reports dispersal statistics: date of

290 dispersal event to western Africa, the evolution of the spatial wavefront distance from the origin of the  
291 epidemic, and the evolution of the weighted lineage dispersal velocity through time.

## 292 **Discussion**

293 This study is the first report on the genetic and phylogenetic characteristics of G1-  
294 lineage H9N2 viruses isolated from LBMs in Mali. The G1-lineage has been known to be  
295 circulating in Africa since 2016 and has spread to different countries within the continent  
296 (Awuni et al., 2019; El Houadfi et al., 2016; Fusade-Boyer et al., 2021; Sulaiman et al., 2021;  
297 Zecchin et al., 2017). Previous studies reported the circulation of AIVs among domestic  
298 and wild birds in Mali, but they have mainly focused on HPAIV strains and did not  
299 provide sufficient information on the genetic and molecular characteristics of the  
300 circulating viruses (Cappelle et al., 2012; Molia et al., 2010, 2017).

301 The positivity rate of AIVs among poultry in LBMs (14 %) was higher than AIV  
302 prevalence previously reported in backyard poultry (3.6%) in Mali (Molia et al., 2010).  
303 LBMs are considered a potential reservoir for AIVs that can play a major role in their  
304 amplification and dissemination among poultry (Molia et al., 2016; Sulaiman et al., 2021).  
305 Additionally, Malian LBMs were characterized by the main risk factors associated with  
306 the presence of AIVs such as poor biosecurity and hygienic practices and large catchment  
307 area of backyard poultry (Molia et al., 2016). Thus, it is possible that after being introduced  
308 in the LBMs, AIVs were amplified and more easily spread among birds.

309 Analysis of the amino acid sequences of the HA protein of the 5 out 7 Malian  
310 isolates indicated the presence of the RSSR/GLF motif at the HA cleavage site, which is  
311 identical to those found in the LPAI H9N2 viruses circulating in western Africa. However,  
312 two Malian H9N2 viruses had a different pattern (RSNR/GLF) at their cleavage site. To

313 the best of our knowledge, this pattern was described only in H9N2 viruses isolated in  
314 humans and poultry in Israel and India (Perk et al., 2006; Tosh et al., 2008). The significance  
315 of this mutation on viral fitness and pathogenicity is not fully understood and further  
316 study is needed. Nevertheless, as the cleavage site is an indicator of pathogenicity, these  
317 findings may indicate a change in the degree of virulence of these two viruses (Klenk &  
318 Rott, 1988).

319 All the Malian H9N2 viruses possess amino acid residues in the HA RBS that were  
320 associated with an increased binding affinity of AIVs to human-type ( $\alpha$ -2, 6-linked sialic  
321 acids) receptors such as L-226 and T155 (Li et al., 2014; Wan & Perez, 2007), indicating the  
322 potential for these viruses to infect humans as reported in previous studies (Jallow et al.,  
323 2020; Saito et al., 2001). These mutations were observed in recent H9N2 viruses belonging  
324 to the G1-lineage isolated in many countries in western Africa confirming the spread of  
325 these viruses within the region. Other key molecular markers linked to mammalian host  
326 adaptation (NP-E372D), increased polymerase activity, and virulence in mammals (PB1-  
327 R207K, PB1-H436Y, M1-N30D, M1-T215A, NS1-P42S, and NS1-F103L) were also found in  
328 Malian H9N2 isolates, confirming the zoonotic potential of these viruses. Furthermore, all  
329 the analyzed H9N2 from Mali have seven N-linked glycosylation sites (positions 21, 97,  
330 133, 290, 297, 484, and 543, H3 numbering), which were identical to those found in H9N2  
331 viruses isolated in northern Africa (Barberis et al., 2020; Larbi et al., 2022) (Barberis et al.,  
332 2020; Larbi et al., 2022). The additional PGS reported in some H9N2 strains isolated in  
333 western Africa (Awuni et al., 2019; Fusade-Boyer et al., 2021; Zecchin et al., 2017) was not  
334 observed in the Malian isolates. Compared to G1- like prototype (A/quail/Hong

335 Kong/G1/97), the Malian isolates lost two PGS at positions 198 and 210. Glycosylation  
336 plays an important role in viral biology, regulating the virulence and receptor-binding  
337 specificity of avian influenza virus (AIV) (Peng et al., 2019; Schulze, 1997). Variations in  
338 the number or position of PGS may affect the biology of AIVs and could allow these  
339 viruses to escape host antibody recognition (Peng et al., 2019).

340 This study also explores the spatial spread of H9N2 lineages in northern and  
341 western Africa. We performed continuous phylogeographic reconstructions based on the  
342 analysis of H9N2 sequences of the HA gene segment, including recent sequences  
343 generated from Mali.

344 The Malian isolates closely clustered with H9N2 viruses circulating in western  
345 Africa (Awuni et al., 2019; Fusade-Boyer et al., 2021; Zecchin et al., 2017) and northern  
346 Africa (El Houadfi et al., 2016; El Mellouli et al., 2022). Most of the borders in western  
347 Africa are known to be porous, therefore, it can be assumed that these viruses most likely  
348 originated from the region and might have been introduced in Mali from the neighboring  
349 countries by cross-border poultry movement and trade as there was no evidence that wild  
350 birds were spreading H9N2 viruses (Fusaro et al., 2019; Molia et al., 2016).

351 Our findings highlight the occurrence of a single long-dispersal event around 2015, during  
352 which the virus spread from Morocco to western Africa at a velocity of approximately 685  
353 km/year. While the involvement of long-distance migratory wild birds during autumn  
354 migration could be a potential contributing factor to the dissemination of H9N2 to western  
355 Africa, it seems that estimates of wild bird migration velocities are higher (Lemke et al.,  
356 2013; Trierweiler et al., 2014). Also, given that H9N2 viruses become well adapted to

357 poultry (Peacock et al., 2019), it is more likely that the dispersal event was influenced by  
358 anthropogenic factors, specifically the movement of live poultry, facilitating the  
359 transmission of H9N2 to western Africa (Peacock et al., 2019). Notably, several countries  
360 in western Africa import hatching eggs and day-old chicks from Morocco, and there has  
361 been a significant increase in import quantities between 2013 and 2015 (Figure S4) (FAO,  
362 2023; Hassan et al., 2017). It is therefore likely that such trade activities have contributed  
363 to the introduction of H9N2 viruses into the region. This result confirms previous studies  
364 suggesting the primary role played by Morocco in the spread of H9N2 viruses in Africa  
365 (El Mellouli et al., 2022; Zecchin et al., 2017). However, the lack of comprehensive poultry  
366 trade data limits our ability to conduct a robust investigation into the influence of live  
367 poultry trade on lineage dispersal. Future studies incorporating more detailed and  
368 comprehensive trade data would provide valuable insights into the dynamics of H9N2  
369 virus dissemination in the region.

370         Our results should be interpreted in light of some limitations. Firstly, the overall  
371 size of the genome data was limited, and transmission events involving unsampled  
372 countries may be missing. For example, Côte d'Ivoire, which is closely connected to the  
373 sampled countries according to poultry trade data, lacks representation in the samples.  
374 We also lack sampling from Niger and Mauritania, which shared borders with countries  
375 in both western and northern Africa. This highlights the need to intensify genomic  
376 surveillance of H9N2 in the region to allow for wider-scale phylogeographic  
377 reconstructions and a more comprehensive understanding of the virus's spread.

378           The H9N2 virus has become endemic in several countries around the world and  
379 occasionally causes outbreaks in poultry, resulting in huge economic losses to the poultry  
380 industry. In western Africa, the surveillance of H9N2 viruses is very limited making it  
381 difficult to obtain reliable data on the genetic characteristics and transmission patterns of  
382 this virus in the region. In addition, the current circulation of highly pathogenic avian  
383 influenza H5Nx of clade 2.3.4.4 b could contribute to the emergence of reassortant strains,  
384 as recently demonstrated in Burkina Faso, posing a threat to human and animal health.  
385 Therefore, long-term surveillance with genome sequencing of the H9N2 virus in western  
386 Africa, particularly in LBMs, would allow monitoring of virus evolution and help control  
387 potential new zoonotic AIV strains.

#### 388 **Author contributions**

#### 389 **Data availability**

390 All Malian H9N2 genome sequences are available on GenBank under accession numbers:  
391 OR133241 - OR133296 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). H9N2 genome sequences used in  
392 this study are available on the GISAID database (<http://www.gisaid.org>). The BEAST 1  
393 XML file used to perform the phylogeographic analysis, together with the accession  
394 numbers of the H9N2 genome sequences and the R scripts are available from add git  
395 Claire.

#### 396 **Conflicts of interest**

397 The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### 398 **Funding information**

399 This study was funded by INRAE (initiative TSARA) and ENSV-FVI. I.N.S is supported by a PhD  
400 scholarship from the French Embassy in Mali.

#### 401 **Ethical approval**

402 **Consent for publication**

403 Not applicable.

404 **Acknowledgments**

405 We gratefully acknowledge all data contributors, i.e., the Authors and their Originating  
406 laboratories responsible for obtaining the specimens, and their Submitting laboratories for  
407 generating the genetic sequence and sharing via the GISAID Initiative, on which this  
408 research is based.

409 **References**

410 Abdelwhab, E. M., Lüscho, D., Harder, T. C., & Hafez, H. M. (2011). The use of FTA® filter  
411 papers for diagnosis of avian influenza virus. *Journal of Virological Methods*, 174(1–2),  
412 120–122.

413 Awuni, J. A., Bianco, A., Dogbey, O. J., Fusaro, A., Yingar, D. T., Salviato, A., Ababio, P. T.,  
414 Milani, A., Bonfante, F., & Monne, I. (2019). Avian influenza H9N2 subtype in Ghana:  
415 virus characterization and evidence of co-infection. *Avian Pathology*, 48(5), 470–476.

416 Ayres, D. L., Cummings, M. P., Baele, G., Darling, A. E., Lewis, P. O., Swofford, D. L.,  
417 Huelsenbeck, J. P., Lemey, P., Rambaut, A., & Suchard, M. A. (2019). BEAGLE 3:  
418 Improved Performance, Scaling, and Usability for a High-Performance Computing  
419 Library for Statistical Phylogenetics. *Systematic Biology*, 68(6), 1052–1061.

420 Barberis, A., Boudaoud, A., Gorrill, A., Loupias, J., Ghram, A., Lachheb, J., Alloui, N., &  
421 Ducatez, M. F. (2020). Full-length genome sequences of the first H9N2 avian influenza  
422 viruses isolated in the Northeast of Algeria. *Virology Journal*, 17(1), 1–16.

423 Barman, S., Turner, J. C. M., Hasan, M. K., Akhtar, S., El-Shesheny, R., Franks, J., Walker, D.,  
424 Seiler, P., Friedman, K., Kercher, L., Jeevan, T., McKenzie, P., Webby, R. J., Webster, R. G.,  
425 & Feeroz, M. M. (2019). Continuing evolution of highly pathogenic H5N1 viruses in  
426 Bangladeshi live poultry markets. *Emerging Microbes and Infections*, 8(1), 650–661.

427 Cappelle, J., Servan de Almeida, R., Fofana, B., Dakouo, M., Balança, G., Gil, P., Albina, E., &  
428 Gaidet, N. (2012). Circulation of avian influenza viruses in wild birds in Inner Niger  
429 Delta, Mali. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(4), 240–244.

430 Chen, G. W., Chang, S. C., Mok, C. K., Lo, Y. L., Kung, Y. N., Huang, J. H., Shih, Y. H., Wang,  
431 J. Y., Chiang, C., Chen, C. J., & Shih, S. R. (2006). Genomic Signatures of Human versus  
432 Avian Influenza A Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 12(9), 1353.

- 433 Chrzastek, K., Lee, D. hun, Gharaibeh, S., Zsak, A., & Kapczynski, D. R. (2018).  
434 Characterization of H9N2 avian influenza viruses from the Middle East demonstrates  
435 heterogeneity at amino acid position 226 in the hemagglutinin and potential for  
436 transmission to mammals. *Virology*, 518, 195–201.
- 437 Dankar, S. K., Wang, S., Ping, J., Forbes, N. E., Keleta, L., Li, Y., & Brown, E. G. (2011). Influenza  
438 A virus NS1 gene mutations F103L and M106I increase replication and virulence.  
439 *Virology Journal*, 8(1), 1–13.
- 440 Dellicour, S., Lemey, P., Artois, J., Lam, T. T., Fusaro, A., Monne, I., Cattoli, G., Kuznetsov, D.,  
441 Xenarios, I., Dauphin, G., Kalpravidh, W., Von Dobschuetz, S., Claes, F., Newman, S. H.,  
442 Suchard, M. A., Baele, G., & Gilbert, M. (2020). Incorporating heterogeneous sampling  
443 probabilities in continuous phylogeographic inference — Application to H5N1 spread in  
444 the Mekong region. *Bioinformatics*, 36(7), 2098–2104.
- 445 Dellicour, S., Rose, R., Faria, N. R., Lemey, P., & Pybus, O. G. (2016). SERAPHIM: studying  
446 environmental rasters and phylogenetically informed movements. *Bioinformatics*, 32(20),  
447 3204–3206.
- 448 Dellicour, S., Rose, R., Rodrigues Faria, N., Fernando, L., Vieira, P., Bourhy, H., Gilbert, M.,  
449 Lemey, P., & Pybus, O. G. (2017). Using Viral Gene Sequences to Compare and Explain  
450 the Heterogeneous Spatial Dynamics of Virus Epidemics. *Molecular Biology and*  
451 *Evolution*, 34(10), 2563–2571.
- 452 Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed Phylogenetics  
453 and Dating with Confidence. *PLOS Biology*, 4(5), e88.
- 454 Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling  
455 trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1–8.
- 456 El-Zoghby, E. F., Arafa, A. S., Hassan, M. K., Aly, M. M., Selim, A., Kilany, W. H., Selim, U.,  
457 Nasef, S., Aggor, M. G., Abdelwhab, E. M., & Hafez, H. M. (2012). Isolation of H9N2 avian  
458 influenza virus from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) in Egypt. *Archives of Virology*,  
459 157(6), 1167–1172.
- 460 El Houadfi, M., Fellahi, S., Nassik, S., Guérin, J. L., & Ducatez, M. F. (2016). First outbreaks and  
461 phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in  
462 Morocco. *Virology Journal*, 13(1), 1–7.
- 463 El Mellouli, F., Mouahid, M., Fusaro, A., Zecchin, B., Zekhnini, H., El Khantour, A., Giussani,  
464 E., Palumbo, E., Idrissi, H. R., Monne, I., & Benhoussa, A. (2022). Spatiotemporal  
465 Dynamics, Evolutionary History and Zoonotic Potential of Moroccan H9N2 Avian  
466 Influenza Viruses from 2016 to 2021. *Viruses*, 14(3), 509.

467 Fan, S., Deng, G., Song, J., Tian, G., Suo, Y., Jiang, Y., Guan, Y., Bu, Z., Kawaoka, Y., & Chen,  
468 H. (2009). Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence  
469 difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology*, 384(1), 28–32.

470 Fouchier, R. A. M., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Van der Kemp, L., Rimmelzwaan, G. F., &  
471 Osterhaus, A. D. M. E. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by  
472 PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *Journal of Clinical*  
473 *Microbiology*, 38(11), 4096–4101.

474 Fusade-Boyer, M., Djegui, F., Batawui, K., Byuragaba, D. K., Jones, J. C., Wabwire-Mangeni,  
475 F., Erima, B., Atim, G., Ukuli, Q. A., Tugume, T., Dogno, K., Adjabli, K., Nzuzi, M., Adjin,  
476 R., Jeevan, T., Rubrum, A., Go-Maró, W., Kayali, G., McKenzie, P., ... Ducatez, M. F.  
477 (2021). Antigenic and molecular characterization of low pathogenic avian influenza  
478 A(H9N2) viruses in sub-Saharan Africa from 2017 through 2019. *Emerging Microbes and*  
479 *Infections*, 10(1), 753–761.

480 Fusaro, A., Zecchin, B., Vrancken, B., Abolnik, C., Ademun, R., Alassane, A., Arafa, A., Awuni,  
481 J. A., Couacy-Hymann, E., Coulibaly, M. ' B., Gaidet, N., Go-Maró, E., Joannis, T., Jumbo,  
482 S. D., Minoungou, G., Meseko, C., Souley, M. M., Ndumu, D. B., Shittu, I., ... Monne, I.  
483 (2019). Disentangling the role of Africa in the global spread of H5 highly pathogenic avian  
484 influenza. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–13.

485 Gaidet, N., Dodman, T., Caron, A., Balança, G., Desvaux, S., Goutard, F., Cattoli, G., Lamarque,  
486 F., Hagemeijer, W., & Monicat, F. (2007). Avian Influenza Viruses in Water Birds, Africa.  
487 *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), 626.

488 Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: An important software for molecular  
489 biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(June), 60–61.  
490 <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>

491 Hill, V., & Baele, G. (2019). Bayesian Estimation of Past Population Dynamics in BEAST 1.10  
492 Using the Skygrid Coalescent Model. *Molecular Biology and Evolution*, 36(11), 2620–  
493 2628.

494 Hulse-Post, D. J., Franks, J., Boyd, K., Salomon, R., Hoffmann, E., Yen, H. L., Webby, R. J.,  
495 Walker, D., Nguyen, T. D., & Webster, R. G. (2007). Molecular Changes in the Polymerase  
496 Genes (PA and PB1) Associated with High Pathogenicity of H5N1 Influenza Virus in  
497 Mallard Ducks. *Journal of Virology*, 81(16), 8515.

498 Jallow, M. M., Fall, A., Barry, M. A., Diop, B., Sy, S., Goudiaby, D., Fall, M., Enouf, V., Niang,  
499 M. N., & Dia, N. (2020). Genetic characterization of the first detected human case of low  
500 pathogenic avian influenza A/H9N2 in sub-Saharan Africa, Senegal. *Emerging Microbes*  
501 *and Infections*, 9(1), 1092–1095.

502 Jeevan, T., Darnell, D., Gradi, E. A., Benali, Y., Kara, R., Guetarni, D., Rubrum, A., Seiler, P. J.,  
503 Crumpton, J. C., Webby, R. J., & Derrar, F. (2019). A(H9N2) influenza viruses associated  
504 with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. *Influenza and Other Respiratory*  
505 *Viruses*, 13(6), 622–626.

506 Jiao, P., Tian, G., Li, Y., Deng, G., Jiang, Y., Liu, C., Liu, W., Bu, Z., Kawaoka, Y., & Chen, H.  
507 (2008). A Single-Amino-Acid Substitution in the NS1 Protein Changes the Pathogenicity  
508 of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. *Journal of Virology*, 82(3), 1146–1154.

509 Kalkauskas, A., Perron, U., Sun, Y., Goldman, N., Baele, G., Guindon, S., & De Maio, N. (2021).  
510 Sampling bias and model choice in continuous phylogeography: Getting lost on a random  
511 walk. *PLOS Computational Biology*, 17(1), e1008561.

512 Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version  
513 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4),  
514 772–780.

515 Kotey, E. N., Asante, I. A., Adusei-Poku, M., Arjarquah, A., Ampadu, R., Rodgers, D., Nyarko,  
516 E. O., Asiedu, W., Dafeamekpor, C., Wiley, M. R., Mawuli, G., Obeng, R. A., Nyarko, S.  
517 O., Magnusen, V., Kodua, E., Attram, N., Nimo-Paintsil, S. C., Pratt, C., Fox, A. T., ...  
518 Ampofo, W. K. (2022). Phylogenetic and genetic characterization of influenza A H9N2  
519 viruses isolated from backyard poultry in selected farms in Ghana. *Veterinary Medicine*  
520 *and Science*, 8(4), 1570–1577.

521 Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast,  
522 scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference.  
523 *Bioinformatics*, 35(21), 4453–4455.

524 Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large  
525 datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278.

526 Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J. J., & Suchard, M. A. (2010). Phylogeography Takes a Relaxed  
527 Random Walk in Continuous Space and Time. *Molecular Biology and Evolution*, 27(8),  
528 1877–1885.

529 Lemke, H. W., Tarka, M., Klaassen, R. H. G., Åkesson, M., Bensch, S., Hasselquist, D., &  
530 Hansson, B. (2013). Annual Cycle and Migration Strategies of a Trans-Saharan Migratory  
531 Songbird: A Geolocator Study in the Great Reed Warbler. *PLOS ONE*, 8(10), e79209.

532 Li, X., Shi, J., Guo, J., Deng, G., Zhang, Q., Wang, J., He, X., Wang, K., Chen, J., Li, Y., Fan, J.,  
533 Kong, H., Gu, C., Guan, Y., Suzuki, Y., Kawaoka, Y., Liu, L., Jiang, Y., Tian, G., ... Chen,  
534 H. (2014). Genetics, Receptor Binding Property, and Transmissibility in Mammals of  
535 Naturally Isolated H9N2 Avian Influenza Viruses. *PLOS Pathogens*, 10(11), e1004508.

- 536 Matrosovich, M. N., Krauss, S., & Webster, R. G. (2001). H9N2 Influenza A Viruses from  
537 Poultry in Asia Have Human Virus-like Receptor Specificity. *Virology*, 281(2), 156–162.
- 538 Miotto, O., Heiny, A. T., Tan, T. W., Thomas, J. T., & Brusica, V. (2008). Identification of human-  
539 to-human transmissibility factors in PB2 proteins of influenza A by large-scale mutual  
540 information analysis. *BMC Bioinformatics*, 9(Suppl 1), S18.
- 541 Molia, S., Boly, I. A., Duboz, R., Coulibaly, B., Guitian, J., Grosbois, V., Fournié, G., & Pfeiffer,  
542 D. U. (2016). Live bird markets characterization and trading network analysis in Mali:  
543 Implications for the surveillance and control of avian influenza and Newcastle disease.  
544 *Acta Tropica*, 155, 77–88.
- 545 Molia, S., Grosbois, V., Kamissoko, B., Sidibe, M. S., Sissoko, K. D., Traore, I., Diakite, A., &  
546 Pfeiffer, D. U. (2017). Longitudinal Study of Avian Influenza and Newcastle Disease in  
547 Village Poultry, Mali, 2009-2011. *Avian Diseases*, 61(2), 165–177.
- 548 Molia, S., Traoré, A., Gil, P., Hammoumi, S., Lesceu, S., de Almeida, R. S., Albina, E., &  
549 Chevalier, V. (2010). Avian influenza in backyard poultry of the Mopti region, Mali.  
550 *Tropical Animal Health and Production*, 42(5), 807–809.
- 551 Molia, S., Traoré, I., Kamissoko, B., Diakité, A., Sidibé, M. S., Sissoko, K. D., & Pfeiffer, D. U.  
552 (2015). Characteristics of commercial and traditional village poultry farming in Mali with  
553 a focus on practices influencing the risk of transmission of avian influenza and Newcastle  
554 disease. *Acta Tropica*, 150, 14–22.
- 555 Monne, I., Hussein, H. A., Fusaro, A., Valastro, V., Hamoud, M. M., Khalefa, R. A., Dardir, S.  
556 N., Radwan, M. I., Capua, I., & Cattoli, G. (2013). H9N2 influenza A virus circulates in  
557 H5N1 endemically infected poultry population in Egypt. *Influenza and Other  
558 Respiratory Viruses*, 7(3), 240–243.
- 559 Monne, I., Ormelli, S., Salviato, A., De Battisti, C., Bettini, F., Salomoni, A., Drago, A., Zecchin,  
560 B., Capua, I., & Cattoli, G. (2008). Development and Validation of a One-Step Real-Time  
561 PCR Assay for Simultaneous Detection of Subtype H5, H7, and H9 Avian Influenza  
562 Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1769–1773.
- 563 Nagy, A., Mettenleiter, T. C., & Abdelwhab, E. M. (2017). A brief summary of the epidemiology  
564 and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the  
565 Middle East and North Africa. *Epidemiology & Infection*, 145(16), 3320–3333.
- 566 Pavade, G., Vintzel, L. W., Hamilton, K., & Dehove, A. (2011). OFFLU review of avian  
567 influenza surveillance and epidemiological projects in some European , African , and  
568 Asian countries.

- 569 Peacock, T. P., James, J., Sealy, J. E., & Iqbal, M. (2019). A Global Perspective on H9N2 Avian  
570 Influenza Virus. *Viruses* 2019, Vol. 11, Page 620, 11(7), 620.
- 571 Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., Chan, K. H., Ip, P. L. S., Lai, R. W. M., Orr, W. K., &  
572 Shortridge, K. F. (1999). Human infection with influenza H9N2. *Lancet*, 354(9182), 916–  
573 917.
- 574 Perez, D. R., & Wit, J. J. (Sjaak) de. (2016). Low-pathogenicity avian influenza. *Animal*  
575 *Influenza*, 271–301.
- 576 Pusch, E. A., & Suarez, D. L. (2018). The multifaceted zoonotic risk of H9N2 avian influenza.  
577 In *Veterinary Sciences* (Vol. 5, Issue 4, p. 82). Multidisciplinary Digital Publishing  
578 Institute.
- 579 Pybus, O. G., Suchard, M. A., Lemey, P., Bernardin, F. J., Rambaut, A., Crawford, F. W., Gray,  
580 R. R., Arinaminpathy, N., Stramer, S. L., Busch, M. P., & Delwart, E. L. (2012). Unifying  
581 the spatial epidemiology and molecular evolution of emerging epidemics. *Proceedings of*  
582 *the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), 15066–15071.
- 583 Qian, Z., Shou-yu, G., Feng-xia, Z., Peng, Y., Wen-jian, S., Jian-liang, L., Jiang, S., & Zhi-jing, X.  
584 (2021). Molecular characteristics of H9N2 influenza viruses isolated from farmed raccoon  
585 dogs and arctic foxes in China. *Research in Veterinary Science*, 135, 542–546.
- 586 Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior  
587 Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5),  
588 901–904.
- 589 Schulze, I. T. (1997). Effects of Glycosylation on the Properties and Functions of Influenza Virus  
590 Hemagglutinin. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(1).  
591 [https://academic.oup.com/jid/article/176/Supplement\\_1/S24/952903](https://academic.oup.com/jid/article/176/Supplement_1/S24/952903)
- 592 Shapiro, B., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2006). Choosing appropriate substitution  
593 models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Molecular Biology and*  
594 *Evolution*, 23(1), 7–9.
- 595 Sood, R., Kumar, N., Gokhe, S. S., Pateriya, A. K., Bhat, S., Bhatia, S., Panickan, S., Mishra, A.,  
596 Murugkar, H. V., Dixit, R., Shrivastava, D., Singh, P., Tripathi, M., & Singh, V. P. (2021).  
597 Identification and molecular characterization of H9N2 viruses carrying multiple  
598 mammalian adaptation markers in resident birds in central-western wetlands in India.  
599 *Infection, Genetics and Evolution*, 94, 105005.
- 600 Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018).  
601 Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus*  
602 *Evolution*, 4(1).

- 603 Sulaiman, L., Shittu, I., Fusaro, A., Inuwa, B., Zecchin, B., Gado, D., Schivo, A., Bianco, A.,  
604 Laleye, A., Gobbo, F., Vakuru, C., Joannis, T., Monne, I., & Meseko, C. (2021). Live bird  
605 markets in nigeria: A potential reservoir for h9n2 avian influenza viruses. *Viruses*, 13(8),  
606 1445.
- 607 Tombari, W., Nsiri, J., Larbi, I., Guerin, J., & Ghram, A. (2011). Genetic evolution of low  
608 pathogenicity H9N2 Avian influenza viruses in Tunisia: Acquisition of new mutations.  
609 *Virology Journal*, 8(1), 1–12.
- 610 Traoré Adama. (2013). Secteur Avicole Mali. Revues nationales de l'élevage de la division de  
611 la production et de la santé animales de la FAO. In *Revue nationale de l'élevage de la*  
612 *division de la production et de la santé animales de la FAO*.
- 613 Trierweiler, C., Klaassen, R. H. G., Drent, R. H., Exo, K. M., Komdeur, J., Bairlein, F., & Koks,  
614 B. J. (2014). Migratory connectivity and population-specific migration routes in a long-  
615 distance migratory bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*,  
616 281(1778).
- 617 Trovão, N. S., Suchard, M. A., Baele, G., Gilbert, M., & Lemey, P. (2015). Bayesian Inference  
618 Reveals Host-Specific Contributions to the Epidemic Expansion of Influenza A H5N1.  
619 *Molecular Biology and Evolution*, 32(12), 3264–3275.
- 620 Wan, H., & Perez, D. R. (2007). Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H9N2 Influenza  
621 Viruses Determines Cell Tropism and Replication in Human Airway Epithelial Cells.  
622 *Journal of Virology*, 81(10), 5181–5191.
- 623 Wang, J., Wu, Y., Ma, C., Fiorin, G., Wang, J., Pinto, L. H., Lamb, R. A., Klein, M. L., & DeGrado,  
624 W. F. (2013). Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion  
625 channel of influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
626 *United States of America*, 110(4), 1315–1320.
- 627 Zecchin, B., Minoungou, G., Fusaro, A., Moctar, S., Ouedraogo-Kaboré, A., Schivo, A., Salviato,  
628 A., Marciano, S., & Monne, I. (2017). Influenza A(H9N2) Virus, Burkina Faso. *Emerging*  
629 *Infectious Diseases*, 23(12), 2118–2119.
- 630 Zhang, Z., Hu, S., Li, Z., Wang, X., Liu, M., Guo, Z., Li, S., Xiao, Y., Bi, D., & Jin, H. (2011).  
631 Multiple amino acid substitutions involved in enhanced pathogenicity of LPAI H9N2 in  
632 mice. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1790–1797.

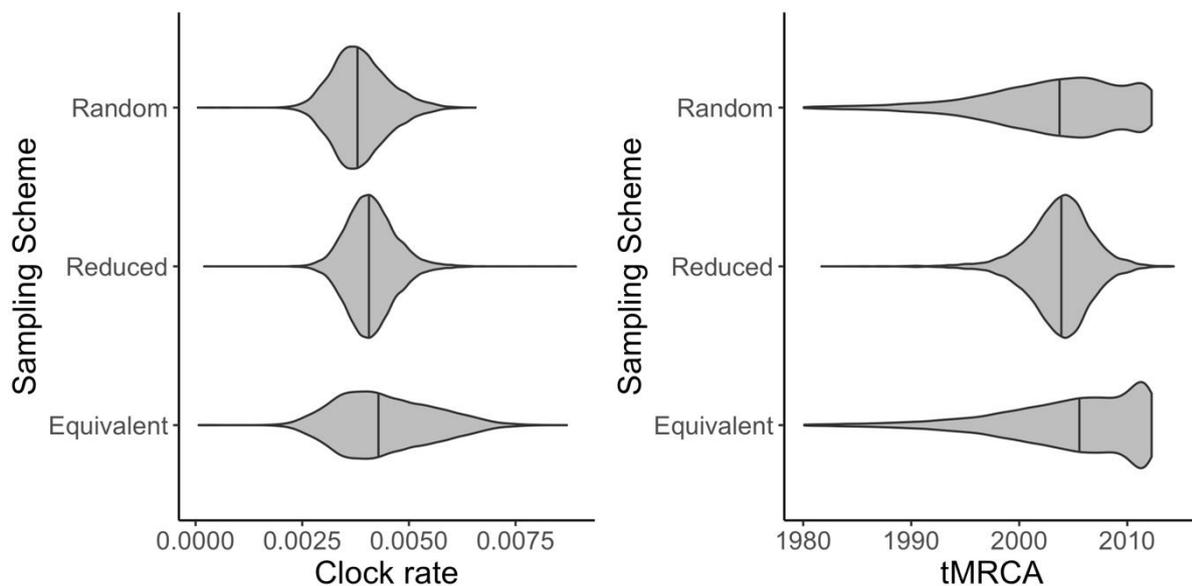
633  
634  
635  
636

637 **Supplementary information**

638 **Table S1.** Descriptive summary of the final dataset of 78 sequences derived from 9 countries  
 639 in northern and western Africa used for phylogeographic analysis

Country	Number	Minimum date	Maximum date
Algeria	4	01-04-2017	15-12-2017
Benin	10	15-12-2018	17-03-2020
Ghana	4	29-11-2017	02-02-2018
Mali	2	08-01-2022	07-02-2022
Morocco	33	15-01-2016	28-04-2021
Nigeria	16	08-02-2019	07-12-2019
Senegal	1	23-04-2017	23-04-2017
Togo	3	04-01-2019	15-04-2019
Tunisia	5	02-04-2012	10-04-2016

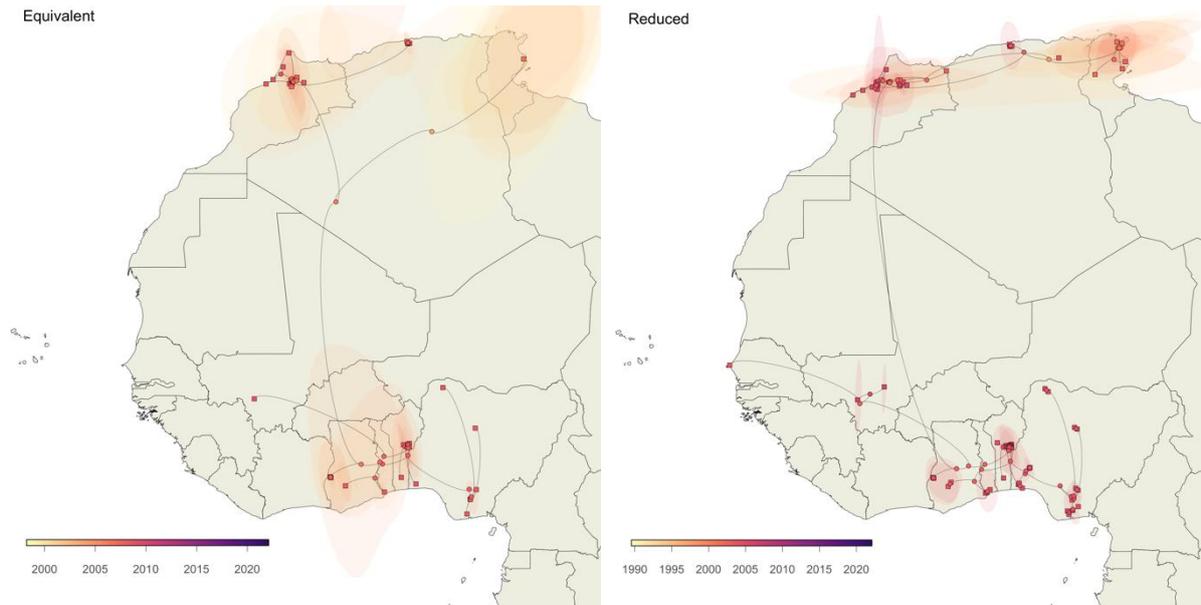
640



641

642 **Figure S2.** Clock rate and time to the most recent common ancestor (tMRCA) estimated by  
 643 different sampling schemes: random sampling, random sampling for equivalent  
 644 representation and random sampling for reduced biased sampling. The central line  
 645 represents the posterior median.

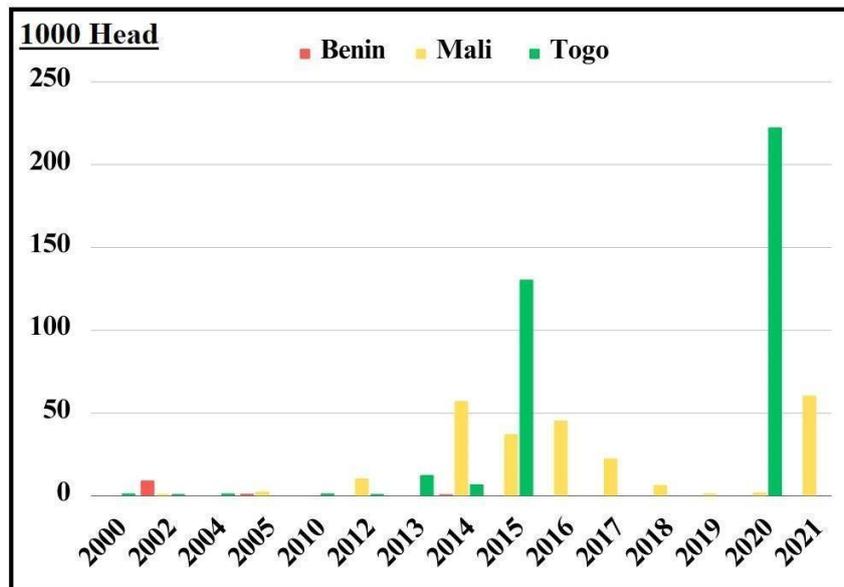
646



647

648 **Figure S3.** Continuous phylogeographic reconstruction of the dispersal history of H9N2  
 649 lineages in northern and western Africa, here based on different sampling schemes: random  
 650 sampling for equivalent representation and random sampling for reduced biased sampling.

651 We here map the maximum clade credibility (MCC) tree and 80% highest posterior density  
 652 regions reflecting the uncertainty related to the Bayesian phylogeographic inference. Nodes  
 653 shaped as circles and squares indicate internal and tip nodes, respectively, and are colored  
 654 according to their time of occurrence.



655

656 **Figure S4:** Import of hatching eggs and day-old chicks from Morocco. Data from (FAO, 2023)

### Article 3

## Identification des zones à risque d'apparition de foyers d'influenza aviaire chez les volailles domestiques au Mali à l'aide de l'approche multicritère d'aide à la décision associée aux systèmes d'information géographique (GIS-MCDA)

Depuis l'émergence du virus influenza H5N1 au Nigéria en 2006, plusieurs foyers sont apparus au cours de ces 15 dernières années dans la plupart des pays de la région. Cependant, au Mali, ce n'est que récemment, en 2021 que les premiers cas officiels d'IAHP ont été notifiés à WOAHA. Toutefois, le pays était considéré comme étant à très grand risque d'influenza aviaire à cause de la possibilité d'introduction du virus par le commerce transfrontalier de volailles ainsi que par la présence dans le pays du Delta intérieur du Niger qui constitue une zone de repos et de reproduction à des millions d'oiseaux migrateurs provenant d'Eurasie et pouvant potentiellement porter des VIA. Au Mali, plus de 90 % des volailles sont élevées dans des systèmes traditionnels avec de faibles mesures de biosécurité, contribuant à la propagation des maladies au sein des élevages. La surveillance des maladies animales, notamment de l'IAHP est essentiellement passive et souvent caractérisée par une sous-déclaration des cas. La surveillance active est très limitée et dépend presque entièrement de fonds extérieurs. Dans ce contexte, dans lequel, les ressources financières sont limitées et les données épidémiologiques sur la circulation des VIA sont rares, pour assurer la pérennité de la surveillance, il est essentiel de développer des méthodes faciles à mettre en œuvre et moins coûteuses comme la surveillance basée sur le risque. La méthode GIS-MCDA associe les informations sur les facteurs de risque liés à une maladie particulière et les données spatiales afin de produire une carte de risque d'apparition ou de propagation de cette maladie.

Cette étude avait pour objectif d'identifier, à travers l'approche GIS-MCDA, les zones à risque d'apparition des foyers d'influenza aviaire chez les volailles domestiques au Mali. La carte de risque ainsi élaborée devra contribuer à la mise en place d'un système de surveillance des VIA basé sur le risque au Mali.

L'approche MCDA a été mise en œuvre en cinq étapes (**figure 13**) : 1) identification des facteurs de risque, 2) détermination du poids relatif de chaque facteur, 3) collecte des données spatiales sur les facteurs de risque, 4) production de la carte de risque finale en combinant les cartes standardisées sur les facteurs de risque et 5) analyse de sensibilité de la carte et validation du modèle.

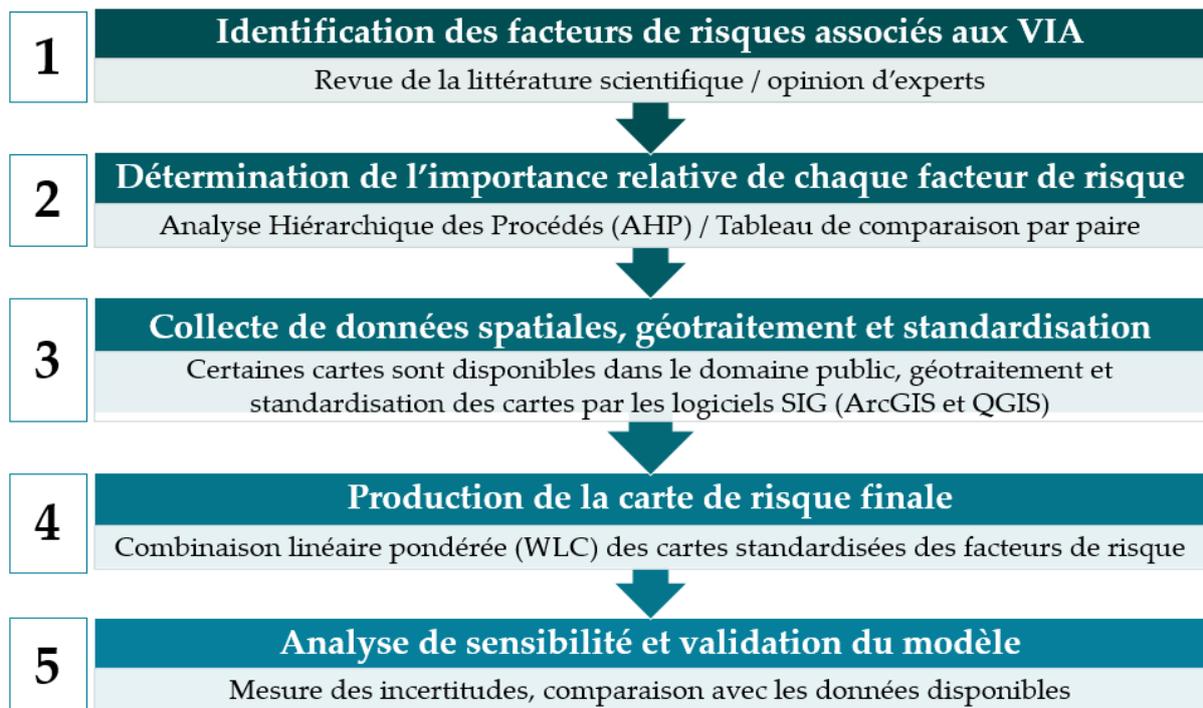


Figure 14 : Cadre de l'étude GIS-MCDA

Cinq facteurs de risque potentiellement associés à l'apparition des VIA en Afrique de l'Ouest ont été identifiés : la densité de volailles (considérée comme le facteur le plus important), les marchés, les élevages commerciaux, la proximité des routes et des points d'eau.

Les zones ayant un grand risque d'apparition de foyers d'influenza aviaire se trouvent dans les régions du centre (Mopti) et du sud-est (Bamako, Sikasso). À l'inverse, les régions du Nord et du sud-ouest du pays sont considérées comme des zones à faible risque. L'analyse de sensibilité a indiqué que le modèle est robuste puisque la modification du poids relatif des facteurs de risque n'a pas une grande incidence sur la carte de risque produite. La superposition de la carte de risque avec les foyers d'IAHP survenus au Mali montre que ces derniers sont apparus dans les zones ayant un risque très élevé

d'apparition de VIA. Il est important de noter certaines limitations associées à l'approche GIS-MCDA. Nous avons uniquement utilisé dans le modèle les facteurs de risque pour lesquels il était possible d'obtenir des données spatiales. D'autres facteurs de risque importants comme les mouvements de volailles, la saison et la distribution des oiseaux sauvages n'ont pas pu être utilisés par manque de données spatiales. Cependant, notre modèle est assez flexible et d'autres données peuvent être intégrées au fur et à mesure qu'elles deviennent disponibles. Une autre limitation de cette étude était la validation qualitative de notre carte de risque. En effet, il n'y avait pas assez de données sur les foyers d'IHAP (seulement 7 rapportés au Mali) pour réaliser une validation quantitative du modèle. Néanmoins, l'approche GIS-MCDA a déjà été validée dans plusieurs études. En conclusion, cette étude est la première cartographie du risque d'apparition des foyers d'influenza aviaire au Mali par la méthode GIS-MCDA. La carte de risque générée devrait servir de base pour la mise en place d'un système de surveillance basé sur le risque et contribuera ainsi à la détection précoce et au contrôle des foyers d'influenza aviaire au Mali.

# Identification of risk areas for Avian Influenza outbreaks in domestic poultry in Mali using the GIS-based MCDA approach

1 Idrissa Nonmon Sanogo<sup>1,2</sup>, Maxime Fusade-Boyer<sup>1</sup>, Sophie Molia<sup>3</sup>, Ousmane A. Koita<sup>4</sup>,  
2 Christelle Camus<sup>1</sup>, Mariette F. Ducatez<sup>1\*</sup>

3 <sup>1</sup>Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP), UMR 1225, Université de Toulouse, ENVT,  
4 INRAE, 31076 Toulouse, France

5 <sup>2</sup>Faculté d'Agronomie et de Médecine Animale (FAMA), Université de Ségou, Ségou BP 24,  
6 Mali

7 <sup>3</sup>UMR ASTRE, Université de Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France

8 <sup>4</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LMBA), Université des Sciences, des  
9 Techniques et des Technologies de Bamako, Bamako, Mali

10

11 **Correspondence:** Mariette F. Ducatez, Idrissa Nonmon Sanogo

12 [mariette.ducatez@envt.fr](mailto:mariette.ducatez@envt.fr), [idrissa.sanogo@envt.fr](mailto:idrissa.sanogo@envt.fr)

13

14 **Keywords:** influenza A virus, poultry, risk mapping, multi-criteria decision analysis,  
15 Geographic information system, Mali.

16

17

18

19

20

21 *Manuscript in preparation*

22

23

24

25

26

27 **Abstract**

28 Avian influenza viruses (AIVs) represent a major concern for human and animal Health.  
29 These viruses are responsible for high morbidity and mortality especially in the poultry  
30 sector, causing huge economic losses and potentially leading to food insecurity,  
31 particularly in the south. Mali is a country where little information is known about the  
32 circulation of AIVs in poultry. Implementing risk-based surveillance strategies would  
33 allow early detection and rapid control of avian influenza outbreaks in the country. In this  
34 study, we implemented a multi-criteria decision analysis (MCDA) method coupled with  
35 a geographic information system (GIS) to identify risk areas for AIVs outbreaks in  
36 domestic poultry in Mali. Five risk factors associated with AIVs occurrence were identified  
37 from the literature review and their relative weights were determined using the analytic  
38 hierarchy process (AHP). Spatial data were collected for each risk factor and processed to  
39 produce risk maps for AIVs outbreaks using a weighted linear combination (WLC). We  
40 identified the southeast regions (Bamako and Sikasso) and the central region (Mopti) as  
41 areas with the highest risk of AIVs occurrence. Conversely, northern regions of the country  
42 could be considered low-risk areas. The risk areas presented an agreement with the  
43 location of avian influenza outbreaks in Mali. This study provided the first risk map  
44 produced using the GIS-MCDA approach to identify risk areas for AIVs occurrence in  
45 Mali. It should provide a basis for designing risk-based and more cost-effective  
46 surveillance strategies for the early detection of avian influenza outbreaks in Mali.

47

48

## 49 **Introduction**

50 Wild birds are the natural reservoir for all subtypes of avian influenza viruses, viruses  
51 from the Orthomyxoviridae family, which can be responsible for highly contagious and  
52 severe illnesses in birds. These viruses are classified as either high pathogenicity (HPAI)  
53 or low pathogenicity (LPAI) viruses depending on their virulence in poultry (Pantin-  
54 Jackwood & Swayne, 2009). LPAI subtypes, although less virulent in birds, represent a  
55 gene pool for the emergence of new HPAI viruses potentially by reassortment, a powerful  
56 evolutionary mechanism used by influenza viruses. Because of their important genetic  
57 diversity and their ability to evolve rapidly, AIVs represent a major concern for human  
58 and animal health worldwide. Indeed, AIVs could cross the species barriers and infect  
59 new hosts, including humans (Bao et al., 2022; Floyd et al., 2021). HPAI viruses are  
60 responsible for high morbidity and mortality, especially in the poultry industry, causing  
61 huge economic losses that can compromise food security in the South (Otte et al., 2008).  
62 Since its first detection in Nigeria in 2006, HPAI viruses have been responsible for large  
63 outbreaks in several countries in Africa over the past 15 years, (Ducatez et al., 2007; FAO,  
64 2022).

65 In West Africa, Mali remained officially free from HPAI until March 2021 despite the  
66 circulation of AIVs being reported since 2007 (Sophie Molia et al., 2010). However, the  
67 country was considered at high risk of infection by HPAIV because it is surrounded by  
68 countries that experienced HPAI outbreaks, in a context where illegal trade and cross-  
69 border movements of poultry are common (Sophie Molia et al., 2015). Furthermore, The  
70 Inner Delta of the Niger River (the second largest continental wetland in Africa) is located

71 in Mali, which provides suitable breeding and resting sites for millions of migratory birds  
72 potentially carrying AIVs (Cappelle et al., 2012; S. Molia et al., 2011). In Mali, more than  
73 90 % of the domestic poultry live in traditional farming systems in which biosecurity  
74 measures are not observed (FAO, 2013). The detection of animal disease outbreaks such  
75 as HPAI relies mainly on passive surveillance in Mali. Active surveillance is very limited  
76 and depends on external funding (Sophie Molia et al., 2012). In such a situation, where  
77 there is a lack of reliable information on the circulation of animal diseases, risk-based  
78 surveillance activities should enable early detection and so quicker outbreak response (K  
79 B Stevens et al., 2010). Methods such as GIS-based multicriteria decision analysis (GIS-  
80 MCDA) may contribute to risk-based surveillance strategies by helping identify areas  
81 where surveillance and control activities should be targeted especially when limited  
82 resources are available.

83 GIS-MCDA allows the combination of data on risk factors linked to a particular disease  
84 and spatial data to produce a risk or suitability map for disease occurrence (Malczewski,  
85 2004). In addition, this method may be appropriate in data-scarce conditions serving as an  
86 alternative to data-driven methods for risk mapping (Kim B. Stevens & Pfeiffer, 2011). GIS-  
87 MCDA approach has been applied to identify suitable areas for the occurrence of influenza  
88 A and D viruses in Africa, Asia, and Latin America (Fusade-Boyer et al., 2020; La Sala et  
89 al., 2019; Paul et al., 2016; Kim B. Stevens et al., 2013).

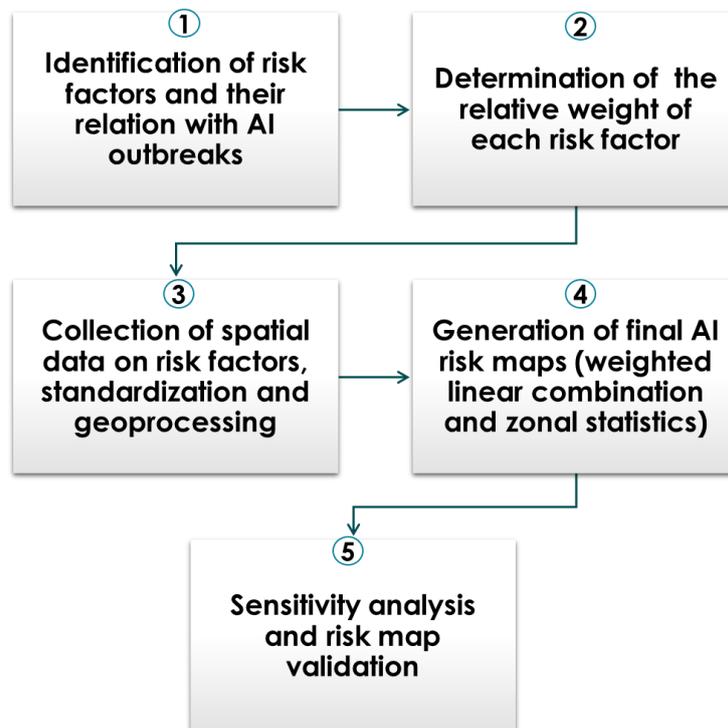
90 In the present study, we aimed to implement a GIS-based MCDA method to identify areas  
91 at risk for AIVs occurrence in domestic poultry in Mali. The output of this study could

92 serve as a basis for designing risk-based and more cost-effective surveillance strategies for  
93 AIVs.

## 94 **Materials and methods**

### 95 *Study framework*

96 In this study, we performed a GIS-based MCDA approach for risk mapping of avian  
97 influenza outbreaks in Mali. The GIS-MCDA method was performed in five main steps  
98 (Figure 1): (1) identification of risk factors related to avian influenza outbreaks, (2)  
99 Determination of the relative weight of each risk factor, (3) Collection of spatial data on  
100 risk factors, standardization, and geoprocessing, (4) Generation of final AI risk maps by  
101 the weighted linear combination of risk factors maps and zonal statistics and (5) Sensitivity  
102 analysis and risk map validation.



103

104

**Figure 1:** Study framework using GIS-based MCDA

105 *Avian influenza risk factors*

106 We carried out a systematic literature review as explained elsewhere (Ruget et al., 2019)  
 107 in two scientific databases (PubMed and Cab abstract) to identify risk factors linked to  
 108 avian influenza outbreaks in domestic poultry in Africa. Two selection criteria were  
 109 considered when selecting the risk factors: The first was their relevance in the  
 110 epidemiology of avian influenza in the region, and the second was the possibility to obtain  
 111 spatial data on the given risk factor. From the literature review, we identified five main  
 112 risk factors (table 1) that are potentially associated with avian influenza outbreaks in West  
 113 Africa.

114 **Table 1** | Risk factors associated with avian influenza outbreaks

<b>Risk factors</b>	<b>Hypothesis/Explanation</b>	<b>References</b>
<b>Poultry density</b>	AIVs are transmitted through direct contact between infected and susceptible birds, therefore high poultry density is expected to increase the risk of Avian Influenza outbreaks.	(Ntsomboh Ntsefong, 2017; Walsh et al., 2017)
<b>Proximity to poultry markets</b>	Live bird markets represent a place where domestic poultry from various origins, breeds, and ages are brought together for purchase and their proximity is therefore considered a risk factor for Avian influenza outbreaks.	(Sophie Molia et al., 2016; Sulaiman et al., 2021)
<b>Proximity to commercial poultry farms</b>	Proximity to commercial poultry farms may involve not only the mixing with other birds but also the potential exchange of equipment such as egg crates between farmers. Therefore, proximity to infected commercial poultry farms is expected to increase the risk of Avian Influenza outbreaks.	(Métras et al., 2013)
<b>Proximity to roads</b>	Proximity to major roads was associated with AI outbreaks. The movement of domestic poultry and their products along major road networks could contribute to the spread of AIVs.	(Gilbert & Pfeiffer, 2012; Rivas et al., 2010)
<b>Proximity to waters areas</b>	Proximity to water bodies is associated with an increased risk of avian influenza outbreaks by favoring contact between domestic poultry and wild birds, which are considered to be AIVs reservoirs.	(Cappelle et al., 2012; S. Molia et al., 2011; Naguib et al., 2019)

115

116 *Expert survey and risk factors weights*

117 An electronic questionnaire was submitted to a group of local and international 14 experts  
118 who have published or are actively working on AIVs in the region. Experts were asked to  
119 fill in a pairwise comparison matrix, where each risk factor was compared with the others,  
120 according to its relative importance, on a five-point scale ranging from 1/5 (“much less  
121 important”5), through 1 (“equally important”) to 5 (“much more important”). Experts  
122 were also asked to select from the list of four mathematical functions (linear, quadratic,  
123 sigmoidal, and linear bi-directional), the relationship between each risk factor and the risk  
124 of AIVs occurrence (Fusade-Boyer et al., 2020; Paul et al., 2016). We used the analytical  
125 hierarchy process (AHP) to assign a weight to each risk factor (T. L. Saaty, 1990). The  
126 consistency of each pairwise comparison was evaluated by calculating the consistency  
127 ratio (CR) using the following equation (1):

128 
$$CR = \frac{\lambda_{max} - n}{RI(n - 1)}$$

129 where  $\lambda_{max}$  is the maximal eigenvalue of the pairwise comparison matrix,  $n$  is the number of factors,  
130 and  $RI$  is a random index (R. W. Saaty, 1987).  $CR < 0.10$  indicates that the pairwise comparison matrix  
131 has an acceptable consistency and the derived weights can be used. However, if  $CR \geq 0.10$ , that indicates  
132 inconsistent judgment, then the pairwise comparison should be revised (R. W. Saaty, 1987).

133

134 *Spatial data collection, standardization, and geoprocessing*

135 Spatial data were collected for each risk factor from various sources (Table 2) and processed  
136 to produce standardized raster layers with cell values ranging from 0 (negligible risk) to 5  
137 (very high risk). The geoprocessing and calculation methods of risk factor layers are presented  
138 in Table 2. All spatial data were processed and transformed using ArcGIS 10.2 (ESRI,

139 Redlands, CA, USA) and QGIS 3.24 (QGIS Development Team, 2022). After the geoprocessing  
 140 step, we obtained for each risk factor a standardized raster layer with a resolution of 1000 ×  
 141 1000 m.

142 **Table 2:** Standardization of geographical layers

Risk factors	Data source	GIS processing	Scaling function
<b>Poultry density</b>	(Robinson et al., 2014) <a href="https://www.geo-wiki.org/">https://www.geo-wiki.org/</a>	Calculate poultry density (nb animal/km <sup>2</sup> ) Standardization (extent, pixel size) Reclassification	Positive linear relationship <b>Reclassification units</b> > 5000 poultry/km <sup>2</sup> : Very high risk (5) 500 – 5000 poultry/km <sup>2</sup> : High risk (4) 200 – 500 poultry/km <sup>2</sup> : Moderate risk (3) 100 – 200 poultry/km <sup>2</sup> : low risk (2) 50 – 100 poultry/km <sup>2</sup> : Very low risk (1) 0 – 50 poultry/km <sup>2</sup> : Negligible risk (0)
<b>Proximity to poultry markets</b>	(Sophie Molia et al., 2016)	Euclidean distance (km) to the feature of interest (Poultry markets, commercial poultry farms, road, and water areas)	Sigmodal, monotonically decreasing relationship with highest risk within 0–5 km from poultry market, commercial poultry farms, road, and water areas afterward AIV risk decreased with negligible risk after 10 km.
<b>Proximity to commercial poultry farms</b>	(Sophie Molia et al., 2016)		
<b>Proximity to roads</b>	(Meijer et al., 2018) <a href="https://www.globio.info/global-patterns-of-current-and-future-road-infrastructure">https://www.globio.info/global-patterns-of-current-and-future-road-infrastructure</a>	Standardization (extent, pixel size) Reclassification with fuzzy membership functions at a scale of 0–5 (unsuitable to perfectly suitable).	<b>Reclassification units</b> < 2 km: Very high risk (5) 2 – 4 km: High risk (4) 4 – 6 km: Moderate risk (3) 6 – 8 km: low risk (2) 8 – 10 km: Very low risk (1) > 10 km: Negligible risk (0)
<b>Proximity to water areas</b>	DIVA - GIS <a href="https://www.diva-gis.org/data-down">https://www.diva-gis.org/data-down</a>		

143

144

145 **Generation of the AI outbreak risk maps**

146 An AI outbreaks risk map was generated with the raster calculator tool of the ArcGIS  
 147 10.4.1 (ESRI, 2017) software by performing a Weighted linear combination (WLC) of the  
 148 standardized spatial layers of risk factors as shown in equation (2):

149 
$$R = \sum_{ij=1}^n (W_i \times F_{ij})$$

150 where  $R$  indicates the risk index estimate for each raster cell,  $n$  is the number of risk factors,  $W_i$  is the  
 151 weight for risk factor  $i$ , and  $F_{ij}$  is the value of risk factor  $i$  for raster cell  $j$ . (La Sala et al., 2019;  
 152 Malczewski, 2000).

153 AI outbreaks risk map was finally presented on a graduated blue-green-yellow-orange-  
154 red scale, ranging from 0 to 5. We have also calculated, the average risk of AI outbreaks  
155 for each municipality by performing zonal statistics on the final AI outbreaks risk map  
156 using ArcGIS 10.4.1 (ESRI, 2017).

### 157 *Sensitivity analysis and risk map validation*

158 A sensitivity analysis was conducted to assess the robustness of the AI risk map to changes  
159 in the relative weights assigned by experts to each risk factor. A total of 10 scenarios were  
160 constructed by increasing and decreasing the weights of each risk factor by a total of 25%  
161 of their initial value. The weights of the other risk factors were adjusted so that the sum of  
162 all the weights was equal to one. For each scenario, a new risk map was generated, and  
163 the average risk value was calculated for all pixels. We used non-parametric Spearman  
164 correlation coefficients (Rho) to compare the final AI risk map with the outputs obtained  
165 in each of the 10 scenarios. A change of <10% in the correlation coefficients indicated  
166 evidence of the robustness of the model to changes in the weights of risk factors  
167 (Rodríguez-Prieto et al., 2012). In addition, the contribution of each risk factor to model  
168 output variance was evaluated by fitting a multiple regression model without intercept,  
169 using the average risk as the dependent variable and the weights as predictors. The  
170 coefficients of the regression were used to measure sensitivity, where higher coefficients  
171 indicate higher rates of variation in the average risk estimate relative to a particular weight  
172 (La Sala et al., 2019). All the sensitivity analyses were conducted using the statistical  
173 software RStudio version 2022.12.0+353 running on R version 4.2.2 (R Development Core

174 Team, 2021). The GIS-MCDA model was visually validated by overlaying the reported  
175 outbreak locations from EMPRES-i database on the AI outbreaks risk map generated.

176

## 177 **Results**

### 178 **Risk factors weights**

179 The relative weights of the risk factors associated with AI outbreaks in Mali are presented  
180 in Table 3.

181 The result of the AHP application showed that experts (9 have fully replied to the  
182 questionnaire) were consistent in their judgment as the consistency ratio (CR) of all risk  
183 factors was less than 0.1. According to the AHP results, poultry density was determined  
184 as the most important risk factor for AI outbreaks in Mali. Proximity to poultry markets  
185 was identified as the next important risk factor, followed by in decreasing order, proximity  
186 to commercial poultry farms, proximity to water areas, and proximity to roads.

187 **Tableau 3: Weights attributed by the experts.**

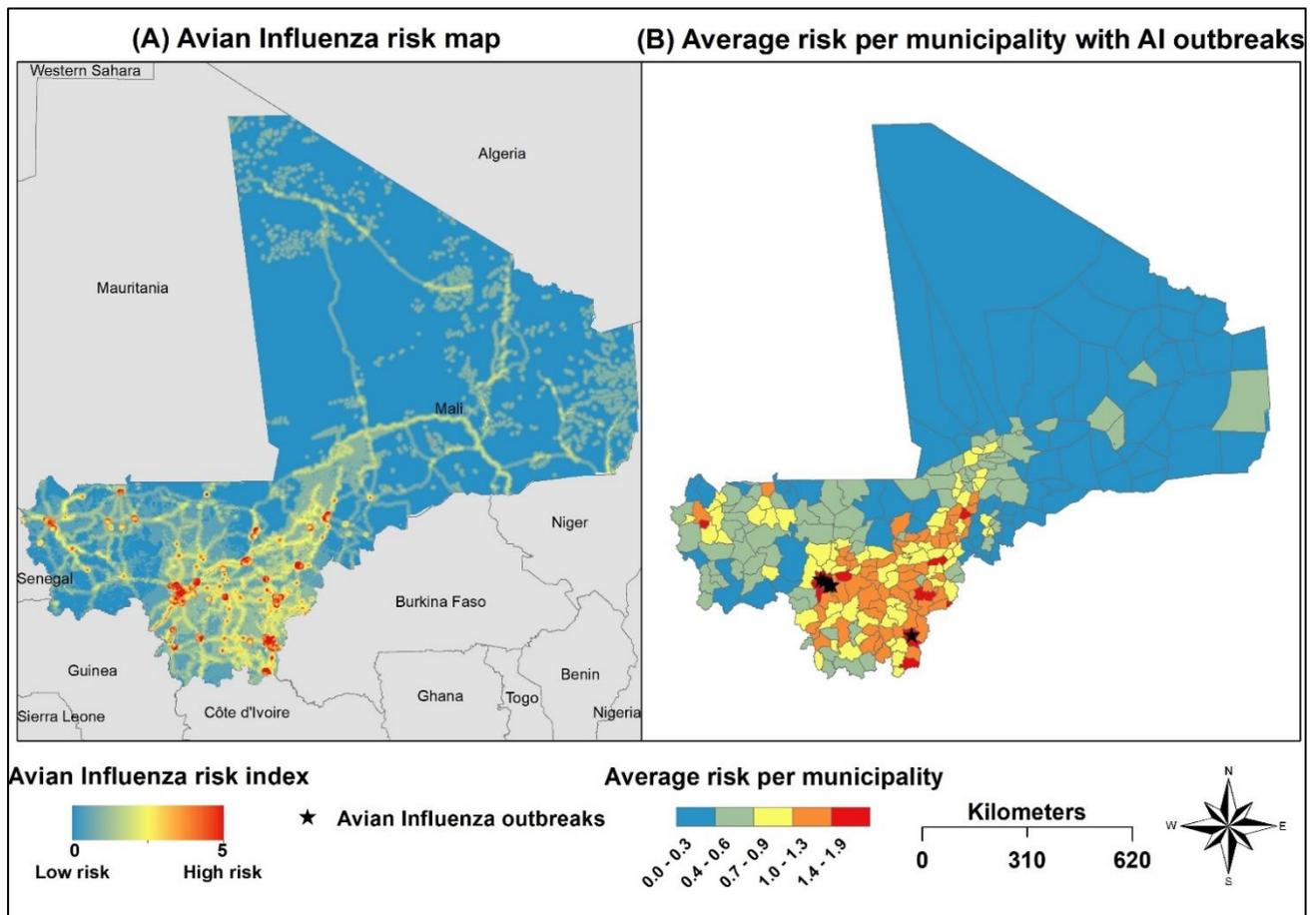
<b>Risk factors</b>	<b>Relative weights (%)</b>
<b>Poultry density</b>	31.33
<b>Proximity to poultry markets</b>	23.07
<b>Proximity to commercial poultry farms</b>	25.62
<b>Proximity to water areas</b>	11.33
<b>Proximity to roads</b>	8.65

188

189

190 *Avian influenza risk maps*

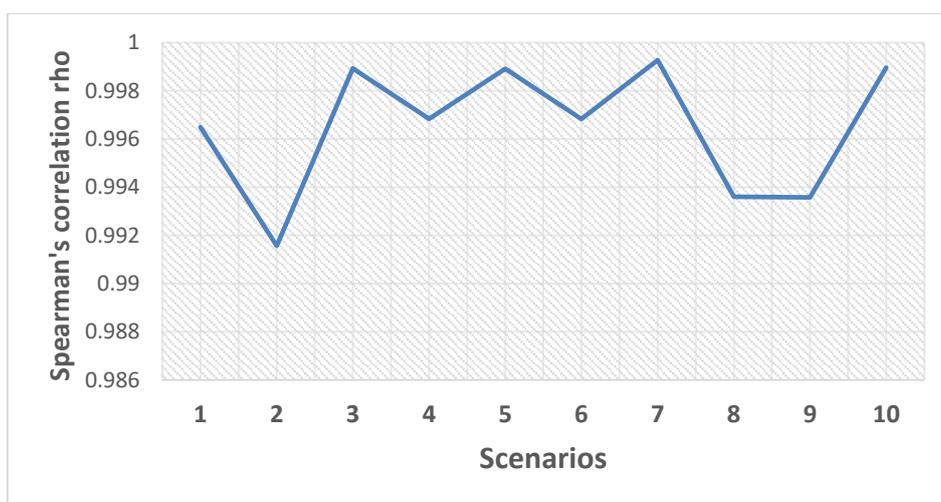
191 In Figure 2A, the risk of AI occurrence in domestic poultry in Mali was displayed on a  
192 continuous scale ranging from 0 (low risk, areas indicated with blue color) to 5 (Very high  
193 risk, areas indicated with red color). Figure 2B represent the average risk of avian  
194 influenza outbreaks for municipalities. Areas with the highest risk for AI occurrence were  
195 located in the central (Mopti) and southeast regions (Bamako, Sikasso). Areas with  
196 moderate risk of AI occurrence included the southwest region (Kayes) neighboring  
197 Senegal. In contrast, northern regions of Mali, including Tombouctou, Gao, and Kidal  
198 were considered low-risk areas for AI occurrence.



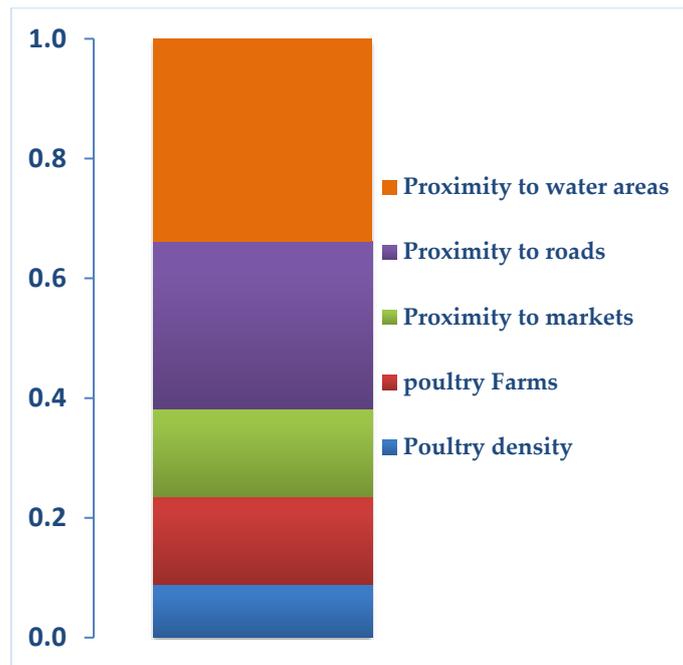
199  
200 **Figure. 2.** Map illustrating the risk of AIVs in domestic poultry in Mali on a continuous scale  
201 from low risk to high risk, as defined by multicriteria decision analysis. (A) Avian influenza  
202 risk map (B) Average risk per municipality with avian influenza outbreaks.

203 *Sensitivity analysis and risk map validation*

204 The results of the ten scenarios (Fig.3) performed in the sensitivity analysis were  
205 significantly correlated (Rho more than 0.99 and  $p < 0.001$ ) with the final avian influenza  
206 risk map. Therefore, the sensitivity analysis demonstrated that the model is robust, as  
207 changes in the relative weights of AI outbreak risk factors did not substantially modify the  
208 size and location of the areas determined as low, moderate, and high-risk areas for AIVs  
209 occurrence in Mali. The changes in the risk index of AIVs occurrence in domestic poultry  
210 in Mali were mainly explained by the weights of two risk factors (Fig.3). Indeed, proximity  
211 to water areas and proximity to roads were the most sensitive parameters, contributing to  
212 more than 60 % of the model output variance. In contrast, the weights of proximity to  
213 poultry markets, proximity to commercial poultry farms, and poultry density were  
214 considered less sensitive. Visual comparison of AI risk maps and the AI outbreak locations  
215 in Mali from EMPRES-i revealed that they all occurred in regions that were deemed to be  
216 very high-risk areas for AI occurrence by our model (Fig.2b).



217  
218 **Figure. 3.** Spearman correlation coefficients (Rho) between raster cells of avian influenza risk  
219 map reference scenario and the ten scenarios in the sensitivity analysis



220

221 **Figure. 4.** Contribution of risk factor weights to model output variance

222 **Discussion**

223 This study presents the first GIS-MCDA that provided risk maps for AIVs occurrence in  
 224 domestic poultry in Mali. Areas with the highest risk for AI outbreaks were identified in  
 225 Bamako District and Sikasso Region. The high density of domestic poultry and the high  
 226 number of poultry markets and commercial poultry farms could explain these results.  
 227 Indeed, high poultry density and poultry markets were associated with an increased risk  
 228 of AI occurrence (Métras et al., 2013; Sophie Molia et al., 2016; Ntsomboh Ntsefong, 2017;  
 229 Walsh et al., 2017). Interestingly, these areas overlap the locations of AI outbreaks reported  
 230 in the country (EMPRES-i). There are other regions of interest for AI occurrence risk in  
 231 Mali. The central regions of Mali, especially Mopti, showed areas with a high risk for AI  
 232 outbreaks. A possible explanation for this might be the presence of the inner delta of the  
 233 Niger River, which provides breeding and resting sites for millions of wild and migratory  
 234 birds that are considered potential reservoirs for AIVs (Cappelle et al., 2010, 2012). Regions

235 of northern Mali are characterized by a low density of domestic poultry, poultry markets,  
236 and commercial poultry farms (FAO, 2013). The low occurrence of these risk factors may  
237 explain why these areas were determined by our model as at low risk of AI outbreaks.  
238 However, the potential risk of AIV introduction through this region should be considered  
239 since AI outbreaks are frequently reported from neighboring Niger (FAO, 2022).

240 Several common limitations inherent to the GIS-MCDA approach have been described by  
241 different authors (Fusade-Boyer et al., 2020; Paul et al., 2016; Ruget et al., 2019; Kim B.  
242 Stevens & Pfeiffer, 2011). One of the main limitations of the present study resides in the  
243 selection of risk factors associated with AI occurrence. The risk factors integrated into the  
244 model were only those identified in the scientific literature to be associated with AI  
245 outbreaks and for which spatial data were available. Other risk factors such as poultry  
246 movements, seasons, husbandry practices, and wild bird distribution may play an  
247 important role in AI occurrence (Cappelle et al., 2012; Sophie Molia et al., 2017). However,  
248 the model presented here is flexible and could be easily updated if other relevant factors  
249 for AI occurrence in Mali become available. Another limitation of the GIS-MCDA method  
250 is related to the quality of spatial data. In the present study, poultry density represents the  
251 most important risk factor. The raster layer available for poultry density in Mali was  
252 generated in 2014, 8 years before the study period, although the areas considered to have  
253 a high density of poultry are still the same (DNPIA, 2019). More updated data would  
254 increase the quality of the resulting AI outbreak risk map in Mali.

255 A third limitation of the GIS-MCDA is the subjectivity that could be related to the weights  
256 assigned to risk factors. In the present study, the weights of risk factors were estimated

257 using AI expert opinion elicitation. Due to the potential subjectivity that could be linked  
258 to the weights of risk factors, an extensive sensitivity analysis was conducted to evaluate  
259 the impact that variations in weights have on the model output. Our model is considered  
260 robust as the changes in weights did not greatly modify the resulting risk map. Although  
261 there is no specification about the number of experts to consult when eliciting health  
262 problems (Knol et al., 2010), only nine experts fully reply to the questionnaire. However,  
263 the judgments of all the experts were consistent and quite similar. We agree that our map  
264 validation method was qualitative and further work is needed for quantitative validation.  
265 We did not perform ROC analysis to quantitatively evaluate the predictive ability of the  
266 model because the number of AI cases was very limited to be used in the estimation of the  
267 Area Under the Curve (AUC). Indeed, the validation of knowledge-driven models such as  
268 GIS-MCDA may be difficult, particularly in data-scarce settings. However, the GIS-MCDA  
269 approach has been validated in several studies (Paul et al., 2016; Kim B. Stevens et al.,  
270 2013) and had even more predictive capacity than statistical models in certain situations  
271 (Gilbert et al., 2008). In addition, data on AIV circulation from future studies and  
272 surveillance datasets could be easily integrated into the model for quantitative validation.

273 The outputs of the GIS-MCDA approach could be particularly useful for risk-based  
274 surveillance strategies and control programs, particularly in settings with very limited  
275 resources as in some countries of Africa and Asia where this method has been previously  
276 performed (Fusade-Boyer et al., 2020; Sangrat et al., 2020; Kim B. Stevens et al., 2013). In  
277 this perspective, GIS-MCDA may contribute to the identification of risk areas, the setting  
278 of surveillance priorities, and the efficient allocation of resources (Stärk et al., 2006). This

279 study represents the first GIS-MCDA approach that provided risk maps for AIVs  
280 occurrence in domestic poultry in Mali. The results presented here could be particularly  
281 useful for the implementation of risk-based and cost-effective surveillance strategies that  
282 would contribute to better prevention and control of potential AI outbreaks in Mali.

### 283 **Conflict of Interest**

284 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or  
285 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### 286 **Author Contributions**

### 287 **Funding**

288 This work was supported by INRAE funding (initiative TSARA) and ENSV-FVI funding.  
289 I.N.S. is supported by a PhD scholarship from the French Embassy in Mali.

### 290 **Acknowledgments**

291 The authors would like to thank all the experts for their valuable answers and comments.

292

293

294 **References**

- 295 Bao, P., Liu, Y., Zhang, X., Fan, H., Zhao, J., Mu, M., Li, H., Wang, Y., Ge, H., Li, S., Yang, X.,  
296 Cui, Q., Chen, R., Gao, L., Sun, Z., Gao, L., Qiu, S., Liu, X., Horby, P. W., ... Liu, W. (2022).  
297 Human infection with a reassortment avian influenza A H3N8 virus: an epidemiological  
298 investigation study. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–8.
- 299 Cappelle, J., Girard, O., Fofana, B., Gaidet, N., & Gilbert, M. (2010). Ecological modeling of the  
300 spatial distribution of wild waterbirds to identify the main areas where avian influenza  
301 viruses are circulating in the Inner Niger Delta, Mali. *EcoHealth*, 7(3), 283–293.
- 302 Cappelle, J., Servan de Almeida, R., Fofana, B., Dakouo, M., Balança, G., Gil, P., Albina, E., &  
303 Gaidet, N. (2012). Circulation of avian influenza viruses in wild birds in Inner Niger  
304 Delta, Mali. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(4), 240–244.
- 305 DNPIA. (2019). *Rapport annuel 2019*.
- 306 Ducatez, M. F., Olinger, C. M., Owoade, A. A., Tarnagda, Z., Tahita, M. C., Sow, A., De  
307 Landtsheer, S., Ammerlaan, W., Ouedraogo, J. B., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A.  
308 M., & Muller, C. P. (2007). Molecular and antigenic evolution and geographical spread of  
309 H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa. *Journal of General*  
310 *Virology*, 88(8), 2297–2306.
- 311 FAO. (2013). Secteur Avicole Mali. Revues nationales de l'élevage de la division de la  
312 production et de la santé animales de la FAO. In *Revue nationale de l'élevage de la division*  
313 *de la production et de la santé animales de la FAO*.
- 314 FAO. (2022). *Sub-Saharan Africa HPAI situation update* FAO Animal Health Service / EMPRES  
315 (Vol. 11, Issue September).
- 316 Floyd, T., Banyard, A. C., Lean, F. Z. X., Byrne, A. M. P., Fullick, E., Whittard, E., Mollett, B.  
317 C., Bexton, S., Swinson, V., Macrelli, M., Lewis, N. S., Reid, S. M., Núñez, A., Duff, J. P.,  
318 Hansen, R., & Brown, I. H. (2021). Encephalitis and death in wild mammals at a  
319 rehabilitation center after infection with highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus,  
320 United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 27(11), 2856–2863.
- 321 Fusade-Boyer, M., Pato, P. S., Komlan, M., Dogno, K., Batawui, K., Go-Maró, E., McKenzie, P.,  
322 Guinat, C., Secula, A., Paul, M., Webby, R. J., Tran, A., Waret-Szkuta, A., & Ducatez, M.  
323 F. (2020). Risk Mapping of Influenza D Virus Occurrence in Ruminants and Swine in Togo  
324 Using a Spatial Multicriteria Decision Analysis Approach. *Viruses*, 12(2), 16–18.
- 325 Gilbert, M., & Pfeiffer, D. U. (2012). Risk factor modelling of the spatio-temporal patterns of  
326 highly pathogenic avian influenza (HPAIV) H5N1: A review. *Spatial and Spatio-Temporal*  
327 *Epidemiology*, 3(3), 173–183.
- 328 Gilbert, M., Xiao, X., Pfeiffer, D. U., Epprecht, M., Boles, S., Czarnecki, C., Chaitaweesub, P.,  
329 Kalpravidh, W., Minh, P. Q., Otte, M. J., Martin, V., & Slingenbergh, J. (2008). Mapping  
330 H5N1 highly pathogenic avian influenza risk in Southeast Asia. *Proceedings of the National*  
331 *Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4769–4774.

- 332 Knol, A. B., Slottje, P., Van Der Sluijs, J. P., & Lebret, E. (2010). The use of expert elicitation in  
333 environmental health impact assessment: A seven step procedure. *Environmental Health:  
334 A Global Access Science Source*, 9(1), 1–16.
- 335 La Sala, L. F., Burgos, J. M., Blanco, D. E., Stevens, K. B., Fernández, A. R., Capobianco, G.,  
336 Tohmé, F., & Pérez, A. M. (2019). Spatial modelling for low pathogenicity avian influenza  
337 virus at the interface of wild birds and backyard poultry. *Transboundary and Emerging  
338 Diseases*, 66(4), 1493–1505.
- 339 Malczewski, J. (2004). GIS-based land-use suitability analysis: a critical overview. *Progress in  
340 Planning*, 62(1), 3–65.
- 341 Meijer, J. R., Huijbregts, M. A. J., Schotten, K. C. G. J., & Schipper, A. M. (2018). Global patterns  
342 of current and future road infrastructure. *Environmental Research Letters*, 13(6), 064006.
- 343 Métras, R., Stevens, K. B., Abdu, P., Okike, I., Randolph, T., Grace, D., Pfeiffer, D. U., &  
344 Costard, S. (2013). Identification of Potential Risk Factors Associated with Highly  
345 Pathogenic Avian Influenza Subtype H5N1 Outbreak Occurrence in Lagos and Kano  
346 States, Nigeria, During the 2006–2007 Epidemics. *Transboundary and Emerging Diseases*,  
347 60(1), 87–96.
- 348 Molia, S., Boly, I. A., Duboz, R., Coulibaly, B., Guitian, J., Grosbois, V., Fournié, G., & Pfeiffer,  
349 D. U. (2016). Live bird markets characterization and trading network analysis in Mali:  
350 Implications for the surveillance and control of avian influenza and Newcastle disease.  
351 *Acta Tropica*, 155, 77–88.
- 352 Molia, S., Grosbois, V., Kamissoko, B., Sidibe, M. S., Sissoko, K. D., Traore, I., Diakite, A., &  
353 Pfeiffer, D. U. (2017). Longitudinal Study of Avian Influenza and Newcastle Disease in  
354 Village Poultry, Mali, 2009–2011. *Avian Diseases*, 61(2), 165–177.
- 355 Molia, S., Kamissoko, B., Sidibé, M. S., Diakité, A., Diall, M., & N'Diaye, M. R. (2012). Deficient  
356 Reporting in Avian Influenza Surveillance, Mali. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), 691.
- 357 Molia, S., Samaké, K., Diarra, A., Sidibé, M. S., Doumbia, L., Camara, S., Kanté, S., Kamissoko,  
358 B., Diakité, A., Gil, P., Hammoumi, S., De Almeida, R. S., Albina, E., & Grosbois, V. (2011).  
359 Avian influenza and newcastle disease in three risk areas for H5N1 highly pathogenic  
360 avian influenza in Mali, 2007-2008. *Avian Diseases*, 55(4), 650–658.
- 361 Molia, S., Traoré, A., Gil, P., Hammoumi, S., Lesceu, S., de Almeida, R. S., Albina, E., &  
362 Chevalier, V. (2010). Avian influenza in backyard poultry of the Mopti region, Mali.  
363 *Tropical Animal Health and Production*, 42(5), 807–809.
- 364 Molia, S., Traoré, I., Kamissoko, B., Diakité, A., Sidibé, M. S., Sissoko, K. D., & Pfeiffer, D. U.  
365 (2015). Characteristics of commercial and traditional village poultry farming in Mali with  
366 a focus on practices influencing the risk of transmission of avian influenza and Newcastle  
367 disease. *Acta Tropica*, 150, 14–22.

- 368 Naguib, M. M., Verhagen, J. H., Samy, A., Eriksson, P., Fife, M., Lundkvist, Å., Ellström, P., &  
369 Järhult, J. D. (2019). Avian influenza viruses at the wild–domestic bird interface in Egypt.  
370 <https://doi.org/10.1080/20008686.2019.1575687>, 9(1).
- 371 Ntsomboh Ntsefong, G. (2017). Incidence of Avian Flu Shocks on Poor Household Livelihoods  
372 of Poultry Farmers in Africa. *International International Journal of Avian & Wildlife Biology*,  
373 2(1).
- 374 Otte, J., Hinrichs, J., Rushton, J., Roland-Holst, D., & Zilberman, D. (2008). Impacts of avian  
375 influenza virus on animal production in developing countries. *CAB Reviews: Perspectives*  
376 *in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 3.
- 377 Pantin-Jackwood, M. J., & Swayne, D. E. (2009). *Pathogenesis and pathobiology of avian influenza*  
378 *virus infection in birds*.
- 379 Paul, M. C., Goutard, F. L., Roulleau, F., Holl, D., Thanapongtharm, W., Roger, F. L., & Tran,  
380 A. (2016). Quantitative assessment of a spatial multicriteria model for highly pathogenic  
381 avian influenza H5N1 in Thailand, and application in Cambodia. *Scientific Reports*,  
382 6(July), 1–10.
- 383 Rivas, A. L., Chowell, G., Schwager, S. J., Fasina, F. O., Hoogesteijn, A. L., Smith, S. D.,  
384 Bisschop, S. P. R., Anderson, K. L., & Hyman, J. M. (2010). Lessons from Nigeria: the role  
385 of roads in the geo-temporal progression of avian influenza (H5N1) virus. *Epidemiology &*  
386 *Infection*, 138(2), 192–198.
- 387 Robinson, T. P., William Wint, G. R., Conchedda, G., Van Boeckel, T. P., Ercoli, V., Palamara,  
388 E., Cinardi, G., D’Aietti, L., Hay, S. I., & Gilbert, M. (2014). Mapping the Global  
389 Distribution of Livestock. *PLOS ONE*, 9(5), e96084.
- 390 Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Martínez, M., Muñoz, M. J., & Sánchez-Vizcaíno, J.  
391 M. (2012). Identification of suitable areas for West Nile virus outbreaks in equid  
392 populations for application in surveillance plans: The example of the Castile and Leon  
393 region of Spain. *Epidemiology and Infection*, 140(9), 1617–1631.
- 394 Ruget, A. S., Tran, A., Waret-Szkuta, A., Moutroifi, Y. O., Charafouddine, O., Cardinale, E.,  
395 Cêtre-Sossah, C., & Chevalier, V. (2019). Spatial Multicriteria Evaluation for Mapping the  
396 Risk of Occurrence of Peste des Petits Ruminants in Eastern Africa and the Union of the  
397 Comoros. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(December), 1–11.
- 398 Saaty, R. W. (1987). The analytic hierarchy process—what it is and how it is used. *Mathematical*  
399 *Modelling*, 9(3–5), 161–176.
- 400 Saaty, T. L. (1990). How to make a decision: The analytic hierarchy process. *European Journal of*  
401 *Operational Research*, 48(1), 9–26.
- 402 Sangrat, W., Thanapongtharm, W., & Poolkhet, C. (2020). Identification of risk areas for foot  
403 and mouth disease in Thailand using a geographic information system-based multi-  
404 criteria decision analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 185, 105183.

405 Stärk, K. D. C., Regula, G., Hernandez, J., Knopf, L., Fuchs, K., Morris, R. S., & Davies, P. (2006).  
406 Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary medicine and veterinary  
407 public health: Review of current approaches. *BMC Health Services Research*, 6, 20.

408 Stevens, K. B., Costard, S., Métras, R., Theuri, W., Hendrickx, S., & Pfeiffer, D. U. (2010). *Risk*  
409 *Mapping for HPAI H5N1 in Africa Improving surveillance for virulent bird fl u Final report and*  
410 *risk maps Under Early Detection, Reporting and Surveillance-Avian Influenza in Africa Project-*  
411 *USAID. May 2014.*  
412 [https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/2420/HPAI\\_RiskMapping\\_En.pdf?seq](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/2420/HPAI_RiskMapping_En.pdf?sequence=4&isAllowed=y)  
413 [uence=4&isAllowed=y](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/2420/HPAI_RiskMapping_En.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

414 Stevens, K. B., Gilbert, M., & Pfeiffer, D. U. (2013). Modeling habitat suitability for occurrence  
415 of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in domestic poultry in Asia: A spatial  
416 multicriteria decision analysis approach. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, 4(1), 1–  
417 14.

418 Stevens, K. B., & Pfeiffer, D. U. (2011). Spatial modelling of disease using data- and knowledge-  
419 driven approaches. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, 2(3), 125–133.

420 Sulaiman, L., Shittu, I., Fusaro, A., Inuwa, B., Zecchin, B., Gado, D., Schivo, A., Bianco, A.,  
421 Laleye, A., Gobbo, F., Vakuru, C., Joannis, T., Monne, I., & Meseko, C. (2021). Live bird  
422 markets in nigeria: A potential reservoir for h9n2 avian influenza viruses. *Viruses*, 13(8),  
423 1445.

424 Walsh, M. G., Amstislavski, P., Greene, A., & Haseeb, M. A. (2017). The Landscape  
425 Epidemiology of Seasonal Clustering of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) in  
426 Domestic Poultry in Africa, Europe and Asia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5),  
427 1465–1478.

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

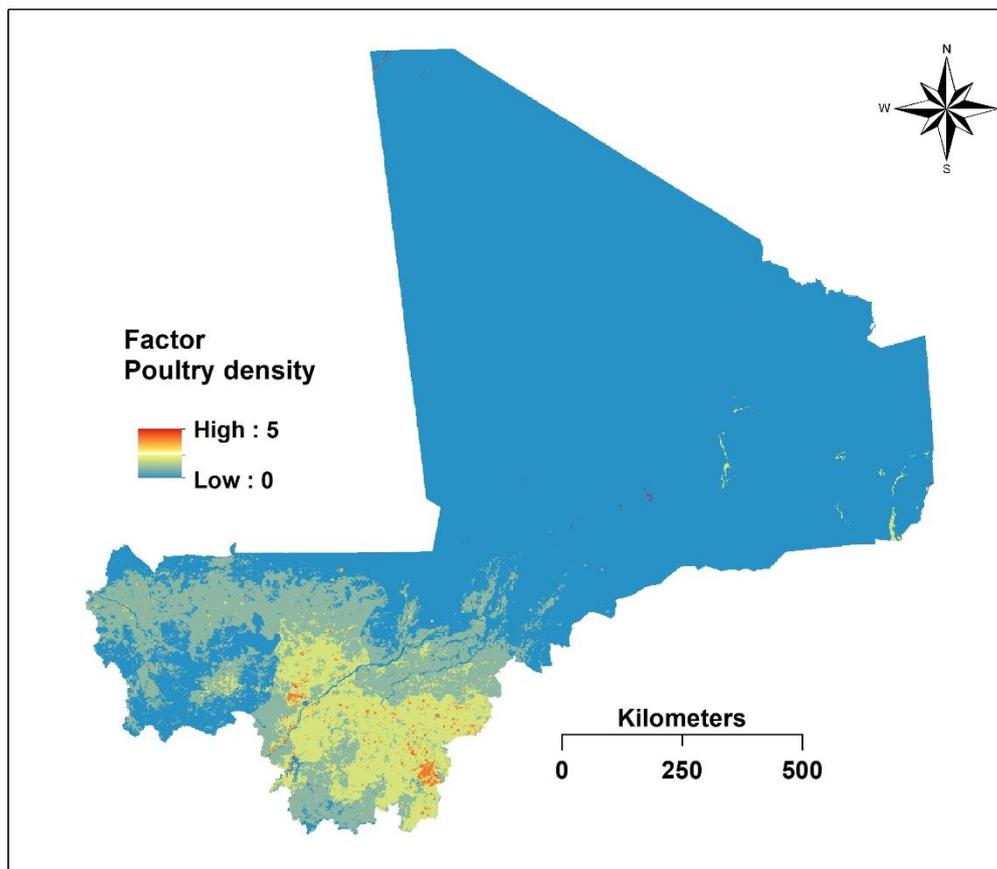
438

439 **Supplementary Materials**

440 **Table S1: Relative weights of risk factors assigned by experts**

Criteria	Poultry density	Poultry farms	Poultry Market	Proximity to roads	Proximity to water	Total	CR Value*
Expert 1	0.34	0.34	0.09	0.10	0.12	1	0.07
Expert 2	0.29	0.15	0.44	0.06	0.06	1	0.05
Expert 3	0.42	0.06	0.25	0.13	0.13	1	0.05
Expert 4	0.26	0.33	0.22	0.07	0.12	1	0.07
Expert 5	0.26	0.33	0.22	0.12	0.07	1	0.07
Expert 6	0.28	0.18	0.35	0.12	0.07	1	0.05
Expert 7	0.28	0.28	0.28	0.12	0.04	1	0.04
Expert 8	0.24	0.24	0.3	0.12	0.1	1	0.03
Expert 9	0.45	0.16	0.16	0.17	0.06	1	0.03
<b>Mean %</b>	<b>31.33</b>	<b>23.07</b>	<b>25.62</b>	<b>11.33</b>	<b>8.65</b>	<b>100</b>	

441 \* Consistency Ratio



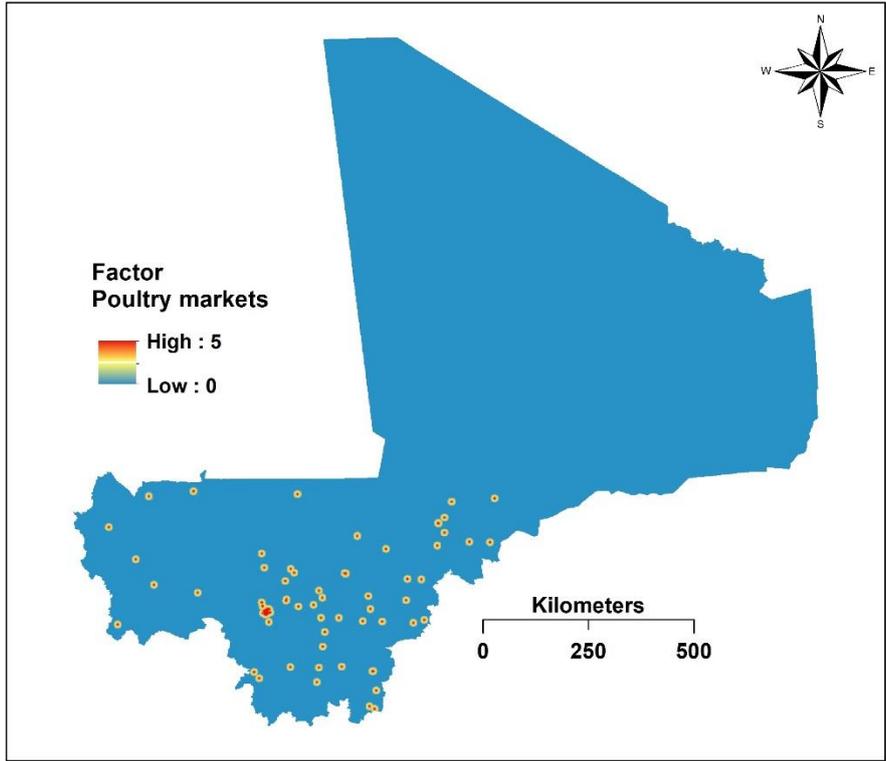
442

443 **Figure S1: Map of poultry density after standardization.**

444

445

446

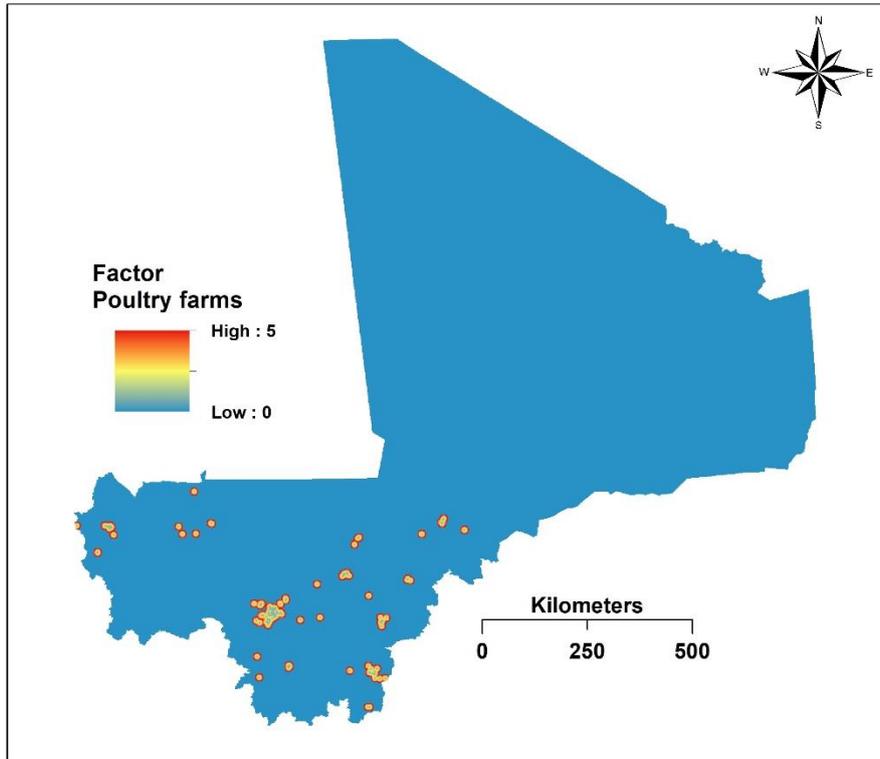


447

448

Figure S2: Map of distance to livestock market after standardization.

449

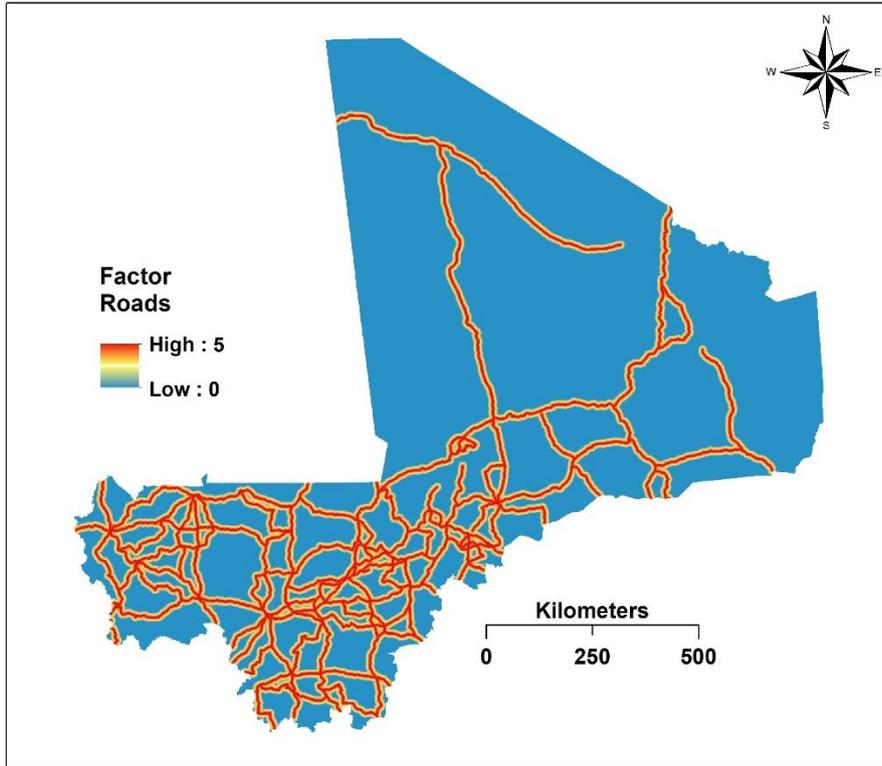


450

451

Figure S3: Map of distance to poultry farms after standardization.

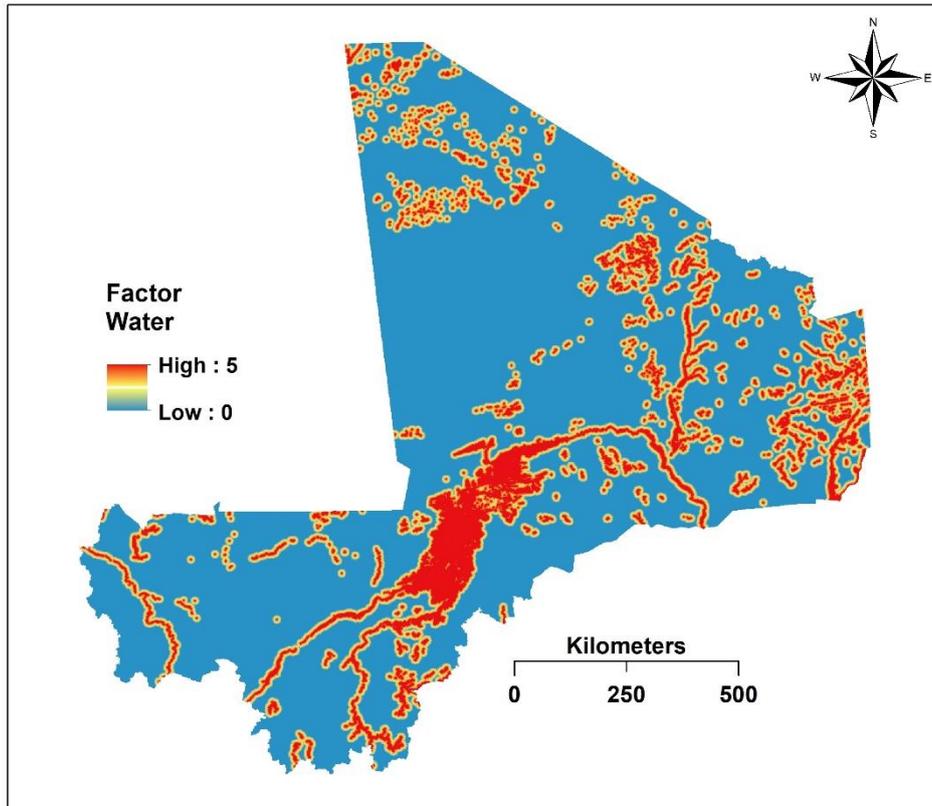
452



453

454

Figure S4: Map of distance to roads after standardization.



455

456

Figure S5: Map of distance to water areas after standardization.

## IV. Discussion générale

Les virus influenza aviaires (VIA) constituent une préoccupation majeure à la fois pour la santé animale et la santé humaine. La plupart de ces virus sont faiblement pathogène et circulent de manière asymptomatique chez les oiseaux. Toutefois, certains virus de sous-types H5 et H7 sont responsables d'une mortalité très élevée chez les volailles.

Depuis sa première introduction en 2006 au Nigeria, le virus H5N1 de la lignée GS/GD a considérablement évolué sur le plan génétique et continue de provoquer des foyers d'IAHP chez les volailles dans la plupart des pays en Afrique de l'Ouest (Ducatez et al., 2007; Tassoni et al., 2016).

En plus du virus H5N1, le virus H9N2 de la lignée G1 circule également en Afrique de l'Ouest depuis 2017. Détecté principalement chez les volailles domestiques, le virus H9N2 a été responsable d'une infection humaine au Sénégal (Fusade-Boyer et al., 2021; Jallow et al., 2020; Sulaiman et al., 2021; Zecchin et al., 2017). Cependant, l'épidémiologie des virus H5N1 et H9N2 reste encore peu connue en Afrique de l'Ouest. En effet, la surveillance des VIA est surtout passive et ne permet donc pas de suivre l'évolution et d'avoir des informations sur la diversité génétique de ces virus (Partie I). Ces travaux de thèse qui se situent entre les disciplines de virologie et d'épidémiologie avaient pour objectifs : (i) d'améliorer nos connaissances sur la circulation et les caractéristiques génétiques des virus influenza aviaires en Afrique de l'Ouest et (ii) de contribuer à l'amélioration de la surveillance des virus influenza aviaires dans une région où les données épidémiologiques et les ressources sont assez limitées. Nos travaux de thèse ont été structurés autour de trois articles.

**L'article 1** s'est focalisé sur les caractéristiques génétiques et antigéniques des virus H5N1 ayant circulé en Afrique de l'Ouest entre 2021-2022 et spécifiquement au Bénin. Ces virus appartiennent à la lignée GS/GD clade 2.3.4.4.B et étaient phylogénétiquement proches des virus H5N1 précédemment isolés en Afrique de l'Ouest et en Europe. Nous avons retrouvé une mutation d'adaptation aux mammifères sur ces virus indiquant leur potentiel

zoonotique. On a également observé une faible réactivité antigénique croisée entre les virus H5N1 du Bénin et les vaccins candidats de l’OMS.

**L’article 2** s’est concentré sur les caractéristiques génétiques des virus H9N2 circulant dans les marchés à volaille au Mali et les mécanismes d’introduction et de propagation de ces virus en Afrique de l’Ouest. Les résultats montrent que les virus H9N2 maliens appartenaient à la lignée G1 et possèdent plusieurs marqueurs moléculaires associés à la virulence et l’adaptation aux mammifères. Nous avons trouvé sur le site de clivage de la HA de ces virus un motif RSNR qui n’a été décrit qu’en Asie. Les virus H9N2 ont été introduits en Afrique de l’Ouest à partir du Maroc vers 2015 et se sont ensuite propagés au sein de la région.

**L’article 3** s’est focalisé sur l’application de la méthode GIS-MCDA afin d’identifier les zones à risque d’apparition des foyers d’influenza aviaire. Une carte de risque d’influenza aviaire a été élaborée et elle pourra servir de base pour la mise place d’un système de surveillance des virus influenza basé sur le risque.

### **Afrique de l’Ouest : une région d’introduction et de propagation du VIAHP H5N1**

L’Afrique de l’Ouest constitue une région d’introduction de virus H5NA sur le continent africain avec un potentiel de propagation subséquente. La région ouest-africaine a été confronté à plusieurs foyers de virus H5N1 depuis 2006 avec au moins trois incursions dans la région. Le premier foyer d’IAHP a été causé par un virus de la lignée GS/GD, clade 2.2 en 2006 au Nigéria, suivi par des foyers d’IAHP d’autres pays en Afrique de l’Ouest (Fasina et al., 2009; Joannis et al., 2006). Après cette première introduction dans la région, la situation épidémiologique du virus H5N1 était assez calme dans la région. Le virus a été responsable que de cas sporadiques et il circulait à des niveaux faibles chez les domestiques et sauvages (Couacy-Hymann et al., 2012; Fuller et al., 2015). En 2015, sept ans après la première vague de foyers d’IAHP, le virus H5N1 de clade 2.3.2.1c a été

introduit en Afrique de l'Ouest (A. Laleye et al., 2018) qui a été ensuite suivi par l'incursion en 2016 des virus H5N1 de clade 2.3.4.4b. Ces derniers se sont propagés à plusieurs pays en Afrique de l'Ouest, notamment Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Ghana, Niger et Togo (Fusaro, Zecchin, Vrancken, Abolnik, Ademun, Akpeli, et al., 2019). Les virus H5N1 de clade 2.3.4.4b circulent depuis lors en Afrique de l'Ouest et continuent de provoquer de multiples foyers comme ce fut le cas tout récemment entre 2020-2022 (FAO, 2022).

Plusieurs études phylogénétiques ont démontré le rôle prépondérant des oiseaux sauvages dans l'introduction des virus H5N1 en Afrique de l'Ouest (Cattoli et al., 2009; Fusaro, Zecchin, Vrancken, Abolnik, Ademun, Alassane, et al., 2019; Gaidet et al., 2012; Tassoni et al., 2016). Une étude récente au Sénégal a décrit l'introduction de virus H5N1 par des oiseaux provenant d'Eurasie qui migrent vers le sud pour l'hiver (Lo et al., 2022). En effet, l'Afrique de l'Ouest offre des sites d'hivernage et de reproduction à des milliers d'oiseaux migrateurs provenant d'Europe et d'Asie du Sud-Ouest pouvant potentiellement être porteurs de virus influenza (Cappelle et al., 2010). Une fois introduits dans la région, les virus H5N1 se propagent généralement entre les pays à travers le commerce et les mouvements transfrontaliers de volailles ou de matériels infectés, encouragés par des frontières poreuses et l'absence de contrôles vétérinaires en Afrique de l'Ouest (Molia et al., 2016; Schneider et al., 2010). Notre étude phylogénétique a démontré que les virus H5N1 de clade 2.3.4.4b collectés au Bénin en 2021 étaient étroitement liés aux virus isolés au Nigéria et en Europe. Nos résultats ont conduit à l'hypothèse que ces virus avaient été très probablement introduits dans le pays à partir du Nigéria, un pays frontalier du Bénin (**article 1**), mais le cas index de H5N1 2.3.4.4b sur le continent avait sans doute une origine chez un oiseau migrateur en provenance d'Europe vue la similarité des séquences.

Malgré la présence des virus H5N1 clade 2.3.4.4b dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest, il reste difficile de déterminer de façon détaillée les mécanismes d'introduction et de propagation de ces virus dans la région. En effet, les informations sur les caractéristiques génétiques des virus H5N1 détectés en Afrique de l'Ouest sont assez limitées.

L'analyse moléculaire des virus H5N1 du Bénin nous a permis de détecter une mutation (113V) sur le segment PB1 associée à une meilleure réplication de ces virus dans les cellules de mammifères (**Article 1**). En effet, les virus H5N1 clade 2.3.4.4b sont particulièrement préoccupants à cause de leur potentiel zoonotique et leur capacité de réassortiments avec d'autres sous-types de virus. Les virus H5N1 clade 2.3.4.4.b ont été responsables de plusieurs cas d'infection humaine dans le monde (WHO, 2023b) et tout récemment, un cas de réassortiment entre ces virus et le segment PA d'un virus H9N2 a été décrit au Burkina Faso (Ouoba et al., 2022). Même si les propriétés biologiques de ce type de réassortiment ne sont pas encore totalement élucidées, certains H5N1/H9N2 reassortants ont été associés à une virulence accrue dans les cellules humaines (Arai et al., 2019).

La circulation continue des virus H5N1 en Afrique de l'Ouest impacte négativement l'économie locale en Afrique de l'Ouest et constitue une menace importante pour la santé humaine et animale. Il s'avère nécessaire de mettre en place des activités de surveillance active des virus H5N1 avec une caractérisation génétique des virus détectés dans la région afin de suivre leur propagation et leur évolution en Afrique de l'Ouest, ce qui contribuera très certainement à une meilleure compréhension de la situation épidémiologique de ces virus et l'élaboration de stratégies de contrôle efficaces.

### **H9N2 : une menace émergente pour les volailles et l'homme en Afrique de l'Ouest**

Depuis la première apparition du virus H9N2 en 2017 au Burkina Faso, le virus s'est répandu à plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest (Zecchin et al., 2017). Tous les virus H9N2 qui ont été détectés dans la région, incluant ceux détectés au Mali au cours de nos travaux (**article 2**), appartiennent à la lignée G1 et sont très proches des virus isolés en Afrique du Nord, notamment au Maroc (Fusade-Boyer et al., 2021; Kalonda et al., 2020). En effet, plusieurs études ont émis l'hypothèse d'une introduction du virus H9N2 en Afrique de l'Ouest à partir du Maroc à travers l'importation d'œufs à couver et de poussins d'un jour (Awuni et al., 2019; El Mellouli et al., 2022; Fusade-Boyer et al., 2021; Zecchin et al., 2017). Notre analyse spatiotemporelle des virus H9N2 détectés en Afrique de l'Ouest et du Nord a révélé un seul événement de transmission de longue distance vers 2015,

confirmant ainsi le rôle important que le Maroc a pu jouer dans l'introduction de ces virus H9N2 en Afrique de l'Ouest (**article 2**). En outre, nous avons démontré que le nombre de séquences disponibles n'affecte pas l'estimation de la période d'introduction des virus H9N2 en Afrique de l'Ouest. En effet, certaines études ont suggéré que les analyses phylogéographiques de ces virus dans la région pourraient être biaisées par la disponibilité d'un plus grand nombre de séquences provenant d'Afrique du Nord que de l'Ouest (El Mellouli et al., 2022; Zecchin et al., 2017).

On observe en Afrique de l'Ouest un décalage temporel entre la période d'introduction des virus H9N2 révélée par notre étude (2015) et leur première détection dans la plupart des pays de la région. En effet, ces virus circulent de manière asymptomatique chez les volailles et ne sont donc pas activement recherchés par les systèmes de surveillance. Par exemple, nous avons décrit pour la première fois les caractéristiques génétiques et phylogénétiques des virus H9N2 circulant dans les marchés à volailles au Mali environ sept ans après leur introduction en Afrique de l'Ouest (**article 2**). Cela démontre des lacunes importantes dans la surveillance de ces virus, rendant difficile l'obtention de données détaillées sur leur circulation dans la région.

Les virus H9N2 semblent aujourd'hui circuler de manière endémique dans les marchés à volailles en Afrique de l'Ouest (Fusade-Boyer et al., 2021; Sulaiman et al., 2021). En effet, les marchés à volailles sont considérés comme des lieux d'émergence et de propagation des VIA à cause du fait qu'ils abritent différentes espèces de volailles d'origines diverses et des liens commerciaux qu'ils entretiennent avec les fermes, les ménages, les abattoirs et les routes (Fasanmi et al., 2017). En Afrique de l'Ouest, la plupart des marchés à volailles sont caractérisés par des mauvaises pratiques d'hygiène et de biosécurité, facilitant ainsi la transmission des virus entre les oiseaux (Molia et al., 2016; Sulaiman et al., 2021).

Au Mali, on a observé un taux de positivité au virus H9N2 assez élevé (14%) comparé à la prévalence de ces virus chez les volailles de basse-cour potentiellement en contact avec des oiseaux sauvages (3,6%) (Molia et al., 2010). Ce taux de positivité était également plus élevé que celui rapporté en 2019 au Togo (2,7%) mais inférieur à ceux décrits au Bénin (24,2%) et en Ouganda (61%) (Fusade-Boyer et al., 2021). Cependant, nos résultats doivent

être interprétés avec précaution à cause du faible nombre d'échantillons collectés (200) au cours de notre étude.

Les virus H9N2 ont été isolés chez l'Homme dans une centaine de cas et ont été associés à une infection bénigne la plupart du temps même si deux cas de décès ont été signalés (Peacock et al., 2019; WHO, 2023a). En Afrique de l'Ouest, seul un cas humain de H9N2 a été signalé en 2019 chez un enfant au Sénégal (Jallow et al., 2020). Cependant, la plupart des virus H9N2 détectés dans la région possèdent les marqueurs d'adaptation aux mammifères identiques à ceux identifiés chez le virus humain isolé au Sénégal (Awuni et al., 2019; Fusade-Boyer et al., 2021; Sulaiman et al., 2021). En effet, nous avons détecté plusieurs mutations au niveau de la protéine HA des virus H9N2 du Mali qui ont été associées à une adaptation de ces virus à l'Homme (**Article 2**). De plus, la présence au niveau du site de clivage d'un motif RSNR, qui n'avait pas encore été décrit en Afrique, est particulièrement inquiétante puisqu'un tel motif a surtout été observé chez des virus H9N2 responsables d'infections humaines en Asie. Toutefois, l'importance de cette mutation sur la stabilité de ces virus ou sur l'augmentation de leur virulence n'est pas totalement élucidée et nécessite des études complémentaires (Takakuwa et al., 2013).

Bien qu'il n'existe pas assez d'informations sur la prévalence des virus H9N2 zoonotiques dans les populations de volailles, leur présence peut contribuer à la transmission du virus à l'Homme, particulièrement aux personnes en contact étroit avec les volailles. La possibilité de réassortiment entre les virus H9N2 et les virus influenza humains saisonniers, qui sont sous détectés en Afrique de l'Ouest, constitue également une autre source d'inquiétude même si on ne connaît pas l'issue de tels réassortiments (Peiris et al., 2001).

Tous ces facteurs peuvent conduire à l'émergence de souches H9N2 pandémiques qui pourraient éventuellement se transmettre efficacement chez l'homme (Pusch & Suarez, 2018). C'est pourquoi, il est important de suivre l'évolution de ces virus à la fois chez l'homme et chez les volailles afin de comprendre le risque et les mécanismes d'infection de l'homme dans le but de prévenir la propagation des virus H9N2 à l'homme.

## La cartographie pour une surveillance basée sur le risque en Afrique de l'Ouest

Les VIA sont caractérisés par une grande diversité génétique et une capacité de réassortiment entre différents sous-types. Dans le but de suivre l'évolution de ces virus, il est nécessaire de disposer de systèmes de surveillance efficaces permettant d'identifier les virus hautement pathogène ou possédant un potentiel zoonotique. Comme cité plus haut, la surveillance des VIA en Afrique de l'Ouest est passive à cause de ressources financières limitées et ne permet donc pas d'obtenir des informations détaillées sur leur circulation et leurs caractéristiques génétiques.

Plusieurs études ont démontré l'importance de la surveillance basée sur le risque, en particulier dans les pays à faible revenu, en raison de son faible coût par rapport à la surveillance active conventionnelle et du fait qu'elle produit des résultats aussi valables que cette dernière (Cameron et al., 2014; Stärk et al., 2006). Les cartes de risque constituent des outils de visualisation permettant d'optimiser la surveillance basée sur le risque en identifiant les régions à prioriser dans le cadre des activités de surveillance (Sangrat et al., 2020; Stevens et al., 2010). Cela est particulièrement intéressant pour les VIA, pour lesquels certains facteurs de risques ont été associés à l'apparition de foyers. Au cours de cette thèse, nous avons donc utilisé un modèle de cartographie (GIS-MCDA) intégrant les informations sur les facteurs de risque liés aux VIA pour identifier les zones à risque d'apparition des foyers d'influenza aviaire chez les volailles domestiques au Mali (**article 3**).

Nous avons détecté un risque très élevé des VIA dans le district de Bamako et la région de Sikasso. Cela peut être en partie être expliqué par l'existence d'une densité élevée de volailles et de marchés à volaille dans ces régions. On constate également un nombre élevé de fermes commerciales de volailles dans la périphérie de ces deux régions. En effet, au Mali 90% des volailles sont élevées dans le système traditionnel avec des mesures de biosécurité limitées constituant ainsi un risque important d'émergence des VIA.

La région de Mopti a également été identifiée comme une zone ayant un très grand risque d'apparition des VIA. Cela pourra s'expliquer par le fait que cette zone abrite le delta intérieur du Niger abritant des millions d'oiseaux sauvages pouvant être potentiellement

infectés par les VIA. En effet, ces oiseaux considérés comme réservoirs des VIA peuvent avoir des contacts avec les volailles domestiques locales.

La méthodologie de cartographie du risque décrite dans ce travail intègre les principaux facteurs de risque associés à l'apparition des VIA, notamment la densité de volailles, la proximité des élevages commerciaux, des marchés à volailles, des routes et des points d'eau. Cependant, il convient de noter l'absence de certains facteurs de risque pouvant être importants dans l'épidémiologie des VIA comme la distribution des oiseaux sauvages et la saison. En effet, au Mali, il a été établi que les VIA peuvent circuler toute l'année dans les zones humides comme le delta intérieur du Niger (DIN), avec une prévalence plus élevée lorsque les oiseaux migrateurs provenant d'Eurasie sont présents, soit entre janvier – mars (Cappelle et al., 2012). Cette variation saisonnière de la prévalence des VIA chez les oiseaux sauvages peut influencer la cartographie du risque mise en œuvre dans ce travail. Il est donc important de prédire la distribution des oiseaux sauvages à travers la modélisation écologique intégrant un ensemble de variables environnementales comme les indices de l'eau, les indices de la végétation et les indicateurs de perturbations anthropiques comme cela a déjà été mise en œuvre dans le DIN (Cappelle et al., 2010).

Pour une application de la méthode GIS-MCDA proposée dans cette étude pour la surveillance et la mise en œuvre des stratégies de prévention et de contrôle des VIA au Mali, il est important de tenir compte des conditions locales telles que l'observance des mesures de biosécurité dans les élevages, ou les mouvements des volailles vivantes entre les régions. Une surveillance active des VIA dans le pays devra prioritairement cibler les zones à risques élevés (Bamako, Sikasso et Mopti) à travers des prélèvements dans les marchés à volailles, les abattoirs et les élevages commerciaux de volailles. Cependant, pour éviter l'introduction des VIA dans le pays par les mouvements illégaux de volailles, il est essentiel de renforcer la surveillance dans les zones frontalières surtout avec les pays dans lesquels surviennent couramment des cas d'influenza aviaire.

Bien que le modèle de cartographie présenté dans ce travail soit simple et facile à mettre en œuvre, il a certaines limites dont la plupart sont inhérentes à la méthodologie utilisée (Stevens & Pfeiffer, 2011). Cependant, le modèle peut être facilement mis à jour en fonction

de la disponibilité de nouvelles données sur les facteurs de risques et de l'amélioration de nos connaissances sur l'épidémiologie des VIA dans la région.

Cette méthode de cartographie du risque peut être particulièrement intéressante pour les services vétérinaires en Afrique de l'Ouest. En effet, elle pourra contribuer à l'élaboration de stratégies de surveillance basées sur le risque, l'allocation efficace des ressources et la mise en place de mesures de sensibilisation et de biosécurité pour prévenir l'apparition des VIA.

### **Limites et difficultés rencontrées**

Les études menées dans le cadre de cette thèse ont certaines limites qui pourront être adressées par les futures activités de recherche sur les virus influenza en Afrique de l'Ouest.

Dans la première étude 1, nous nous sommes limités à la caractérisation génétique et antigénique des virus H5N1 clade 2.3.4.4.B du Bénin alors que des foyers d'IHAP étaient signalés dans la plupart des pays d'Afrique de l'Ouest. Ainsi, cela ne nous permet pas d'avoir une vision d'ensemble sur la diversité génétique des virus H5N1 qui ont circulé dans la région entre 2021 et 2022. Cependant, les séquences commencent à être disponibles pour certains pays, ainsi des études phylogénétiques prenant en compte ces nouvelles données permettront très certainement d'améliorer nos connaissances sur les caractéristiques de ces virus.

Dans la seconde étude, la caractérisation des virus H9N2 du Mali a été faite à partir d'acides nucléiques présents sur des cartes FTA, de ce fait, la culture et l'isolement de ces virus n'ont donc pas pu être réalisés. En effet, nous avons eu des difficultés à envoyer nos échantillons en France à cause des restrictions liées au transport de matériels infectieux. Avec les cartes FTA, il nous était possible de conserver les échantillons à température ambiante et de nous affranchir de la contrainte de maintien de la chaîne de froid sur le terrain et des problèmes de transport des échantillons. Une autre limite de cette étude est le nombre de marchés à volailles échantillonnés au Mali. Nous n'avons prélevé nos échantillons que dans une dizaine de marchés sur plus de 200. Ainsi, il n'était pas possible

de calculer la prévalence des virus H9N2 chez les volailles et les dynamiques de transmission de ces virus entre les marchés à l'échelle nationale. Donc, de futures études pourront prendre en compte ces aspects en travaillant sur un nombre plus important d'échantillons et en réalisant une analyses des réseaux des marchés à volailles.

Enfin, dans la troisième étude, la principale limite de notre modèle est sa non-validation par des méthodes quantitatives. En effet, au début de ce projet, il était prévu de valider les cartes de risque élaborées en faisant des prélèvements d'échantillons chez les volailles à la fois dans les zones identifiées comme à risque élevé et à risque faible d'apparitions des foyers d'influenza aviaire. Cependant, nous n'avons pas pu réaliser cette activité à cause du contexte sécuritaire dégradé dans plusieurs régions du Mali dans lesquelles il était déconseillé de se rendre. Par ailleurs, pour diminuer la subjectivité dans la pondération des facteurs de risque utilisés dans le modèle, d'autres méthodes de pondération pourront être utilisées comme l'odds ratio calculé à travers une revue systématique de la littérature ciblant l'Afrique de l'Ouest associée à une méta-analyse.

## V. Conclusions et perspectives

Ces dernières années, plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest ont connu des foyers causés par les VIA. Ces virus constituent un défi important en matière de santé humaine et animale pour la région, nécessitant la mise en place de modalités de surveillance efficaces malgré des ressources limitées.

Les travaux qui ont été menés dans le cadre de cette thèse ont permis d'améliorer nos connaissances sur la circulation et les caractéristiques génétiques de ces virus au Mali et en Afrique de l'Ouest. Les caractéristiques génétiques et antigéniques du virus H5N1 2.3.4.4b au Bénin en provenance du Nigéria ont été déterminées. Nous avons établi qu'il y a une forte circulation du virus H9N2 dans les marchés à volailles au Mali et que ce virus possédait plusieurs mutations augmentant son potentiel zoonotique et sa virulence.

Un modèle de cartographie du risque a également été mis en œuvre qui pourra être utilisé par les services vétérinaires de la région afin d'identifier les zones à risque d'apparition des VIA dans le cadre de la surveillance basée sur le risque. Ces connaissances contribueront à l'optimisation des futurs programmes de surveillance des virus influenza aviaires en Afrique de l'Ouest. Il serait intéressant de présenter ce travail à la Direction des Services Vétérinaires du Mali pour discuter des possibilités de mise en place d'une surveillance basée sur le risque et à l'initiative malienne sans attendre la disponibilité des fonds étrangers.

En termes de perspectives, il serait intéressant d'étudier les propriétés biologiques du motif RSNR observé au niveau du site de clivage des virus H9N2 du Mali et de vérifier s'il a un lien avec le spectre d'hôte et la virulence de ces virus. Une étude pourra également se focaliser sur la mutation 113V identifiée sur la protéine PB1 des virus H5N1 du Bénin qui est associée à une adaptation de ces virus aux cellules de mammifères.

Aussi, les oiseaux sauvages étant considérés comme les principaux réservoirs des VIA, ils devront être inclus dans les prochaines études épidémiologiques sur les VIA afin d'élucider les mécanismes d'introduction de ces virus dans les populations de volailles domestiques en Afrique de l'Ouest.

Les séquences de génomes commencent à être disponibles pour plusieurs pays d'Afrique. Ainsi, des études phylogénétiques et phylogéographiques à large échelle pourront être également mise en œuvre avec ces nouvelles informations et en se basant sur les données issues de cette thèse.

Le modèle de cartographie présenté dans ce travail offre plusieurs perspectives. Le modèle pourra être appliqué à d'autres pays de la région pour lesquelles certaines données sur les facteurs de risques liés aux VIA sont disponibles comme le Bénin, le Togo ou le Nigéria voir plus globalement à toutes l'Afrique de l'Ouest. Il est également possible d'utiliser ce modèle pour d'autres maladies aviaires impactant la région comme la maladie de Newcastle.

## VI. Références bibliographiques

- Abdel-Ghafar, A.-N., Chotpitayasunondh, T., Gao, Z., Hayden, F. G., Hien, D., De Jong, M. D., Naghdaliyev, A., Peiris, J. S. M., Shindo, N., Soeroso, S., & Uyeki, T. M. (2008). Update on Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Humans. *New England Journal of Medicine*, 358(3), 261–273.
- AbuBakar, U., Amrani, L., Kamarulzaman, F. A., Karsani, S. A., Hassandarvish, P., & Khairat, J. E. (2023). Avian Influenza Virus Tropism in Humans. *Viruses* 2023, Vol. 15, Page 833, 15(4), 833.
- Adlhoch, C., Gossner, C., Koch, G., Brown, I., Bouwstra, R., Verdonck, F., Penttinen, P., & Harder, T. (2014). Comparing introduction to Europe of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8) in 2014 and A(H5N1) in 2005. *Eurosurveillance*, 19(50), 20996.
- Arai, Y., Ibrahim, M. S., Elgendy, E. M., Daidoji, T., Ono, T., Suzuki, Y., Nakaya, T., Matsumoto, K., & Watanabe, Y. (2019). Genetic Compatibility of Reassortants between Avian H5N1 and H9N2 Influenza Viruses with Higher Pathogenicity in Mammals. *Journal of Virology*, 93(4).
- Awuni, J. A., Bianco, A., Dogbey, O. J., Fusaro, A., Yingar, D. T., Salviato, A., Ababio, P. T., Milani, A., Bonfante, F., & Monne, I. (2019). Avian influenza H9N2 subtype in Ghana: virus characterization and evidence of co-infection. *Avian Pathology*, 48(5), 470–476.
- Aymard, M., Douglas, A. R., Fontaine, M., Gourreau, J. M., Kaiser, C., Million, J., & Skehel, J. J. (1985). Antigenic characterization of influenza A (H1N1) viruses recently isolated from pigs and turkeys in France. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(3), 537. /pmc/articles/PMC2536417/?report=abstract
- Bailey, E. S., Choi, J. Y., Fieldhouse, J. K., Borkenhagen, L. K., Zemke, J., Zhang, D., & Gray, G. C. (2018). The continual threat of influenza virus infections at the

- human-animal interface: What is new from a one health perspective? *Evolution, Medicine and Public Health*, 2018(1), 192–198.
- Beigel, J. H., de Jong, D., Thi Kim Tien, N., Institute, P., Chi Minh City, H., Tran Hien, N., Tinh Hien, T., Penh, P., & Yuen, K.-Y. (2005). Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *https://doi.org/10.1056/NEJMra052211*, 353(13), 1374–1385.
- Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W. H., & Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research*, 124(1–2), 12–21.
- Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). THE BIOLOGY OF INFLUENZA VIRUSES. *Vaccine*, 26(Suppl 4), D49.
- Cameron, A., Njeum, F., Chibeu, D., & Martin, T. (2014). Risk-based disease surveillance – A manual for veterinarians on the design and analysis of surveillance for demonstration of freedom from disease. In *FAO Animal Production and Health Manual*. <http://www.fao.org/3/a-i4205e/i4205e.pdf>
- Cappelle, J., Girard, O., Fofana, B., Gaidet, N., & Gilbert, M. (2010). Ecological modeling of the spatial distribution of wild waterbirds to identify the main areas where avian influenza viruses are circulating in the Inner Niger Delta, Mali. *EcoHealth*, 7(3), 283–293.
- Cappelle, J., Servan de Almeida, R., Fofana, B., Dakouo, M., Balança, G., Gil, P., Albina, E., & Gaidet, N. (2012). Circulation of avian influenza viruses in wild birds in Inner Niger Delta, Mali. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(4), 240–244.
- Capua, I., & Alexander, D. J. (2009a). Avian influenza and newcastle disease: A field and laboratory manual. *Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual*, 1–186.
- Capua, I., & Alexander, D. J. (2009b). Ecology, epidemiology and human health

- implications of avian influenza virus infections. *Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual*, 1–18.
- Capua, I., & Terregino, C. (2009). Clinical traits and pathology of avian influenza infections, guidelines for farm visit and differential diagnosis. *Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual*, 45–71.
- Cattoli, G., Monne, I., Fusaro, A., Joannis, T. M., Lombin, L. H., Aly, M. M., Arafa, A. S., Sturm-Ramirez, K. M., Couacy-Hymann, E., Awuni, J. A., Batawui, K. B., Awoume, K. A., Aplogan, G. L., Sow, A., Ngangnou, A. C., El Nasri Hamza, I. M., Gamatié, D., Dauphin, G., Domenech, J. M., & Capua, I. (2009). Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N1 in Africa: A Comprehensive Phylogenetic Analysis and Molecular Characterization of Isolates. *PLOS ONE*, 4(3), e4842.
- Chan, P. K. S. (2002). Outbreak of Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in Hong Kong in 1997. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Supplement\_2), S58–S64.
- Chen, G. W., Chang, S. C., Mok, C. K., Lo, Y. L., Kung, Y. N., Huang, J. H., Shih, Y. H., Wang, J. Y., Chiang, C., Chen, C. J., & Shih, S. R. (2006). Genomic Signatures of Human versus Avian Influenza A Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 12(9), 1353.
- Chen, L. M., Blixt, O., Stevens, J., Lipatov, A. S., Davis, C. T., Collins, B. E., Cox, N. J., Paulson, J. C., & Donis, R. O. (2012). In vitro evolution of H5N1 avian influenza virus toward human-type receptor specificity. *Virology*, 422(1), 105–113.
- Chen, L., Wang, C., Luo, J., Li, M., Liu, H., Zhao, N., Huang, J., Zhu, X., Ma, G., Yuan, G., & He, H. (2017). Amino acid substitution K470R in the nucleoprotein increases the virulence of H5N1 influenza A virus in mammals. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1308.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill,

- R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine* 2001 7:12, 7(12), 1306–1312.
- Chenavas, S., Cre ´pin, T., Delmas, B., Ruigrok, R. W. H., & Slama-Schwok, A. (2013). Influenza virus nucleoprotein: structure, RNA binding, oligomerization and antiviral drug target. [Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb.13.128](http://dx.doi.org/10.2217/Fmb.13.128), 8(12), 1537–1545.
- Cheng, K., Yu, Z., Chai, H., Sun, W., Xin, Y., Zhang, Q., Huang, J., Zhang, K., Li, X., Yang, S., Wang, T., Zheng, X., Wang, H., Qin, C., Qian, J., Chen, H., Hua, Y., Gao, Y., & Xia, X. (2014). PB2-E627K and PA-T97I substitutions enhance polymerase activity and confer a virulent phenotype to an H6N1 avian influenza virus in mice. *Virology*, 468–470, 207–213.
- Cheung, T. K. W., & Poon, L. L. M. (2007). Biology of Influenza A Virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1102(1), 1–25.
- Chrzastek, K., Lee, D. hun, Gharaibeh, S., Zsak, A., & Kapczynski, D. R. (2018). Characterization of H9N2 avian influenza viruses from the Middle East demonstrates heterogeneity at amino acid position 226 in the hemagglutinin and potential for transmission to mammals. *Virology*, 518, 195–201.
- Chutinimitkul, S., van Riel, D., Munster, V. J., van den Brand, J. M. A., Rimmelzwaan, G. F., Kuiken, T., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., & de Wit, E. (2010). In Vitro Assessment of Attachment Pattern and Replication Efficiency of H5N1 Influenza A Viruses with Altered Receptor Specificity . *Journal of Virology*, 84(13), 6825–6833.
- Ciminski, K., Chase, G. P., Beer, M., & Schwemmle, M. (2021). Influenza A Viruses: Understanding Human Host Determinants. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 27, Issue 2, pp. 104–112). Elsevier Current Trends.
- Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G., & Paulson, J. C. (1994). Receptor

- Specificity in Human, Avian, and Equine H2 and H3 Influenza Virus Isolates. *Virology*, 205(1), 17–23.
- Couacy-Hymann, E., Kouakou, V. A., Aplogan, G. L., Awoume, F., Kouakou, C. K., Kakpo, L., Sharp, B. R., McClenaghan, L., McKenzie, P., Webster, R. G., Webby, R. J., & Ducatez, M. F. (2012). Surveillance for influenza viruses in poultry and swine, West Africa, 2006-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9), 1446–1452.
- Cox, N. J., Trock, S. C., & Uyeki, T. M. (2016). Public health implications of animal influenza viruses. In *Animal Influenza* (pp. 92–132). John Wiley & Sons, Ltd.
- Crossley, B. M., Rejmanek, D., Baroch, J., Stanton, J. B., Young, K. T., Killian, M. L., Torchetti, M. K., & Hietala, S. K. (2021). Nanopore sequencing as a rapid tool for identification and pathotyping of avian influenza A viruses. <https://doi.org/10.1177/1040638720984114>, 33(2), 253–260.
- Deshpande, K. L., Fried, V. A., Ando, M., & Webster, R. G. (1987). Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(1), 36–40.
- Donis, R. O., Smith, G. J. D., Perdue, M. L., Brown, I. H., Chen, H., Fouchier, R. A. M., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., Shu, Y., Capua, I., Cox, N., Davis, T., Garten, R., Smith, C., Guan, Y., Vijaykrishna, D., Mumford, E., Russell, C. A., & Smith, D. (2008). Toward a Unified Nomenclature System for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) - Volume 14, Number 7—July 2008 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7).
- Ducatez, M. F., Olinger, C. M., Owoade, A. A., De Landtsheer, S., Ammerlaan, W., Niesters, H. G. M., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., & Muller, C. P. (2006). Multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature* 2006 442:7098, 442(7098), 37–37.
- Ducatez, M. F., Olinger, C. M., Owoade, A. A., Tarnagda, Z., Tahita, M. C., Sow, A.,

- De Landtsheer, S., Ammerlaan, W., Ouedraogo, J. B., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., & Muller, C. P. (2007). Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa. *Journal of General Virology*, 88(8), 2297–2306.
- El-Zoghby, E. F., Arafa, A. S., Hassan, M. K., Aly, M. M., Selim, A., Kilany, W. H., Selim, U., Nasef, S., Aggor, M. G., Abdelwhab, E. M., & Hafez, H. M. (2012). Isolation of H9N2 avian influenza virus from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) in Egypt. *Archives of Virology*, 157(6), 1167–1172.
- El Houadfi, M., Fellahi, S., Nassik, S., Guérin, J. L., & Ducatez, M. F. (2016). First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco. *Virology Journal*, 13(1), 1–7.
- El Mellouli, F., Mouahid, M., Fusaro, A., Zecchin, B., Zekhnini, H., El Khantour, A., Giussani, E., Palumbo, E., Idrissi, H. R., Monne, I., & Benhoussa, A. (2022). Spatiotemporal Dynamics, Evolutionary History and Zoonotic Potential of Moroccan H9N2 Avian Influenza Viruses from 2016 to 2021. *Viruses*, 14(3), 509.
- Elgendy, E. M., Arai, Y., Kawashita, N., Daidoji, T., Takagi, T., Ibrahim, M. S., Nakaya, T., & Watanabe, Y. (2017). Identification of polymerase gene mutations that affect viral replication in H5N1 influenza viruses isolated from pigeons. *Journal of General Virology*, 98(1), 6–17.
- Ellis, T. M., Bousfield, R. B., Bissett, L. A., Dyrting, K. C., Luk, G. S. M., Tsim, S. T., Sturm-Ramirez, K., Webster, R. G., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2010). Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/03079450400003601](http://dx.doi.org/10.1080/03079450400003601), 33(5), 492–505.
- Ellis, T. M., Leung, C. Y. H. C., Chow, M. K. W., Bissett, L. A., Wong, W., Guan, Y., & Peiris, J. S. M. (2004). Vaccination of chickens against H5N1 avian influenza in the face of an outbreak interrupts virus transmission. *Avian Pathology: Journal of*

*the W.V.P.A*, 33(4), 405–412.

Engelhardt, O. G., & Fodor, E. (2006). Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Reviews in Medical Virology*, 16(5), 329–345.

Fan, S., Deng, G., Song, J., Tian, G., Suo, Y., Jiang, Y., Guan, Y., Bu, Z., Kawaoka, Y., & Chen, H. (2009). Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. *Virology*, 384(1), 28–32.

FAO. (1999). *Manual on Livestock Disease Surveillance and Information Systems (FAO Animal Health Manual)*.

FAO. (2022). *Sub-Saharan Africa HPAI situation update FAO Animal Health Service / EMPRES (Vol. 11, Issue September)*.

FAO. (2023). Global AIV with Zoonotic Potential situation update. In *Rome*.  
<https://www.gov.uk/government/news/avian-flu-detected-in-2-individuals-taking-part-in-testing-programme>

Fasanmi, O. G., Odetokun, I. A., Balogun, F. A., & Fasina, F. O. (2017). Public health concerns of highly pathogenic avian influenza H5N1 endemicity in Africa. *Veterinary World*, 10(10), 1194.

Fasina, F. O., Bisschop, S. P. R., Joannis, T. M., Lombin, L. H., & Abolnik, C. (2009). Molecular characterization and epidemiology of the highly pathogenic avian influenza H5N1 in Nigeria. *Epidemiology and Infection*, 137(4), 456–463.

Ficken, M. D., Guy, J. S., & Gonder, E. (1989). An outbreak of influenza (H1N1) in turkey breeder hens. *Avian Diseases*, 33(2), 370–374.

Fouchier, R. A. M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B., & Osterhaus, A. D. M. E. (2005). Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16)

Obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology*, 79(5), 2814–2822.

Fuller, T. L., Ducatez, M. F., Njabo, K. Y., Couacy-Hymann, E., Chasar, A., Aplogan, G. L., Lao, S., Awoume, F., Téhou, A., Langeois, Q., Krauss, S., & Smith, T. B. (2015). Avian influenza surveillance in Central and West Africa, 2010–2014. *Epidemiology and Infection*, 143(10), 2205–2212.

Fusade-Boyer, M., Djegui, F., Batawui, K., Byuragaba, D. K., Jones, J. C., Wabwire-Mangeni, F., Erima, B., Atim, G., Ukuli, Q. A., Tugume, T., Dogno, K., Adjabli, K., Nzuzi, M., Adjin, R., Jeevan, T., Rubrum, A., Go-Maró, W., Kayali, G., McKenzie, P., ... Ducatez, M. F. (2021). Antigenic and molecular characterization of low pathogenic avian influenza A(H9N2) viruses in sub-Saharan Africa from 2017 through 2019. *Emerging Microbes and Infections*, 10(1), 753–761.

Fusaro, A., Nelson, M. I., Joannis, T., Bertolotti, L., Monne, I., Salviato, A., Olaleye, O., Shittu, I., Sulaiman, L., Lombin, L. H., Capua, I., Holmes, E. C., & Cattoli, G. (2010). Evolutionary Dynamics of Multiple Sublineages of H5N1 Influenza Viruses in Nigeria from 2006 to 2008. *Journal of Virology*, 84(7), 3239–3247.

Fusaro, A., Zecchin, B., Vrancken, B., Abolnik, C., Ademun, A. R., Akpeli, Y. P., Alassane, A., Awuni, J. A., Couacy-Hymann, E., Coulibaly, M., Go-Maró, E., Joannis, T., Jumbo, S. D., Minoungou, G., Meseko, C., Moutari, S. M., Ndumu, D. B., Twabela, A., Wade, A., ... Monne, I. (2019). Global origins of African highly pathogenic avian influenza H5Nx viruses and intracontinental spread. *International Journal of Infectious Diseases*, 79, 9–10.

Fusaro, A., Zecchin, B., Vrancken, B., Abolnik, C., Ademun, R., Alassane, A., Arafa, A., Awuni, J. A., Couacy-Hymann, E., Coulibaly, M. ' . B., Gaidet, N., Go-Maró, E., Joannis, T., Jumbo, S. D., Minoungou, G., Meseko, C., Souley, M. M., Ndumu, D. B., Shittu, I., ... Monne, I. (2019). Disentangling the role of Africa in the global spread of H5 highly pathogenic avian influenza. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–13.

- Gaidet, N., Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G. S., Balança, G., Hammoumi, S., Cattoli, G., Abolnik, C., de Servan Almeida, R., Gil, P., Fereidouni, S. R., Grosbois, V., Tran, A., Mundava, J., Fofana, B., Ould El Mamy, A. B., Ndlovu, M., Mondain-Monval, J. Y., Triplet, P., ... Dodman, T. (2012). Understanding the ecological drivers of avian influenza virus infection in wildfowl: a continental-scale study across Africa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1731), 1131–1141.
- Gao, R., Cao, B., Hu, Y., Feng, Z., Wang, D., Hu, W., Chen, J., Jie, Z., Qiu, H., Xu, K., Xu, X., Lu, H., Zhu, W., Gao, Z., Xiang, N., Shen, Y., He, Z., Gu, Y., Zhang, Z., ... Hu, W. (2013). Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304459>, 368(20), 1888–1897.
- Gao, Y., Zhang, Y., Shinya, K., Deng, G., Jiang, Y., Li, Z., Guan, Y., Tian, G., Li, Y., Shi, J., Liu, L., Zeng, X., Bu, Z., Xia, N., Kawaoka, Y., & Chen, H. (2009). Identification of Amino Acids in HA and PB2 Critical for the Transmission of H5N1 Avian Influenza Viruses in a Mammalian Host. *PLOS Pathogens*, 5(12), e1000709.
- Garten, R. J., Davis, C. T., Russell, C. A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A., Sessions, W. M., Xu, X., Skepner, E., Deyde, V., Okomo-Adhiambo, M., Gubareva, L., Barnes, J., Smith, C. B., Emery, S. L., Hillman, M. J., Rivaller, P., Smagala, J., De Graaf, M., ... Cox, N. J. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 325(5937), 197–201.
- Ghendon, Y. (1994). Introduction to pandemic influenza through history. *European Journal of Epidemiology*, 10(4), 451–453.
- Grace, D., Songe, M., & Knight-jones, T. (2015). Impact des maladies négligées sur la productivité animale et la santé publique en Afrique. 2015 – Afrique – Commission Régionale OIE, 00100, 1–33. [www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/](http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/)

- Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., Sagulenko, P., Bedford, T., & Neher, R. A. (2018). Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, 34(23), 4121–4123.
- Hasan, N. H., Ignjatovic, J., Peaston, A., & Hemmatzadeh, F. (2016). Avian influenza virus and DIVA strategies. In *Viral Immunology* (Vol. 29, Issue 4, pp. 198–211). Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA.
- Hassan, N., Kaoutar, M., Sara, G., & Mustapha, M. (2017). Focus on Poultry in Morocco. *Advances in Environmental Biology*, 11(10), 1–9.  
<https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=19950756&v=2.1&it=r&id=G ALE%7CA518588590&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
- Hause, B. M., Ducatez, M., Collin, E. A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A. D., Webby, R. J., Simonson, R. R., & Li, F. (2013). Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses. *PLoS Pathogens*, 9(2).
- Herrera-Ong, L. R. (2023). Strategic construction of mRNA vaccine derived from conserved and experimentally validated epitopes of avian influenza type A virus: a reverse vaccinology approach. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 12(2), 156.
- Hinshaw, V. S., Air, G. M., Gibbs, A. J., Graves, L., Prescott, B., & Karunakaran, D. (1982). Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. *Journal of Virology*, 42(3), 865–872.
- Hoang, H. T. T., Nguyen, C. H., Nguyen, N. T. T., Pham, A. D., Nguyen, H. T. T., Le, T. H., Tran, H. X., Chu, H. H., & Nguyen, N. T. (2020). Immunization with the H5N1 Recombinant Vaccine Candidate Induces High Protection in Chickens against Vietnamese Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains. *Vaccines* 2020, Vol. 8, Page 159, 8(2), 159.

- Homme, P. J., & Easterday, B. C. (1970). Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus. *Avian Diseases*, 14(1), 66–74.
- Hulse-Post, D. J., Franks, J., Boyd, K., Salomon, R., Hoffmann, E., Yen, H. L., Webby, R. J., Walker, D., Nguyen, T. D., & Webster, R. G. (2007). Molecular Changes in the Polymerase Genes (PA and PB1) Associated with High Pathogenicity of H5N1 Influenza Virus in Mallard Ducks. *Journal of Virology*, 81(16), 8515.
- Ito, T., & Kawaoka, Y. (2000). Host-range barrier of influenza A viruses. *Veterinary Microbiology*, 74(1–2), 71–75.
- Iwani, S., Suzuki, T., & Takeuchi, Y. (2009). Paradox of vaccination: is vaccination really effective against avian flu epidemics? *PloS One*, 4(3).
- Jallow, M. M., Fall, A., Barry, M. A., Diop, B., Sy, S., Goudiaby, D., Fall, M., Enouf, V., Niang, M. N., & Dia, N. (2020). Genetic characterization of the first detected human case of low pathogenic avian influenza A/H9N2 in sub-Saharan Africa, Senegal. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 1092–1095.
- Jeevan, T., Darnell, D., Gradi, E. A., Benali, Y., Kara, R., Guetarni, D., Rubrum, A., Seiler, P. J., Crumpton, J. C., Webby, R. J., & Derrar, F. (2019). A(H9N2) influenza viruses associated with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 13(6), 622–626.
- Jiao, P., Tian, G., Li, Y., Deng, G., Jiang, Y., Liu, C., Liu, W., Bu, Z., Kawaoka, Y., & Chen, H. (2008). A Single-Amino-Acid Substitution in the NS1 Protein Changes the Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. *Journal of Virology*, 82(3), 1146–1154.
- Joannis, T., Lombin, L. H., De Benedictis, P., Cattoli, G., & Capua, I. (2006). Confirmation of H5N1 avian influenza in Africa [3]. In *Veterinary Record* (Vol. 158, Issue 9, pp. 309–310).

- Joseph, U., Su, Y. C. F., Vijaykrishna, D., & Smith, G. J. D. (2017). The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 11(1), 74–84.
- Kalonda, A., Saasa, N., Nkhoma, P., Kajihara, M., Sawa, H., Takada, A., & Simulundu, E. (2020). Avian Influenza Viruses Detected in Birds in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. *Viruses* 2020, Vol. 12, Page 993, 12(9), 993.
- Kamiki, H., Matsugo, H., Kobayashi, T., Ishida, H., Takenaka-Uema, A., Murakami, S., & Horimoto, T. (2018). A PB1-K577E Mutation in H9N2 Influenza Virus Increases Polymerase Activity and Pathogenicity in Mice. *Viruses* 2018, Vol. 10, Page 653, 10(11), 653.
- Kapczynski, D. R., Sylte, M. J., Killian, M. L., Torchetti, M. K., Chrzastek, K., & Suarez, D. L. (2017). Protection of commercial turkeys following inactivated or recombinant H5 vaccine application against the 2015 U.S. H5N2 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191, 74–79.
- Kim, H., Webster, R. G., & Webby, R. J. (2018). Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunology*, 31(2), 174–183.
- Klenk, H. D., & Rott, R. (1988). The Molecular Biology of Influenza Virus Pathogenicity. *Advances in Virus Research*, 34(C), 247–281.
- Kleyheeg, E., Slaterus, R., Bodewes, R., Rijks, J. M., Spierenburg, M. A. H., Beerens, N., Kelder, L., Poen, M. J., Stegeman, J. A., Fouchier, R. A. M., Kuiken, T., & van der Jeugd, H. P. (2017). Deaths among Wild Birds during Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Outbreak, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2050.
- Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A.

- (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1, 4(1), 1–21.
- Laleye, A., Joannis, T., Shittu, I., Meseko, C., Zamperin, G., Milani, A., Zecchin, B., Fusaro, A., Monne, I., & Abolnik, C. (2018). A two-year monitoring period of the genetic properties of clade 2.3.2.1c H5N1 viruses in Nigeria reveals the emergence and co-circulation of distinct genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 98–105.
- Laleye, A. T., Bianco, A., Shittu, I., Sulaiman, L., Fusaro, A., Inuwa, B., Oyetunde, J., Zecchin, B., Bakam, J., Pastori, A., Olawuyi, K., Schivo, A., Meseko, C., Vakuru, C., Fortin, A., Monne, I., & Joannis, T. (2022). Genetic characterization of highly pathogenic avian Influenza H5Nx clade 2.3.4.4b reveals independent introductions in Nigeria. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 423–433.
- Lamb, R. A., & Choppin, P. W. (1983). The gene structure and replication of influenza virus. In *Annual review of biochemistry* (Vol. 52, pp. 467–506). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Lee, C.-W., & Suarez, D. L. (2005). Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. *Animal Health Research Reviews*, 6(1), 1–15.
- Lee, D. H., Bertran, K., Kwon, J. H., & Swayne, D. E. (2017). Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *Journal of Veterinary Science*, 18(S1), 269–280.
- Leigh Perkins, L. E., & Swayne, D. E. (2002). Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Diseases*, 46(1), 53–63.
- Li, X., Shi, J., Guo, J., Deng, G., Zhang, Q., Wang, J., He, X., Wang, K., Chen, J., Li, Y., Fan, J., Kong, H., Gu, C., Guan, Y., Suzuki, Y., Kawaoka, Y., Liu, L., Jiang, Y., Tian, G., ... Chen, H. (2014). Genetics, Receptor Binding Property, and Transmissibility in Mammals of Naturally Isolated H9N2 Avian Influenza

- Viruses. *PLOS Pathogens*, 10(11), e1004508.
- Li, Z., Chen, H., Jiao, P., Deng, G., Tian, G., Li, Y., Hoffmann, E., Webster, R. G., Matsuoka, Y., & Yu, K. (2005). Molecular Basis of Replication of Duck H5N1 Influenza Viruses in a Mammalian Mouse Model. *Journal of Virology*, 79(18), 12058–12064.
- Lina, B. (2008). History of influenza pandemics. *Paleomicrobiology: Past Human Infections*, 199–211.
- Lindstrom, S. E., Cox, N. J., & Klimov, A. (2004). Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957–1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. *Virology*, 328(1), 101–119.
- Liu, Q., Mena, I., Ma, J., Bawa, B., Krammer, F., Lyoo, Y. S., Lang, Y., Morozov, I., Mahardika, G. N., Ma, W., García-Sastre, A., & Richt, J. A. (2015). Newcastle Disease Virus-Vectored H7 and H5 Live Vaccines Protect Chickens from Challenge with H7N9 or H5N1 Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology*, 89(14), 7401–7408.
- Liu, R., Sheng, Z., Huang, C., Wang, D., & Li, F. (2020). Influenza D virus. *Current Opinion in Virology*, 44, 154–161.
- Lo, F. T., Zecchin, B., Diallo, A. A., Ba, R. O., Tassoni, L., Diop, A., Diouf, M., Diouf, M., Samb, Y. N., Pastori, A., Gobbo, F., Ellero, F., Diop, M., Lo, M. M., Diouf, M. N., Fall, M., Ndiaye, A. A., Gaye, A. M., Badiane, M., ... Monne, I. (2022). Intercontinental Spread of Eurasian Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) to Senegal. *Emerging Infectious Diseases*, 28(1), 234.
- Londt, B. Z., Banks, J., & Alexander, D. J. (2010). Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in in vivo tests. <https://doi.org/10.1080/03079450701589134>, 36(5), 347–350.
- Long, J. S., Mistry, B., Haslam, S. M., & Barclay, W. S. (2018). Host and viral

- determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology* 2018 17:2, 17(2), 67–81.
- Lupiani, B., & Reddy, S. M. (2009). The history of avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(4), 311–323.
- Manuguerra, J. C., & Hannoun, C. (1992). Natural infection of dogs by influenza C virus. *Research in Virology*, 143(C), 199–204.
- McCauley, J. W., & Mahy, B. W. J. (1983). Structure and function of the influenza virus genome. *Biochemical Journal*, 211(2), 281.
- Molia, S., Boly, I. A., Duboz, R., Coulibaly, B., Guitian, J., Grosbois, V., Fournié, G., & Pfeiffer, D. U. (2016). Live bird markets characterization and trading network analysis in Mali: Implications for the surveillance and control of avian influenza and Newcastle disease. *Acta Tropica*, 155, 77–88.
- Molia, S., Traoré, A., Gil, P., Hammoumi, S., Lesceu, S., de Almeida, R. S., Albina, E., & Chevalier, V. (2010). Avian influenza in backyard poultry of the Mopti region, Mali. *Tropical Animal Health and Production*, 42(5), 807–809.
- Mostafa, A., Abdelwhab, E. M., Mettenleiter, T. C., & Pleschka, S. (2018). Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses* 2018, Vol. 10, Page 497, 10(9), 497.
- Mounts, A. W., Kwong, H., Izurieta, H. S., Ho, Y. Y., Au, T. K., Lee, M., Bridges, C. B., Williams, S. W., Mak, K. H., Katz, J. M., Thompson, W. W., Cox, N. J., & Fukuda, K. (1999). Case-Control Study of Risk Factors for Avian Influenza A (H5N1) Disease, Hong Kong, 1997. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(2), 505–508.
- Naguib, M. M., Verhagen, J. H., Samy, A., Eriksson, P., Fife, M., Lundkvist, Å., Ellström, P., & Järhult, J. D. (2019). Avian influenza viruses at the wild–domestic bird interface in Egypt. <https://doi.org/10.1080/20008686.2019.1575687>, 9(1).
- Nagy, A., Mettenleiter, T. C., & Abdelwhab, E. M. (2017). A brief summary of the

- epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. *Epidemiology & Infection*, 145(16), 3320–3333.
- Nations Online. (2020). *Political Map of West Africa*.  
<https://www.nationsonline.org/oneworld/map/west-africa-map.htm>
- Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H., & Barman, S. (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*, 143(2), 147–161.
- Nili, H., & Asasi, K. (2003). Avian Influenza (H9N2) Outbreak in Iran. *Avian Diseases*, 47(s3), 828–831.
- OIE. (2022a). *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*.  
<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/codes-et-manuels/acces-en-ligne-au-manuel-terrestre/>
- OIE. (2022b). *Terrestrial Code Online Access - WOAHA - World Organisation for Animal Health*. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/>
- Osterhaus, A. D. M. E., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E. E., Bestebroer, T. M., & Fouchier, R. A. M. (2000). Influenza B virus in seals. *Science*, 288(5468), 1051–1053.
- Ouoba, L. B., Habibata-Zerbo, L., Zecchin, B., Barbierato, G., Hamidou-Ouandaogo, S., Palumbo, E., Giussani, E., Bortolami, A., Niang, M., Traore-Kam, A., Terregino, C., Guitti-Kindo, M., Angot, A., Guigma, D., Barro, N., Fusaro, A., & Monne, I. (2022). Emergence of a Reassortant 2.3.4.4b Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus Containing H9N2 PA Gene in Burkina Faso, West Africa, in 2021. *Viruses*, 14(9), 1901.
- Palese, P. (1977). The genes of influenza virus. *Cell*, 10(1), 1–10.
- Pavade, G., Vintzel, L. W., Hamilton, K., & Dehove, A. (2011). *OFFLU review of avian*

*influenza surveillance and epidemiological projects in some European , African , and Asian countries.*

- Peacock, T. P., James, J., Sealy, J. E., & Iqbal, M. (2019). A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus. *Viruses* 2019, Vol. 11, Page 620, 11(7), 620.
- Pedroni, E., Muñoz, X., Sotomayor, V., Muñoz, J. C., Arenas, M., Fasce, R., & Olea, A. (2012). [Outbreak of human A (H1N1) influenza in turkeys of a commercial poultry farm, Valparaiso, Chile: August 2009]. *Revista Chilena de Infectología : Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 29(4), 420–426.
- Peiris, J. S. M., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R. G., & Shortridge, K. F. (2001). Cocirculation of Avian H9N2 and Contemporary “Human” H3N2 Influenza A Viruses in Pigs in Southeastern China: Potential for Genetic Reassortment? *Journal of Virology*, 75(20), 9679–9686.
- Peng, W., Bouwman, K. M., McBride, R., Grant, O. C., Woods, R. J., Verheije, M. H., Paulson, J. C., & de Vries, R. P. (2018). Enhanced Human-Type Receptor Binding by Ferret-Transmissible H5N1 with a K193T Mutation. *Journal of Virology*, 92(10).
- Perez, D. R., & Wit, J. J. (Sjaak) de. (2016). Low-pathogenicity avian influenza. *Animal Influenza*, 271–301.
- Petrini, A., & Vallat, B. (2009). Notification of avian influenza and newcastle disease to the world organisation for animal health (OIE). *Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual*, 27–30.
- Pusch, E. A., & Suarez, D. L. (2018). The multifaceted zoonotic risk of H9N2 avian influenza. In *Veterinary Sciences* (Vol. 5, Issue 4, p. 82). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Pybus, O. G., Rambaut, A., Belshaw, R., Freckleton, R. P., Drummond, A. J., & Holmes, E. C. (2007). Phylogenetic Evidence for Deleterious Mutation Load in RNA Viruses and Its Contribution to Viral Evolution. *Molecular Biology and*

*Evolution*, 24(3), 845–852.

- Ran, Z., Shen, H., Lang, Y., Kolb, E. A., Turan, N., Zhu, L., Ma, J., Bawa, B., Liu, Q., Liu, H., Quast, M., Sexton, G., Krammer, F., Hause, B. M., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Richt, J., Li, F., & Ma, W. (2015). Domestic Pigs Are Susceptible to Infection with Influenza B Viruses. *Journal of Virology*, 89(9), 4818–4826.
- Röhm, C., Zhou, N., Süß, J., Mackenzie, J., & Webster, R. G. (1996). Characterization of a Novel Influenza Hemagglutinin, H15: Criteria for Determination of Influenza A Subtypes. *Virology*, 217(2), 508–516.
- Romero-Tejeda, A., & Capua, I. (2013). Virus-specific factors associated with zoonotic and pandemic potential. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7(SUPPL.2), 4–14.
- Rossman, J. S., & Lamb, R. A. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411(2), 229–236.
- Rovid Spickler, A. (2006). *Avian Influenza Fowl Plague, Grippe Aviaire*.  
[www.cfsph.iastate.edu](http://www.cfsph.iastate.edu)
- Rutvisuttinunt, W., Chinnawirotpisan, P., Simasathien, S., Shrestha, S. K., Yoon, I. K., Klungthong, C., & Fernandez, S. (2013). Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 394–404.
- Salem, E., Cook, E. A. J., Lbacha, H. A., Oliva, J., Awoume, F., Aplogan, G. L., Hymann, E. C., Muloi, D., Deem, S. L., Alali, S., Zouagui, Z., Fèvre, E. M., Meyer, G., & Ducatez, M. F. (2017). Serologic Evidence for Influenza C and D Virus among Ruminants and Camelids. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 2015–2018.
- Salman, M. (2003). Animal Disease Surveillance and Survey Systems. In *Animal Disease Surveillance and Survey Systems*. Wiley.

- Samji, T. (2009). Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 82(4), 153. /pmc/articles/PMC2794490/
- Sang, X., Wang, A., Ding, J., Kong, H., Gao, X., Li, L., Chai, T., Li, Y., Zhang, K., Wang, C., Wan, Z., Huang, G., Wang, T., Feng, N., Zheng, X., Wang, H., Zhao, Y., Yang, S., Qian, J., ... Xia, & X. (2015). *Adaptation of H9N2 AIV in guinea pigs enables efficient transmission by direct contact and inefficient transmission by respiratory droplets OPEN.*
- Sangrat, W., Thanapongtharm, W., & Poolkhet, C. (2020). Identification of risk areas for foot and mouth disease in Thailand using a geographic information system-based multi-criteria decision analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 185, 105183.
- Sanogo, I. N., Kouakou, C., Batawui, K., Djegui, F., Byarugaba, D. K., Adjin, R., Adjabli, K., Wabwire-Mangen, F., Erima, B., Atim, G., Ukuli, Q. A., Tugume, T., Dogno, K., Go-Maró, W., Couacy-Hymann, E., Kayali, G., McKenzie, P., Webby, R. J., & Ducatez, M. F. (2021). Serological surveillance of influenza D virus in ruminants and swine in west and East Africa, 2017–2020. *Viruses*, 13(9), 1749.
- Saunders-Hastings, P. R., & Krewski, D. (2016). Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens* 2016, Vol. 5, Page 66, 5(4), 66.
- Schmolke, M., Manicassamy, B., Pena, L., Sutton, T., Hai, R., Varga, Z. T., Hale, B. G., Steel, J., Pérez, D. R., & García-Sastre, A. (2011). Differential Contribution of PB1-F2 to the Virulence of Highly Pathogenic H5N1 Influenza A Virus in Mammalian and Avian Species. *PLOS Pathogens*, 7(8), e1002186.
- Schneider, K., Gugerty, M. K., Plotnick, R., & Anderson, C. L. (2010). Poultry market in West Africa : Overview & comparative analysis. *Evans School of Policy Analysis and Research (EPAR)*, 82, 1–26. [http://evans.washington.edu/files/Evans UW\\_Request](http://evans.washington.edu/files/Evans_UW_Request)

- Schrauwen, E. J. A., & Fouchier, R. A. M. (2019). Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Https://Doi.Org/10.1038/Emi.2014.9*, 3, 9.
- Sediri, H., Thiele, S., Schwalm, F., Gabriel, G., & Klenk, H. D. (2016). PB2 subunit of avian influenza virus subtype H9N2: A pandemic risk factor. *Journal of General Virology*, 97(1), 39–48.
- Senne, D. A., Panigrahy, B., Kawaoka, Y., Pearson, J. E., Suss, J., Lipkind, M., Kida, H., & Webster, R. G. (1996). Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: Amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Diseases*, 40(2), 425–437.
- Sergeant, E., & Perkins, N. (2015). Epidemiology for field veterinarians: an introduction. In *Epidemiology for field veterinarians: an introduction*. CABI.
- Shinya, Y., Hatta, M., Staker, B. L., Watanabe, S., Imai, M., Shinya, K., Sakai-Tagawa, Y., Ito, M., Ozawa, M., Watanabe, T., Sakabe, S., Li, C., Kim, J. H., Myler, P. J., Phan, I., Raymond, A., Smith, E., Stacy, R., Nidom, C. A., ... Kawaoka, Y. (2010). Biological and Structural Characterization of a Host-Adapting Amino Acid in Influenza Virus. *PLOS Pathogens*, 6(8), e1001034.
- Sims, L. D. (2007). Lessons Learned from Asian H5N1 Outbreak Control. *Avian Diseases*, 51(s1), 174–181.
- Sims, L. D., & Brown, I. H. (2016). Multi-continental panzootic of H5 highly pathogenic avian influenza (1996–2015). *Animal Influenza*, 202–247.
- Sims, L. D., Ellis, T. M., Liu, K. K., Dyrting, K., Wong, H., Peiris, M., Guan, Y., & Shortridge, K. F. (2003). Avian Influenza in Hong Kong 1997–2002. *Https://Doi.Org/10.1637/0005-2086-47.S3.832*, 47(s3), 832–838.
- Sims, L. D., Weaver, J., & Swayne, D. E. (2016). Epidemiology of avian influenza in agricultural and other man-made systems. *Animal Influenza*, 302–336.

- Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 69, pp. 531–569). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Smith, G. J. D., & Donis, R. O. (2015). Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 9(5), 271–276.
- Song, M.-S., Pascua, P. N. Q., Lee, J. H., Baek, Y. H., Lee, O.-J., Kim, C.-J., Kim, H., Webby, R. J., Webster, R. G., & Choi, Y. K. (2009). The Polymerase Acidic Protein Gene of Influenza A Virus Contributes to Pathogenicity in a Mouse Model. *Journal of Virology*, 83(23), 12325–12335.
- Song, W., & Qin, K. (2020). Human-infecting influenza A (H9N2) virus: A forgotten potential pandemic strain? In *Zoonoses and Public Health* (Vol. 67, Issue 3, pp. 203–212). John Wiley & Sons, Ltd.
- Sonnberg, S., Webby, R. J., & Webster, R. G. (2013). Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus Research*, 178(1), 63–77.
- Spackman, E. (2008). A brief introduction to the avian influenza virus. *Methods in Molecular Biology*, 436, 1–6.
- Spackman, E., Cattoli, G., & Suarez, D. L. (2016). Diagnostics and surveillance methods. *Animal Influenza*, 31–44.
- Spesock, A., Malur, M., Hossain, M. J., Chen, L.-M., Njaa, B. L., Davis, C. T., Lipatov, A. S., York, I. A., Krug, R. M., & Donis, R. O. (2011). The Virulence of 1997 H5N1 Influenza Viruses in the Mouse Model Is Increased by Correcting a Defect in Their NS1 Proteins. *Journal of Virology*, 85(14), 7048–7058.
- Stärk, K. D. C., Regula, G., Hernandez, J., Knopf, L., Fuchs, K., Morris, R. S., & Davies, P. (2006). Concepts for risk-based surveillance in the field of veterinary

- medicine and veterinary public health: Review of current approaches. *BMC Health Services Research*, 6, 20.
- Steel, J., Lowen, A. C., Mubareka, S., & Palese, P. (2009). Transmission of Influenza Virus in a Mammalian Host Is Increased by PB2 Amino Acids 627K or 627E/701N. *PLOS Pathogens*, 5(1), e1000252.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., & Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122(2), 281–288.
- Stevens, K. B., Costard, S., Métras, R., Theuri, W., Hendrickx, S., & Pfeiffer, D. U. (2010). *Risk Mapping for HPAI H5N1 in Africa Improving surveillance for virulent bird flu Final report and risk maps Under Early Detection, Reporting and Surveillance-Avian Influenza in Africa Project-USAID*. May 2014.  
[https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/2420/HPAI\\_RiskMapping\\_En.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/2420/HPAI_RiskMapping_En.pdf?sequence=4&isAllowed=y)
- Stevens, K. B., & Pfeiffer, D. U. (2011). Spatial modelling of disease using data- and knowledge-driven approaches. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, 2(3), 125–133.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D., & Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *The EMBO Journal*, 11(7), 2407–2414.
- Su, Y., Yang, H. Y., Zhang, B. J., Jia, H. L., & Tien, P. (2008). Analysis of a point mutation in H5N1 avian influenza virus hemagglutinin in relation to virus entry into live mammalian cells. *Archives of Virology*, 153(12), 2253–2261.
- Suarez, D. L. (2000). Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology*, 74(1–2), 15–27.

- Suarez, D. L. (2005). Overview of avian influenza DIVA test strategies. *Biologicals*, 33(4), 221–226.
- Suarez, D. L. (2012). DIVA vaccination strategies for avian influenza virus. *Avian Diseases*, 56(4 SUPPL.1), 836–844.
- Suarez, D. L. (2016). Influenza A virus. *Animal Influenza*, 1–30.
- Suarez, D. L., & Pantin-Jackwood, M. J. (2017). Recombinant viral-vectored vaccines for the control of avian influenza in poultry. *Veterinary Microbiology*, 206, 144–151.
- Subbarao, E. K., London, W., & Murphy, B. R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *Journal of Virology*, 67(4), 1761–1764.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., & Cox, N. (1998). Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness. *Science*, 279(5349), 393–396.
- Sulaiman, L., Shittu, I., Fusaro, A., Inuwa, B., Zecchin, B., Gado, D., Schivo, A., Bianco, A., Laleye, A., Gobbo, F., Vakuru, C., Joannis, T., Monne, I., & Meseko, C. (2021). Live bird markets in nigeria: A potential reservoir for h9n2 avian influenza viruses. *Viruses*, 13(8), 1445.
- Suttie, A., Deng, Y. M., Greenhill, A. R., Dussart, P., Horwood, P. F., & Karlsson, E. A. (2019). Inventory of molecular markers affecting biological characteristics of avian influenza A viruses. *Virus Genes*, 55(6), 739–768.
- Swayne, D. E. (2012). Impact of Vaccines and Vaccination on Global Control of Avian Influenza. *Avian Diseases*, 56(4s1), 818–828.
- Taft, A. S., Ozawa, M., Fitch, A., Depasse, J. V., Halfmann, P. J., Hill-Batorski, L.,

- Hatta, M., Friedrich, T. C., Lopes, T. J. S., Maher, E. A., Ghedin, E., Macken, C. A., Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2015). Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1–12.
- Takakuwa, H., Yamashiro, T., Le, M. Q., Phuong, L. S., Ozaki, H., Tsunekuni, R., Usui, T., Ito, H., Yamaguchi, T., Ito, T., Murase, T., Ono, E., & Otsuki, K. (2013). The characterization of low pathogenic avian influenza viruses isolated from wild birds in northern Vietnam from 2006 to 2009. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(6), 581–590.
- Tassoni, L., Fusaro, A., Milani, A., Lemey, P., Awuni, J. A., Sedor, V. B., Dogbey, O., Commey, A. N. O., Meseko, C., Joannis, T., Minoungou, G. L., Ouattara, L., Haido, A. M., Cisse-Aman, D., Couacy-Hymann, E., Dauphin, G., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). Genetically Different Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Viruses in West Africa, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), 2132.
- Taubenberger, J. K., Hultin, J. V., & Morens, D. M. (2007). Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. In *Antiviral Therapy* (Vol. 12, Issue 4 B, pp. 581–591).
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., Wang, R., Jin, G., & Fanning, T. G. (2005). Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 437(7060), 889–893.
- Teng, Q., Xu, D., Shen, W., Liu, Q., Rong, G., Li, X., Yan, L., Yang, J., Chen, H., Yu, H., Ma, W., & Li, Z. (2016). A Single Mutation at Position 190 in Hemagglutinin Enhances Binding Affinity for Human Type Sialic Acid Receptor and Replication of H9N2 Avian Influenza Virus in Mice. *Journal of Virology*, 90(21), 9806–9825.
- To, K. K. W., Tsang, A. K. L., Chan, J. F. W., Cheng, V. C. C., Chen, H., & Yuen, K. Y. (2014). Emergence in China of human disease due to avian influenza A(H10N8) – Cause for concern? *Journal of Infection*, 68(3), 205–215.

- Tombari, W., Nsiri, J., Larbi, I., Guerin, J., & Ghram, A. (2011). Genetic evolution of low pathogenicity H9N2 Avian influenza viruses in Tunisia: Acquisition of new mutations. *Virology Journal*, 8(1), 1–12.
- Tondel, F. (2019). *Dynamiques régionales des filières d'élevage en Afrique de l'Ouest*. [www.ecdpm.org/dp241fr](http://www.ecdpm.org/dp241fr)
- Vandegrift, K. J., Sokolow, S. H., Daszak, P., & Kilpatrick, A. M. (2010). Ecology of avian influenza viruses in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195(1), 113–128.
- Vasin, A. V., Temkina, O. A., Egorov, V. V., Klotchenko, S. A., Plotnikova, M. A., & Kiselev, O. I. (2014). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research*, 185, 53–63.
- Wade, D., Ashton-Butt, A., Scott, G., Reid, S. M., Coward, V., Hansen, R. D. E., Banyard, A. C., & Ward, A. I. (2023). High pathogenicity avian influenza: targeted active surveillance of wild birds to enable early detection of emerging disease threats. *Epidemiology & Infection*, 151, e15.
- Wahlgren, J. (2011). Influenza A viruses: an ecology review. [Http://Dx.Doi.Org/10.3402/Iee.V1i0.6004](http://Dx.Doi.Org/10.3402/Iee.V1i0.6004), 1(1), 6004.
- Wan, H., & Perez, D. R. (2007). Amino Acid 226 in the Hemagglutinin of H9N2 Influenza Viruses Determines Cell Tropism and Replication in Human Airway Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 81(10), 5181–5191.
- Wan, H., Sorrell, E. M., Song, H., Hossain, M. J., Ramirez-Nieto, G., Monne, I., Stevens, J., Cattoli, G., Capua, I., Chen, L. M., Donis, R. O., Busch, J., Paulson, J. C., Brockwell, C., Webby, R., Blanco, J., Al-Natour, M. Q., & Perez, D. R. (2008). Replication and Transmission of H9N2 Influenza Viruses in Ferrets: Evaluation of Pandemic Potential. *PLOS ONE*, 3(8), e2923.

- Wang, R., & Taubenberger, J. K. (2010). Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(5), 517–527.
- Watanabe, T., Watanabe, S., & Kawaoka, Y. (2010). Cellular Networks Involved in the Influenza Virus Life Cycle. *Cell Host & Microbe*, 7(6), 427–439.
- Webby, R. J., & Webster, R. G. (2001). Emergence of influenza A viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1416), 1817–1828.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 152–179.
- WHO. (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization*, 58(4), 585–591.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/6969132/?tool=EBI>
- WHO. (2023a). Avian Influenza Weekly Update Number 899. In *Disease Outbreak News*.
- WHO. (2023b). *Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A (H5N1) reported to WHO, 2003-2023*.  
[https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a\(h5n1\)-reported-to-who-2003-2023-24-april-2023](https://www.who.int/publications/m/item/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a(h5n1)-reported-to-who-2003-2023-24-april-2023)
- Wilson, I. A., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 1981 289:5796, 289(5796), 366–373.
- Wood, G. W., McCauley, J. W., Bashiruddin, J. B., & Alexander, D. J. (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H 5 and H 7 subtypes. *Archives of Virology*, 130(1–2), 209–217.
- Wu, T., & Perrings, C. (2018). The live poultry trade and the spread of highly

- pathogenic avian influenza: Regional differences between Europe, West Africa, and Southeast Asia. *PLOS ONE*, 13(12), e0208197.
- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., & Gao, G. F. (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 22(4), 183–191.
- Xu, G., Zhang, X., Gao, W., Wang, C., Wang, J., Sun, H., Sun, Y., Guo, L., Zhang, R., Chang, K.-C., Liu, J., & Pu, J. (2016). Prevailing PA Mutation K356R in Avian Influenza H9N2 Virus Increases Mammalian Replication and Pathogenicity. *Journal of Virology*, 90(18), 8105–8114.
- Xu, X., Subbarao, K., Cox, N. J., & Guo, Y. (1999). Genetic Characterization of the Pathogenic Influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) Virus: Similarity of Its Hemagglutinin Gene to Those of H5N1 Viruses from the 1997 Outbreaks in Hong Kong. *Virology*, 261(1), 15–19.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Sakai-Tagawa, Y., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Shinya, K., Sawada, T., Kiso, M., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L. F., Stevens, D. J., ... Kawaoka, Y. (2006). Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 2006 444:7117, 444(7117), 378–382.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., & Ishihama, A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: Association of the ns2 protein with virion matrix. *Virology*, 196(1), 249–255.
- Yi Yeo, J., Ken-En Gan, S., Baz, M., & Mifsud, E. (2021). Peering into Avian Influenza A(H5N8) for a Framework towards Pandemic Preparedness. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 2276, 13(11), 2276.
- Zecchin, B., Minoungou, G., Fusaro, A., Moctar, S., Ouedraogo-Kaboré, A., Schivo, A., Salviato, A., Marciano, S., & Monne, I. (2017). Influenza A(H9N2) Virus,

Burkina Faso. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2118–2119.

Zhang, Z., Hu, S., Li, Z., Wang, X., Liu, M., Guo, Z., Li, S., Xiao, Y., Bi, D., & Jin, H. (2011). Multiple amino acid substitutions involved in enhanced pathogenicity of LPAI H9N2 in mice. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1790–1797.

## VII. Annexes

Brief Report

# Serological Surveillance of Influenza D Virus in Ruminants and Swine in West and East Africa, 2017–2020

Idrissa Nonmon Sanogo <sup>1,2</sup>, Casimir Kouakou <sup>3</sup>, Komla Batawui <sup>4</sup>, Fidélia Djegui <sup>5</sup>, Denis K. Byarugaba <sup>6,7</sup>, Rachidatou Adjin <sup>5</sup>, Komlan Adjabli <sup>4</sup>, Fred Wabwire-Mangen <sup>6,7</sup>, Bernard Erima <sup>7</sup>, Gladys Atim <sup>7</sup>, Ouilazoni A. Ukuli <sup>7</sup>, Titus Tugume <sup>7</sup>, Koffi Dogno <sup>4</sup>, Wolali Go-Maró <sup>4</sup>, Emmanuel Couacy-Hymann <sup>3</sup>, Ghazi Kayali <sup>8,9</sup>, Pamela McKenzie <sup>10</sup>, Richard J. Webby <sup>10</sup> and Mariette F. Ducatez <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Interactions Hôtes-Agents Pathogènes (IHAP), UMR 1225, Université de Toulouse, ENVT, INRAE, 31076 Toulouse, France; idrissa.sanogo@envt.fr
  - <sup>2</sup> Faculté d'Agronomie et de Médecine Animale (FAMA), Université de Ségou, Ségou BP 24, Mali
  - <sup>3</sup> Laboratoire National d'Appui au Développement Agricole (LANADA), Bingerville BP 206, Côte d'Ivoire; casymyr2006@yahoo.fr (C.K.); chymann@gmail.com (E.C.-H.)
  - <sup>4</sup> Laboratoire Central Vétérinaire de Lomé, Lomé BP 4041, Togo; dbatawui@yahoo.fr (K.B.); fo\_mathias@yahoo.fr (K.A.); koffipolo001@yahoo.fr (K.D.); emilygomaro@yahoo.fr (W.G.-M.)
  - <sup>5</sup> Laboratoire de Diagnostic Vétérinaire et de Sérosurveillance (LADISERO), Parakou BP 23, Benin; djegui\_fidelia@yahoo.fr (F.D.); adjinrachidath@yahoo.fr (R.A.)
  - <sup>6</sup> College of Veterinary Medicine Animal Resources and Biosecurity, Makerere University, Kampala P.O. Box 7062, Uganda; denis.byarugaba@mak.ac.ug (D.K.B.); fwabwire@musph.ac.ug (F.W.-M.)
  - <sup>7</sup> Makerere University Walter Reed Project, Kampala P.O. Box 16524, Uganda; berima@muwrrp.org (B.E.); gatim@muwrrp.org (G.A.); kukuli@muwrrp.org (Q.A.U.); ttugume@muwrrp.org (T.T.)
  - <sup>8</sup> Human Link, Dubai Multi Commodity Center (DMCC), Dubai 48800, United Arab Emirates; ghazi@human-link.org
  - <sup>9</sup> Health Sciences Center, University of Texas, Houston, TX 77030, USA
  - <sup>10</sup> Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN 38105, USA; Pamela.McKenzie@stjude.org (P.M.); richard.webby@stjude.org (R.J.W.)
- \* Correspondence: mariette.ducatez@envt.fr; Tel.: +33-5611-932-49



**Citation:** Sanogo, I.N.; Kouakou, C.; Batawui, K.; Djegui, F.; Byarugaba, D.K.; Adjin, R.; Adjabli, K.; Wabwire-Mangen, F.; Erima, B.; Atim, G.; et al. Serological Surveillance of Influenza D Virus in Ruminants and Swine in West and East Africa, 2017–2020. *Viruses* **2021**, *13*, 1749. <https://doi.org/10.3390/v13091749>

Academic Editors: Chao-Nan Lin and Peck Tong Ooi

Received: 27 July 2021  
Accepted: 30 August 2021  
Published: 2 September 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Influenza D virus (IDV) was first isolated in 2011 in Oklahoma, USA from pigs presenting with influenza-like symptoms. IDV is known to mainly circulate in ruminants, especially cattle. In Africa, there is limited information on the epidemiology of IDV, although the virus has likely circulated in the region since 2012. In the present study, we investigated the seropositivity of IDV among domestic ruminants and swine in West and East Africa from 2017 to 2020. Serum samples were analyzed using the hemagglutination inhibition (HI) assay. Our study demonstrated that IDV is still circulating in Africa, with variations in seropositivity among countries and species. The highest seropositivity was detected in cattle (3.9 to 20.9%). Our data highlights a need for extensive surveillance of IDV in Africa in order to better understand the epidemiology of the virus in the region.

**Keywords:** influenza D virus; Africa; cattle; small ruminants; swine; epidemiology; serology

## 1. Introduction

Influenza viruses are members of the *Orthomyxoviridae* family and are divided into four types (A, B, C, D). Animals are mainly infected by influenza type A and D viruses [1,2]. Influenza D Virus (IDV) was first isolated in 2011 in Oklahoma, USA from pigs presenting with flu-like symptoms [3]. After its first isolation, IDV has been detected in other countries in America [4], Europe [5–8] and Asia [9,10]. Serological studies showed the circulation of IDV in many countries in Africa [11–13], suggesting a worldwide geographic distribution of the virus.

Evidence for IDV infection has been found in a large number of animal species, such as cattle, sheep, goats [14,15], pigs and wild boars [16], dromedary camels [12] and horses [17]. Cattle are the main host of IDV, contributing to the spread of the virus to other

animal species [5,18,19]. IDV is considered to play a role in the bovine respiratory disease complex [4], which is responsible for huge economic losses for the livestock sector globally. In addition to animals, IDV-specific antibodies have been found in humans, with very high seroprevalence among people exposed to cattle, thus suggesting the zoonotic potential of the virus [20,21].

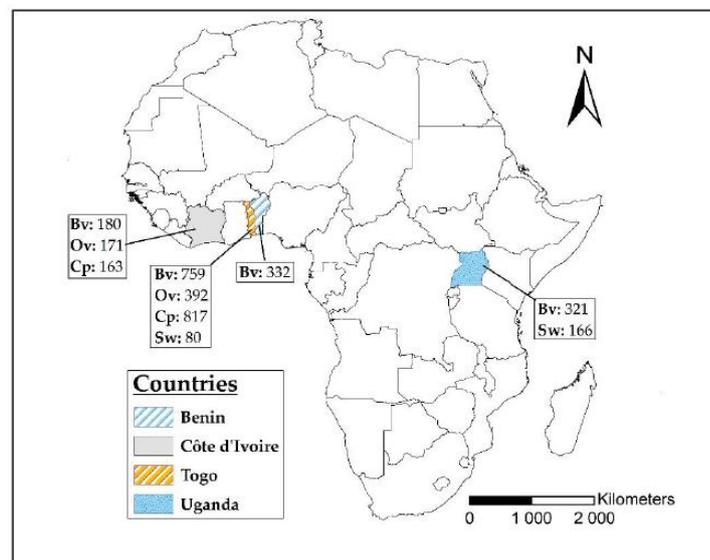
In Africa, there is limited information on the epidemiology of IDV, although evidence suggests that the virus may have been circulating in the region since at least 2012 [11]. Studies in Kenya and Ethiopia [11,12] showed substantially higher seroprevalence in camelids (99%), suggesting the importance of the species in the epidemiology of IDV in Africa. In Morocco (North Africa), 35% of cattle sera collected were positive for anti-IDV antibodies [11]. In West Africa, lower seropositivity rates for IDV were reported in cattle (1.9–10.4%) and small ruminants (1.4–2.2%) [11]. To date, no antibodies were detected in pigs in Africa, and attempts to isolate the virus have been unsuccessful [11,13].

The capacity of IDV to infect humans and numerous other animal species, and the ability of influenza viruses to regularly mutate, make this virus a continuing threat to animal and public health. Therefore, it is necessary to carry out further research on this virus. In this study, we aimed to investigate the seropositivity of IDV among domestic ruminants and swine in West and East Africa from 2017 to 2020 and to compare these results with previously available data.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Serum Samples Collection

From 2017 to 2020, we conducted a prospective serosurveillance for IDV in four countries in Sub-Saharan West and East Africa (Figure 1). A total of 3381 sera were collected from apparently healthy adult domestic ruminants and swine either from farms, cattle markets or slaughterhouses. Immediately after collection, the samples were stored in a cool box at +4 °C and transferred to the laboratory within 24 h. Animal health status and sex, as well as the date and place of sampling, were recorded. Sera samples collected in Togo during a previous study on IDV were also included in this study [13].



**Figure 1.** Map of countries where sera were collected. The number of samples collected from each species is indicated. Bv: cattle; Ov: sheep; Cp: goat; Sw: swine. In Uganda, all sera were collected in slaughterhouses. The map was designed using ArcMap 10.4 (ESRI, Redlands, CA, USA).

## 2.2. Serological Analysis

For the detection of IDV antibodies in serum, hemagglutination inhibition (HI) tests were performed using D/bovine/France/5920/2014 as the antigen and 1% chicken red blood cells for hemadsorption according to the procedures described by Salem et al. [11]. The HI titer was expressed as the reciprocal of the highest serum dilution showing complete inhibition of hemagglutination. A serum sample was determined as seropositive when the HI titer was  $\geq 1:10$  [11,22].

## 2.3. Data Analysis

Data were recorded into a standard Excel spreadsheet in Microsoft Excel 2016 (Microsoft corporation, Seattle, WA, USA). The anti-IDV seropositivity in each country and animal species was calculated as the number of sera with a titer greater than or equal to 1:10 out of the total number of sera tested. Statistical analyses were carried out with RStudio Desktop 1.4 software (RStudio Inc., Boston, MA, USA). The Chi-square test of independence was performed to test the relationship between the prevalence of anti-IDV antibodies and different explanatory variables (species, sex and place of sampling) at a level of significance of 5% ( $p \leq 0.05$ ). We then examined the effects of species, countries and sex, individually, on the odds of seropositivity to IDV by using the epi.2by2 function of the epiR package in RStudio Desktop 1.4 (RStudio, Inc., Boston, MA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Seropositivity of IDV in Cattle, Sheep, Goats and Swine

The results of HI analyses revealed that anti-IDV antibodies were present in a percentage of serum samples from all four animal species (Table 1). Out of the 3381 samples collected, 232 (6.9%) were positive for IDV antibodies. The highest seropositivity rate for IDV (20.9%) was observed in cattle in Uganda. Seropositive swine were also detected only in Uganda. Sheep and goats had much lower seropositivity (2 to 4.4%) than did cattle. HI titers observed in positive samples ranged from 10 to 640, with the highest titers seen in cattle and swine sera. When selecting 20 instead of 10 as a threshold titer for positive sera, very similar results were obtained.

**Table 1.** Seropositivity rates of influenza D virus (IDV) in cattle, sheep, goat and swine in four countries of West and East Africa.

Country	Sampling Period	Animal Species	Number of Tested Samples	Number of Positive Samples	Positivity Rate (%)	HI Titer Range
Benin	2017–2019	Cattle	332	13	3.9	20–80
Côte d'Ivoire	2019	Cattle	180	13	7.2	10–80
		Sheep	171	7	4.1	10–40
		Goat	163	6	3.7	10–40
Togo	2017–2020	Cattle	759	48	6.3	10–320
		Sheep	392	8	2	10–80
		Goat	817	36	4.4	20–160
		Swine	80	0	–	–
Uganda	2017–2019	Cattle	321	67	20.9	10–160
		Swine	166	34	20.5	10–640

### 3.2. Factors Associated with IDV Seropositivity

We next determined what factors were associated with IDV seropositivity. The variables that had a statistically significant association with IDV seropositivity are presented in Table 2. Cattle were more likely to be seropositive than goats or sheep (OR = 0.48 for goats and OR = 0.30 for sheeps  $p < 0.001$ ); however, swine had 1.5 times higher odds (OR = 1.56,  $p = 0.03$ ) of being seropositive to IDV in comparison to cattle. Additionally, cattle

in Uganda had a higher risk of being infected by IDV than in other countries (OR 5.33,  $p < 0.001$ ).

**Table 2.** Factors associated with anti-IDV seropositivity rates among cattle, sheep, goat and swine in four countries of West and East Africa.

Variable	Categories (N)	n (%)	OR	95% (CI)	<i>p</i>
Species	Cattle (1592)	141 (8.9)	RF		
	Goat (980)	42 (4.3)	0.48	0.34–0.69	<0.001
	Sheep (563)	15 (2.7)	0.30	0.18–0.52	<0.001
	Swine (246)	34 (13.6)	1.56	1.05–2.32	0.03
Countries *	Benin (332)	13 (3.9)	RF		
	Côte d’Ivoire (180)	13 (7.2)	–	–	0.1
	Togo (759)	48 (6.3)	–	–	0.1
	Uganda (321)	67 (20.9)	5.33	2.89–9.84	<0.001
Sex	Male (1456)	90 (6.2)	RF		
	Female (1925)	142 (7.4)	–	–	0.2

N: number of samples tested; n: number of positive samples; %: proportion of positive samples; OR: odds ratios; CI: confidence interval; RF: reference factor; *p* values  $\leq 0.05$  are considered statistically significant; \* For these countries, only cattle sera were considered.

There was no significant difference between seropositivity in cattle in Benin, Côte d’Ivoire and Togo. Moreover, there was no statistically significant difference in seropositivity by sex.

#### 4. Discussion

In this study, we determined the prevalence of anti-IDV antibodies among domestic ruminants and swine in West and East Africa. Our results confirm that IDV is still circulating in the region, as previously shown by other studies in Africa [11,13]. However, in Benin and Côte d’Ivoire, our data showed higher IDV seropositivity in cattle than seen in prior studies assessing sera collected between 1991–2015 (1.9% and 0%, respectively). Conversely, IDV seropositivity in cattle in Togo in our study was lower than that seen in sera collected from 1991–2015 (10.4%). We did find a higher IDV seropositivity rate in cattle in Togo (6.3%) compared with data previously reported between 2017–2019 (4.5%), suggesting that the virus continues to circulate widely.

IDV seropositivity in cattle differed significantly between countries in West and East Africa. These differences between countries might be related to the variability in husbandry practices, as previously suggested [14]. We found that Uganda had the highest IDV seropositivity rate in cattle. This finding may be the result of the importance of the cattle population in Uganda (16.3 million heads in 2019) compared to the other three countries in West Africa (Benin: 2.5 million; Côte d’Ivoire: 1.7 million; Togo: 0.5 million heads) [23]. The higher seropositivity in Uganda might also be partly explained by the high number of camels in East Africa (60% of the world population in the horn of Africa), as camels have been postulated to contribute to the persistence of IDV in Africa [12,24]. Nevertheless, further serological and virological studies are required to better understand the role played by camels in the epidemiology of IDV.

Seropositivity rates of IDV in domestic ruminants and swine and HI titers in Africa are much lower than those observed in other continents [8,14,19]. Antigenically different IDV strains were isolated in many regions of the world [5]. In this study, the virus we used for the HI test was D/bovine/France/5920/2014, isolated in France, and classified as a D/swine/Oklahoma-like virus. It cannot be ruled out that antigenically different IDV strains may be circulating in Africa, lowering the sensitivity of our assay.

Our data indicated a higher IDV seropositivity rate in cattle compared to the other animal species. These results are in line with data reported in European countries [8]. Indeed, cattle are considered as the main host for IDV, contributing to its spread. Furthermore, high

levels of IDV antibodies were reported in newborn calves [19]; our study focused only on adult animals as they are the ones found in livestock markets and slaughterhouses.

Our study provides the first serological evidence of IDV in swine in Africa. Previous studies have reported IDV in swine in France [16] and Italy [6]. However, IDV is circulating at lower levels in swine compared with cattle, but at higher levels than in sheep [15]. Our study found higher odds for swine to be seropositive to IDV when compared with cattle. However, the number of swine sera was limited and only collected in Togo and Uganda, underpowering our study to some degree.

The results presented in this study, while commendable, should be treated cautiously because they are based on convenience samples. In addition, we did not carry out any confirmatory serological tests, such as ELISA or microneutralization assays. Thus, large-scale and well-designed studies based on random samples are needed to expand on our results.

In summary, our findings confirm that IDV is circulating among domestic animals in West and East Africa, albeit at lower rates than observed in other regions. We identified evidence of variation in IDV seropositivity among different countries and species. Nevertheless, as our study was based on non-random samples, further serological and virological studies are needed to investigate the epidemiology of IDV in Africa and to examine its potential threat to public health.

**Author Contributions:** Conceptualization, I.N.S. and M.F.D.; methodology, I.N.S., C.K., R.A., K.A., and M.F.D.; formal analysis, I.N.S. and M.F.D.; investigation, I.N.S., C.K., K.B., F.D., D.K.B., R.A., K.A., B.E., G.A., Q.A.U., T.T., K.D., W.G.-M., E.C.-H. and M.F.D.; resources, K.B., F.W.-M., G.K., P.M., R.J.W. and M.F.D.; data curation, I.N.S.; writing—original draft preparation, I.N.S. and M.F.D.; writing—review and editing, I.N.S., D.K.B., E.C.-H., G.K., P.M., R.J.W. and M.F.D.; project administration, F.D., D.K.B., W.G.-M., E.C.-H., G.K., P.M., M.F.D.; funding acquisition, R.J.W. and M.F.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was founded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (CEIRS contract no. HHSN272201400006C). I.N.S. is supported by a PhD scholarship of the French Embassy in Mali.

**Institutional Review Board Statement:** This study was approved by the St. Jude Children’s Research Hospital Institutional Animal Care and Use Committee (Amended IACUC Approval # 546-100491-07/17; expires 4/5/23).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request to the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Maxime Fusade-Boyer, Maria Gaudino, Adrien Lion, and Gilles Meyer (IHAP, France) for fruitful discussions.

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

## References

1. Ducatez, M.F.; Webster, R.G.; Webby, R.J. Animal influenza epidemiology. *Vaccine* **2008**, *26*, 67–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Asha, K.; Kumar, B. Emerging influenza D virus threat: What we know so far! *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hause, B.M.; Ducatez, M.; Collin, E.A.; Ran, Z.; Liu, R.; Sheng, Z.; Armien, A.; Kaplan, B.; Chakravarty, S.; Hoppe, A.D.; et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*. [[CrossRef](#)]
4. Mitra, N.; Cernicchiaro, N.; Torres, S.; Li, F.; Hause, B.M. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 1771–1784. [[CrossRef](#)]
5. Ducatez, M.F.; Pelletier, C.; Meyer, G. Influenza D virus in cattle, France, 2011–2014. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 368–371. [[CrossRef](#)]
6. Chiapponi, C.; Faccini, S.; De Mattia, A.; Baioni, L.; Barbieri, I.; Rosignoli, C.; Nigrelli, A.; Foni, E. Detection of influenza D virus among swine and cattle, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 352–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Flynn, O.; Gallagher, C.; Mooney, J.; Irvine, C.; Ducatez, M.; Hause, B.; McGrath, G.; Ryan, E. Influenza D virus in cattle, Ireland. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 389–391. [[CrossRef](#)]
8. Gaudino, M.; Moreno, A.; Snoeck, C.J.; Zohari, S.; Saegerman, C.; O'Donovan, T.; Ryan, E.; Zanni, I.; Foni, E.; Sausy, A.; et al. Emerging influenza D virus infection in European livestock as determined in serology studies: Are we underestimating its spread over the continent? *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *68*, 1–11. [[CrossRef](#)]
9. Jiang, W.-M.; Wang, S.-C.; Peng, C.; Yu, J.-M.; Zhuang, Q.-Y.; Hou, G.-Y.; Liu, S.; Li, J.-P.; Chen, J.-M. Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China. *Virus Genes* **2014**, *49*, 493–496. [[CrossRef](#)]
10. Murakami, S.; Endoh, M.; Kobayashi, T.; Takenaka-Uema, A.; Chambers, J.K.; Uchida, K.; Nishihara, M.; Hause, B.; Horimoto, T. Influenza d virus infection in herd of cattle, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1517–1519. [[CrossRef](#)]
11. Salem, E.; Cook, E.A.J.; Lbacha, H.A.; Oliva, J.; Awoume, F.; Aplogan, G.L.; Couacy Hymann, E.; Muloi, D.; Deem, S.L.; Alali, S.; et al. Serologic evidence for influenza C and D virus among ruminants and camelids, Africa, 1991–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1556–1559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Murakami, S.; Odagiri, T.; Melaku, S.K.; Bazartseren, B.; Ishida, H.; Takenaka-Uema, A.; Muraki, Y.; Sentsui, H.; Horimoto, T. Influenza D virus infection in dromedary camels, Ethiopia. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1224–1225. [[CrossRef](#)]
13. Fusade-Boyer, M.; Pato, P.S.; Komlan, M.; Dogno, K.; Batawui, K.; Go-Maró, E.; McKenzie, P.; Guinat, C.; Secula, A.; Paul, M.; et al. Risk mapping of influenza D virus occurrence in ruminants and swine in togo using a spatial multicriteria decision analysis approach. *Viruses* **2020**, *12*, 128. [[CrossRef](#)]
14. Oliva, J.; Eichenbaum, A.; Belin, J.; Gaudino, M.; Guillotin, J.; Alzieu, J.P.; Nicollet, P.; Brugidou, R.; Gueneau, E.; Michel, E.; et al. Serological evidence of influenza D virus circulation among cattle and small ruminants in France. *Viruses* **2019**, *11*, 516. [[CrossRef](#)]
15. O'Donovan, T.; Donohoe, L.; Ducatez, M.F.; Meyer, G.; Ryan, E. Seroprevalence of influenza D virus in selected sample groups of Irish cattle, sheep and pigs. *Ir. Vet. J.* **2019**, *72*, 11–13. [[CrossRef](#)]
16. Gorin, S.; Fablet, C.; Quéguiner, S.; Barbier, N.; Paboef, F.; Hervé, S.; Rose, N.; Simon, G. Assessment of influenza D virus in domestic pigs and wild boars in France: Apparent limited spread within swine populations despite serological evidence of breeding sow exposure. *Viruses* **2019**, *12*, 25. [[CrossRef](#)]
17. Nedland, H.; Wollman, J.; Sreenivasan, C.; Quast, M.; Singrey, A.; Fawcett, L.; Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.; Kaushik, R.S.; Wang, D.; et al. Serological evidence for the co-circulation of two lineages of influenza D viruses in equine populations of the Midwest United States. *Zoonoses Public Health* **2018**, *65*, e148–e154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hause, B.M.; Collin, E.A.; Liu, R.; Huang, B.; Sheng, Z.; Lu, W.; Wang, D.; Nelson, E.A.; Li, F. Characterization of a novel influenza virus in cattle and swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Luo, J.; Ferguson, L.; Smith, D.R.; Woolums, A.R.; Epperson, W.B.; Wan, X.F. Serological evidence for high prevalence of influenza D viruses in cattle, Nebraska, United States, 2003–2004. *Virology* **2017**, *501*, 88–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Trombetta, C.M.; Marchi, S.; Manini, I.; Kistner, O.; Li, F.; Piu, P.; Manenti, A.; Biuso, F.; Sreenivasan, C.; Druce, J.; et al. Influenza D virus: Serological evidence in the Italian population from 2005 to 2017. *Viruses* **2019**, *12*, 30. [[CrossRef](#)]
21. White, S.K.; Ma, W.; McDaniel, C.J.; Gray, G.C.; Lednicky, J.A. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *J. Clin. Virol.* **2016**, *81*, 31–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Saegerman, C.; Salem, E.; Ait Lbacha, H.; Alali, S.; Zouagui, Z.; Meyer, G.; Ducatez, M.F. Formal estimation of the seropositivity cut-off of the hemagglutination inhibition assay in field diagnosis of influenza D virus in cattle and estimation of the associated true prevalence in Morocco. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 1392–1399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. FAO FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed on 5 July 2021).
24. Faye, B. The camel today: Assets and potentials. *Anthropozoologica* **2014**, *49*, 167–176. [[CrossRef](#)]

## Résumé

### **Epidémiologie moléculaire des virus influenza aviaries et cartographie du risque au Mali et en Afrique de l'Ouest**

Les virus influenza aviaries constituent une menace importante pour la santé humaine et animale. Ces virus sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité très élevées surtout dans les filières avicoles occasionnant d'énormes pertes économiques.

L'Afrique de l'Ouest constitue une région où l'on manque d'information sur la circulation et les propriétés génétiques des virus influenza, malgré l'apparition de plusieurs foyers chez les oiseaux. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la circulation et aux caractéristiques génétiques des virus influenza aviaries de sous-types H5N1 et H9N2 circulant en Afrique de l'Ouest. Nous avons également mis en place un modèle de cartographie du risque de propagation de ces virus. Les caractéristiques génétiques et antigéniques des virus influenza ont été déterminées à travers une caractérisation moléculaire et des analyses phylogénétiques et phylogéographiques. Le virus H5N1 retrouvé au Bénin en 2021 était hautement pathogène, appartenait à la lignée GS/GD - clade 2.3.4.4.B, et était associé aux virus H5N1 contemporains détectés en Afrique de l'Ouest et en Europe. Ce virus possédait une mutation d'adaptation aux mammifères (sur la protéine PB1) et présentait un profil antigéniquement différent des souches vaccinales recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé dans le cadre de la préparation pré-pandémique. Les virus H9N2 détectés chez la volaille au Mali appartenaient à la lignée G1 et possédaient aussi plusieurs marqueurs moléculaires de virulence et d'adaptation aux mammifères. Nous avons notamment trouvé un motif (RSNR) au niveau du site de clivage de l'Hémagglutinine de ces virus qui n'avait jusqu'à présent pas été détecté en Afrique. L'analyse des dynamiques spatio-temporelles des virus H9N2 a révélé que leur introduction est probablement survenue en Afrique de l'Ouest en 2015 en provenance du Maroc. Enfin, le modèle de cartographie sur la base de la méthode d'analyse multicritère d'aide à la décision associée aux systèmes d'information géographique a permis de produire des cartes de risque d'introduction et de propagation de foyers d'influenza aviaire au Mali. Ce modèle pourra servir de base pour la mise en place d'une surveillance basée sur le risque des virus influenza aviaire.

En conclusion, cette thèse fournit des informations essentielles sur la circulation et les caractéristiques génétiques des virus influenza tout en proposant un modèle de cartographie du risque pouvant améliorer l'efficacité de leur surveillance en Afrique de l'Ouest.

**Mots clés :** Virus influenza A, Mali, Afrique de l'Ouest, phylogénie, cartographie du risque, épidémiologie

## **Molecular epidemiology of avian influenza viruses and risk mapping in Mali and West Africa**

Avian influenza viruses represent a major threat to human and animal health. These viruses are responsible for high morbidity and mortality, especially in the poultry industry, resulting in huge economic losses. West Africa is a region with little information on the circulation and genetic characteristics of avian influenza viruses, despite the occurrence of several outbreaks in birds.

In this thesis, we studied the circulation and genetic characteristics of avian influenza viruses of subtypes H5N1 and H9N2 circulating in West Africa. We also developed a model to map the risk of the spread of these viruses. The genetic and antigenic characteristics of the influenza viruses were determined by molecular characterization and phylogenetic and phylogeographic analysis. The H5N1 virus found in Benin in 2021 was highly pathogenic, belonged to the GS/GD lineage - clade 2.3.4.4.B, and was closely related to contemporary H5N1 viruses detected in West Africa and Europe. This virus had a mammalian adaptation mutation (on the PB1 protein) and an antigenic profile that differed from the vaccine strains recommended by the World Health Organization as part of pre-pandemic preparedness. The H9N2 viruses detected in poultry in Mali belonged to the G1 lineage and also possessed several molecular markers of virulence and adaptation to mammals. In particular, we have found a motif (RSNR) at the cleavage site of the haemagglutinin of these viruses that had not previously been detected in Africa. Analysis of the spatiotemporal dynamics of H9N2 viruses revealed that they were probably introduced into West Africa in 2015 from Morocco. Finally, we implemented the risk mapping model, based on the multicriteria decision analysis method associated with geographic information systems, to produce risk maps for the introduction and spread of avian influenza in Mali. This model can be used as a basis for implementing risk-based surveillance of avian influenza viruses.

In conclusion, this thesis provides essential information on the circulation and genetic characteristics of avian influenza viruses in West Africa and proposes a risk mapping model for more effective surveillance in the region.

**Keywords:** Influenza A virus, Mali, West Africa, phylogeny, risk mapping, epidemiology