

**ANALYSE PHYLOGENETIQUE DE VIRUS INFLUENZA AVIAIRE H5 HAUTEMENT PATHOGENES  
EN FRANCE DURANT L'ÉPIZOOTIE 2020-21**

**François-xavier Briand<sup>1</sup>, Pascale Massin<sup>1</sup>, Claire Martenot<sup>1</sup>, Martine Cherbonnel-Pansart<sup>1</sup>, Katell Louboutin<sup>1</sup>, Rachel Busson<sup>1</sup>, Chantal Allee<sup>1</sup>, Carole Guillemoto<sup>1</sup>, Florent Souchaud<sup>1</sup>, Isabelle Pierre<sup>1</sup>, Hélène Quenault<sup>1</sup>, Pierrick Lucas<sup>1</sup>, Yannick Blanchard<sup>1</sup>, Nicolas Eterradosi<sup>1</sup>, Anne Van de Wiele<sup>2</sup>, Axelle Scoizec<sup>1</sup>, Sophie Le Bouquin-Leneveu<sup>1</sup>, Séverine Rautureau<sup>3</sup>, Yves Lambert<sup>3</sup>, Audrey Schmitz<sup>1</sup>, Eric Niqueux<sup>1</sup>, Béatrice Grasland<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 22440 Ploufragan, France*

<sup>2</sup>*Office français de la biodiversité, 94300 Vincennes, France*

<sup>3</sup>*Direction Générale de l'Alimentation, 75732 Paris, France*

[Francois-xavier.briand@anses.fr](mailto:Francois-xavier.briand@anses.fr)

**RÉSUMÉ**

Depuis 1996, les virus de l'influenza aviaire (IA) H5 hautement pathogènes (HP) de la lignée A/goose/Guangdong/1/96 (Gs/GD/96) provoquent des épidémies récurrentes avec des taux de mortalité élevés chez les oiseaux sauvages et domestiques. L'Europe a connu des introductions majeures au cours des années 2005-2007 et 2014-2020. De novembre 2020 à juillet 2021, 519 cas d'infection par des virus IAHP A(H5) appartenant au clade 2.3.4.4b ont été détectés en France. Le premier cas d'IAHP A(H5N8) en France a été confirmé le 16 novembre 2020 chez des poulets dans une animalerie en Corse. Après cette date, 10 autres détections de virus IA HP A(H5) ont été confirmées à partir des liens épidémiologiques du premier foyer. Par la suite, de nombreux autres virus HP A(H5) ont également été détectés principalement dans des élevages de canards du Sud-Ouest de la France mais également de manière sporadique dans le reste de la France chez des oiseaux sauvages et domestiques. L'analyse des séquences génomiques virales a indiqué que 3 sous-types de virus HP A(H5) ont été détectés (H5N1, H5N3, H5N8), mais le sous-type H5N8 était largement majoritaire. Tous les virus A(H5N8) français présentaient le même génotype, à l'instar de la majorité des virus IAHP A(H5N8) détectés en Europe. Les analyses phylogénétiques des virus HP A(H5N8) ont aussi révélé que les séquences françaises étaient distribuées en 9 génogroupes, suggérant 9 introductions potentielles en France.

**ABSTRACT**

**Phylogenetic analyses of highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during epizootic period 2020-21**

Since 1996, highly pathogenic (HP) H5 avian influenza (AI) viruses of the A/goose/Guangdong/1/96 (Gs/GD/96) lineage have caused recurrent outbreaks with high death rates in wild and domestic birds. Europe experienced major introductions during the 2005–2007 and 2014–2020 periods. From November 2020 to July 2021, 519 cases of infections with HP H5 belonging to clade 2.3.4.4b were detected in France. The first case of HPAI A(H5N8) in France was confirmed on the 16th November 2020 from a chicken in a pet store in Corsica. Since this date, 10 other HPAI A(H5) cases were confirmed investigations following epidemiological links with the first detection. In addition, many other HP A(H5) viruses were also detected from mainly domestic duck farms in South-Western of France and sporadically in other regions of France from wild and domestic birds. Viral genome sequences indicated that 3 subtypes of HPAI A(H5) were detected (H5N1, H5N3, H5N8), but H5N8 subtype was the overwhelmingly the major one. All French viruses exhibited the same genotype, similarly to the most of HPAI A(H5N8) viruses detected in Europe. Phylogenetic analyses of HPAI A(H5N8) viruses revealed that French sequences were distributed into 9 genogroups, suggesting 9 potential introductions of this virus in France.

## INTRODUCTION

Depuis août 2020, la Russie, le Kazakhstan et l'Europe ont de nouveau été confrontés à une épizootie d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) due à des virus A(H5). À l'heure actuelle, au moins 5 sous-types de virus de l'IAHP (H5N8, H5N1, H5N3, H5N4 et H5N5) ont été identifiés, parmi lesquels au moins 19 génotypes ont été décrits ; le sous-type A(H5N8) dont le génotype A était le plus représenté (EFSA, 2021). Ces virus possèdent tous un segment HA appartenant au clade 2.3.4.4b de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996. Fin mars 2021, plus de 1800 signalements chez des oiseaux sauvages et de 800 foyers chez les volailles ont été rapportés en Europe. La majorité des virus IAHP détectés en élevage d'octobre 2020 à mars 2021 l'ont été en France (n=490 au 29/03/2021), dont la quasi-totalité dans les élevages de canards (filière palmipèdes gras) du Sud-Ouest de la France (n=475). Le séquençage d'une partie des virus issus de différents foyers et de cas en avifaune sauvage en France a permis d'étudier la diversité virale observée et d'en déduire, après comparaison avec les autres séquences disponibles au niveau international, les potentielles introductions sur le territoire français

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Détection, sous-typage et pathotypage moléculaire.

Pour chaque suspicion d'influenza aviaire hautement pathogène sur des oiseaux sauvages ou domestiques, ainsi que sur les élevages en lien avec des cas déjà confirmés, des écouvillons trachéaux et cloacaux ont été réalisés. Les ARN viraux ont été extraits à partir de mélanges de 5 surnageants d'écouvillons au maximum (RNeasy mini kit, Qiagen). Ces ARN ont ensuite été testés en RT-PCR temps réel (rRT-PCR) gène M ainsi qu'en rRT-PCR gène H5 par les laboratoires départementaux agréés. Les échantillons criblés positifs ont ensuite été transférés au Laboratoire national de Référence pour l'Influenza aviaire (LNR IA, Anses-Ploufragan-Plouzané-Niort) pour la réalisation des rRT-PCR spécifiques du gène H5 de clade 2.3.4.4b et du gène N8. La séquence nucléotidique encadrant la zone du site de clivage de l'hémagglutinine a également été déterminé par RT-PCR point final gène H5 Kha1/Kha3 et séquençage (Slomka et al., 2007) afin de déterminer le pathotype (séquençage de la zone codant le site de clivage de l'hémagglutinine).

### 1.2 Séquençage complet des génomes viraux

Le séquençage des génomes complets a été programmé sur les virus issus de tous les cas d'IAHP français que ce soit chez les oiseaux sauvages ou domestiques. Pour chacun des cas, l'échantillon possédant la valeur de Ct

la plus faible en rRT-PCR de criblage (charge génomique la plus forte) a été sélectionné. Les 8 segments viraux ont été amplifiés par RT-PCR (Zhou et al., 2009). Après préparation des bibliothèques, les amplicons ont été séquencés sur un séquenceur Ion Proton (life technologies). Les reads obtenus ont alors été nettoyés par le logiciel Trimmomatic 0.32 (Bolger et al., 2014) puis ont été alignés avec un génome de référence par le logiciel Bowtie 2 (Langmead et al., 2009) afin d'obtenir une séquence consensus. Ces séquences consensus ont alors été comparées avec les séquences recréées par assemblage *de novo*.

### 1.3. Phylogénie des génomes viraux

Les analyses phylogénétiques des virus IAHP A(H5N8) ont été réalisées sur les 8 segments viraux concaténés puis alignés par ClustalW. Une vérification préliminaire qu'aucun virus IAHP A(H5N8) réassortant n'était présent a été entreprise grâce au logiciel RDP4. Les séquences des virus HP A(H5N8) identifiés en France ont été comparées aux séquences virales d'IAHP A(H5N8) européens, russes et kazakhs de la même période épizootique et disponibles dans les banques de données internationales. L'analyse phylogénétique a ensuite été réalisée par la méthode de Neighbor-joining avec le modèle Tamura-3-parametres ainsi que 1000 réplicats de bootstrap.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1 Chronologie de détection des IAHP H5

Le 10 novembre 2020, des signes cliniques évocateurs d'IAHP ont été observés sur des poulets, des canards et des paons dans une animalerie en Corse, France. Après un criblage positif en rRT-PCR gène M et gène H5, la présence du virus IAHP A(H5N8) a été confirmée. Par la suite, les détenteurs d'oiseaux en lien épidémiologique direct ou indirect avec ce premier cas ont été investigués. Au total, 10 cas d'IAHP A(H5N8) liés à la première détection ont été confirmés, 8 dans les départements de Haute-Corse-2B et de Corse-du-Sud-2A, 1 dans le département des Yvelines-78 et 1 échantillon environnemental dans le département du Nord-59. Selon l'enquête épidémiologique menée par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, l'hypothèse la plus probable était que les cas corses (départements de Haute-Corse-2A et de Corse-du-Sud-2B) avaient été contaminés du fait d'un transport d'ois infectées provenant du détenteur d'oiseaux d'ornements du département Nord-59. Par la suite, des virus IAHP A(H5) ont également été détectés en France chez des oiseaux sauvages, des oiseaux captifs et chez des volailles, touchant notamment les deux principales zones de production de canards de l'Ouest et du Sud-Ouest de la France (Anses, 2017). Le nombre

de cas d'IAHP A(H5) par semaine détectés en France a été variable pendant la période d'épizootie en France. Pendant 7 semaines consécutives (semaines 45 à 51 de 2020), entre 2 et 5 confirmations hebdomadaires d'IAHP A(H5) ont été diagnostiquées, provenant principalement d'établissements avicoles commerciaux d'oiseaux d'ornements et d'oiseaux sauvages. Par la suite, malgré les mesures de contrôle mises en place, le nombre de cas par semaine a augmenté rapidement pour atteindre un maximum de 147 cas confirmés en semaine 2 de 2021, presque exclusivement en provenance du Sud-Ouest de la France (Figure 1). Cette augmentation soudaine était due à l'introduction du virus d'IAHP A(H5) dans la zone à forte densité d'élevages de canards du Sud-Ouest de la France où un nombre important de canards domestiques étaient encore élevés en plein air alors même que le confinement de toutes les volailles était déjà requis (période de risque élevé d'influenza aviaire) (Anses, 2021). Après la semaine 6 de 2021, le nombre de cas a diminué pour atteindre moins de 13 cas d'IAHP A(H5) par semaine. La dernière détection a eu lieu le 2 juillet 2021, neuf semaines après la précédente détection du virus IAHP en France (Figure 1). Au total, du 10 novembre 2020 au 2 juillet 2021, 519 cas d'HP A(H5) ont été détectés en France, 24 chez des oiseaux sauvages, 2 chez des oiseaux captifs, 492 chez des volailles (très majoritairement localisées dans le sud-ouest de la France) et un dans des échantillons environnementaux. 462 virus ont été identifiés comme étant des virus IAHP A(H5N8), trois ont été identifiés comme étant des virus IAHP A(H5N3) provenant de bécasseaux maubèche et de courlis cendrés, un seul a été identifié comme étant un virus IAHP A(H5N1) provenant d'une oie bernache (figure 2).

## 2.2 Analyses phylogénétiques

L'analyse des génomes montre que les virus français d'IAHP A(H5N8) appartenaient au cours de l'épisode 2020-2021 au génotype A, ce qui correspond au génotype le plus fréquemment détecté parmi les sept génotypes de virus IAHP A(H5N8) décrits en Europe l'hiver dernier (Fusaro et al., 2021). L'analyse phylogénétique des génomes concaténés démontre que les virus français se répartissent en 9 génogroupes, ce qui suggère qu'au moins neuf introductions indépendantes de virus IAHP A(H5N8) ont eu lieu en France. Le premier génogroupe était le plus important en nombre de détections et en distribution géographique. En effet, il comprend la quasi-totalité des cas d'infection détectés avant le 9 janvier 2021. Ce premier génogroupe viral présentait une large répartition géographique incluant des cas détectés dans les départements français 2A, 2B, 13, 14, 40, 44, 54, 65, 79 et 85 (Figure 2). Les séquences de ce génogroupe étaient étroitement liées aux séquences des virus détectés en fin d'année 2020 en Angleterre, en

Belgique, en Irlande et aux Pays-Bas. Tous les autres génogroupes phylogénétiques (notés 2 à 9) n'ont été détectés que sporadiquement sur le territoire français, avec de 1 à 6 détections pendant la période épizootique, sur des oiseaux de basse-cour, des oiseaux captifs ou des oiseaux sauvages. Pour les génogroupes détectés à plusieurs reprises, ces détections ont eu lieu dans des zones géographiques réduites et sur un pas de temps réduit, à l'exception du génogroupe 5. En effet, les deux séquences du génogroupe 5 ont été identifiées dans le Nord de la France à la mi-mars 2021 et dans le Loiret-45 en juillet 2021, à plus de 3 mois d'intervalle. Ce résultat suggère une possible circulation inapparente de virus appartenant à ce génogroupe viral pendant quelques mois en France, probablement chez des oiseaux sauvages résidents ou commensaux, ou bien une persistance de virus A(H5N8) infectieux dans l'environnement.

## 2.3 Evolution de l'épizootie d'IAHP A(H5) 2020-2021

En France, l'épizootie d'IAHP A(H5) de 2020-21 a été globalement très similaire à la précédente épizootie d'IAHP A(H5) de 2016-17 (Ramey et al., 2021). En effet, au cours de ces deux périodes épizootiques, environ 500 cas d'IAHP A(H5N8) ont été identifiés. De plus, les cas ont été essentiellement détectés dans les élevages de canards du Sud-Ouest de la France (qui est une zone à haut risque de transmission de l'influenza aviaire entre établissements avicoles en raison du grand nombre d'élevages de palmipèdes regroupés sur un nombre réduit de communes (élevages essentiellement basés sur l'élevage plein air) et seulement à quelques reprises dans le reste de la France chez des oiseaux sauvages et des volailles. Mais contrairement à 2016-17, quatre cas d'IAHP A(H5N8) ont été détectés dans des élevages de canards domestiques dans une autre zone à forte densité d'élevages de canards du Nord-Ouest de la France. Cette introduction du virus dans cette zone n'a pas été suivie d'une augmentation des cas d'IAHP A(H5N8) comme dans la zone du Sud-Ouest (figure 2). Cette différence de propagation virale entre ces deux zones peut s'expliquer par les différences dans les structures et les conditions d'élevages des canards. La surveillance de l'influenza aviaire en France, notamment pour les élevages de canards, reste essentielle pour limiter la propagation des virus IA et les pertes économiques de la filière avicole (pertes qui ont été estimées à 500 millions € lors des épizooties d'IAHP). Cette surveillance est d'autant plus importante que ce virus peut présenter selon les conditions de protection utilisées un potentiel zoonotique, comme cela a été décrit en Russie en décembre 2020 lors d'une forte exposition à des volailles infectées. Enfin, le séquençage complet du génome des virus IAHP permet d'identifier les relations génétiques entre les virus et suggère plusieurs

introductions virales en France ainsi que l'existence de liens épidémiologiques ou de chaînes de transmission au niveau national ou entre les élevages.

## CONCLUSION

En résumé, durant toute la période épidémiologique 2020-21 en France, 11 introductions virales d'IAHP A(H5) ont été identifiées, neuf à partir de virus IAHP A(H5N8), une à partir de virus A(H5N1) et une à partir de virus A(H5N3), le sous-type H5N8 identifié chez des volailles, d'oiseaux sauvages et d'oiseaux captifs et les sous-types H5N1 et H5N3 chez des oiseaux sauvages uniquement.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Evaluation des niveaux de risque influenza aviaire et leur évolution. 2017.

<https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2017SA0203-partie2.pdf>

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Retour d'expérience sur la crise influenza aviaire hautement pathogène 2020-2021. 2021.

<https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2021SA0022.pdf>

European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control and European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Adlhoch C, Fusaro A, Gonzales JL, Kuiken T, Marangon S, Niqueux É, Staubach C, Terregino C, Muñoz Guajardo I, Lima E, Baldinelli F. Avian influenza overview May - September 2021. EFSA J. 2021 Mar 3;19(3):e06497.

Fusaro AT, C. Update on the genetic characteristics of HPAI H5NX and analyses of the situation of HPAI in wild birds in Europe in 2020-2021. 2021. [https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-06/reg-com\\_ahw\\_20210617\\_hpai\\_eurl.pdf](https://ec.europa.eu/food/system/files/2021-06/reg-com_ahw_20210617_hpai_eurl.pdf)

Ramey AM, Reeves AB, Lagasse BJ, Patil V, Hubbard LE, Kolpin DW, et al. Evidence for interannual persistence of infectious influenza A viruses in Alaska wetlands. Sci Total Environ. 2021 Sep 3;803:150078.

Slomka MJ, Coward VJ, Banks J, Löndt BZ, Brown IH, Voermans J, Koch G, Handberg KJ, Jørgensen PH, Cherbonnel-Pansart M, Jestin V, Cattoli G, Capua I, Ejdersund A, Thorén P, Czifra G. Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. Avian Dis. 2007 Mar;51(1 Suppl):227-34.

Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y, et al. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. J Virol. 2009;83:10309-13.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014 Aug 1;30(15):2114-20.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009;10(3):R25.

**Figure 1.** Distribution temporelle du nombre de virus IA A(H5) détectés par semaine en France entre le mois de Novembre 2020 et le mois juillet 2021.

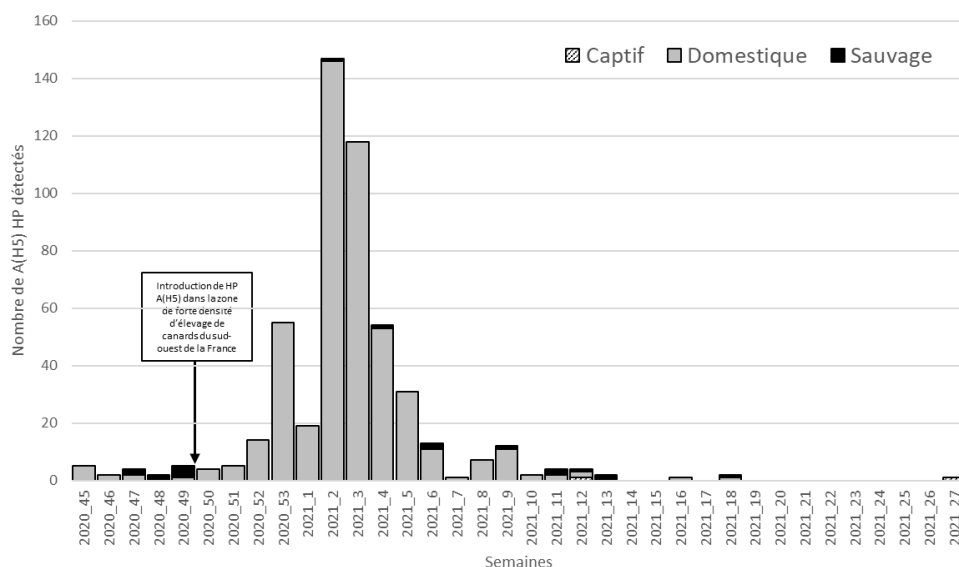


**Figure 2.** Répartition géographique des sous-types IAHP A(H5) et des génogroupes de IAHP A(H5N8) détectés en France entre le mois de Novembre 2020 et le mois juillet 2021

