

CONTRIBUTION DE L'EPITHELIUM DES PLUMES A LA DISSEMINATION ET A L'ECOLOGIE DES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES HAUTEMENT PATHOGENES DE CLADE 2.3.4.4B

Nicolas Gaide¹, Fabien Filaire¹², Kateri Bertran³, Manuela Crispo¹, Malorie Dirat¹, Aurélie Secula¹, Charlotte Foret-Lucas¹, Bruno Payré⁴, Albert Perlas³, Guillermo Cantero³, Natàlia Majó^{3,5}, Sébastien Soubies¹ & Jean-Luc Guérin¹

¹IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, 31300 TOULOUSE,

²THESEO France, LanXess Biosecurity, LanXess Group, LAVAL,

³IRTA-UAB en Sanitat Anima, CReSA. Campus de la Universitat UAB, 08193 BELLATERRA,

⁴CMEAB, University of Toulouse, TOULOUSE.

⁵Departament de Sanitat i Anatomia animals. Facultat de Veterinària. Campus de la Universitat UAB, 08193, BELLATERRA.

jean-luc.guerin@envt.fr

RÉSUMÉ

Les plumes sont des annexes abondantes de la peau des oiseaux aujourd'hui reconnues pour leur susceptibilité à l'infection par les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP). Cependant, il n'est pas clair si les plumes jouent un rôle actif dans la transmission virale. Cette étude vise à examiner la contribution de l'épithélium plumeux à la dissémination des VIAHP de la lignée H5 clade 2.3.4.4b goose/Guangdong/1996 dans l'environnement, en se basant sur des infections naturelles et expérimentale de canards domestiques. Au cours des épizooties de 2016 à 2022, les HPAIV de type H5 présentent un tropisme persistant, fréquent et marqué pour l'épithélium des plumes chez les canards domestiques. Sur le plan pathologique, l'infection des plumes conduit à la nécrose et au clivage de l'épithélium plumeux et à la production et la libération de virions infectieux. L'analyse d'aérosols prélevés en élevages confirmés VIAHP H5 positifs révèle une colocalisation des antigènes viral et tégumentaire plumeux. En résumé, l'épithélium des plumes contribue à la réplication virale et constitue une source probable de matériel infectieux dans l'environnement. Cette voie d'excrétion sous-estimée pourrait avoir un impact considérable sur l'écologie des HPAIV, en facilitant les infections aéroportées, les infections liées au lissage au sein d'un groupe d'oiseaux, et en favorisant une infectiosité virale prolongée et une transmission virale à longue distance entre les exploitations avicoles.

ABSTRACT

Feathers are abundant appendages of birds' skin susceptible to infection by High Pathogenicity Avian Influenza Viruses (HPAIVs). However, it remains unclear whether feathers actively contribute to environmental diffusion and viral transmission. This study aims to investigate the role of the feather epithelium in the dissemination of H5 clade 2.3.4.4b goose/Guangdong/1996 lineage HPAIV in the environment, based on natural and experimental infections in domestic ducks. During the epizootics from 2016 to 2022, H5 HPAIVs exhibited persistent, frequent, and marked tropism for the feather epithelium in domestic ducks. Pathologically, feather infection led to necrosis and cleavage of the feather epithelium, resulting in the production and release of infectious virions. Analysis of aerosols collected in confirmed H5-positive HPAIV farms revealed co-localization of viral and feather tegument antigens. In summary, feather epithelium contributes to viral replication and constitutes a likely source of infectious material in the environment. This underestimated excretion pathway could have a significant impact on the ecology of HPAIVs by facilitating airborne infections, ethological-related transmission infections such as preening, and promoting prolonged viral infectivity and long-distance viral transmission between poultry farms.

INTRODUCTION

Les virus de l'influenza aviaire hautement pathogènes (VIAHP) de la lignée H5 clade 2.3.4.4b goose/Guangdong/1996 (Gs/GD) ont eu un impact considérable sur l'industrie avicole et les populations d'oiseaux sauvages ces dernières années, entraînant l'abattage à grande échelle de volailles et la mortalité massive d'espèces en danger dans le monde entier.¹ Les canards, en particulier, jouent un rôle crucial dans la transmission des VIAHP en raison de l'excrétion de grandes quantités de matériel infectieux pendant la phase pré-symptomatique, qui peut durer plusieurs jours. Les principales voies d'excrétion comprennent les voies digestives et respiratoires. Dans le but de développer des mesures de contrôle efficaces, il est essentiel de bien comprendre les mécanismes sous-jacents à l'infection et à la dissémination des VIAHP chez les canards. Sur le plan clinique, l'infection des canards domestiques, par les VIAHP de la lignée H5 clade 2.3.4.4b peuvent conduire à des troubles neurologiques et à une mortalité. Les constatations pathologiques rapportées incluent une triade lésionnelle associant encéphalite, myocardite et pancréatite. Cependant, étant donné que ces virus se répliquent de manière systémique, ils peuvent être détectés dans de nombreux autres tissus.^{2,3}

Le tropisme viral fait référence à la capacité d'un virus à infecter et à se répliquer dans des cellules et tissus conduisant à la libération de nouveaux virions pouvant se manifester par des lésions. Le tropisme viral joue donc un rôle critique dans l'écologie virale, car le spectre de tissus et d'organes susceptibles à l'infection virale détermine les signes cliniques, la durée et les voies d'excrétion virale.³ Les follicules plumeux sont reconnus comme un site de réplication des VIAHP de sous-type H5 et H7 chez les ansériformes et les gallinacés.⁴⁻⁶ Les plumes sont des annexes cutanées, externes, abondantes. À l'état immature, ce sont des structures tubulaires en croissance, nourries par la pulpe vascularisée et protégées par une gaine externe. Au cours de leur croissance, l'épithélium des plumes prolifère et se différencie en barbes et en barbules. La gaine externe s'ouvre et l'épithélium entre en contact avec l'environnement extérieur (l'air). Les données expérimentales montrent que les plumes infectées permettent une réplication virale productive, et que l'infectiosité des plumes prélevées sur des carcasses peut persister pendant 160 jours et 15 jours post-mortem à 4°C et 20°C, respectivement.⁷ De plus, la stabilité des VIAHP serait augmentée par les sécrétions de la glande uropygienne associée aux comportements de lissage (*preening*).⁸

Les poussières collectées dans les élevages avicoles sont composées de diverses particules provenant de l'alimentation, des excréments, de la peau, des plumes, des débris de litière, des micro-organismes et de fragments d'insectes. Les plumes peuvent représenter 10% de la poussière trouvée dans les étables de poules pondeuses commerciales.⁹ La

poussière est connue pour contribuer à la dispersion virale des VIAHP au sein des exploitations. De plus, les particules inhalables (<100 µm) peuvent conduire à une transmission aérienne entre congénères.^{10,11} Néanmoins la contribution spécifique des plumes à l'excrétion et la diffusion environnementale de VIAHP demeurent floues.

Cette étude a pour but de caractériser, chez le canard domestique, le tropisme plumeux des VIAHP de sous-type H5, et d'investiguer leur rôle potentiel dans la diffusion environnementale, en combinant des infections naturelles et expérimentales.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Infections spontanées

8 lots de canards domestiques (2 lots de canard de barbarie, 6 lots de canard mulards) issus d'élevages français confirmés positifs pour le VIAHP H5 par les tests officiels ont été collectés sur le terrain, au cours des foyers 2016-17 (8 sujets), 2020-21 (10 sujets) et 2021-22 (18 sujets). Pour chaque individu, des échantillons de peaux et de plumes immatures ont été prélevés, fixés en solution tamponnée de formaldéhyde 10%,

1.2. Infections expérimentales

50 canards mulard domestiques de 5 semaines d'âge ont été infectés par voie intra-choanale avec 5 log¹⁰ EID₅₀ de A/mulard duck/France/171201g/2017 (H5N8/2017) ou A/Mule duck/France/20320/2020 (H5N8/2020) et suivis pendant 14 jours post-inoculation (jpi). Les groupes incluaient : un groupe témoin, non infecté (n=3) et pour chaque virus testé un groupe inoculé (n=16), ainsi qu'un groupe contact (n=6) ajouté dans chaque box 24 heures après inoculation. La charge virale des plumes immatures a été suivie sur 10 sujets inoculés par virus et 6 sujets contact à 0, 2, 4, 7, 10 et 14 jpi. La charge virale des plumes a été déterminée après extraction des ARN (kid ID gene Mag Fast Extraction kit et robot d'extraction IDEAL 32). Les PCR ont été réalisées à l'aide de kits H5/H7 Triplex (Innovative diagnostics) selon les recommandations techniques du fournisseur. En parallèle, une autopsie complète a été réalisée sur les canards inoculés 3 et 5 jpi (n=3 sujets par point cinétique et par virus). À l'autopsie, des échantillons de peau, de plumes en croissance incluant la tête, l'aile et la queue ont été prélevés et fixés en solution tamponnée de formol 10% pour caractérisation lésionnelle et évaluation de la distribution virale antigénique.

1.3. Histopathologie et détection virale *in situ*

Après fixation formolée, les tissus ont été inclus en paraffine, coupés à 3 µm d'épaisseur, colorés en Hémalum-Eosine (H&E) pour la caractérisation des lésions, et traités par immunohistochimie anti-nucléoprotéine (NP) influenza A pour évaluer la distribution virale antigénique.²⁴ Une hybridation *in*

situ RNAscope ciblant le gène M du virus de l'influenza aviaire a été effectuée sur une sélection de sections de plumes dans le but de confirmer la présence d'ARN viraux au sein des lésions.²⁵

1.4. Microscopie électronique à transmission

Les analyses ultra-structurales ont été effectuées sur un total de 6 sections tissulaires de plumes en croissance d'un canard infecté par le VIAHP H5 2017, après fixation (glutaraldéhyde 2%, Tétraoxyde d'osmium 1%) et lavages en solution de Sörensen. Après déshydratation en solution d'éthanol puis d'oxyde de propylène, les tissus ont été inclus en résine Epoxy (EMBed 812). L'analyse ultra-structurale a été conduite sur des sections ultrafines de 70 nm après coloration à l'acétate d'uranyle 3% and citrate de plomb. L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique Hitachi HT7700.

1.5. Titration virale

Dans le but de déterminer si la réplication virale plumeuse aboutit à la libération effective de virions infectieux, des plumes immatures, issues de deux lots de canards infectés par le VIAHP H5 2021 stockés à -80°C, ont été utilisées. Dans un premier temps, ces plumes ont subi une étape de décontamination externe à l'éthanol 70% par immersion après avoir scellé les extrémités à l'aide de cire. Dans un second temps, les plumes ont été disséquées pour prélever l'épithélium plumeux, la pulpe et la gaine externe après décontamination externe. Les échantillons prélevés ont été placés en tampon PBS BSA 0,5% pendant 30 min à température ambiante. Les échantillons d'épithélium ont été soumis à une dissociation mécanique à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes permettant de distinguer une fraction dite « libre » (avant homogénéisation) et « liée » (après homogénéisation). Une titration a ensuite été effectuée à partir des surnageants à l'aide de cellules MDCK, par la méthode de Matrosovitch et al (2006).²⁶

1.2. Caractérisation microscopique des aérosols

Les aérosols d'élevages de canards confirmés H5-HPAIV positifs ont été prélevés au cours des foyers 2021-2022 à l'aide d'un collecteur cyclonique Coriolis compact (20 min 50 L/min) et stockés à -80°C. 100 µL de ces aérosols ont été centrifugés 10 min à 300 g. Après élimination du surnageant, le culot a été remis en suspension dans 50 µL de PBS puis mélangé à 100 µL d'Histogel en surfusion à 60°C +/- 5°C. Les blocs de poussières ont ensuite été fixés en solution tamponnée de formaldéhyde 10% et inclus en paraffine selon le protocole de routine pour analyse histologique (coloration H&E) et immunofluorescence double combinant la détection de l'antigène virale nucléoprotéine influenza A et la détection de protéines associées aux kératines (*Corneous beta-protein*).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Profil lésionnel

Sur l'ensemble de la période analysée (2016-2022), l'infection spontanée des canards domestiques par les VIAHP H5 de clade 2.3.4.4b se traduit par l'apparition d'une nécrose, multifocale à diffuse, touchant l'épithélium des plumes en croissance (Figure 1A), tant sur les segments indifférenciés, que sur les segments différenciés. Cette nécrose conduit à la dissociation, au clivage de l'épithélium, et à la libération de fragments dans la cavité délimitée par la gaine externe. Elle s'accompagne d'une inflammation active du derme plumeux associant congestion, exsudation, et infiltration par des leucocytes de nature variable (hétérophiles, macrophages, lymphocytes).

2.2. Détection virale *in situ*

Les antigènes sont principalement détectés dans le compartiment épithélial plumeux (Figure 1B et 1C), se colocalisant avec les lésions de nécrose. Ils sont en revanche moins fréquents et moins marqués dans les autres compartiments de la plume comprenant la gaine externe, le derme plumeux, les plumes matures et la peau. On constate toutefois pour les sujets des foyers 2021-22 une distribution plus étendue des antigènes viraux dans les différents compartiments tégumentaires. L'hybridation *in situ* RNAscope confirme la présence d'ARN viraux au sein des lésions, en concordance avec la distribution virale antigénique. Les analyses ultra-structurales des sections de plume infectée indiquent la présence au sein de l'épithélium plumeux de particules filamenteuses libres ou à la surface des cellules épithéliales, évoquant des virions de forme filamenteuse, mesurant 60-80 nm de diamètre et mesurant jusqu'à 500 nm de longueur. Ces résultats suggèrent que l'infection virale de l'épithélium plumeux aboutit à la production de particules virales et à leur accumulation dans la lumière délimitée par la gaine plumeuse.

2.3. Dynamique d'infection

Les ARN viraux sont détectés dans les plumes en croissance à partir de 2 jpi, pour atteindre un maximum de détection à 4 jpi. La détection est positive sur les deux groupes jusqu'à 14 jpi au sein des sujets testés encore vivants. A 3 jours-post-infection, en phase pré-symptomatique, les antigènes viraux sont principalement détectés dans le derme de la plume. Au sein de l'épithélium l'expression est multifocale d'intensité légère à modérée. A 5 jpi, lorsque l'expression clinique est maximale (syndrome neurologiques, mortalité), la détection des antigènes viraux s'étend sur l'ensemble de l'épithélium plumeux. L'expression est diffuse, en particulier pour le virus H5N8/2016-2017. Ces résultats indiquent que la réplication des VIAHP H5 de clade 2.3.4.4b dans l'épithélium plumeux de canards domestiques est rapide, précédant l'apparition des signes cliniques, maximale en phase symptomatique et persistante sur les sujets encore

vivants dans les 14 jours suivant une inoculation expérimentale par voie intra-choanale.

2.4. Infectiosité des compartiments plumeux

Bien que des niveaux de charge virale infectieuse soient notés au niveau de la gaine externe, à des niveaux modérés ($2,16 \log_{10}$ Unités formant plages de lyse FFU/mL), la décontamination à l'éthanol a permis de réduire drastiquement l'infectiosité, jusqu'à des niveaux inférieurs à la limite de détection sur 8 échantillons sur 10 (Figure 2B). Des niveaux de charge élevée ($4,39 \log_{10}$ FFU/mL) ont été détectés après incubation simple (fraction libre). Un titre viral similaire a été noté après agitation mécanique des échantillons épithéliaux (fraction liée). Enfin, la pulpe présente un niveau de charge de $3,53 \log_{10}$ FFU/mL en moyenne. Statistiquement, les niveaux de charges sont plus élevés dans l'épithélium que dans les autres compartiments (ANOVA $p < 0,05$). Ces résultats supportent l'hypothèse que l'infection de l'épithélium plumeux conduit à une production élevée de particules virales infectieuses par l'épithélium en particulier.

2.5. Investigation histologique des aérosols d'élevages

L'étude morphologique des aérosols collectés sur le terrain révèle la présence d'une communauté d'éléments d'aspect organiques et inorganiques incluant des amas bactériens, des champignons microscopiques, des particules informes de nature indéterminée ainsi que la présence d'éléments aciculés (allongés, à bords pointus), acidophiles, pâles, à noyau fantomatique et à réfringence variable. Ils mesurent en moyenne 50 à 200 μm de longueur et 5 à 10 μm de large. Sur le plan antigénique ces éléments sont positifs pour l'antigène CBP indiquant une origine tégumentaire, plumeuse notamment. Une colocalisation de l'antigène anti-nucléoprotéine influenza A est fréquemment observée au niveau de

ces structures. Les données suggèrent, sur la base d'une détection antigénique, la présence de fragments de plumes infectés dans les aérosols d'élevages infectés par les VIAHP H5 de clade 2.3.4.4b.

2.6. Discussion

Collectivement, les résultats ci-dessus indiquent que les VIAHP sont capables chez le canard domestique, de disséminer par voie sanguine, pénétrer dans les plumes, infecter l'épithélium en croissance, d'induire une mort et un détachement de cellules infectées, aboutissant à la libération de particules virales infectieuses. Sur le plan dynamique, cette infection débute avant la phase symptomatique et aboutit au cours de la phase symptomatique à une charge virale élevée et infectieuse. Sur le plan environnemental, les données suggèrent la diffusion de débris de plumes infectées au sein des particules aéroportées. Ces données suggèrent donc que les plumes en croissance constituent une voie alternative de diffusion des VIAHP H5 s'ajoutant aux voies digestive et respiratoire. Des études additionnelles sont nécessaires pour 1) quantifier plus finement la contribution de cette voie de diffusion ; 2) évaluer les déterminants de ce tropisme, qu'il soit viral ou lié à l'hôte ; 3) investiguer les mécanismes conduisant à une persistance accrue de l'infectiosité virale des plumes infectées.

CONCLUSION

En résumé, l'épithélium des plumes en croissance est un contributeur majeur de la réplication des VIAHP H5 de clade 2.3.4.4b chez le canard domestique. Il constitue une source de matériel infectieux pouvant potentiellement diffuser dans l'environnement. Cette voie d'excrétion, souvent sous-estimée, pourrait influencer significativement l'écologie des VIAHP et les modalités de transmission.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Shi, J. et al, 2023. Emerg. Microbes Infect. 12, 2155072.
2. Pantin-Jackwood, M. J. et al, 2017. Vet. Res. 48, 33.
3. Pantin-Jackwood, M. J. & Swayne, D. E, 2009. Rev. Sci. Tech. OIE 28, 113–136 (2009).
4. Yamamoto, Y. et al, 2007. Avian Dis. 51, 744–749.
5. Yamamoto, Y. et al, 2008. Emerg. Infect. Dis. 14, 1671–1672.
6. Nuradji, H. et al, 2017. Vet. Pathol. 54, 226–233.
7. Yamamoto, Y., et al, 2010. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5496–5499.
8. Karunakaran, A. C. et al, 2019. Transbound. Emerg. Dis. 66, 1306–1313.
9. Ahaduzzaman, M., et al, 2021. Poult. Sci. 100, 101188.
10. Filaire, F. et al. 2022. Emerg. Infect. Dis. 28, 1446–1450.
11. Wang, C. C. et al. Airborne transmission of respiratory viruses. Science 373, eabd9149 (2021).
12. Landmann, M. et al, 2021. Viruses 13, 868 (2021).
13. Gaide, N. et al, 2023. J. Vet. Diagn. Invest. 10406387231182384.
14. Matrosovich M, et al, 2006. Virol J 3: 63. doi:10.1186/1743-422X-3-63.

Figure 1. Lésion et distribution virale antigénique au sein des plumes de canard domestiques infectés par les VIAHP de sous-type H5 et de clade 2.3.4.4b de 2016 à 2022. A, illustration microscopique de plumes immatures saine et infectée en coloration Hémalum et Eosine (H&E) et immunohistochimie anti- nucléoprotéine influenza A (IHC). Echelle : 100µm. B, Fréquence de la détection virale antigénique (nombre de sujets positifs par lot). C, Score moyen de détection virale des sujets positifs (0, absence de détection ; 1 : oligo-focal ; 2, multifocal ; 3, diffus).

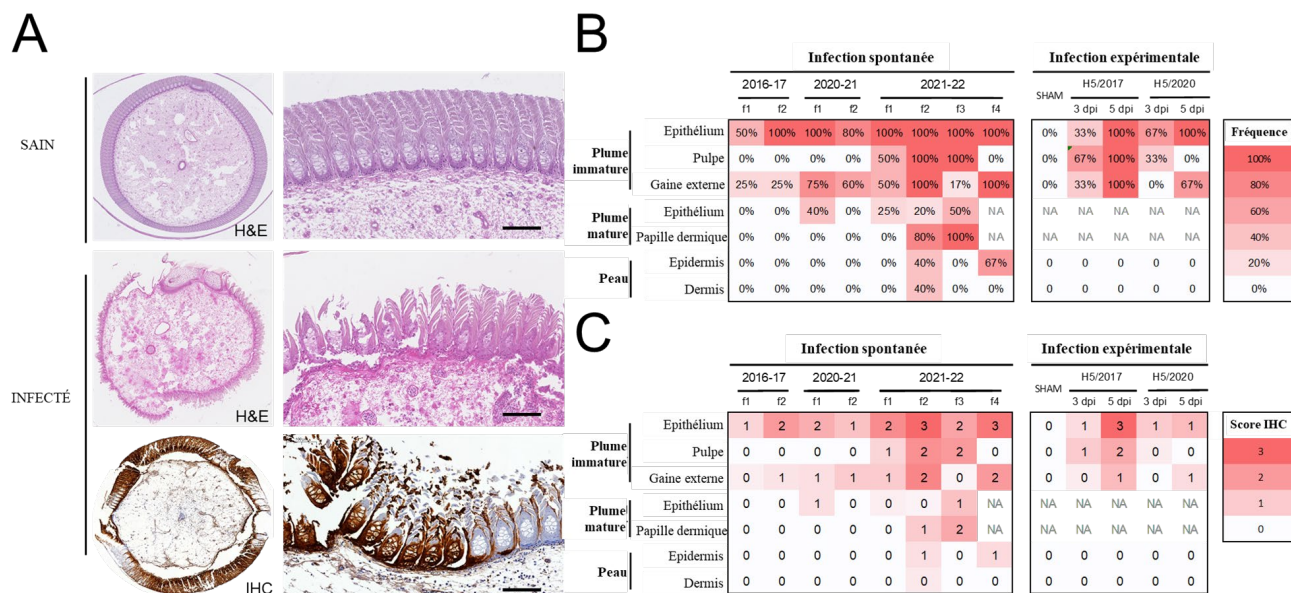


Figure 2. A, illustration des plumes immatures abondantes sur un canard mulard de 40 jours et des compartiments plumeux disséqués pour la titration virale (gaine, sh ; épithélium, ep ; pulpe, pu). B, titration virale en fonction des compartiments plumeux, exprimée en Log₁₀ FFU/mL. Chaque point représente un sujet. La couleur représente un lot.

