

DIVERSITE GENETIQUE DES VIRUS H5 HAUTEMENT PATHOGENES DETECTES DANS LE SUD-OUEST DE LA FRANCE EN 2015-2016

**Briand Francois-Xavier¹, Audrey Schmitz¹, Hirchaud Edouard², Quenault Hélène²,
Blanchard Yannick², Marie-Odile Le Bras¹, Chantal Allée¹, Le Prioux Aurélie¹, Guillou-
Cloarec¹, Ogor Katell¹, Gares Hélène³, Daniel Patrick⁴, Fediaevsky Alexandre⁵, Massin
Pascale¹, Le Bouquin Sophie⁶, Martenot Claire¹, Eterradosi Nicolas¹, Niqueux Eric¹**

¹Anses Unité VIPAC- 41, Rue de Beaucemaine - 22440 PLOUFRAGAN,

²Anses Unité GVB- 41, Rue de Beaucemaine - 22440 PLOUFRAGAN,

³Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche -24138 COULOUNIEIX CHAMIE,

⁴Laboratoire des Pyrénées et des Lande- 40000 MONT-DE-MARSAN,

⁵Direction Générale de l'Alimentation - 75732 PARIS,

⁶Anses Unité EBEAC- 41, Rue de Beaucemaine - 22440 PLOUFRAGAN.

francois-xavier.briand@anses.fr

RÉSUMÉ

Depuis l'identification d'un virus H5N1 hautement pathogène en Dordogne fin novembre 2015 sur des poulets de basse-cour (première détection d'un tel virus en France depuis 2007), 81 foyers en élevage ont été identifiés dans dix départements du sud-ouest de la France. Ces virus ont principalement été mis en évidence dans des élevages de palmipèdes mais également dans des élevages de poulets ou pintades. L'analyse des séquences d'hémagglutinine des virus identifiés dans ces différents foyers a montré qu'elles sont toutes directement apparentées entre elles (site de clivage original HQRKRGLF), ainsi qu'avec des virus H5 faiblement pathogènes ayant précédemment circulé en Europe, mais qu'elles ne sont pas directement apparentées aux séquences des H5 hautement pathogènes de la lignée Gs/Gd/1/96 (potentiellement zoonotique). Grâce à des analyses de « Time of the Most Recent Common Ancestor » (tMRCA), l'âge de l'ancêtre commun de ces séquences H5 hautement pathogènes a été estimé à début 2014 (± 1 an). De plus, la détermination du gène de la neuraminidase a permis d'identifier 3 sous-types (N1, N2, N9), indiquant que des phénomènes de réassortiment ont déjà eu lieu avec d'autres virus Influenza aviaires. L'étude des gènes internes obtenus jusqu'à présent pour plusieurs virus H5N1, H5N2 et H5N9 hautement pathogènes, conforte l'idée que de nombreux réassortiments ont déjà eu lieu, indiquant un nombre important de co-infections depuis l'apparition du premier virus H5 hautement pathogène.

ABSTRACT

Genetic diversity of highly pathogenic H5 viruses detected in South-West of France during 2015-2016

Since the identification of highly pathogenic H5N1 in Dordogne in late November 2015 in backyard chickens (first detection of such viruses in France since 2007), 81 different outbreaks have been identified in ten departments of South-Western France. These viruses have mainly been demonstrated in farms of waterfowl but also in chickens or guinea fowl flocks. Preliminary analysis of the hemagglutinin sequences of the viruses identified in these outbreaks has shown that they are all directly related (original cleavage site HQRKRGLF) and with low pathogenic H5 virus had previously circulated in Europe, but they are not related to the highly pathogenic H5 lineage Gs / Gd / 1/96 (zoonotic potential). Through analysis of "Time of the Most Recent common ancestor", it was also estimated that the common ancestor of the highly pathogenic H5 sequences detected in South-Western France could date back to early 2014 (± 1 year). Moreover, the determination of the neuraminidase gene identified three subtypes (N1, N2, N9) in these viruses, indicating that reassortment events did already occur with other avian influenza viruses. The study of internal genes obtained to date for several H5N1, H5N2 and H5N9 highly pathogenic, supports the idea that many reassortment events did occur. This indicates that a large number of co-infections with highly pathogenic H5 and other influenza viruses did take place since the first highly pathogenic H5 virus emerged.

INTRODUCTION

Les oiseaux aquatiques sont le réservoir des Influenzavirus aviaires (AIV). Le génome des AIV est segmenté en 8 brins d'ARN négatifs codant pour 11 protéines, parmi lesquelles l'hémagglutinine (qui, une fois clivée dans le milieu extérieur, permet au virus entrant dans une nouvelle cellule de se lier à son récepteur) et la neuraminidase (qui permet aux particules virales nouvellement formées de se détacher de la cellule infectée). Actuellement 16 types d'hémagglutinines et 9 types de neuraminidases ont été décrits chez les oiseaux (Fouchier et al., 2005). L'évolution génétique de ces virus peut provenir de différents mécanismes incluant des mutations, des insertions, des délétions, et des réassortiments (Webster et al., 2007). Les mutations sont dues aux erreurs engendrées par le complexe polymérase au cours de la réplication. Ces mutations peuvent notamment changer le motif du site de clivage de la protéine HA, et par exemple le rendre facilement clivable dans tous les tissus de l'organisme, ce qui transforme les virus de sous-types H5 ou H7 faiblement pathogènes (FP) en virus hautement pathogènes (HP). Par ailleurs, des délétions peuvent également être observées sur la neuraminidase lors de l'adaptation du virus aux volailles domestiques (Matrosovich et al., 1999). Enfin, le dernier phénomène pouvant faire évoluer les virus Influenza provient de leur capacité à réassortir entre eux. En effet, lorsque plusieurs virus infectent simultanément un même hôte et se retrouvent au sein d'une même cellule, les virus résultant de cette co-infection peuvent partager des gènes hérités des différents virus parents, phénomène ayant par exemple généré les virus pandémiques (Kawaoka et al., 1989). L'infection par des virus H5 ou H7 FP peut être asymptomatique chez les oiseaux sauvages ou domestiques mais elle peut également entraîner des symptômes non négligeables en cas de co-infections avec d'autres agents pathogènes. De plus, du fait de leur capacité à devenir hautement pathogènes, la présence des virus H5 ou H7 FP chez les volailles est indésirable et fait l'objet d'une réglementation internationale.

De novembre 2015 à décembre 2016, 81 foyers d'IA HP, appartenant à 3 sous-types différents (H5N1, H5N2, H5N9), ont été détectés dans les départements du sud-ouest de la France dans des élevages de canards domestiques ainsi que dans des élevages de poules ou pintades. Afin de mieux comprendre l'évolution génétique (mutations/réassortiments) des virus H5HP, le séquençage complet de 15 d'entre eux a été entrepris.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Détection, sous-typage et pathotypage moléculaire.

Dans un premier temps, les ARN viraux ont été extraits à partir de mélanges de 5 surnageants d'écouvillons trachéaux ou cloacaux (RNeasy mini kit, Qiagen). Ces ARN ont ensuite été testés en rRT-PCR gène M ainsi qu'en rRT-PCR H5 par les laboratoires départementaux agréés. Dans un second temps, les échantillons criblés positifs ont été expédiés au Laboratoire National de Référence pour l'Influenza aviaire et la maladie de Newcastle afin de déterminer la séquence nucléotidique codant la zone de clivage de l'hémagglutinine, par RT-PCR H5 Khal/Kha3 (Slomka et al., 2007). La séquençage d'une partie du gène de la neuraminidase est également réalisé pour déterminer le type de neuraminidase (RT-PCR PanNA ; Gall et al., 2009). Les produits issus de ces deux RT-PCR ont ensuite été séquencés comme décrit précédemment (Briand et al.).

1.2. Isolement viral

A partir des écouvillons cloacaux ou trachéaux individuels certains virus H5 HP ont été isolés/multipliés sur des œufs embryonnés exempts d'organismes pathogènes spécifiés de 9 jours inoculés par voie intra-allantoïdienne. Les virus ainsi multipliés ont été identifiés par inhibition de leur activité hémagglutinante à l'aide d'antisérums de référence selon les recommandations internationales.

1.3. Préparation des bibliothèques, séquençage des génomes par Next Generation Sequencing (NGS), obtention des séquences génomiques

Les ARN les plus positifs en RT-PCR gène H5 ainsi que les ARN extraits de virus H5 HP isolés sur œufs ont été sélectionnés afin de déterminer les séquences complètes des génomes viraux par NGS. Une première étape a consisté à appliquer un traitement par DNase (DNA-free kit ; Ambion) ainsi qu'un traitement réduisant la quantité d'ARN ribosomique (Low Input RiboMinus Eukaryote System Kit ; Ambion). Les ARN ainsi obtenus ont alors été fragmentés par un traitement RNase avant d'être ligés à des adaptateurs nucléotidiques afin de créer les bibliothèques (Ion Total RNA-Seq Kit ; Life Technologies). Après validation de la qualité des bibliothèques, le séquençage a été réalisé par un séquenceur Ion Proton (life technologies) disponible sur la plateforme NGS/Transcriptomique (Anses, Ploufragan). Les séquences (*reads*) obtenus ont alors été nettoyés par le logiciel Trimmomatic 0.32 puis alignés avec un génome de référence par le logiciel Bowtie 2 afin d'obtenir une séquence consensus des génomes viraux étudiés. Par sécurité, ces séquences ont alors été comparées avec les séquences consensus recrées par assemblage *De Novo* des *reads* de départ.

1.4 Analyses phylogéniques et génotypage

Pour chacun des huit segments des virus Influenza, une analyse phylogénique a été effectuée. Pour cela les différentes séquences ont été alignées aux séquences les plus proches de celles des virus H5 HP français disponibles dans les banques de données internationales. La reconstruction de l'arbre phylogénétique par méthode bayésienne et l'estimation des âges (date à laquelle circulait l'ancêtre commun) des différentes ancêtres communs ont été réalisées en utilisant le logiciel BEAST.

La détermination des différents génotypes ainsi que l'estimation du nombre de recombinaisons depuis l'apparition du site de clivage hautement pathogène a été basée sur la comparaison de l'âge des ancêtres commun du gène H5 HP avec l'âge des ancêtres commun obtenus pour chaque groupe obtenu pour les autres gènes. En effet, pour chaque gène, différents groupes phylogénétiques ont été définis si l'ancêtre commun de 2 groupes a été trouvé antérieur à l'estimation de l'âge de l'ancêtre commun de tous les gènes H5 HP français.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

15 virus H5 HP provenant d'élevages du sud-ouest de la France ont été entièrement séquencés. Sur ces 15 virus, 5 correspondent à des virus H5N1, 5 à des H5N2 et 5 à des H5N9. Ces virus présentent tous un site de clivage polybasique de l'hémagglutinine correspondant à des virus hautement pathogènes (motif de clivage original : H₂NRKR/GLF). L'analyse phylogénique du gène H5 (Figure 1), indique bien que ces virus H5 HP français de 2015-2016 sont tous directement apparentés et que la date de circulation de leur ancêtre commun est estimée autour de début 2014 ($\pm$ 1 an). L'analyse phylogénique du gène H5 a également permis de mettre en évidence 2 différents sous-clusters. Le premier sous-groupe est composé des virus H5N2 et H5N9 alors que le second groupe est composé uniquement par des virus H5N1. L'analyse phylogénique des 7 autres gènes a permis d'identifier plusieurs génogroupes. Notamment pour le gène PB2, 4 groupes phylogénétiques différents ont pu être identifiés (Figures 2). De la même manière,

pour les gènes PA, NP, NA et NS 4 groupes ont également été identifiés. Pour les gènes PB1 et M, 5 clusters différents ont pu être définis. Malgré la présence de plusieurs groupes phylogénétiques, toutes les séquences des 15 virus H5 HP français appartiennent à la lignée eurasienne mais sont différentes de celles des gènes retrouvés chez des virus H5N1 HP de lignée asiatiques (Gs/Gd/96). Ces différents groupes phylogénétiques ainsi identifiés, ont permis de déterminer le génotype de chacun des virus (Tableau 1). Pour les 15 H5 virus détectés, 10 virus présentent des génotypes différents indiquant ainsi qu'au moins 9 événements de réassortiment ont eu lieu depuis l'apparition du site de clivage hautement pathogène des virus H5 ayant été découverts dans le sud-ouest de la France entre novembre 2015 et juillet 2016. Ce nombre important de réassortiments indique que de nombreuses co-infection ont eu lieu.

Afin de tenter d'éradiquer le virus H5 HP, un vide sanitaire a été appliqué du 18 avril au 16 mai dans les élevages de production de canards (prêts-à-gaver, en cours de gavage) dans les départements du sud-ouest. Malgré ce vide sanitaire, du virus H5 HP a été détecté dans 4 élevages en juillet 2016. Deux des quatre virus ont été entièrement séquencés et présentent le même génotype que la majorité des H5N1 HP détectés avant le vide sanitaire. Ce résultat semble indiquer que ces virus ne proviennent pas de l'introduction d'un nouveau virus hautement pathogène mais serait le fait de la détection de quelques cas sporadiques restant encore sur le terrain (même après action du vide sanitaire).

CONCLUSION

De novembre 2015 à juillet 2016, la France a été confrontée à un très grand nombre de foyers d'Influenza H5 hautement pathogène. L'analyse des séquences des virus a permis de démontrer que ces virus étaient apparus bien avant leur première détection, permettant ainsi d'évoluer et de réassortir. Afin de contrôler au mieux l'émergence de nouveaux virus HP ou la réémergence de virus H5HP déjà existants, il est essentiel de continuer et/ou renforcer la surveillance des virus Influenza sur le territoire français en particulier dans les élevages de palmipèdes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Briand, F.X., Le Gall-Reculé G, Guillou-Cloarec C, Ogor K, Jestin V.(2010). J Gen Virol, Apr;91(Pt 4):960-70.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus A.D. (2005). J Virol, 79, 2814-2822
- Gall, A., B. Hoffmann, T. Harder, C. Grund, R. Ehrlich, and M. Beer. (2009). J Clin Microbiol 47:2985-8.
- Kawoka, Y., Krauss, S., Webster, R.G. (1989). J Virol, 63, 2189-2191.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawoka, Y., Webster, R.G. (1999). J Virol. 73(2),1146-1155
- Slomka, M.J.; Coward, V.J.; Banks, J.; LöndtZ.; Brown, I.H.; Voermans, J.; Koch, G.; Handberg, K.J.; Jørgensen, P.H.; Cherbonnel-Pansart, M.; Jestin, V.; Cattoli, G.; Capua, I.; Ejdersund, A.; Thorén, P.; Czifra, G. (2007). Avian Dis Mar, 51 (1 suppl) :227-34
- Webster, R.G., Krauss, S., Hulse-Post, D., Sturn-Ramirez, K. (2007). J Wildlife Diseases, 43(3)

Tableau 1. Génotypage de 15 virus H5 hautement pathogènes détectés dans le Sud-Ouest de la France en 2015-2016.

	Après vide		Avant vide sanitaire												
Hôte	poulet	canard	poulet	canard	canard	pintade	canard	pintade	canard	poulet	poulet	poulet	canard	oie	canard
departement	24	24	24	40	24	40	24	40	64	64	64	40	64	65	32
Subtype	H5N1	H5N1	H5N1	H5N1	H5N1	H5N9	H5N9	H5N9	H5N9	H5N9	H5N2	H5N2	H5N2	H5N2	H5N2
Virus Identifiant	160678	160683	150169	150253	150206	150223	150289	150207	150236	160102	160001	160013	160014	150294	150233
PB2															
PB1															
PA															
HA															
NP															
NA															
M															
NS															

Pour chaque ligne, chaque niveau de gris représente un groupe phylogénétique différent.

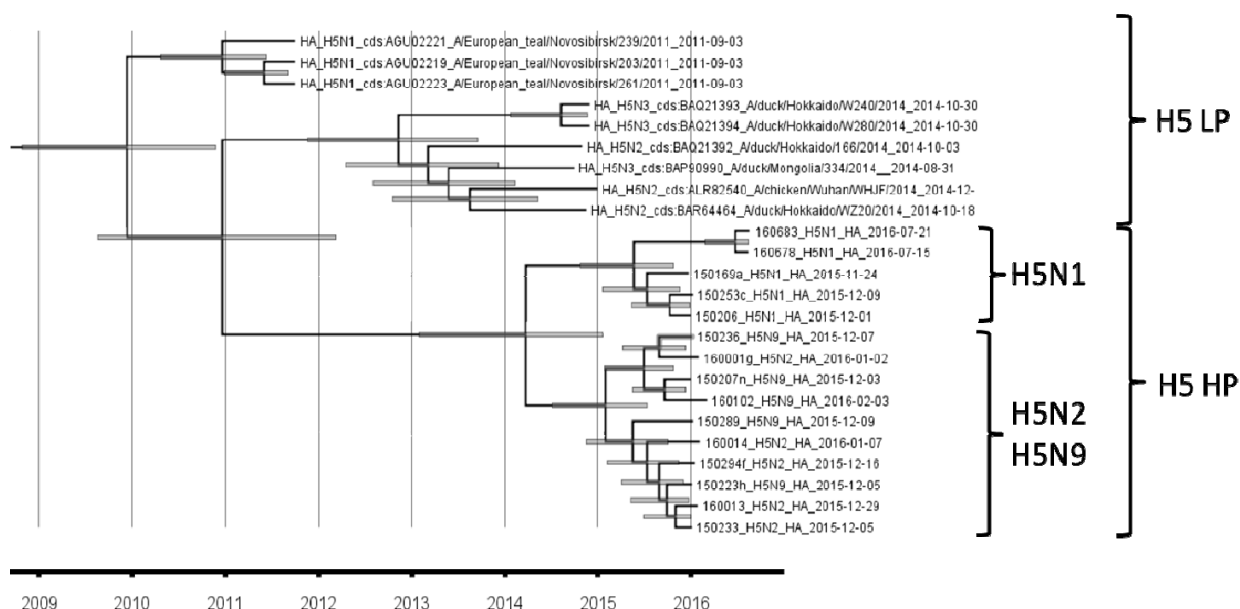


Figure 1.

Arbre MCC (maximum clade credibility) basé sur 1695 nucléotides du gène H5. Les barres horizontales présentent les intervalles de confiance (95% HPD) de la date estimée des ancêtres communs de chacun des nœuds de l'arbre.

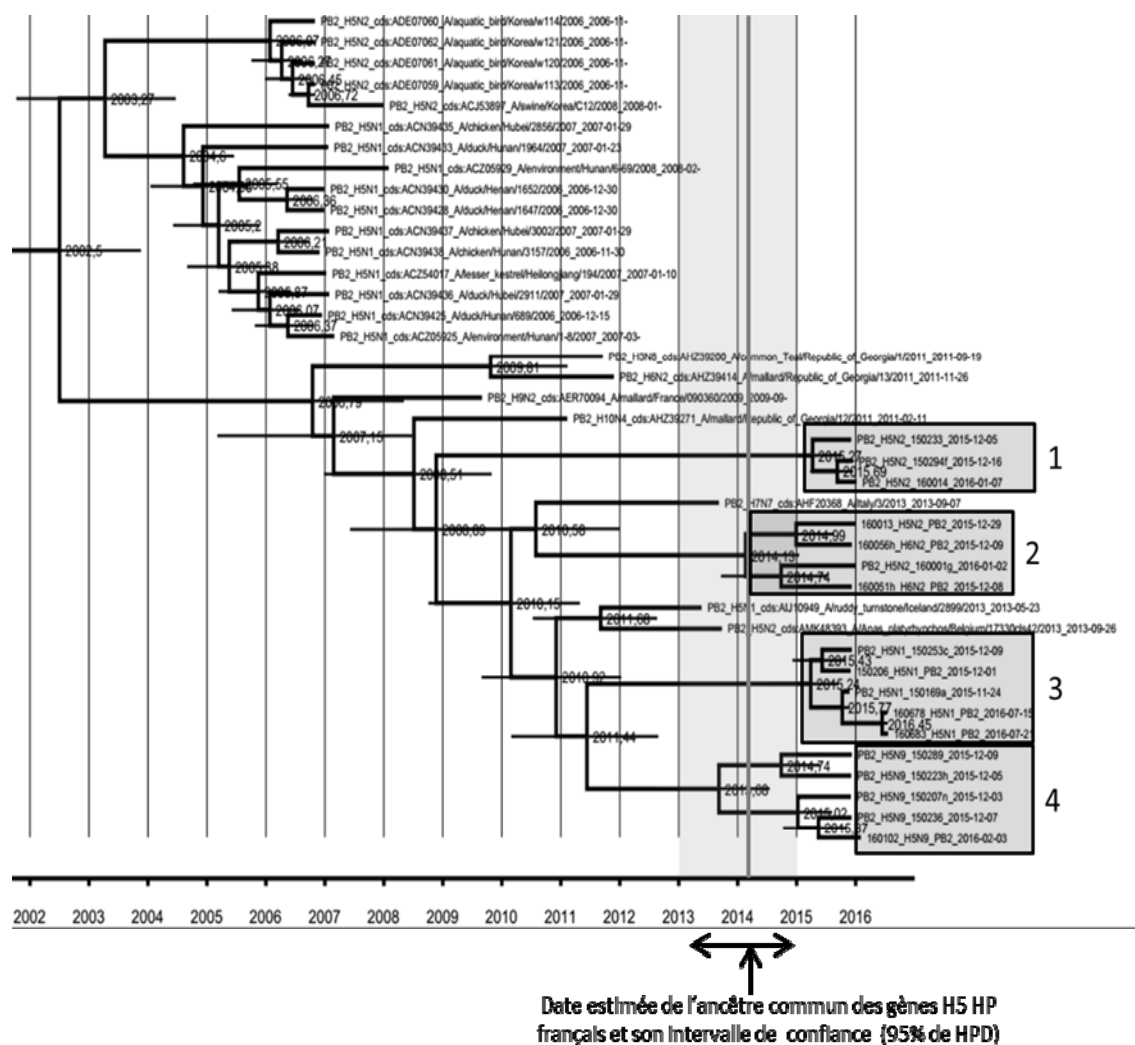


Figure 2.

Arbre MCC (maximum clade credibility) basé sur 2280 nucléotides du gène PB2. Les barres horizontales présentent les intervalles de confiances (95% HPD) de l'âge estimés des ancêtres communs de chacun des nœuds de l'arbre. Les 4 génogroupes différents identifiés pour les virus H5 HP français sont marqués par un rectangle gris.