

**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES INFECTIONS À VIRUS INFLUENZA AVIAIRES
H5 HAUTEMENT PATHOGÈNES CHEZ LE CANARD MULARD
COMPARAISON DES SOUCHES FRANÇAISES RESPONSABLES DES FOYERS
DE 2015-2016 ET 2016-2017**

**Niqueux Éric¹, Schmitz Audrey¹, Briand François-Xavier¹, Massin Pascale¹,
Martenot Claire¹, Cherbonnel Martine¹, Allée Chantal¹, Chatel Marina¹,
Guillemoto Carole¹, Guillou-Cloarec Cécile¹, Kerbrat Florian¹, Lebras Marie-Odile¹,
Ogor Katell¹, Pierre Isabelle¹, Amelot Michel², Courtois David², Mangard Jean-Michel²,
Lecoq Thierry², Scoizec Axelle³, Huneau Adeline³, Le Bouquin Sophie³, Keïta Alassane²,
Grasland Béatrice¹, Eterradosi Nicolas¹**

¹Anses, unité VIPAC, LNR influenza aviaire - BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN, France,

²Anses, SELEAC - BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN, France,

³Anses, unité EpiSaBE - BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN, France,

^{1, 2 et 3}Université Bretagne Loire - CS 54417 - 35044 RENNES, France

eric.niqueux@anses.fr

RÉSUMÉ

De novembre 2015 à juillet 2017, deux épisodes successifs d'infections à virus influenza aviaires (IA) H5 hautement pathogènes (HP) ont touché les élevages de volailles en France, et tout particulièrement la production de palmipèdes gras dans le Sud-Ouest. En 2015-2016, 81 foyers ont concerné exclusivement les élevages de volailles (majoritairement des palmipèdes sans symptômes déclarés). Alors qu'en 2016-2017, les foyers détectés ont touché à la fois les volailles (486 cas) et l'avifaune (55 cas), et la proportion de détections dans le cadre de la surveillance événementielle en élevage était plus élevée que lors de l'épisode précédent.

Un modèle expérimental d'infection chez le canard mulard conventionnel de 6 à 7 semaines a été établi pour une souche H5N1 HP isolée en 2015 et une souche H5N8 HP de 2016. Cette étude a permis de caractériser et de comparer la réceptivité et la sensibilité du canard mulard vis-à-vis de ces souches récentes, ainsi que la dynamique d'infection du virus et son tropisme.

L'infection expérimentale par le virus H5N1 HP n'a engendré ni signes cliniques majeurs ni mortalité liée au virus, et le profil d'excrétion a présenté un tropisme intestinal similaire à celui observé pour des virus IA faiblement pathogènes. Sur ces deux points, le virus H5N8 HP avait des caractéristiques différentes du virus précédent : les signes cliniques étaient plus marqués (avec l'apparition notamment de signes nerveux) et la mortalité était présente (2 canards sur 12). Le tropisme respiratoire marqué de l'infection était également caractéristique des virus H5 HP de lignée A/goose/Guandong/1/1996. Ces caractéristiques expérimentales sont corrélables aux observations épidémiocliniques sur le terrain, et vont permettre une étude des marqueurs génétiques associés à ces phénotypes différents.

ABSTRACT

Highly pathogenic H5 avian influenzavirus experimental infections in mule ducks: comparing French strains from 2015-2016 and 2016-2017 outbreaks

From November 2015 to July 2017, two succeeding episodes of highly pathogenic (HP) avian influenza (AI) H5 infections affected poultry farms in France, mostly domestic ducks raised for fatty liver production in Southwestern France. In 2015-2016, 81 outbreaks were detected in poultry farms only (mostly domestic waterfowl without declared disease). While in 2016-2017, the detected outbreaks affected both poultry (486 cases) and wild birds (55 cases), and the proportion of flocks detected following passive surveillance in poultry was higher than during the previous episode.

An experimental infection model was established in 6 to 7-week old mule ducks, with a HP H5N1 strain isolated in 2015 and a HP H5N8 strain from 2016. We were able to characterize and compare the susceptibility and

sensitivity of mule ducks for these recent strains, as well as the dynamics of infection and the tropism of the tested virus strains.

Experimental infection with HP H5N1 virus did not result in major clinical signs or virus-related mortality, and the excretion pattern had an intestinal tropism similar to that observed for low pathogenic AI viruses. On both previous criteria, the HP H5N8 virus had different characteristics: clinical signs were more noticeable (with the notable appearance of nervous symptoms) and mortality was observed in 2 ducks out of 12. The marked respiratory tropism of the infection was also characteristic of the A/goose/Guangdong/1/1996 lineage HP H5 viruses. These experimental characteristics were consistent with the epidemiological field observations, and will allow further study of the genetic markers associated with these different phenotypes.

INTRODUCTION

De novembre 2015 à juillet 2017, deux épisodes successifs d'infections à virus influenza aviaire (IA) H5 hautement pathogènes (HP) ont touché les élevages de volailles en France, essentiellement en production de canards gras dans le Sud-Ouest. De novembre 2015 à août 2016, 81 foyers d'infections liés à des virus IAHP H5 ont été déclarés dans 10 départements du Sud-Ouest de la France, uniquement en élevages de volailles (Le Bouquin *et al.*, 2016 ; Moisson *et al.*, 2017). Bien qu'au moins trois sous-types de neuraminidase différents (N1, N2 et N9) aient été associés aux virus en cause, les séquences de l'hémagglutinine H5 étaient apparentées entre elles et constituaient un groupe monophylétique dérivé des virus IA H5 de la lignée eurasiennne, distinct de la lignée H5 HP A/goose/Guangdong/1/1996 (Briand *et al.*, 2017 ; Briand *et al.*, 2018). Seuls 30 foyers (15 foyers sur troupeaux de galliformes, soit la totalité des foyers correspondants, et 15 foyers sur troupeaux de palmipèdes) ont été détectés dans le cadre de la surveillance événementielle. Toutefois, le caractère HP de ces virus a bien été confirmé par des tests in vivo de pathogénicité par voie intra-veineuse chez le poulet.

De novembre 2016 à juillet 2017, les foyers d'infections à virus IAHP H5 ont touché à la fois les volailles (486 cas dans 10 départements du Sud-Ouest, de l'Ouest et du Nord de la France) et l'avifaune sauvage (55 cas dans 15 départements sur l'ensemble du territoire). À une exception près, tous ces foyers étaient associés à des virus IA H5 HP différents de l'épisode précédent et appartenant au clade 2.3.4.4 de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996, pour lesquels le sous-type de neuraminidase N8 a généralement été identifié (Bronner *et al.*, 2017). La proportion de détections dans le cadre de la surveillance événementielle en élevage ($216/486 = 44\%$) était plus élevée que lors de l'épisode précédent ($30/81 = 37\%$) et la présentation clinique relevée sur le terrain était également plus marquée.

Un modèle expérimental d'infection chez le canard mulard conventionnel a été établi afin de caractériser et de comparer la réceptivité et la sensibilité du canard

mulard vis-à-vis de deux souches récentes, issues de chacun des épisodes distincts précédemment décrits. De plus, ce modèle permet la description de la dynamique d'infection du virus et de son tropisme, observés en conditions contrôlées.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Procédure d'expérimentation animale

Animaux

Les canards mulards mâles conventionnels ont été achetés à 1 jour d'âge auprès de Grimaud Frères Sélection (49). Les animaux ont été élevés à l'Anses Ploufragan, en conditions confinées et atmosphère filtrée, jusqu'à leur inoculation ou mise en contact.

Virus

Deux virus issus de chacun des épisodes décrits en introduction ont été retenus :

- H5N1 A/chicken/France/150169a/2015 (H5N1 HP 150169a), isolé à partir d'écouvillons trachéaux prélevés sur des poulets de basse-cour (suspicion clinique) au 2^e passage sur œufs embryonnés de poules EOPS. L'index IPIV du virus sur poulets EOPS de 5 à 7 semaines était de 2,9.
- H5N8 A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8 HP 161105a, appartenant au clade 2.3.4.4 de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996), isolé à partir d'écouvillons trachéaux de canards appelants (suspicion clinique) au 2^e passage. L'index IPIV du virus sur poulets EOPS de 5,5 semaines était de 2,9.

Dispositif expérimental

Pour l'étude de chaque virus, deux groupes de canards mulards mâles conventionnels de 6,5 semaines ont été constitués :

- 8 canards ont été infectés, en isolateur, par instillation oculaire d'une dose de 10^6 DIE₅₀ (dans un volume de 100 µl) de virus ;
- 4 canards contacts non infectés ont été introduits dans le même isolateur 24 heures après inoculation.

Le statut séronégatif et vironégatif individuel des canards a été préalablement vérifié vis-à-vis des virus IA, en ELISA NP, en ELISA H5 et en RT-PCR temps réel (rRT-PCR) selon les méthodes décrites en 1.2.

Les animaux occupaient un isolateur de surface accessible aux animaux de 3 m² sur grillage, et avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture.

La procédure d'expérimentation animale a fait l'objet d'un avis favorable du comité d'éthique institutionnel Anses/ENVA/UPEC (demande d'autorisation APAFiS 2017010410579770) et a été conduite en accord avec les législations européennes et françaises.

Prélèvements et examen clinique

Des écouvillons oropharyngés et cloacaux ont été prélevés individuellement quotidiennement après l'inoculation (sauf les 5^e, 6^e, 12^e et 13^e jours) et jusqu'au 18^e jour. Les animaux ont également fait l'objet d'un examen clinique quotidien (observation des signes généraux, respiratoires, nerveux et cutanés éventuels). Des prélèvements sanguins individuels sans anticoagulants ont été réalisés au 7^e jour et au 14^e-15^e jour après l'inoculation, et à la fin de l'étude (22 jours pour le virus H5N1 HP 150169a, et 18 jours pour le virus H5N8 HP 161105a).

1.2. Analyses de laboratoire

Les écouvillons individuels ont été repris, lysés et les ARN totaux ont été extraits comme décrit précédemment (Niqueux *et al.*, 2014). Le génome du virus influenza aviaire de type A a été recherché par rRT-PCR ciblant le gène M selon une méthode dérivée du manuel de diagnostic européen (Cherbonnel *et al.*, 2013 ; JOCE, 2006).

Les sérums ont été testés individuellement par techniques ELISA par compétition (trousses commerciales) pour la recherche d'anticorps anti-influenza aviaire de type A (Influenza A virus Antibody test kit, Idexx Laboratories) et anti-H5 (ID Screen Influenza H5 Antibody Competition, ID Vet). Les valeurs d'indice de densité optique obtenues ont été interprétées selon la notice en vigueur du fournisseur. Des analyses ont également été effectuées par technique d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) selon la méthode normalisée (AFNOR, 2013) avec l'antigène inactivé homologue au virus utilisé au cours de l'essai correspondant. Le seuil de positivité retenu est de 16.

1.3. Analyse des données

Les valeurs brutes de Ct obtenues en rRT-PCR ont été normalisées en utilisant une gamme d'ARN étalon de concentration connue pour chaque essai. Une valeur-seuil de positivité a été établie à partir des valeurs normalisées de Ct en rRT-PCR obtenues à partir d'une série de dilutions de raison 10 d'un stock de chacun des virus, titrés en parallèle sur œufs embryonnés de poules EOPS : soit une dose équivalente à 2 à 6 DIE₅₀ / réaction rRT-PCR selon le virus (Niqueux *et al.*, 2014).

Les résultats normalisés ont été interprétés qualitativement en fonction du seuil de positivité précédemment défini, afin d'estimer la période d'excrétion du virus. Cette durée a été déterminée individuellement comme le nombre de jours

consécutifs où des résultats positifs sont observés par voie oropharyngée ou cloacale (incluant le cas échéant un résultat entièrement négatif isolé, encadré par deux résultats positifs).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Signes cliniques

Au cours de l'étude expérimentale du virus H5N1 HP 150169a, seuls des symptômes discrets et inconstants de conjonctivite ont été observés. L'un des canards inoculés a été euthanasié au 8^e jour de l'essai, suite à une blessure sévère sans lien avec l'infection.

Pour le virus H5N8 HP 161105a, les 12 canards inoculés ou contacts ont présenté des signes cliniques modérés (œdème du cou et de la base de la tête associé ou non à une conjonctivite) à sévères, avec des symptômes neurologiques évidents (torticolis et ataxie), à partir du 4^e jour après inoculation. Les signes cliniques les plus marqués ont évolué vers la mort tardive d'un canard contact au 13^e jour après inoculation, et l'euthanasie au 14^e jour d'essai d'un canard inoculé trop affaibli par la maladie.

Excrétion virale (Figure 1)

Pour les deux virus testés, l'excrétion virale a débuté (soit par voie oropharyngée seule, soit par voie oropharyngée et cloacale) dès 24 heures après inoculation ou contact pour l'ensemble des canards. Pour le virus H5N1 HP 150169a, l'excrétion oropharyngée et cloacale était simultanée dès le lendemain de la mise en contact, alors que le délai a été de 2 jours après l'inoculation pour les canards directement infectés. Pour le virus H5N8 HP 161105a, le délai a été de 3 jours après inoculation ou contact pour observer une excrétion simultanée.

L'excrétion virale a persisté pour la totalité des sujets infectés et contacts jusqu'à moins de 6 jours et jusqu'à 7 jours après l'inoculation, respectivement pour le virus IAHP H5N1 150169a et le virus IAHP H5N8 161105a. Pour le virus H5N1 HP 150169a, les durées d'excrétion observées s'échelonnaient d'au moins 4 à au moins 10 jours après inoculation ou contact, avec une durée médiane de 8 jours. La proportion de détection par voie cloacale a été significativement plus importante que par voie oropharyngée (test de Mc Nemar ; $p=0,006$), l'excrétion par voie cloacale seule ayant été majoritaire pendant la 2^e semaine de l'essai. Pour le virus H5N8 HP 161105a, l'excrétion virale a persisté pendant 7 à au moins 15 jours après inoculation ou contact, avec une durée médiane de 8 jours. Le profil de détection était inversé par rapport au virus précédent, la proportion de détection par voie oropharyngée ayant été significativement plus importante que par voie cloacale (test de Mc Nemar ; $p=0,011$).

Cinétique de l'immunité humorale spécifique

Pour les deux virus testés, tous les sérums prélevés au 7^e jour après inoculation étaient positifs en ELISA NP et en ELISA H5, sur les 12 canards testés. Pour le

virus H5N1 HP 151169a, les 12 canards étaient positifs en IHA avec l'antigène homologue dès le 7^e jour après inoculation. Pour le virus H5N8 HP 161105a, seuls 6 des 8 canards directement inoculés étaient positifs en IHA vis-à-vis de l'antigène homologue, et aucun des 4 canards contacts n'était positif. Cependant, l'ensemble des 11 canards survivants au 15^e jour avaient bien séroconverti en IHA homologue.

La séropositivité pour les tests ELISA NP, ELISA H5 et IHA homologues persistait au 14^e ou 15^e jour et à l'abattage sur l'ensemble des canards survivants (soit un effectif de 10 à 11 canards selon le virus testé et la date de prélèvement).

CONCLUSION

Les canards mulards de 6,5 semaines étaient très réceptifs à l'infection expérimentale par voie intra-oculaire, pour les virus IAHP H5N1 150169a et H5N8 161105a testés, et la transmission aux canards contacts naïfs a été très efficace et très rapide (dans les 24 heures après introduction).

La sensibilité à la maladie était nulle pour le virus IAHP H5N1 150169a et modérée à importante pour le virus IAHP H5N8 161105a. Pour ce dernier, les symptômes observés étaient discrets à sévères (avec

des signes nerveux dans ce cas) et la mortalité faible et tardive (2 canards morts sur 12 sujets).

Cette différence était corrélée à l'augmentation de la proportion de détections de cas cliniques en élevage lors de la saison 2016-2017.

Bien que les durées d'excrétion observées aient été proches pour les deux virus testés, les profils d'excrétion étaient nettement différenciés. L'excrétion cloacale était dominante pour le virus IAHP H5N1 150169a évoquant des profils d'excrétion typiques de virus influenza aviaires faiblement pathogènes chez le canard (Niqueux *et al.*, 2014) et similaires au profil d'excrétion chez le canard de Barbarie EOPS d'un virus H5N9 HP isolé en 2015 et apparenté au virus H5N1 HP testé ici (Niqueux *et al.*, 2017). Alors que l'excrétion oro-pharyngée était plus prononcée pour le virus IAHP H5N8 161105a, et semblable aux profils d'excrétion décrits chez le canard pour d'autres virus IAHP de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996 (Guionie *et al.*, 2010), y compris d'autres virus appartenant au clade 2.3.4.4 (Pantin-Jackwood *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2016 ; Grund *et al.*, 2017).

Le modèle expérimental d'infection décrit ici permettra l'étude des facteurs de pathogénicité et de virulence propres à ces virus, après reconstruction par génétique inverse de virus porteurs de différents marqueurs potentiels identifiés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Le Bouquin S., Huneau-Salaün A., Hamon M., Moisson M.C., Scoizec A., Niqueux É., Schmitz A., Briand F.X., van de Wiele A., Bronner A., 2016. L'épisode d'influenza aviaire en France en 2015-2016 – Situation épidémiologique au 30 juin 2016. BE santé animale et alimentation, (75), 2-8.
- Moisson M.C., Huneau-Salaün A., Hamon M., Niqueux É., Scoizec A., Schmitz A., Briand F.X., Fediaevsky A., Le Bouquin S., Bronner A., 2017. Résultats de la surveillance de l'influenza aviaire en France - Point de situation au 08/08/2016. <https://www.pplateforme-esa.fr/article/resultats-de-la-surveillance-de-l-influenza-aviaire-en-france-point-de-situation-au-08082016>.
- Cherbonnel M., Henry A., Ogor K., Jestin V., 2013. Validation of a duplex real-time RT-PCR assay to detect avian influenza virus matrix gene using armored RNA as an internal positive control. In : Book of abstracts, WVPAC 2013, 19-23 août 2013, Nantes, France. 466.
- Niqueux É., Picault J.P., Amelot M., Allée C., Lamandé J., Guillemoto C., Pierre I., Massin P., Blot G., Briand F.X., Rose N., Jestin V., 2014. Quantitative transmission characteristics of different H5 low pathogenic avian influenza viruses in Muscovy ducks. Vet Microbiol, (168), 78-87.
- Briand F.X., Schmitz A., Ogor K., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Guillemoto C., Allée C., Le Bras M.O., Hirchaud E., Quenault H., Touzain F., Cherbonnel-Pansart M., Lemaitre E., Courtillon C., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Massin P., Blanchard Y., Eterradosi N., van der Werf S., Jestin V., Niqueux É., 2017. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. Euro Surveill, (22), pii=30473 (11p.).
- Briand F.X., Niqueux É., Schmitz A., Hirchaud E., Quenault H., Allée C., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Ogor K., Le Bras M.O., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Martenot C., Massin P., Le Bouquin S., Blanchard Y., Eterradosi N., 2018. Emergence and multiple reassortments of French 2015-2016 highly pathogenic H5 avian influenza viruses. Infect Genet Evol, (61), 208-214.
- Bronner A., Niqueux É., Schmitz A., Le Bouquin S., Huneau-Salaün A., Guinat C., Paul M., Courcoul A., Durand B., 2017. Description de l'épisode d'influenza aviaire hautement pathogène en France en 2016-2017. BE santé animale et alimentation, (79), 13-17.

- 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. *J Vet Sci*, (18 S1), 269-280.
- AFNOR, 2013. NF U 47-036-1 et NF U 47-036-2, Méthodes d'analyse en santé animale – Recherche d'anticorps contre les orthomyxovirus (influenzavirus) aviaires de type A de sous-types H5 et H7 par la technique d'inhibition de l'hémagglutination – partie 1 : criblage et partie 2 : confirmation. 11 octobre 2013. AFNOR (Éd.), Paris, France.
- JOCE, 2006. Décision 2006/437/CE de la Commission du 4 août 2006 portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CE du Conseil. (L237), 1-27.
- Guionie O., Guillou Cloarec C., Courtois D., Bougeard S., Amelot M., Jestin V., 2009. Experimental infection of Muscovy ducks with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) belonging to clade 2.2. *Av Dis*, (54 S1), 538-547.
- Grund C., Hoffmann D., Ulrich R., Naguib M., Schinköthe J., Hoffmann B., Harder T., Saenger S., Zscheppang K., Tönnies M., Hippenstiel S., Hocke A., Wolff T., Beer M., 2018. A novel European H5N8 influenza A virus has increased virulence in ducks but low zoonotic potential. *Emerg Microbes Infect*, (7), 132 (14 p.).
- Pantin-Jackwood M.J., Costa-Hurtado M., Shepherd E., DeJesus E., Smith D., Spackman E., Kapczynski D.R., Suarez D.L., Stallknecht D.E., Swayne D.E., 2016. Pathogenicity and Transmission of H5 and H7 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Mallards. *J Virol*, (90), 9967-9982.
- Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E., 2009. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *OIE Rev Sci Tech*, (28), 113-136.

Figure 1. Profils individuels d'excrétion des virus IAHP H5N1 150169a et H5N8 161105a chez le canard mulard conventionnel de 6 à 7 semaines

