

**EXCRETION VIRALE ET DISPERSION ENVIRONNEMENTALE DES VIRUS
INFLUENZA AVIAIRES HAUTEMENT PATHOGENES H5 DE CLADE 2.3.4.4B
CHEZ LE CANARD MULARD.**

Filaire Fabien^{1,2}, Kateri Bertran^{3,4}, Nicolas Gaide¹, Rosa Valle^{3,4}, Aurélie Sécula¹, Albert Perlas^{3,4}, Charlotte Foret-Lucas¹, Miquel Nofrarias^{3,4}, Guillermo Cantero^{3,4}, Guillaume Croville¹, Natalia Majo^{3,4} & Jean-Luc Guerin¹.

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

²THESEO FRANCE, LanXess Biosecurity, LanXess Group, Laval, France,

³Unitat mixta d'Investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal, CReSA, Campus de la UAB,
Bellaterra, 08193, Catalonia, Spain,

⁴IRTA, Programa de Sanitat Animal, CReSA, Campus de la UAB, Bellaterra, 08193,
Catalonia, Spain.

fabien.filaire@envt.fr

RÉSUMÉ

Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP) ont été à l'origine d'épizooties majeures ces dernières années, avec des conséquences dévastatrices pour les oiseaux domestiques et la faune sauvage dans le monde entier. Les canards domestiques et sauvages peuvent être très sensibles aux VIAHP et l'infection entraîne une réplication virale rapide et une excrétion massive ce qui contribue à une large dissémination virale. Il est important de noter que les canards sont connus pour excréter de grandes quantités de virus dans la première phase de l'infection, mais la dynamique et l'impact de la contamination environnementale dans l'épidémiologie des épidémies VIAHP sont mal compris. Dans cette étude, nous avons suivi des canards mulards infectés expérimentalement par deux VIAHP H5N8 du clade 2.3.4.4b Goose/Guangdong prélevés en France lors des épizooties de 2016-2017 et 2020-2021. Nous avons étudié la dynamique de l'excrétion virale dans l'oropharynx, le cloaque, les tissus conjonctivaux et les plumes ; la transmission virale d'oiseau à oiseau ; et le rôle de l'environnement dans la propagation virale et comme stratégie de prélèvement pour la détection précoce et la surveillance. Nos résultats ont confirmé que l'excrétion virale commençait avant l'apparition des signes cliniques, c'est-à-dire dès 1 jour après l'inoculation ou l'exposition au virus, atteignait son maximum à 4 jours après l'inoculation et durait jusqu'à 14 jours après l'inoculation. La détection de l'ARN viral dans les aérosols, la poussière et les échantillons d'eau reflétait la dynamique de l'excrétion virale, et l'isolement viral à partir de ces échantillons environnementaux a été réussi tout au long de l'expérience. Nos résultats confirment que les canards mulards peuvent excréter des titres élevés de VIAHP par différentes voies d'excrétion tout en étant asymptomatiques, et que l'échantillonnage environnemental pourrait être un outil non invasif pour la détection précoce de l'ARN viral dans les élevages infectés par les VIAHP.

ABSTRACT

Viral shedding and environmental dispersion of two clade 2.3.4.4b H5 high pathogenicity avian influenza viruses in experimentally-infected mule ducks: implications for environmental sampling.

High pathogenicity avian influenza viruses (HPAIVs) have caused major epizootics in the last years with devastating consequences for poultry and wildlife worldwide. Domestic and wild ducks can be highly susceptible to HPAIVs, and infection leads to efficient viral replication and massive shedding (i.e., high titers for an extended time), contributing to widespread viral dissemination. Importantly, ducks are known to shed high amounts of virus in the earliest phase of infection, but the dynamics and impact of environmental contamination in the epidemiology of HPAIV outbreaks is poorly understood. In this study we monitored mule ducks experimentally-infected with two H5N8 clade 2.3.4.4b goose/Guangdong HPAIVs sampled in France in the 2016-2017 and 2020-2021 epizootics. We investigated viral shedding dynamics in oropharynx, cloaca, conjunctiva, and feathers; bird-to-bird viral transmission; and the role of the environment in viral spread and as sampling strategy for early detection and surveillance. Our findings confirmed that viral shedding started before the onset of clinical signs, i.e., as early as 1 day post-inoculation (dpi) or post-contact exposure, peaked at 4 dpi, and lasted for 14 dpi. Detection of viral RNA in aerosols, dust, and water samples mirrored viral shedding dynamics, and viral isolation from these environmental samples was successful all throughout the experiment. Our results confirm that mule ducks can shed high HPAIV titers through various excretion routes while being asymptomatic, and that environmental sampling could be a non-invasive tool for early viral RNA detection in HPAIV infected farms.

INTRODUCTION

Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP) constituent une menace majeure pour l'industrie avicole et la biodiversité [1,2]. Ces virus affectent un grand nombre d'espèces d'oiseaux, ce qui pourrait expliquer leur dissémination massive dans les populations d'oiseaux sauvages dans le monde [1,3]. Les oiseaux aquatiques sont plus sensibles aux virus de la lignée Goose/Guangdong (Gs/GD) que les gallinacés [4-7]. Ainsi, les élevages de canards jouent un rôle crucial dans la dispersion des VIAHP [4]. Une fois le virus excrété par les animaux infectés, l'environnement joue un rôle majeur dans la persistance et la propagation du virus. En particulier, les aérosols, la poussière et l'eau pourraient véhiculer le virus au sein d'un élevage [7-9]. Par conséquent, les prélèvements environnementaux pourraient être une alternative à l'écouvillonnage des canards pour la surveillance des VIAHP, car non invasifs, rapides et ne nécessitant pas l'intervention de personnels qualifiés. Les enquêtes de terrain menées par notre groupe ont suggéré que la collecte d'aérosols, ou même de poussières, permettait de détecter des charges virales élevées, même à un stade précoce de l'infection au niveau d'un élevage [10].

Au cours de cette étude nous avons étudié la dynamique d'excrétion virale et de la dispersion environnementale des VIAHP de clade 2.3.4.4b lors d'une infection chez le canard mulard. Nous avons utilisé deux souches différentes isolées à partir de foyers français en 2017 et 2020 pour évaluer les changements potentiels dans leurs propriétés biologiques. Notre objectif était d'évaluer l'application potentielle des prélèvements environnementaux, la persistance et la dissémination des particules virales dans l'environnement des élevages.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Virus

Deux isolats du clade 2.3.4.4b de la lignée Gs/GD du virus H5N8 de l'IAHP ont été utilisés : Canard mulard A/France/171201g/2017 (H5N8) HPAIV (H5N8/2017) (numéros d'accèsion MK859904 à MK859911) [11] et Canard mulard A/France/20353/2020 (H5N8/2020) (numéros d'accèsion MZ166297 à MZ166304).

1.2. Animaux et logement

Trente-deux canards mulards (*Cairina moschata* x *Anas platyrhynchos*) âgés de 3 semaines ont été obtenus auprès d'un producteur commercial (avec l'aimable autorisation de Manel Vinyes, GALLSA, Tarragone, Espagne). Les oiseaux ont été répartis de manière aléatoire dans deux salles de l'animalerie BSL-

3. Les oiseaux avaient un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Chaque salle était équipée d'une piscine de 1,5 m de diamètre et de 30 cm de profondeur avec une rampe d'accès. Avant l'inoculation, des écouvillons oropharyngés (OP) et cloacaux (CL) ainsi que des échantillons de sang ont été prélevés sur tous les oiseaux. L'ensemble des animaux inclus dans l'étude étaient sérologiquement négatifs vis-à-vis des virus influenza.

1.3. Protocol expérimental

Après une semaine d'acclimatation, 10 oiseaux par salle ont été inoculés par voie intra-choanale avec une dose infectieuse de 10^5 EID₅₀. Pour évaluer la transmission virale, six canards non inoculés ont été ajoutés à chaque chambre un jour après l'inoculation. Les signes cliniques ont été contrôlés quotidiennement pendant 14 jours après l'inoculation.

Pour étudier l'excrétion virale individuelle, des écouvillons oropharyngés (OP), cloacaux (CL) et conjonctivaux (CJ), ainsi que des échantillons de pulpe de plumes (FP), ont été prélevés sur des oiseaux inoculés et des oiseaux de contact à 2, 4, 7, 10 et 14 jours post-inoculation (jpi).

1.4. Prélèvements environnementaux

Pour évaluer la contamination virale dans l'environnement des canards inoculés expérimentalement et des canards de contact, des échantillons d'aérosols, de poussière et d'eau ont été prélevés. L'échantillonnage des aérosols a été effectué à l'aide de deux échantillonneurs d'air cycloniques secs : le Coriolis Compact (50 L/min) (Bertin Technologies, <https://www.bertin-instruments.com>) et le NIOSH BC 251 (3,5 L/min) (National Institute of Occupational Safety and Health, <https://www.cdc.gov/niosh>). Les deux instruments ont été utilisés simultanément à chaque point d'échantillonnage, pendant 20 minutes pour le Coriolis Compact et de 40 minutes à 1 heure pour le NIOSH BC 251, à environ 1 m au-dessus du sol et à 2 m de distance l'un de l'autre pour éviter les interférences de flux d'air.

Des échantillons de poussière ont été prélevés à l'aide de gazes sèches, l'une sur les murs et l'autre sur les mangeoires. Les échantillons d'eau de piscine et d'eau de boisson ont été prélevés à l'aide de tubes Falcon de 50 ml. Tous les prélèvements environnementaux ont été effectués dans chaque groupe à 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 et 14 jours. Tous les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'à deux jours après le prélèvement et à -80 °C jusqu'à leur traitement.

1.5. Pré-traitement

Avant les extractions d'ARN, tous les échantillons ont été préparés comme suit. Les écouvillons (OP, CL et CJ) et la FP ont été placés individuellement dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml remplis de 500 µl de solution saline tamponnée au phosphate 1X (PBS) et vigoureusement vortexés pendant 10 à 15 secondes.

Les aérosols collectés avec le Coriolis Compact et les deux plus grandes tailles de particules du NIOSH BC 251 ont été remis en suspension avec 1 ml de PBS. Les tubes de collecte ont été vigoureusement agités au

vortex pendant 5 à 15 s pour éliminer les particules des parois et des bords du tube. Le filtre à membrane de la troisième fraction du NIOSH BC 251 a été soigneusement retiré de la cassette et placé dans un tube de collecte sec de 50 ml. Le filtre a été vortexé à sec pendant 10 à 15 s avant d'ajouter 1,5 ml de PBS, puis vortexé à nouveau. La remise en suspension du liquide aérosol a été aliquotée dans un tube à centrifuger de 1,5 ml. Les gazes contenant de la poussière ont été traitées en ajoutant 20 ml de PBS dans les sacs de transport, en massant le contenu à la main pendant 2 à 3 minutes, puis en recueillant et en aliquotant les surnageants dans des tubes de centrifugeuse de 1,5 ml. Les échantillons d'eau de piscine et d'eau potable ont été aliquotés dans des tubes à centrifuger de 2 ml.

1.6. Détection d'ARN viral

Les ARNs totaux de tous les échantillons (écouvillons, plumes et prélèvements environnementaux) ont été extraits à l'aide du kit d'extraction rapide ID Gene Mag à base de billes magnétiques (Innovative Diagnostics, Grabel, France) grâce au robot d'extraction magnétique automatisé KingFisher 96 (ThermoFisher, Carlsbad, CA) en suivant les instructions du fabricant. La présence d'ARN d'AIV du sous-type H5 a été détectée en effectuant une PCR quantitative en transcription inverse en temps réel (rRT-qPCR) en une étape à l'aide du kit Influenza H5/H7 Triplex (Innovative Diagnostics, Grabel, France).

1.7. Virus isolement

Les prélèvements d'aérosols, de poussières et d'eaux ont été utilisés pour rechercher la présence de particules infectieuses dans l'environnement. Pour les aérosols et les poussières, les échantillons présentant la plus grande charge en ARN ont été sélectionnés.

L'isolement du virus a été effectué dans des œufs de poule embryonnés SPF âgés de 9 à 11 jours. 200 µl de chaque échantillon ont été mélangés à 400 µl de pénicilline (1 000 U/ml) et de streptomycine (1 mg/ml). Trois œufs par échantillon ont été inoculés avec 150 µL de la solution et maintenus dans une chambre humide à 37°C pendant 48 h avant d'être placés à 4°C pendant 12 h. Le liquide allantoïdien a été prélevé sur chaque œuf et directement analysé par RT-qPCR ciblant le sous-type H5 (kit Influenza H5/H7 Triplex, Innovative Diagnostics, France) et par test d'hémagglutination [12]. Jusqu'à trois passages successifs par échantillon ont été effectués.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Signes cliniques et mortalité

Les signes cliniques ont commencé à 3 jours et 4 jours pour les oiseaux inoculés H5N8/2017 et H5N8/2020, respectivement. Les signes cliniques comprenaient une dépression non spécifique allant jusqu'à la prostration

et l'incapacité de se tenir debout, des signes neurologiques (ataxie, tremblement de la tête, inclinaison de la tête) et une absence de réponse aux stimuli visuels. Chez les oiseaux inoculés, la mortalité a commencé à 5 et 6 jours après le début des signes cliniques pour les groupes inoculés par le virus H5N8/2017 et le virus H5N8/2020, respectivement, et a duré 4 et 2 jours, respectivement (Figures 1). Les taux de mortalité des oiseaux inoculés étaient de 30 % (H5N8/2017) et de 20 % (H5N8/2020), avec des durées moyennes avant la mort (DMT) de 7 jours (H5N8/2017) et de 6,5 jours (H5N8/2020) (Figure 1). Les taux de mortalité des oiseaux de contact étaient de 100 % (H5N8/2017) et de 33 % (H5N8/2020) (Figure 1).

Excrétion virale chez les canards

Les profils d'excrétion des virus étaient similaires quel que soit le virus et la voie d'infection (inoculation ou contact) (Figure 2). En particulier, l'ARN viral (ARN_v) a été détecté pour la première fois à 2 jpi, l'excrétion virale a atteint son maximum à 4 jpi et a progressivement diminué jusqu'à 10 jpi, puis est devenue stable jusqu'à 14 jpi (Figures 2).

L'ARN viral des deux virus était déjà détectable dans les écouvillons OP, les écouvillons CL, les écouvillons CJ et les échantillons FP à 2 jours après inoculation, chez les oiseaux inoculés et chez les oiseaux en contact, à l'exception des échantillons FP H5N8/2017 (Figure 2).

Détection de l'ARN viral dans l'environnement

L'ARN viral a été détecté pour la première fois dans les échantillons environnementaux dès 1 jpi dans l'échantillon H5N8/2020 Coriolis (Ct : 35,05) et l'échantillon d'eau potable (Ct : 31,37), et 2 jpi dans les échantillons H5N8/2017. Dans l'ensemble, la cinétique de tous les échantillons environnementaux était similaire, quel que soit le virus. En particulier, la charge d'ARN_v a augmenté progressivement et a atteint son maximum à 5 jours avant de diminuer jusqu'à 10 jours. Entre 10 et 14 jours, la charge d'ARN_v dans l'environnement est restée à peu près stable. Cette tendance était différente pour les échantillons d'eau de piscine ; pour les deux virus, la charge d'ARN_v a atteint un pic à 3 jpi (H5N8/2017 Ct moyen : 26,9, sd : 0,65 ; H5N8/2020 Ct moyen : 26,81, sd : 0,67) et est restée stable jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 3).

La détection de l'ARN viral dans les échantillons d'aérosols NIOSH a eu une cinétique similaire à celle

des échantillons Coriolis, même si les premiers échantillons positifs ont été détectés à 3 jpi.

Isolement du virus à partir d'échantillons environnementaux

Pour le virus H5N8/2017, très peu d'échantillons ont permis l'isolement de virus infectieux. L'isolement le plus précoce a eu lieu à 2 jpi. À 5 jpi, des particules infectieuses ont pu être isolées dans la poussière, l'eau de piscine et l'eau de boisson. Les échantillons d'aérosols de Coriolis n'ont permis d'isoler le virus qu'à 14 jpi (Tableau 1).

Contrairement aux échantillons H5N8/2017, l'isolement du virus à partir des échantillons environnementaux H5N8/2020 a été possible dans l'eau de boisson à 1 jpi, et dans tous les types d'échantillons à 2 jpi et 5 jpi. Des particules infectieuses ont également été isolées à 14 jours sur la poussière de mur et l'eau de boisson (Tableau 1).

CONCLUSION

La diversité des prélèvements environnementaux testés positifs au début de l'infection soulève de nombreuses questions et défis concernant le contrôle des futures épizooties de VIAHP. L'infectivité élevée de ces virus et leur capacité à contaminer différents types de matrices environnementales peuvent avoir un impact considérable sur les mesures de biosécurité actuelles,

non seulement pendant la vie productive des oiseaux, mais aussi lors de leurs déplacements et des opérations d'abattage. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que les VIAHP H5N8 du clade 2.3.4.4b se propagent non seulement par les animaux vivants, mais aussi par l'environnement dans lequel vivent les animaux infectés, comme l'eau ou la poussière, qui peuvent être aérosolisés et conduire à une dissémination sur de longues distances [13, 14]. Par conséquent, les opérations d'abattage, ainsi que le nettoyage et la désinfection, peuvent présenter un risque de dissémination virale si elles ne sont pas effectuées correctement.

L'excrétion virale efficace au cours de la période pré-symptomatique des canards mulards infectés expérimentalement par les VIAHP du clade 2.3.4.4b H5N8 suggère qu'une stratégie de détection passive basée sur des signes cliniques manifestes n'est pas optimale pour contenir la propagation virale. La détection de l'ARN viral dans des échantillons environnementaux en l'absence de signes cliniques permettrait de réagir plus rapidement, en limitant le nombre d'oiseaux infectés et le nombre de particules infectieuses excrétées. Les prélèvements environnementaux, en particulier l'échantillonnage de l'eau de boisson et de la poussière, pourraient constituer une stratégie facile à mettre en œuvre, rapide, non invasive, peu coûteuse pour les activités de détection active et de surveillance des VIAHP dans les élevages. La mise en œuvre efficace de ces stratégies de prélèvements doit toutefois s'accompagner d'une chaîne analytique rapide, de la collecte des échantillons aux rendus des résultats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Lewis NS, Banyard AC, Whittard E, et al. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10:148–151.
- [2] Adlhoch C, Baldinelli F. Avian influenza, new aspects of an old threat. *Eurosurveillance.* 2023;28:1–3.
- [3] Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech l'OIE.* 2000;19:463–482.
- [4] Kwon J, Bahl J, Swayne DE, et al. Domestic ducks play a major role in the maintenance and spread of H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in South Korea. *Transbound Emerg Dis.* 2020;67:844–851.
- [5] Leyson C, Youk S, Smith D, et al. Pathogenicity and genomic changes of a 2016 European H5N8 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4) in experimentally infected mallards and chickens. *Virology.* 2019;537:172–185.
- [6] Hill SC, Lee Y-J, Song B-M, et al. Wild waterfowl migration and domestic duck density shape the epidemiology of highly pathogenic H5N8 influenza in the Republic of Korea. *Infect Genet Evol.* 2015;34:267–277.
- [7] Ahrens AK, Selinka HC, Mettenleiter TC, et al. Exploring surface water as a transmission medium of avian influenza viruses—systematic infection studies in mallards. *Emerg Microbes Infect [Internet].* 2022;11:1250–1261. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2065937>.
- [8] James J, Warren CJ, De Silva D, et al. The Role of Airborne Particles in the Epidemiology of Clade 2.3.4.4b H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus in Commercial Poultry Production Units. *Viruses.* 2023;15:1002.
- [9] Beerens N, Germeaad EA, Venema S, et al. Comparative pathogenicity and environmental transmission of recent highly pathogenic avian influenza H5 viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10:97–108.
- [10] Filàire F, Lebre L, Foret-Lucas C, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Clade 2.3.4.4b Virus in Dust Samples from Poultry Farms, France, 2021. *Emerg Infect Dis.* 2022;28:1446–1450.
- [11] Bessière P, Figueroa T, Coggon A, et al. Opposite Outcomes of the Within-Host Competition between High- and Low-Pathogenic H5N8 Avian Influenza Viruses in Chickens Compared to Ducks. Subbarao K, editor. *J Virol.* 2022;96:e01366-21.
- [12] Brown JD, Stallknecht DE. Avian Influenza Virus [Internet]. Spackman E, editor. *Methods Mol. Biol.* Totowa, NJ: Humana Press; 2008. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-279-3>.
- [13] Asadi S, Gaaloul ben Hnia N, Barre RS, et al. Influenza A virus is transmissible via aerosolized fomites. *Nat Commun.* 2020;11:4062.
- [14] Torremorell M, Alonso C, Davies PR, et al (2016). Investigation into the Airborne Dissemination of H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus During the 2015 Spring Outbreaks in the Midwestern United States. *Avian Dis.* 2016;60:637–643.

Tableau 1. Tableau résumé des isollements réalisés dans des œufs de poule embryonnés à partir de prélèvements environnementaux. jpi : jours post-inoculation, NT : non testé, + : positif, - : négatif.

Sous-type	Echantillon	1 jpi	2 jpi	3 jpi	5 jpi	10 jpi	14 jpi
H5N8/2017	Aérosols (Coriolis)	NT	-	-	-	-	+
	Poussière (murs)	NT	-	-	+	-	-
	Eau (piscine)	NT	-	-	+	-	-
	Eau de boisson	-	+	NT	+	-	-
H5N8/2020	Aérosols (Coriolis)	-	+	NT	+	-	-
	Poussière (murs)	NT	+	NT	+	NT	+
	Eau (piscine)	NT	+	NT	+	-	-
	Eau de boisson	+	+	NT	+	NT	+

Figure 1. Évolution du taux de survie tout au long de l'étude expérimentale. A, pourcentage de survie chez les canards inoculés. B, pourcentage de survie chez les canards en contact. dpi : jours post-inoculation.

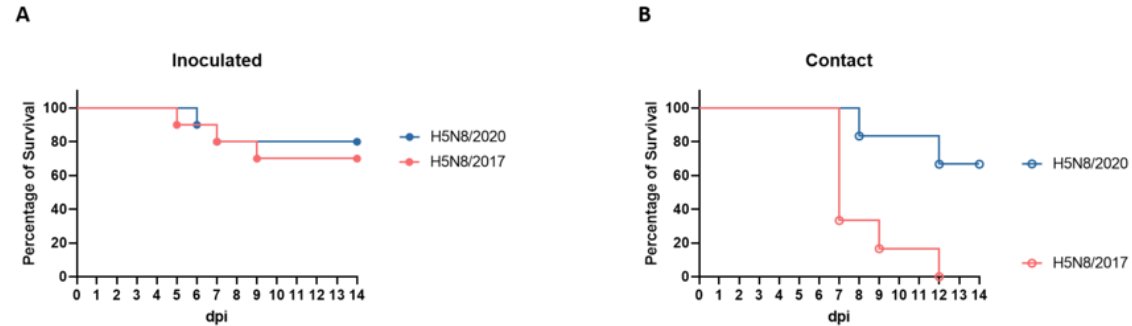


Figure 2. Excrétion virale dans les écouvillons oropharyngés, cloacaux et conjonctivaux, et dans les échantillons de pulpe de plumes avec information sur le statut de l'animal. L'état de santé de chaque oiseau est décrit dans chaque panneau. + : détection positive de l'ARNv, - : détection négative de l'ARNv, dpi : jours après l'inoculation.

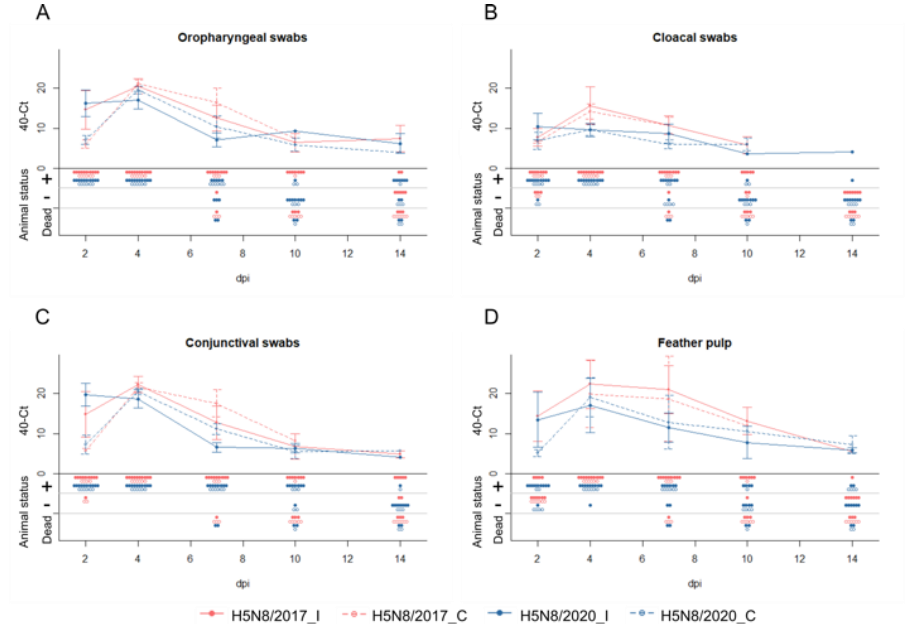


Figure 3 : Surveillance de l'excrétion virale dans les échantillons environnementaux. A, échantillons de poussière. B, échantillons d'eau (eau de boisson, eau de piscine). C, aérosols collectés à l'aide du Coriolis Compact. D, aérosols collectés à l'aide du NIOSH BC 251. dpi : jours post-inoculation.

