

**LE ROLE DE LA POUSSIERE COMME VEHICULE ET MATRICE DE
DETECTION DES VIRUS H5N8 HAUTEMENT PATHOGENES (CLADE 2.3.4.4B)
DANS LES ELEVAGES AVICOLES FRANÇAIS EN 2021**

Filaire Fabien^{1,2}, Lebre Laetitia¹, Foret-Lucas Charlotte¹, Vergne Timothée¹, Patrick Daniel³, Lelièvre Aurélie⁴, De Barros Antoine¹, Jbenyeni Adam¹, Bolon Pierrick¹, Paul Mathilde¹, Croville Guillaume¹ et Guérin Jean-Luc¹

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

²THESEO France, Groupe LanXess, Laval, France,

³Laboratoire Pyrénées Landes LPL, Mont-de-Marsan, France,

⁴SOCSA-40, Amou, France

fabien.filaire@envt.fr

RÉSUMÉ

Au cours de l'hiver 2020-2021, la France a déclaré 492 foyers d'influenza aviaire H5N8 hautement pathogène (HP), majoritairement localisés dans le sud-ouest. Cette nouvelle épidémie rappelait celle de 2016-2017 et soulevait des questions principalement liées aux modalités de transmission du virus et aux stratégies de détection précoce des foyers pour endiguer la dynamique épidémiologique.

Si l'introduction initiale du virus dans les élevages en France est attribuée à l'avifaune sauvage, les modes de transmissions inter- et intra-élevages sont encore mal connus et donc mal maîtrisés. Pour documenter les modalités de transmission du virus, et éventuellement développer de nouvelles stratégies de surveillance, des prélèvements environnementaux ont été réalisés dans des élevages infectés par le virus H5N8 HP ou suspect de l'être. Ainsi, entre décembre 2020 et avril 2021, des prélèvements de poussières et aérosols ont été réalisés dans 63 élevages du sud-ouest en parallèle d'écouvillons réalisés dans le cadre de la surveillance officielle. L'ensemble de ces prélèvements ont été analysés à l'aide de méthodes officielles et les données générées ont été analysées statistiquement par modèle bayésien à classe latente afin de comparer les performances de sensibilité et spécificité des méthodes de prélèvement. Les données obtenues suggèrent de très bonnes performances de détectabilité des prélèvements environnementaux (poussières et aérosols), par comparaison avec les écouvillons trachéaux, en particulier dans les cas d'infections sans expression de signes cliniques, autrement dit, aux phases précoces d'infection. Au-delà des potentielles applications pour la surveillance, ces résultats confirment que la poussière des élevages peut être considérée comme un véhicule significatif de transmission du virus influenza H5N8.

ABSTRACT

Dust as a vehicle and surveillance sample of H5N8 highly pathogenic avian influenza virus (clade 2.3.4.4b) in poultry farms, France, 2021.

During the winter 2020-2021, 492 avian influenza H5N8 highly pathogenic (AIHP) outbreaks have been reported in France, mostly in the south-west. After the 2016-2017 epizootic, this novel episode raised numerous questions regarding viral transmission routes and the development of new methods for early detection of outbreaks to contain the spread of the disease.

Even though the virus entry in French farms is assigned to wild aquatic birds, both inter- and intra- animal houses transmission routes are still poorly understood and ultimately poorly handled. Environmental samples from H5N8 HP infected or suspicious animal houses were realized in order to assess the virus transmission modality and to, potentially, develop new surveillance strategies. So, from December 2020 to April 2021, 63 HPAI-infected or suspicious poultry houses were identified for dust and aerosol sampling in complement to tracheal swabs realized for official surveillance. Every samples were analyzed based on official molecular methods and the results were analyzed using a latent class bayesian model to investigate the sampling methods sensitivity and specificity. Altogether, the data suggest that environmental sampling (dust and aerosols) shows a higher sensitivity compared to tracheal swabs, especially when no clinical signs were observed within the flocks. In other words, environmental sampling present higher sensitivity for early detection of the H5N8 HP virus. Beyond their potential surveillance application, environmental samples confirmed that dust may play a major role as H5N8 HP virus vehicle.

INTRODUCTION

L'influenza aviaire est une maladie virale causée par les virus influenza A, virus à ARN simple brin à polarité négative, appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*. Les oiseaux aquatiques sauvages sont considérés comme le réservoir de ces virus et sont à l'origine de panzooties lors des migrations saisonnières (1). Les sous-types hautement pathogènes (HP) sont à l'origine des épizooties caractérisées par de très forts taux de mortalité chez les oiseaux sauvages et domestiques, générant des pertes économiques majeures pour l'industrie aviaire. La diffusion périodique de ces virus à risque zoonotique conduit à de nombreux questionnements de santé public.

Au cours de l'hiver 2020-2021, un virus H5N8 HP appartenant au clade 2.3.4.4b (A/goose/Guangdong/1/1996) a été responsable de centaines de foyers en Europe (2,3). Entre le 5 décembre 2020 et le 3 mai 2021, la France, avec 492 élevages foyers, a été le pays le plus impacté, en particulier la filière palmipède à foie gras. Malgré un renforcement des activités de surveillance, le virus H5N8 HP a circulé rapidement, défiant les mesures de surveillance et de contrôle de l'épidémie. La stratégie de surveillance et de détection officielle mise en place au niveau Européen et national, basée sur la réalisation d'écouvillons trachéaux et cloacaux (4,5), est laborieuse et fait appel à des personnels entraînés, ce qui complique son application à large échelle. Ces difficultés d'application, en situation d'épizootie majeure, révèlent le besoin urgent de nouvelles méthodes de surveillance. Dans le même temps, les modèles épidémiologiques évoquent que la transmission du virus intra-élevage est très rapide, suggérant un rôle important de l'environnement comme source de contamination pour les élevages voisins (6). La propagation de virus influenza aviaire HP (IAHP) peut se faire *via* les aérosols ou « fomites » transportés par des hommes ou animaux. Les « fomites » correspondent à des débris de plumes, particules fécales et, plus largement, la poussière (7,8). La poussière est connue pour être massivement produite dans les élevages aviaires par mise en suspension de particules venant de litières, aliments, fèces, peau et plumes des animaux (9). Ces particules peuvent servir de véhicule pour la propagation de bactéries et virus, et sont classifiées comme inhalable, thoracique ou respirable en fonction de leur taille, à savoir respectivement <100µm, <10µm et <4µm de diamètre (9). Dans les élevages avicoles, les particules de poussières sont majoritairement classifiées comme non-respirables (>4µm) (9).

Au cours de cette étude, nous avons évalué le rôle de la poussière comme véhicule des virus H5N8 HP de clade 2.3.4.4b, et évalué si la collecte de poussières et

d'aérosols peut servir de stratégie alternative aux méthodes d'écouvillonnages officielles pour la surveillance des virus HP dans les élevages.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements en élevages

La poussière a systématiquement été collectée sur les murs des bâtiments inclus dans cette étude et dans 51 des bâtiments la poussière des mangeoires a également été collectée. La collecte des poussières a été réalisée grâce à des chiffonnettes sèches. Lors de la collecte des poussières, une attention particulière a été portée sur l'ensemble des éléments pouvant inhiber la PCR comme les débris d'aliment, les fèces ou la litière afin de les éviter.

Deux collecteurs d'aérosols ont été simultanément utilisés dans 19 bâtiments, au centre des bâtiments à 2 mètres l'un de l'autre pour éviter toutes interférences. Il s'agit du Coriolis Compact® (Bertin Technologies) et du 2-phases cyclonique bioaérosols collecteur 251 (BC 251) développé par l'institut national de la santé et de la sécurité professionnelle (NIOSH). Le NIOSH BC 251 a la particularité de séparer les particules en 3 fractions en fonction de la taille : >4µm (fraction 1), entre 1 et 4µm de diamètre (fraction 2) et <1µm (fraction 3).

Ces deux collecteurs ont été utilisés en accord avec les règles transmises par les concepteurs.

Des écouvillons trachéaux ont été réalisés sur 20 individus de chaque bâtiment.

L'ensemble des prélèvements ont été transportés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse puis stockés à 4°C avant utilisation.

Toutes les procédures faites en élevage ainsi que le transport des échantillons ont été réalisées en strict accord avec les procédures et règles de biosécurité, avec autorisation et supervision officielle des services vétérinaires.

1.2. Analyses moléculaires

Après reconditionnement des échantillons, les ARNs totaux ont été extraits grâce au kit commercial ID Gene™ Mag Fast Extraction Kit (ID-vet). A partir de ces extractions, une RT-qPCR ciblant le gène M des virus influenza A a été réalisée, suivie d'une RT-qPCR ciblant le sous-type H5 pour les échantillons positifs.

1.3. Isolement viral

5 bâtiments présentant des RT-qPCR positives au sous-type H5 ont été sélectionnés sur la base des valeurs de Ct des échantillons pour isoler les virus. L'isolement a été fait sur des œufs embryonnés EOPS achetés à l'INRAE, PFIE (Nouzilly, France). Les œufs ont été incubés de 9 à 11 jours à 37°C. L'inoculation des œufs s'est faite en trois répliques à différentes concentrations en fonction de la méthode

de prélèvement. Toutes les dilutions ont été faites avec du PBS stérile 1X avec pénicilline (1000 U/mL) et streptomycine (1mg/mL). Après l'inoculation des œufs par 150µL des différentes concentrations, les œufs ont été incubés pendant 48h à 37°C avant d'être laissés 12h à 4°C.

Après les 12h à 4°C, le liquide allantoïque de chaque œuf a été collecté et un titrage par hémagglutination a été réalisé dans une plaque 96 puits à fond rond. Une RT-qPCR ciblant le sous-type H5 a été réalisée comme contrôle sur l'ensemble des prélèvements en utilisant le kit Influenza H5/H7 Triplex (ID-Vet).

Tous les prélèvements négatifs ont été testés sur deux nouveaux passages sur œufs dans les mêmes conditions.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude a été menée entre décembre 2020 et avril 2021 dans 63 bâtiments situés dans 4 départements, hautement impactés par l'épizootie H5N8 HP du sud-ouest de la France. A partir de rapports quotidiens, des élevages foyers et des élevages en liens étroits (proximité géographique, liens de filières, liens épidémiologique...) ont été sélectionnés pour être inclus dans l'étude. La sélection avait pour but de choisir une diversité de stade infectieux de phases très précoces, sans signes cliniques ni mortalité, à des phases tardives associées à de forts taux de mortalité. En particulier, les bâtiments avec des animaux asymptomatiques ont été favorisés pour investiguer la dispersion du virus lors des temps précoces de l'infection et ainsi évaluer les performances de l'analyse des poussières pour la surveillance des phases précoces des infections par virus IAHP. Également différentes espèces ont été incluses : canard (48), poulets (12), cailles (2) et oie (1).

L'ensemble des prélèvements environnementaux (poussières et aérosols) ainsi que les écouvillons trachéaux ont été analysés par rRT-qPCR ciblant les gènes M puis H5. La distribution des Ct de chaque type d'échantillon a été comparé à partir 'raincloud plot' et 'boxplot model' (Figure 1A et 1B). De manière générale, les Ct étaient plus faibles pour les écouvillons trachéaux (~25,2) que pour les poussières (~28,6). Pour les aérosols, le Coriolis démontre un nombre supérieur de résultats positifs (Ct <40) que le NIOSH. En comparant les différentes fractions du NIOSH aux résultats du Coriolis, il apparaît clairement que l'ARN viral est plus facilement détectable dans les plus grosses particules (Figure 1C). Ces résultats suggèrent que le virus H5N8 HP est associé aux larges particules de poussière qui peuvent jouer un rôle de véhicule pour la dispersion virale dans l'environnement.

Afin d'estimer la sensibilité des 4 différentes méthodes de prélèvements (écouvillons trachéaux, chiffonnettes, Coriolis et NIOSH) dans des bâtiments

avec ou sans signes cliniques, une analyse par classe latente a été réalisée permettant de comparer des tests de détection indépendants sans qu'une méthode consensus n'ait été établie au préalable (11). Les résultats du modèle suggèrent que les différentes méthodes de prélèvement ont une sensibilité similaire dans des bâtiments où les animaux présentent des signes cliniques. Toutefois, les prélèvements de poussière et d'aérosols présentent une meilleure sensibilité dans des lots sans signes cliniques ou en d'autres termes, dans les phases précoces de l'infection (Figure 1C).

Enfin, afin d'investiguer le caractère infectieux des poussières et aérosols, 25 échantillons (écouvillons trachéaux, poussières et aérosols) prélevés dans 5 bâtiments ont été analysés par isolement viral sur œufs embryonnés. 12 échantillons ont été testés positifs, confirmant l'infectiosité des poussières et aérosols mais aussi permettant de mettre en avant ces nouvelles matrices pour des isolements de virus.

CONCLUSION

Cette étude avait pour objectif d'évaluer, en conditions terrain, si les virus influenza aviaire HP pouvait être véhiculés par la poussière et de comparer la poussière et les aérosols aux écouvillons conventionnels comme matrice de détection moléculaire. La poussière a été collectée en utilisant des chiffonnettes et deux collecteurs d'aérosols au cours de l'épizootie H5N8 HP en France. Les méthodes standards de détection moléculaire ont révélé que de fortes concentrations d'ARN viral étaient détectables dès les phases préliminaires de l'infection. De plus, le fractionnement, par taille, des aérosols a montré que les fortes charges d'ARN viral, mais aussi de particules infectieuses étaient associées aux plus larges fractions (>4µm) qui sont les plus faciles à collecter et à utiliser pour une détection moléculaire. Les observations faites au cours de cette étude ne peuvent pas être reproduites lors d'expérimentation animale en animalerie. En effet, les conditions d'hébergement des animaux imposent, pour des questions d'éthique et de biosécurité, des caractéristiques qui diminuent drastiquement la quantité de poussière. Il est donc difficile de comparer valablement ces conditions expérimentales à celles des élevages.

De travaux de recherche récents sur les voies de transmission des virus influenza ont relevé que les particules d'origine non-respiratoire sont plus à même d'être responsable d'infections que les gouttelettes ou « fomites » (7). En particulier, des aérosols infectieux, générés à partir d'objets inertes manipulés par des hommes ou au cours de mouvements d'animaux peuvent aboutir de nouvelles infections. Connaissant

cette capacité de véhicule des particules infectieuses et l'omniprésence des virus en élevage aviaire (9), la poussière peut jouer un rôle majeur de moyen de transmission et de dispersion environnementale. Ces recherches suggèrent que les protocoles de biosécurité doivent être adaptés pour massivement limiter la dispersion de poussière, notamment à partir de du matériel agricole. Plus spécifiquement, la poussière et les aérosols collectés respectivement sur surfaces inertes et avec collecteur à haut débit montrent une plus grande sensibilité pour la détection précoce du virus. Toutefois, la poussière sur surface inerte montre une plus grande sensibilité de détection de génomes viraux que la collecte d'aérosols. Ceci peut s'expliquer par l'accumulation des poussières et donc de particules infectieuses dans le temps.

La plus grande sensibilité des prélèvements environnementaux, comparés aux écouvillons est susceptible d'être due à la dynamique d'infection des

lots. En effet, au cours des phases préliminaires d'infections, peu d'individus sont infectieux, réduisant la probabilité de détection d'individus infectés par écouvillons (6). Bien que la technique officielle d'écouvillonnage présente une bonne sensibilité de détection, similaire aux aérosols, cette stratégie est longue, laborieuse et plus chère, ce qui peut limiter la rapide détection du virus dans une population donnée.

Enfin, les chiffonnets sont peu coûteux, facile à réaliser et non-invasive rendant cette méthode plus pratique que les écouvillons trachéaux ou cloacaux. Les prélèvements de poussière par chiffonnette apparaissent donc comme une stratégie de surveillance performante et pourrait permettre d'accélérer les délais de réponse diminuant la rapidité de propagation du virus dans les élevages.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Munster V, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan G, Beyer W, Schutten M, Olsen B, Osterhaus A, Fouchier R, 2007. In: PLoS Pathog 3:e61.
2. Lewis N, Banyard A, Whittard E, Karibayev T, Al Kafagi T, Chvala I, Byrne A, Meruyert (Akberovna) S, King J, Harder T, Grund C, Essen S, Reid S, Brouwer A, Zinyakov N, Tegzhanov A, Irza V, Pohlmann A, Beer M, Fouchier R, Akhmetzhan (Akievich) S, Brown I, 2021. In: Emerg Microbes Infect 10(1), pp.148-151.
3. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control and European Union Reference Laboratory for Avian Influenza., 2020. In: EFSA 18, e06270.
4. World Organization for Animal Health (OIE), 2004. In: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Healthstandards/tahm/3.03.04_AI.pdf.
5. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (EFSA AHAW Panel), Nielsen S, Alvarez J, Bicoût D, Calistri P, Depner K, Drewe J, Garin-Bastuji B, Gonzales Rojas J, Schmidt C, Herskin M, Michel V, Chueca M, Pasquali P, Roberts H, Sihvonen L, Spooler H, Stahl K, Velarde Calvo A, Viltrop A, Winckler C, De Clercq K, Klement E, Stegeman JA, Gubbins S, Antoniou SE, Broglia A, Van der Stede Y, Zancanaro G, Aznar I, 2021. In: EFSA J19(1).
6. Vergne T, Gubbins S, Guinat C, Bauzile B, Delpont M, Chakraborty D, Gruson H, Roche B, Andraud M, Paul M, Guérin JL, 2021. In: Transbound Emerg Dis 11(1).
7. Spekrijse D, Bouma A, Koch G, Stegeman A, 2013. In: Influenza Other Respir Viruses 7(2), 132–138.
8. Yang Zhao, André J. A. Aarnink, Mart C. M. De Jong & Peter W. G. Groot Koerkamp 2014. In : Environ Sci Technol 48(10), pp.1071-1128.
9. Carrique-Mas JJ, Breslin M, Sayers AR, McLaren I, Arnold M, Davies R, 2008. In: Appl Microbiol 47(6), pp.514-519.
10. Gaide N, Foret-Lucas C, Figueroa T, Vergne T, Lucas MN, Robertet L, Souvestre M, Croville G, Le Loc'h G, Delverdier M, Guérin JL, 2021. In: Sci Rep 11(1).
11. Beerens N, Germeaad EA, Venema S, Verheij E, Pritz-Verschuren S, Gonzales JL, 2021. In: Emerg Microbes Infect 10(1), pp.97-108.
12. Raynor PC, Adesina A, Aboubakr HA, Yang M, Torremorell M, Goyal MS, 2021. In: PLoS One 16(1), p.e0244977.

Tableau 1. Isolement viral sur œufs embryonnés réalisé sur 5 des 63 bâtiments de volailles prélevés lors de cette étude.

Prélèvement	Bâtiment 1		Bâtiment 2		Bâtiment 3		Bâtiment 4		Bâtiment 5	
	C _t	IV	C _t	IV	C _t	IV	C _t	IV	C _t	IV
ET	25	Pos	20.7	Pos	21.9	Pos	18.9	Pos	20	Pos
Poussière 1	25.8	Neg	25.1	Neg	27.4	Pos	29.5	Pos	24,2	Pos
Poussière 2	27.5	Pos	25.5	Neg	30.1	Pos	28.3	Pos	23	Pos
Coriolis	32	Neg	33.6	Neg	27.8	Neg	25.8	Pos	26,9	Pos
N1	34	Neg	33.6	Neg	27.8	Neg	25.8	Pos	23,7	Pos
N2	Neg	NR	36	Neg	32.4	Neg	33.1	Neg	18,6	Pos
N3	Neg	NR	Neg	NR	36.3	Neg	Neg	NR	Neg	NR

Abréviation : Pos = Positif, Neg = Négatif, NR = Non réalisé, N1 = NIOSH Fraction 1, N2 = NIOSH Fraction 2, N3 = NIOSH Fraction 3, Ct= Cycle Threshold, IV = Isolement viral

Figure 1. Représentation graphique de la distribution de valeurs de Ct en fonction des prélèvements réalisés ainsi que la prévalence de la présence du virus H5N8 HP dans les élevages. A, représentation raincloud plot de la valeur des Ct selon le mode de prélèvement (chiffonnettes ou écouvillons trachéaux) et la présence, ou non, de signes cliniques dans le bâtiment d'élevage. B, distribution de la valeur de Ct des prélèvements d'aérosols. Les points au-dessus de 40, sont dans les deux représentations des échantillons négatifs. C, prévalence du virus dans les élevages et sensibilité des techniques de prélèvements (chiffonnettes, écouvillons trachéaux, Coriolis, NIOSH BC 251) selon la présence, ou non, de signes cliniques.

