



**HAL**  
open science

# Étude du tropisme des virus influenza aviaries hautement pathogènes de clade 2.3.4.4 chez le canard : applications potentielles du tropisme dans les plumes

Clément Dussot

► **To cite this version:**

Clément Dussot. Étude du tropisme des virus influenza aviaries hautement pathogènes de clade 2.3.4.4 chez le canard : applications potentielles du tropisme dans les plumes. Médecine vétérinaire et santé animale. 2018. dumas-04539453

**HAL Id: dumas-04539453**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04539453>**

Submitted on 9 Apr 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.


L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25423

**To cite this version:**

Dussot, Clément . *Étude du tropisme des virus influenza aviaries hautement pathogènes de clade 2.3.4.4 chez le canard : applications potentielles du tropisme dans les plumes*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 49 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr](mailto:tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr)

# ETUDE DU TROPISME DES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES HAUTEMENT PATHOGENES DE CLADE 2.3.4.4 CHEZ LE CANARD : APPLICATIONS POTENTIELLES DU TROPISME DANS LES PLUMES

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE  
DIPLOME D'ETAT  
*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*  
*par*

**DUSSOT Clément**

Né, le 06 décembre 1992 à MONTAUBAN (82)

---

**Directeur de thèse : M. Jean-Luc GUERIN**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Jacques IZOPET**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Jean-Luc GUERIN**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**M. Guillaume LE LOC'H**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

## REPARTITION DES ENSEIGNANTS PAR GRADE

(Mise à jour : 07/09/2018)

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

### PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE (6)

|     |                    |                         |   |
|-----|--------------------|-------------------------|---|
| Mme | CLAUW Martine      | SECTION C.N.E.C.A. N° 8 |   |
| M.  | CONCORDET Didier   |                         | 3 |
| M.  | DELVERDIER Maxence |                         | 7 |
| M.  | ENJALBERT Francis  |                         | 6 |
| M.  | PETIT Claude       |                         | 1 |
| M.  | SHELCHER François  |                         | 8 |

### PROFESSEURS 1° CLASSE (17)

|     |                            |  |    |
|-----|----------------------------|--|----|
| M   | BAILLY Jean-Denis          |  | 4  |
| M.  | BERTAGNOLI Stéphane        |  | 1  |
| M.  | BERTHELOT Xavier           |  | 6  |
| M.  | BOUSQUET-MELOU Alain       |  | 7  |
| M.  | BRUGERE Hubert             |  | 10 |
| Mme | CADIERGUES Marie-Christine |  | 8  |
| Mme | CHASTANT-MAILLARD Sylvie   |  | 6  |
| M.  | DUCOS Alain                |  | 6  |
| M.  | FOUCRAS Gilles             |  | 8  |
| Mme | GAYRARD-TROY Véronique     |  | 7  |
| M   | GUERIN Jean-Luc            |  | 6  |
| Mme | HAGEN-PICARD Nicole        |  | 6  |
| M.  | JACQUIET Philippe          |  | 8  |
| M.  | LEFEBVRE Hervé             |  | 7  |
| M.  | MEYER Gilles               |  | 8  |
| M.  | SANS Pierre                |  | 6  |
| Mme | TRUMEL Catherine           |  | 7  |

### PROFESSEURS 2° CLASSE (7)

|     |                         |  |   |
|-----|-------------------------|--|---|
| Mme | BOULLIER Séverine       |  | 1 |
| Mme | BOURGES-ABELLA Nathalie |  | 7 |
| M.  | GUERRE Philippe         |  | 7 |
| Mme | LACROUX Caroline        |  | 7 |
| M.  | MAILLARD Renaud         |  | 8 |
| M   | MOGICATO Giovanni       |  | 7 |
| Mme | LETRON-RAYMOND Isabelle |  | 7 |

### PROFESSEUR CERTIFIÉ (P.C.E.A.)

|     |   |
|-----|---|
| Mme | MICHAUD Françoise, Professeur d'Anglais |
| M.  | SEVERAC Benoît, Professeur d'Anglais    |

### MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE (11)

|     |                     |  |   |
|-----|---------------------|--|---|
| M.  | BERGONIER Dominique |  | 6 |
| Mme | DIQUELOU Armelle    |  | 8 |
| M.  | JAEG Jean-Philippe  |  | 7 |
| M.  | JOUGLAR Jean-Yves   |  | 8 |
| M.  | LYAZRHI Faouzi      |  | 3 |
| M.  | MATHON Didier       |  | 8 |
| Mme | MEYNADIER Annabelle |  | 6 |
| Mme | PRIYMENKO Nathalie  |  | 6 |
| M.  | RABOISSON Didier    |  | 6 |
| M   | VERWAERDE Patrick   |  | 8 |
| M.  | VOLMER Romain       |  | 1 |

### MAITRES DE CONFERENCES classe normale (24)

|      |                                |  |   |
|------|--------------------------------|--|---|
| M.   | ASIMUS Erik                    |  | 8 |
| Mme  | BENNIS-BRET Lydie              |  | 7 |
| Mme  | BIBBAL Delphine                |  | 4 |
| Mme  | BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle |  | 1 |
| Mme  | BOUHSIRA Emilie                |  | 8 |
| M    | CONCHOU Fabrice                |  | 8 |
| M    | CORBIERE Fabien                |  | 8 |
| M.   | CUEVAS RAMOS Gabriel           |  | 8 |
| Mme  | DANIELS Héléne                 |  | 1 |
| Mme  | DAVID Laure                    |  | 4 |
| Mlle | DEVIERS Alexandra              |  | 7 |
| M.   | DOUET Jean-Yves                |  | 8 |
| Mme  | FERRAN Aude                    |  | 7 |
| Mme  | LALLEMAND Elodie               |  | 8 |
| Mme  | LAVOUE Rachel                  |  | 8 |
| M.   | LE LOC'H Guillaume             |  | 8 |
| M    | LIENARD Emmanuel               |  | 8 |
| Mme  | MILA Hanna                     |  | 6 |
| Mme  | MEYNAUD-COLLARD Patricia       |  | 8 |
| M.   | NOUVEL Laurent                 |  | 6 |
| Mme  | PALIERNE Sophie                |  | 8 |
| Mme  | PAUL Mathilde                  |  | 6 |
| M.   | VERGNE Timothée                |  | 7 |
| Mme  | WASET-SZKUTA Agnès             |  | 6 |

### A.E.R.C. (6)

|     |                         |  |   |
|-----|-------------------------|--|---|
| Mme | BLONDEL Margaux         |  | 8 |
| M.  | CARTIAUX Benjamin       |  | 7 |
| M.  | COMBARROS-GARCIA Daniel |  | 8 |
| Mme | COSTES Laura            |  | 4 |
| M.  | GAIDE Nicolas           |  | 7 |
| M.  | JOUSSERAND Nicolas      |  | 8 |

### MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL (2)

|     |                  |  |   |
|-----|------------------|--|---|
| Mme | DORE-BORDE Laura |  | 8 |
| M.  | LEYNAUD Vincent  |  | 8 |

## **REMERCIEMENTS**

### **A notre président de thèse,**

A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET,  
Professeur à la faculté de médecine de Toulouse Purpan,  
*Virologie,*  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse.  
Hommages respectueux.

### **A notre jury de thèse,**

A Monsieur le Professeur Jean-Luc GUERIN,  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Aviculture et Pathologie aviaire,*  
Pour son aide, son encadrement, sa bonne humeur, ses blagues d'encouragement et sa disponibilité tout au long de cette thèse.  
Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Guillaume LE LOC'H,  
Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Médecine zoologique et santé de la faune sauvage,*  
Qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.  
Hommages respectueux.

|  |    |
|--|----|
| Table des illustrations : .....  | 6  |
| <b>Introduction :</b> .....  | 8  |
| <b>PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : LES VIRUS INFLUENZA A</b> .....   | 9  |
| <i>I. Influenzavirus de type A : éléments de virologie.</i> .....  | 10 |
| <i>a. Type d’Influenzavirus :</i> .....  | 10 |
| <i>b. Propriétés des influenzavirus de type A :</i> .....  | 10 |
| <i>c. Protéines structurales</i> .....   | 12 |
| 1. <i>Hémagglutinine</i> .....   | 12 |
| 2. <i>Neuraminidase</i> .....  | 13 |
| 3. <i>Autres protéines de structure</i> .....  | 13 |
| <i>d. Cycle de réplication virale</i> .....  | 15 |
| <i>e. Des variations antigéniques fréquentes</i> .....   | 16 |
| 1. <i>Mutations ponctuelles</i> .....  | 16 |
| 2. <i>Réassortiment génétique</i> .....  | 17 |
| <i>f. Facteurs de virulence d’un influenzavirus</i> .....  | 17 |
| <i>g. Les virus influenza H5 hautement pathogènes</i> .....  | 20 |
| <i>h. Expression clinique des infections à VIAHP 2.3.4.4. chez les ansériformes et chez les gallinacés</i><br>21 |    |
| <i>II. Epidémiologie descriptive : panzootie à virus influenza H5N8 hautement pathogène :</i> .....              | 24 |
| <i>a. Introduction en Europe par l’Asie et la Russie</i> .....   | 24 |
| <i>b. Octobre 2016 – Décembre 2016 : Début de la crise européenne</i> .....                                      | 25 |
| 1. <i>H5N8 en élevage</i> .....  | 25 |
| 2. <i>H5N8 dans l’avifaune sauvage</i> .....   | 26 |
| 3. <i>H5N8 dans l’avifaune captive</i> .....   | 28 |
| <i>c. Evolution de la situation européenne jusqu’à Mars 2017</i> .....   | 28 |
| <i>d. Epidémiologie descriptive : Etude du territoire français.</i> .....  | 29 |
| <b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....   | 33 |
| <i>I. Objectif de l’étude</i> .....  | 34 |
| <i>II. Matériel et Méthode</i> .....   | 35 |
| <i>a. Matériel expérimental</i> .....  | 35 |
| <i>b. Prélèvements réalisés</i> .....  | 36 |
| <i>c. Autopsie et prélèvements réalisés</i> .....  | 38 |
| <i>d. Analyse virologique : (RT)-qPCR</i> .....  | 38 |

|   |    |
|---|----|
| <i>III. Résultats</i> .....                                   | 39 |
| <i>a. Résultats représentés par jour post-infection</i> ..... | 39 |
| <i>b. Résultats cinétiques par type de prélèvement</i> .....  | 41 |
| <i>c. Résultats cinétiques par groupe</i> .....               | 43 |
| <i>IV. Discussion</i> .....                                   | 44 |
| <i>a. Méthode expérimentale</i> .....                         | 44 |
| <i>b. Résultats</i> .....                                     | 45 |
| <b>Conclusion générale</b> .....                              | 47 |
| Bibliographie .....   | 48 |

## Table des illustrations :

### Tableaux :

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1: Protéines codées par le génome d'un IAV. Source : Ducouso, 2016 .....   | 11 |
| Tableau 2: Répartition des types hémagglutinine en fonction des espèces.....   | 12 |
| Tableau 3: Répartition des types de neuraminidase en fonction des espèces.....   | 13 |
| Tableau 4 : Liste des espèces sauvages infectées par les VAHP H5N8 en Europe en 2014/2015 et en 2016 avant le 11/12/2016, Source : EFSA Journal, 2016 .....                      | 27 |
| Tableau 5 : Liste des espèces captives infectées par les VIAHP H5N8 en Europe en 2014/2015 et en 2016 avant le 11/12/2016, Source : EFSA Journal, 2016 .....                     | 28 |
| Tableau 6 : Nombre de foyers et cas d'IAHP H5N8 domestiques, sauvages et captifs par pays de l'UE entre le 26 octobre 2016 et le 26 mars 2017, Source : OIE/ADNS/DGAL 2017 ..... | 29 |
| Tableau 7: Répartition des foyers à H5N8 par type de production, d'espèces en France sur la période de Novembre 2016 à Mars 2017. Source : Guinat, 2018 .....                    | 32 |
| Tableau 8: Liste des types de prélèvements réalisés tel jour, durant la totalité de la manipulation ...  | 37 |

### Figures :

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Schéma simplifié d'un influenza virus. Ducouso, 2016.....   | 14 |
| Figure 2 : Cycle viral d'un influenza virus ; Source : (Buisson, 2007).....   | 16 |
| Figure 3 : Illustration des différents réassortiments génétiques qui ont conduit à l'IAHP H5N8 isolé en Europe en Sibérie en 2016, Source : (El-Shesheny, 2017).....  | 17 |
| Figure 4: Site de clivage de l'hémagglutinine d'un IAHP. Les étoiles correspondent aux sites des récepteurs de cette hémagglutinine. ....   | 19 |
| Figure 5: Site de clivage de l'hémagglutinine d'un IAHP. Les étoiles correspondent aux sites des récepteurs de cette hémagglutinine .....   | 19 |
| Figure 6: Arbre phylogénétique des virus influenza H5 ; source : (Lee, 2017).....   | 20 |
| Figure 7: Arbre phylogénétique des influenza H5 ; source : (Rôle des oiseaux migrateurs dans la propagation mondiale de l'influenza virus H5N8, Nov 2018) .....   | 21 |
| Figure 8 : Lésions macroscopiques causées par une infection à VIAHP 2.3.4.4. H5N8. En haut : Pancréatite, Au centre : Myocardite, En bas : Myocardite, Source : ENVT Photo 2017 .....                         | 22 |
| Figure 9 : Lésions macroscopiques causées par une infection à VIAHP 2.3.4.4. H5N8. En haut : Hémorragie rénale, Au centre : Hémorragie splénique, En bas : Lésions de cyanose, Source : ENVT Photo 2017 ..... | 23 |
| Figure 10 : Lésions macroscopiques causées par une infection à VIAHP 2.3.4.4. H5N8. En haut : Hémorragie de la face, En bas : Inflammation des tonsilles caecales, Source : ENVT Photo 2017.....              | 24 |
| Figure 11 :Influence des voies migratoires dans la transmission des IAHP ; Source : Journal of Virology, 2015 .....   | 25 |
| Figure 12 : Cas d'IAHP H5N8 en Europe entre le 20 Octobre 2016 et le 1 Janvier 2017, Source : OIE/FAO/ADNS/DGAL, 2017 .....   | 26 |
| Figure 13 : Foyers d'IAHP H5N8 en Europe entre le 26/10/2016 et le 26/03/2017, Source : OIE/FAO/ADNS/DGAL, 2017 .....   | 28 |



|   |    |
|---|----|
| Figure 14: Evolution spatio-temporelle hebdomadaire des foyers d'IAHP déclarés dans les élevages de volailles entre le 28 novembre 2016 (déclaration du premier cas d'IAHP, semaine16-48) et le 6 mars 201 , Source : (Anne Bronner, Mars 2017) .....   | 30 |
| Figure 15 : Proportion d'établissements infectés autour des foyers cliniques (gras: 1km, normal: 3km, tirets: 10 km), Source : (Anne Bronner, Mars 2017) .....  | 31 |
| Figure 16: Modélisation de l'expérimentation durant les 10 jours.....   | 36 |
| Figure 17: Représentation graphique d'une courbe d'amplification de PCR en temps réel. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis pour que le signal d'émission de fluorescence soit significativement plus élevé que la ligne de base. .... | 39 |
| Figure 18: Etude la cinétique virale selon le type d'échantillon. Chaque point correspond à un individu .....   | 41 |
| Figure 19: Résultats cinétiques selon le type de prélèvement. Chaque point représente la moyenne des valeurs par groupe de 5 canards. ....  | 41 |
| Figure 20: Résultats cinétiques par groupe de canards. Chaque point représente la moyenne des valeurs par groupe de 5 canards. ....   | 43 |

## Introduction :

L'influenza, plus communément appelée « grippe », est une maladie contagieuse qui représente une menace sérieuse pour la santé animale et humaine. Cette maladie est transmise par les virus influenza. Le genre Influenza A en particulier est le plus commun et peut infecter un large spectre d'espèces dont l'homme, faisant de ce virus un agent de zoonose. Ce virus a d'ailleurs causé trois pandémies pendant le siècle dernier faisant, sans doute des dizaines de millions de victimes. Plus récemment, le monde a dû faire face à une panzootie d'influenza aviaire à virus H5N1 à partir de 1997. Les oiseaux en particulier aquatiques, constituent le réservoir de ces virus. Du fait des nombreux sous-types existants et leurs capacités de mutations, les virus influenza A peuvent franchir les barrières inter-espèces, pour infecter des mammifères : porcs, chevaux, mammifères marins, et l'homme. Alors que chez les oiseaux aquatiques sauvages l'infection reste majoritairement asymptomatique, chez les volailles domestiques comme les poulets, les canards, les dindes ou encore les cailles, les manifestations cliniques dépendent largement de la souche virale, pouvant aller de l'asymptomatique à une forme systémique létale.

En 2014, une nouvelle lignée de virus influenza aviaire hautement pathogène (lignée 2.3.4.4 sous-type H5N8) s'est rapidement propagée en Europe. En infectant de la volaille d'élevage, ces virus hautement pathogènes ont causé de nombreux problèmes économiques en limitant les échanges commerciaux et en provoquant des la mort de plusieurs millions de volailles. Devant l'émergence de nouvelles souches potentiellement pandémiques, et devant les impacts socioéconomiques que représenterait une nouvelle pandémie, l'étude poussée de ces virus est devenue une priorité.

PREMIERE PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : LES  
VIRUS INFLUENZA A

I. Influenzavirus de type A : éléments de virologie.

a. *Type d'Influenzavirus :*

Les influenzavirus font partie de la famille des *Orthomyxoviridae*, au sein de laquelle, ils sont classés en sept genres : les influenzavirus de type A, B, C et D forment les quatre premiers genres, les trois derniers regroupant les *Isavirus*, les *Quaranjavirus* et les *Thogotovirus*. Cette classification se base sur les différences antigéniques des protéines virales de nucléocapside et de matrice (Büchen-Osmond, 2006).

Seuls les influenzavirus de type A sont véritablement inféodés à diverses espèces animales. Ils ont été isolés chez des oiseaux (sauvages et domestiques), des mammifères terrestres (Homme, porcins, équidés, mustélidés, félidés) et des mammifères marins (baleines et phoques) (Ebrahim, 2004). Les influenzavirus de type B et C sont globalement inféodés à l'homme bien que des influenzavirus de type B aient également été isolés chez des phoques et que des influenzavirus de type C aient également été isolés chez des porcs (D. Kaye, 2005).

b. *Propriétés des influenzavirus de type A :*

Les influenzavirus de type A sont des virus enveloppés, de forme sphérique ou filamenteuse, d'un diamètre d'environ 100 nm (Delvallée, 2004). Ces virus sont sensibles à la chaleur (30 minutes à 56°C), à un pH acide (< 3) et aux solvants lipidiques (Ethanol, aldéhydes, hypochlorite) mais sont particulièrement résistants dans les tissus et dans l'environnement, notamment dans l'eau (Formosa, 2004). On estime qu'ils peuvent survivre 4 jours à 22°C, plus de 30 jours à 0°C dans l'eau et 40 jours dans les fientes (Spickler, 2016).

Ces virus sont constitués de huit segments d'ARN monocaténaire, codant pour dix-sept protéines virales. Parmi elles, deux glycoprotéines d'enveloppe, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), sont les principaux inducteurs d'anticorps protecteurs chez l'hôte infecté. L'hémagglutinine permet l'attachement de l'Influenzavirus à un récepteur cellulaire de l'hôte par reconnaissance des acides

sialiques que ce récepteur porte (N. Etteradossi, 2002). La neuraminidase permet l'hydrolyse du récepteur cellulaire ce qui favorise la libération des particules virales.

Le tableau ci-dessous reprend les protéines codées par le génome d'une influenza aviaire. (Ducousso, 2016)

| Brin d'ARN                        | Protéine(s) codé(es)         | Principales fonctions                           | Taille (acides aminés) |
|-----------------------------------|------------------------------|---|------------------------|
| <b>Protéines non structurales</b> |                              |   |                        |
| 1                                 | PB2 : Protéine Basique 2     | Sous-unité de la polymérase                     | 759                    |
| 2                                 | PB1 : Protéine Basique 1     | Sous-unité de la polymérase                     | 757                    |
|                                   | PB1-N40                      | Régulation de la réplication                    | 87                     |
|                                   | PB1-F2                       | Activité pro-apoptotique                        |                        |
|                                   |                              | Augmentation de la virulence                    |                        |
| 3                                 | PA : Protéine Acide          | Sous-unité de la polymérase                     | 716                    |
|                                   | PA-N155                      | Capture de la coiffe d'ARNm cellulaires         |                        |
|                                   | PA-N182                      | Atténuation de la virulence                     |                        |
|                                   | PA-X                         | id  |                        |
|                                   |                              | Atténuation de la virulence ?                   |                        |
| 5                                 | NP : Nucléoprotéine          | Liaison à l'ARN                                 | 498                    |
| 8                                 | NS1 (Non Structurale 1)      | Capture de la coiffe d'ARNm cellulaires         | 230                    |
|                                   | NS2                          |   | 121                    |
|                                   | NS3                          | Isoforme de NS1 ; adaptation à l'hôte ?         |                        |
|                                   | NEP : Nuclear Export Protein | Translocation des ARN viraux vers le cytoplasme |                        |
| <b>Protéines structurales</b>     |                              |   |                        |
| 4                                 | HA : Hémagglutinine          | Adsorption aux acides sialiques                 | 566                    |
|                                   |                              | Fusion enveloppe/membrane du phagolysosome      |                        |
| 6                                 | NA : Neuraminidase           | Clive la liaison A. sialique/galactose          | 454                    |
| 7                                 | M1 : Protéine de Matrice 1   | Forme de la particule virale                    | 252                    |
|                                   | M2 : Protéine de Matrice 2   | Canal à protons                                 | 97                     |
|                                   | M42                          | Isoforme de M2                                  |                        |

Tableau 1: Protéines codées par le génome d'un IAV. Source : Ducousso, 2016

Les différentes souches d'influenzavirus sont soumis à une classification officielle. Celle-ci se base sur le type (A, B ou C) ; l'espèce animale où la souche a été isolée, le lieu où elle a été isolée, le numéro d'ordre de l'isolat ; les deux derniers chiffres de l'année d'isolement ainsi que les sous-types de l'hémagglutinine (HA) et de la neuraminidase (NA).

Ex : A/goose/Guangdong/1/1996

### c. Protéines structurales

#### 1. Hémagglutinine

Son nom lui vient de sa capacité à agglomérer les érythrocytes hématiques (D.L. Nelson, 2005). Seize sous-types d'hémagglutinine sont décrits à ce jour chez les oiseaux (notés de H1 à H16) et 2 chez les chiroptères (H17 et H18) (Mehle, 2014). L'hémagglutinine (HA) est composée de deux sous-unités qui possèdent des sites de fixation spécifiques à certains récepteurs des cellules cibles, et des sites de fixation pour les anticorps neutralisants anti-hémagglutinine. Elle permet l'attachement du virus à son récepteur et la fusion entre la membrane de la cellule et l'enveloppe virale. Elle est la cible majeure de la réponse immunitaire humorale de l'hôte (Forrest L., 2010). L'hémagglutinine est une protéine trimérique, et chaque monomère est composé d'une tête globulaire et d'une tige, et peut être décomposé en deux sous-unités nommée HA1 et HA2. La sous-unité HA1 est formée par la tête globulaire complète et une partie de la tige, et possède le site récepteur qui permet l'attachement du virus à la cellule cible. La sous-unité HA2 est comprise dans la tige uniquement, et intervient dans la fusion entre la membrane de la cellule et l'enveloppe virale (Forrest L., 2010). L'hémagglutinine des virus s'attache à l'acide N-acétyl-neuraminique (ou acide sialique) terminal des récepteurs membranaires de la cellule hôte, permettant ainsi l'entrée du virus dans la cellule par endocytose (Rosenberg, 1956). L'endosome contenant la particule virale migre vers l'intérieur de la cellule. Le pH va chuter dans l'endosome jusqu'à 5 environ, provoquant un changement de conformation de la molécule d'hémagglutinine qui permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale.

| Sous- types | Avifaune | Porc | Cheval | Chiroptères | Homme |
|-------------|----------|------|--------|-------------|-------|
| H1          | +        | +    | -      | -           | +     |
| H2          | +        | -    | -      | -           | +     |
| H3          | +        | +    | +      | -           | +     |
| H4 à H6     | +        | -    | -      | -           | -     |
| H7          | +        | -    | +      | -           | -     |
| H8 à H16    | +        | -    | -      | -           | -     |
| H17 à H18   | -        | -    | -      | +           | -     |

Tableau 2: Répartition des types hémagglutinine en fonction des espèces

## 2. Neuraminidase

La neuraminidase (NA) est la deuxième protéine la plus représentée dans l'enveloppe virale. Son rôle est complémentaire à celui de l'hémagglutinine. Elle est dotée d'une activité enzymatique et catalyse le clivage des résidus terminaux de l'acide sialique. Cette fonction est capitale au stade tardif de la réplication, pour permettre la libération des virions nouvellement formés, attachés à la surface de la cellule infectée. Des données récentes indiquent qu'elle facilite également le détachement des virions du mucus présent au niveau de l'épithélium respiratoire, riche en acide sialique (Webster, 1992) (Landolt, 2007). Comme l'hémagglutinine, la neuraminidase est un déterminant antigénique et montre une variation importante en réponse à la pression immunitaire de l'hôte (Forrest L., 2010). Il existe jusqu'à onze sous-types (Mehle, 2014) de neuraminidases dont 9 sous-types présents chez l'avifaune.

| Sous-types | Avifaune | Porc | Cheval | Chiroptères | Homme |
|------------|----------|------|--------|-------------|-------|
| N1 à N2    | +        | +    | -      | -           | +     |
| N3 à N6    | +        | -    | -      | -           | -     |
| N7 à N8    | +        | -    | +      | -           | -     |
| N9         | +        | -    | -      | -           | -     |
| N10 à N11  | -        | -    | -      | +           | -     |

Tableau 3: Répartition des types de neuraminidase en fonction des espèces

## 3. Autres protéines de structure

Les protéines M1 et M2 se trouvent sous la couche lipidique et assurent la cohérence de la structure. La protéine M1 est la protéine la plus abondante du virion. Elle s'associe à la partie intracellulaire des protéines de surface et à la nucléoprotéine, et assure la rigidité du virion (Forrest L., 2010). La protéine M2 est codée par le même segment d'ARN que M1 et 14 est insérée dans l'enveloppe virale. Elle se comporte comme un canal ionique activé à pH bas et permet l'entrée d'ions hydrogène. Elle intervient également dans la maturation des glycoprotéines, agissant en association avec l'hémagglutinine dans les processus de

décapsidation et le transport des glycoprotéines vers la surface cellulaire pour la formation de nouvelles particules infectieuses. A l'intérieur du virion, les 8 segments de génome sont entourés par une nucléoprotéine, qui lie et habille les segments et contribue à la mise en volume du virion. Chaque complexe RNP (pour ribonucléoprotéine) est donc composé d'un segment d'ARN négatif et d'une nucléoprotéine. Au bout de ces derniers se trouve un complexe polymérase 3P composé de trois sous-unités : PB1, PB2 et PA. La protéine de matrice M1 entoure les 8 complexes RNP et se situe sous la membrane (Bourret, 2012). Enfin, bien que la protéine NS1 soit présente en grande quantité dans les cellules infectées pendant la réplication des virus, elle n'est pas incorporée dans les nouveaux virions (Forrest L., 2010). Elle jouerait plusieurs rôles, dont un rôle important dans l'échappement du virus à l'action antivirale de l'interféron (Hale, 2008). Quant à la protéine NS2, elle assure le transport des ribonucléoprotéines nouvellement formées du noyau vers le cytoplasme

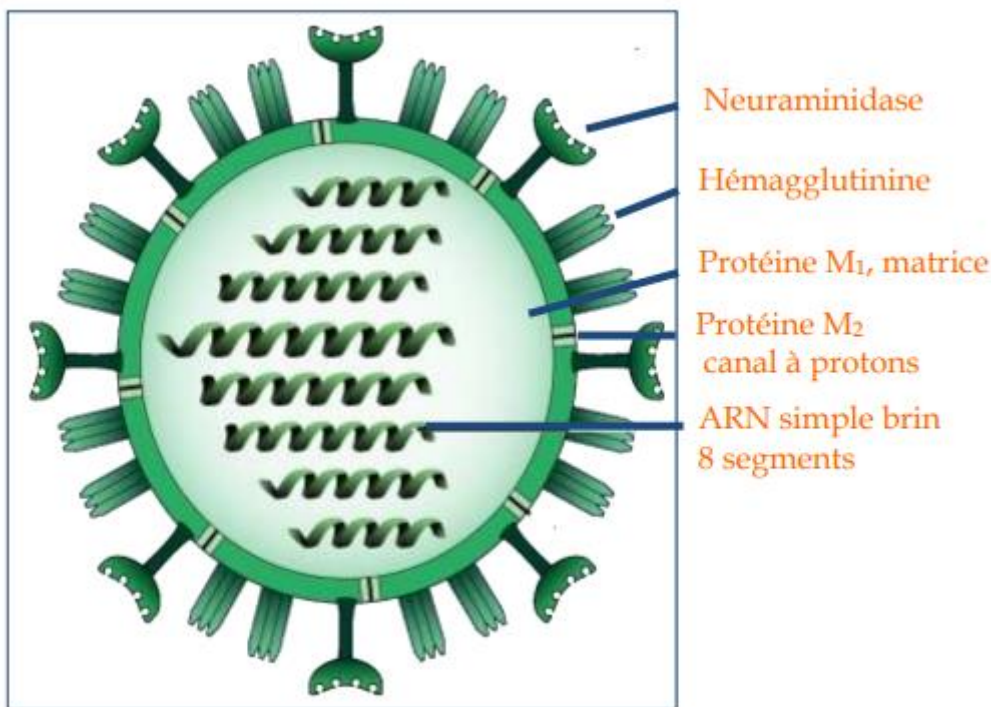


Figure 1: Schéma simplifié d'un influenza virus. Ducouso, 2016



#### *d. Cycle de réplication virale*

L'entrée du virus dans la cellule hôte est permise par l'hémagglutinine qui permet l'attachement virus/cellule sensible. Elle reconnaît le récepteur à l'extérieur de la cellule qui se termine par un acide sialique relié à un galactose. Ensuite se produit l'endocytose grâce aux clatrides. La vésicule d'endocytose contenant le virus est acidifiée et son canal ionique permet le passage des protons à l'intérieur du virus. Si des antiviraux n'inhibent pas ce transfert, la membrane de l'endosome fusionne avec la membrane du virus grâce à la sous-unité H2 de l'hémagglutinine. Les RNP sont libérées dans le cytosol. Les ARN viraux sont ensuite transportés vers le noyau grâce à la protéine NP, où le cycle de réplication se déroule (le virus de la grippe constitue donc une exception notable car la majorité des virus à ARN ont un cycle de réplication cytoplasmique). Ils pénètrent le noyau à travers les pores nucléaires. Dans le noyau, chaque segment de l'ARN viral (négatif) est, d'une part, transcrit en ARN message (positif) et d'autre part, répliqué pour former de nouveaux segments génomiques viraux (ARN- → ARN+ → ARN-). Les ARNm produits grâce au complexe polymérase à partir des segments 7 et 8, subissent un épissage différentiel ce qui permet la synthèse de 2 protéines différentes à partir d'un même segment (ex : le segment 7 fournit deux protéines : la protéine M1 qui forme la matrice et la protéine M2 qui forme les canaux ioniques). C'est l'utilisation de l'épissage différentiel qui explique sans doute le fait que le cycle viral soit nucléaire. Les ARNm sont maturés puis exportés dans le cytoplasme pour y être traduits, permettant ainsi la synthèse des protéines virales. Dans le cytoplasme, les différentes protéines virales sont assemblées. Les glycoprotéines d'enveloppe sont transportées vers la membrane. Les protéines NP se lient aux brins d'ARN négatifs pour former les RNP. Ces derniers, avec la protéine M1, vont former la matrice (Pflug, 2017). Les nouveaux virions formés par bourgeonnement, se détachent de la cellule par clivage de l'hémagglutinine par la neuraminidase. Il existe certains antiviraux qui agissent comme des inhibiteurs de la neuraminidase. Un cycle de réplication entier d'un virus dans une cellule hôte ne dure souvent que quelques heures et a pour effet la genèse de plusieurs centaines de virions.

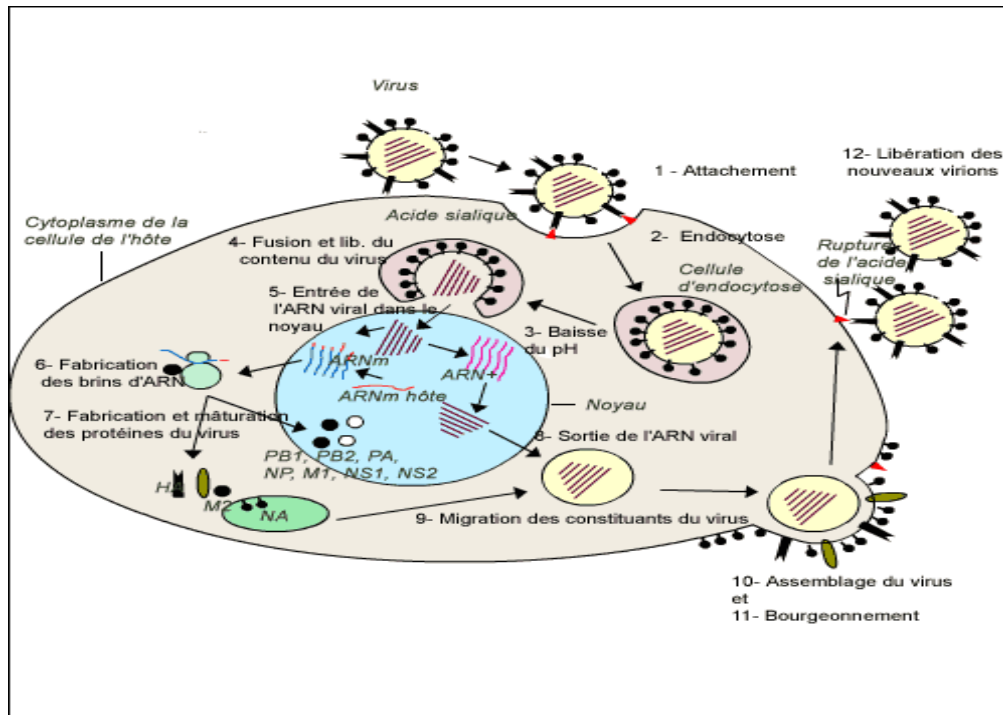


Figure 2 : Cycle viral d'un influenza virus ; Source : (Buisson, 2007)

### e. Des variations antigéniques fréquentes

Les IA présentent une grande variabilité génétique. Deux mécanismes principaux participent à cette variabilité : les mutations ponctuelles et les réassortiments génétiques.

#### 1. Mutations ponctuelles

L'importance de ce mécanisme de variation est dépendant du type d'hôte en question. En effet, chez les oiseaux aquatiques, hôtes naturels des influenza virus de type A, les virus évoluent peu car leur niveau d'adaptation élevé à leur hôte résulte en une faible pression de sélection. Il est alors très peu probable qu'une mutation engendre un avantage sélectif conséquent. En revanche, en cas de changement d'hôte, une évolution rapide des virus peut se produire. Cela est dû directement au fonctionnement des ARN polymérases virales qui ne possèdent pas de système de réparation lors d'erreur de réplication de l'ARN, ce qui contribue à une évolution virale très rapide. Même si la plupart des modifications restent mineures et n'aboutissent pas forcément à une modification de la séquence des acides aminés, il se peut qu'elle affecte l'hémagglutinine ou la neuraminidase provoquant un changement dans la structure de ces protéines, ce qui aura une influence sur l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection.

## 2. Réassortiment génétique

Ce mécanisme repose sur la nature segmentée du génome viral. Lors de la co-infection d'une cellule hôte par deux virus de génotype différent, on peut assister lors de l'assemblage de virions lors de la réplication, à la création de virions « hybrides » possédant des segments viraux de chacun des deux virus. C'est ce mécanisme qui est à l'origine de la création de « nouveaux » virus influenza capables de franchir les barrières d'espèces et de causer des pandémies majeures (Landolt, 2007).

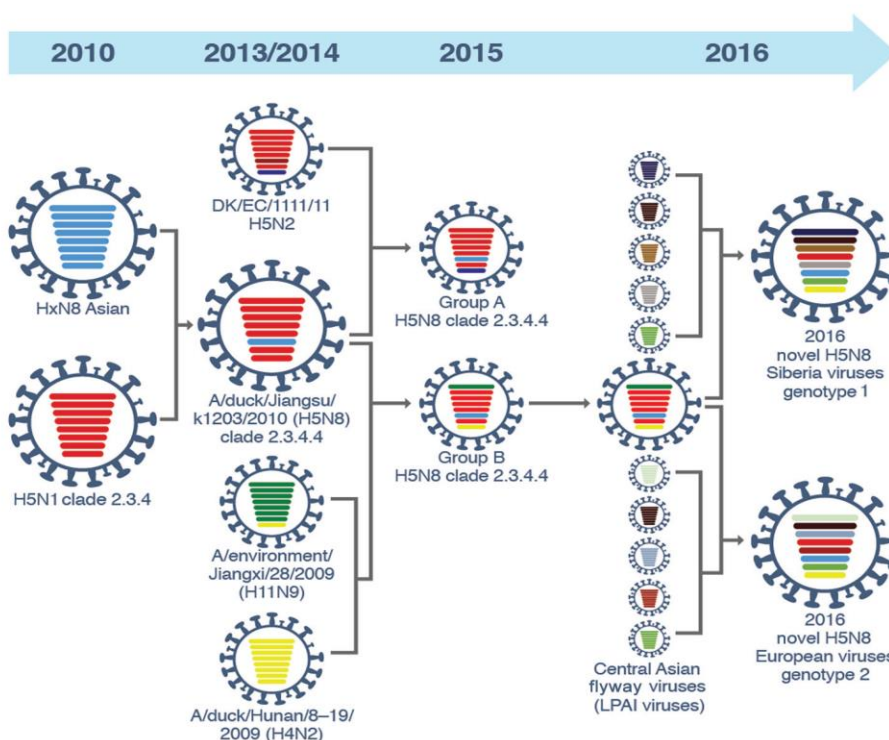


Figure 3 : Illustration des différents réassortiments génétiques qui ont conduit à l'IAHP H5N8 isolé en Europe et en Sibérie en 2016, Source : (El-Shesheny, 2017)

### f. Facteurs de virulence d'un influenza virus

Les virus influenza virus de type A peuvent être généralement classés dans deux catégories. On distingue ainsi :

- Les virus influenza faiblement pathogènes (VIAFP) responsables de peu ou pas de manifestations cliniques chez les oiseaux domestiques ou sauvages.

- Les virus influenza hautement pathogènes (VIAHP) pouvant provoquer de sévères manifestations cliniques avec une forte mortalité (pouvant aller jusqu'à 100 % en quelques jours). Les virus influenza hautement pathogènes (VIAHP) regroupent les influenza H5Nx et H7Nx. Ces VIAHP sont généralement considérés comme issus des VIAFP circulant chez les oiseaux sauvages qui, après introduction et adaptation à la volaille domestique, acquièrent par mutation et recombinaison des caractéristiques génétiques leur conférant une haute pathogénicité. (Munster VJ, 2010) (Beato MS, 2011)

L'hémagglutinine constitue un facteur majeur de la virulence, sans pour autant en être l'unique déterminant (Ha et al. 2001). En effet, comme évoqué précédemment, l'hémagglutinine est responsable de l'attachement et de la pénétration cellulaire du virus dans la cellule hôte par fusion des membranes cellulaire et virale. Pour ce faire, la protéine précurseur HA0 doit être clivée en deux sous-unités (HA1 et HA2) par les protéases de la cellule-hôte. L'hémagglutinine des souches d'influenzavirus peu virulentes ne contient qu'une seule arginine au niveau du site de clivage. Elle ne peut être clivée que par des enzymes cellulaires de type trypsine, présentes dans un nombre restreint de cellules des tractus respiratoire et intestinal, ce qui limite les infections par ces virus à ces organes.

Au contraire, l'hémagglutinine des souches d'influenzavirus hautement pathogènes pour les oiseaux présente à son site de clivage des acides aminés basiques multiples, qui sont reconnus par des protéases intracellulaires de type furine ubiquitaires présentes dans de nombreux organes, ce qui explique la dissémination de ces virus dans tout l'organisme infecté (poumon, rate, rein, cerveau, foie).

En raison de la richesse de l'ARN viral en bases de type purine au niveau de la région codant le site de clivage de l'HA, la polymérase virale aurait tendance à faire davantage d'erreurs (« bégaiement »), ce qui rend la probabilité de mutations à cet endroit de la séquence particulièrement élevée. Jusqu'à présent, c'est uniquement chez des VIA de sous-types H5 et H7 que s'est produit ce mécanisme de genèse de souches hautement pathogènes à partir de souches faiblement pathogènes. Ces sous-types ont été à l'origine des épisodes cliniques graves recensés dans le monde, certains aboutissant à des épizooties catastrophiques. Les

caractéristiques du site de clivage de l'HA constituent de ce fait un critère officiel d'évaluation de la virulence des sous-types H5 et H7 pour les oiseaux.

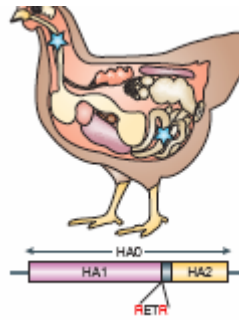


Figure 4: Site de clivage de l'hémagglutinine d'un IAFP. Les étoiles correspondent aux sites des récepteurs de cette hémagglutinine.

Source : : (Buisson, 2007)

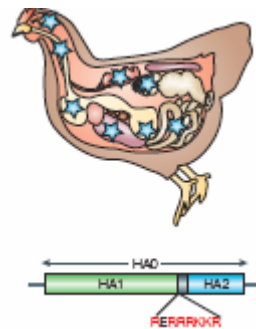


Figure 5: Site de clivage de l'hémagglutinine d'un IAHP. Les étoiles correspondent aux sites des récepteurs de cette hémagglutinine

D'autres mécanismes entrent en jeu dans l'expression de la pathogénicité : la protéine NS1, codée par le segment 8, joue un rôle central d'antagoniste des réponses de l'hôte en contrecarrant la production de l'interféron cellulaire de type 1 (Garcia-Sastre, 1998). La protéine PB1-F2 induit l'apoptose cellulaire en se fixant sur la paroi des mitochondries, puis en la perforant ce qui provoque une fuite de cytochrome C. Cette même protéine occasionne chez la souris une dérégulation de la production de cytokines et aggrave les infections secondaires pulmonaires (Conenello, 2007).

g. Les virus influenza H5 hautement pathogènes

Les virus influenza H5 hautement pathogènes descendants du virus A/goose/Guandong/1/ 1996 présentent une très grande diversité génétique, liée à une circulation intensive chez diverses espèces aviaires depuis plus de 20 ans. On distingue ainsi des « clades » ou sous-groupes génétique, notés 1, 2, 3 puis 1.1, 1.2 et... Cette classification, très évolutive, permet de regrouper des virus présentant des propriétés biologiques, immunologiques et pathologiques similaires. Les virus circulant depuis 2014 en Europe appartiennent au clade 2.3.4.4 et le principal sous-type représenté en est le H5N8. Des réassortants H5N5 et H5N6 ont également été décrits en Europe, alors que les sous-type H5N1 et H5N2 ont été isolés aux Etats-Unis en 2015.

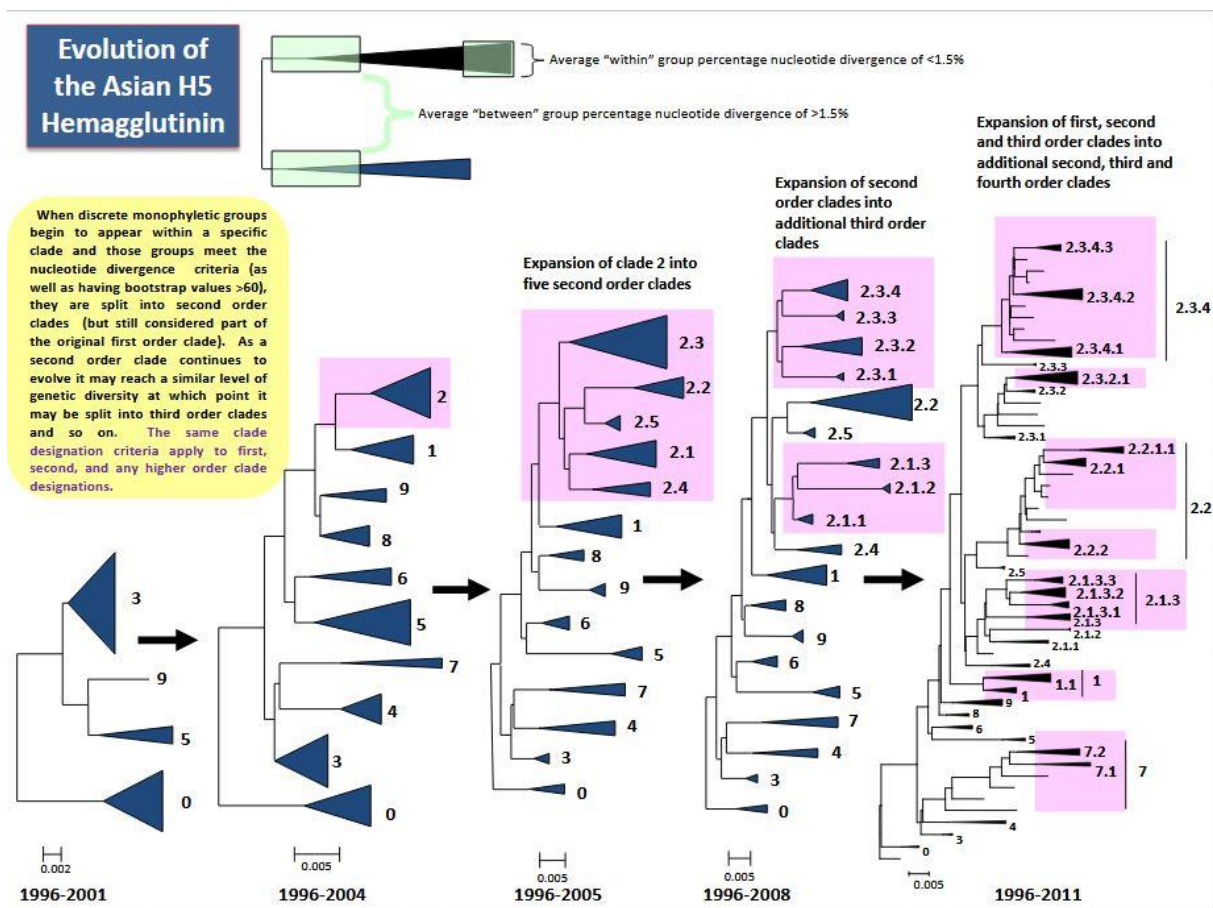


Figure 6: Arbre phylogénétique des virus influenza H5 ; source : (Lee, 2017)

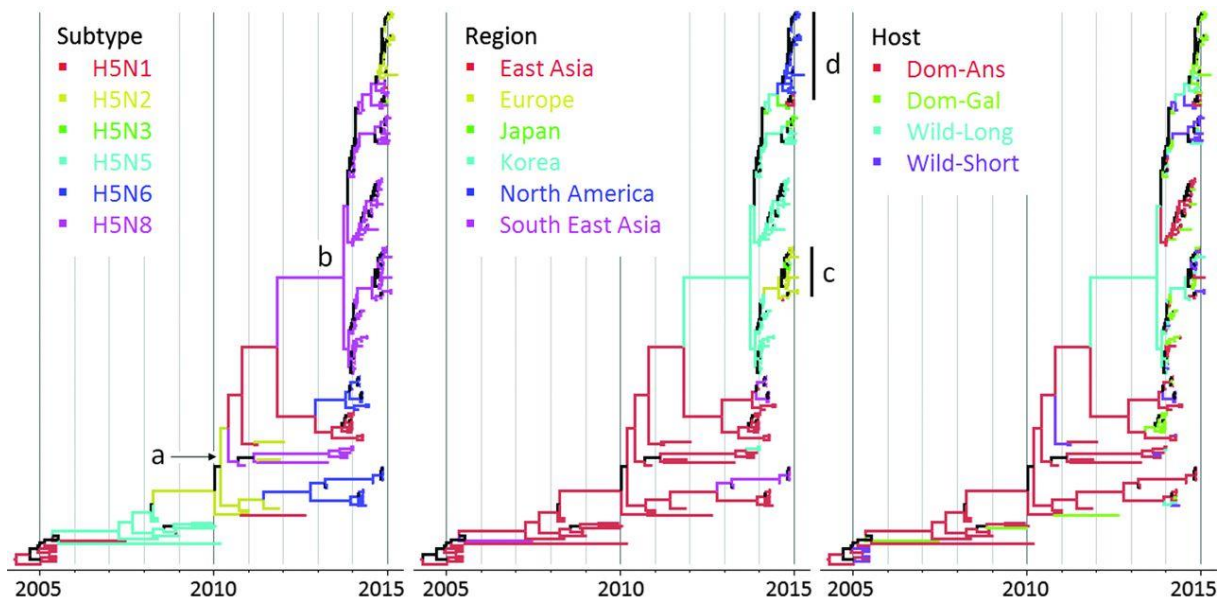


Figure 7: Arbre phylogénétique des influenza H5 ; source : (Rôle des oiseaux migrateurs dans la propagation mondiale de l'influenza virus H5N8, Nov 2018)

*h. Expression clinique des infections à VIAHP 2.3.4.4. chez les ansériformes et chez les gallinacés*

L'expression clinique de l'IAHP à virus 2.3.4.4. (essentiellement de sous-type H5N8) dépend de l'espèce touchée ainsi que de l'âge de l'animal. Il s'agit d'un virus extrêmement contagieux dont les charges virales sont nettement supérieures aux souches de VIAHP H5 déjà connues qui ont frappé la France en 2015. Les voies d'excrétion sont multiples : aérienne, *via* les plumes, ou les fèces. Une particularité de ce virus H5N8 réside dans les lésions causées chez les ansériformes. En effet, la plupart des virus, même hautement pathogènes, restent asymptomatiques chez les canards -alors qu'ils causent généralement de graves lésions et de la mortalité chez les poulets ; cependant dans ce cas, on observe nombreuses lésions chez les canards associées à un tableau clinique observable sur le terrain.

Chez les ansériformes les lésions sont majoritairement des myocardites et pancréatites, associées dans quelques cas à des œdèmes et des lésions de cyanose sur d'autres organes (poumons, peau, rate, foie, intestins, œsophage, cerveau)



*Figure 8 : Lésions macroscopiques causées par une infection à VIAHP 2.3.4.4. H5N8. En haut : Pancréatite, Au centre : Myocardite, En bas : Myocardite, Source : ENVT Photo 2017*



Chez les galliformes les lésions sont majoritairement des lésions hémorragiques de la tête, des caroncules, des pattes voire des reins et de la rate.



*Figure 9 : Lésions macroscopiques causées par une infection à VIAHP 2.3.4.4. H5N8. En haut : Hémorragie rénale, Au centre : Hémorragie splénique, En bas : Lésions de cyanose, Source : ENVT Photo 2017*



Figure 10 : Lésions macroscopiques causées par une infection à VIAHP 2.3.4.4. H5N8. En haut : Hémorragie de la face, En bas : Inflammation des tonsilles caecales, Source : ENVT Photo 2017

II. Epidémiologie descriptive : panzootie à virus influenza H5N8 hautement pathogène :

a. *Introduction en Europe par l'Asie et la Russie*

Les flux d'oiseaux migratoires ont clairement été identifiés comme probable source d'introduction du virus en Europe par de l'avifaune sauvage infectée provenant de Russie et d'Asie. En effet, la migration automnale des sites de nichées en Russie vers les sites hivernaux en Asie constitue le plus gros de ces échanges intercontinentaux. Le virus H5N8 est détecté en Mai 2016 en Russie sur une oie sauvage au niveau des routes migratoires entre l'Asie de

l'est et l'Europe. L'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) suggère que l'avifaune sauvage joue en effet un rôle majeur dans la dissémination intercontinentale du virus entre l'Asie et l'Europe. (Adlhoch, November 2016)

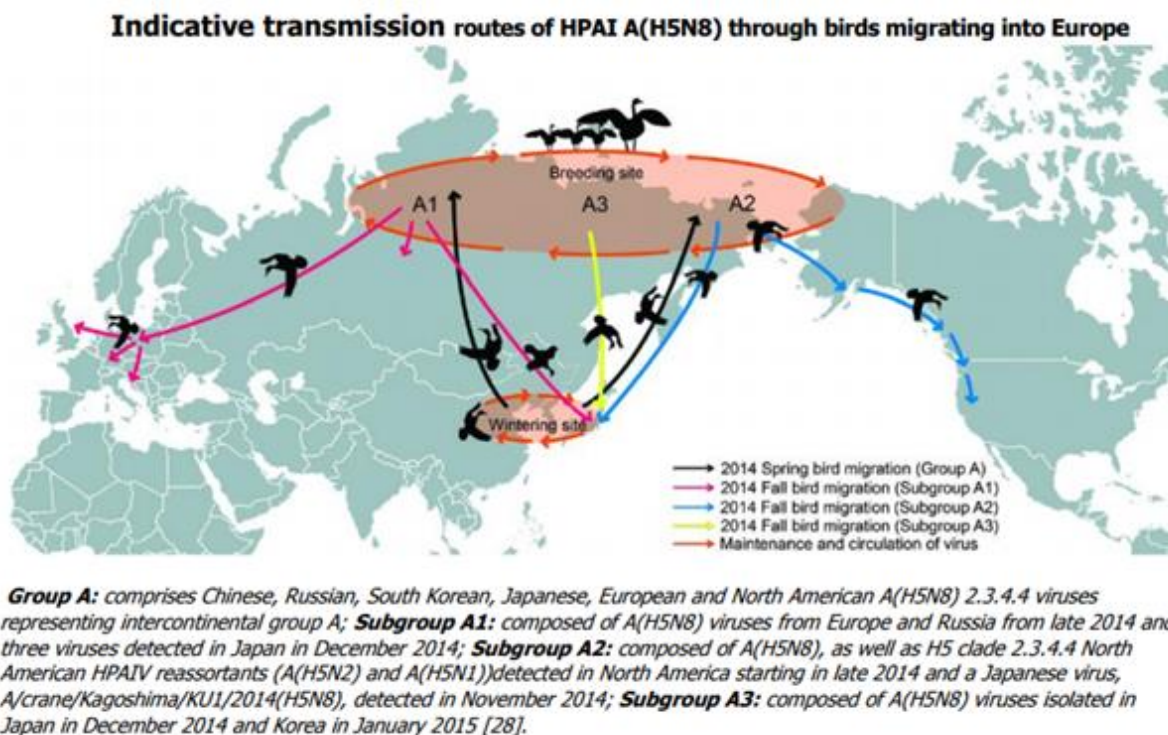


Figure 11 :Influence des voies migratoires dans la transmission des IAHP ; Source : Journal of Virology, 2015

## b. Octobre 2016 – Décembre 2016 : Début de la crise européenne

### 1. H5N8 en élevage

La transmission virale entre l'avifaune migratoire et l'avifaune domestique a lieu *via* des contacts directs et indirects étant que le virus H5N8 reste actif dans les fèces des oiseaux migrateurs. L'avifaune domestique européenne infectée est à chaque fois située à proximité de points d'eaux servant d'habitat à l'avifaune sauvage et donc de potentiels réservoirs viraux. Au global, 163 élevages se sont retrouvés infectés par le influenza virus H5N8 durant la fin d'année 2016. Le premier cas confirmé (03/11/2016) concernait un élevage de dindes en Hongrie. Une semaine plus tard, des cas ont été notifiés en Autriche, Allemagne et dans d'autres élevages en Hongrie. L'extension géographique du virus en Europe a été confirmée

par la présence de cas notifiés dans d'autres pays membres de l'Union Européenne, tel que le Danemark (21/11/2016), les Pays-Bas (26/11/2016), la Suède (28/11/2016), la France (01/12/2016) et la Pologne (03/12/2016). D'autres cas sont rapportés successivement en Hongrie et en France. On dénombre 81 élevages de canards touchés, dont 70 en Hongrie et 9 en France, 40 élevages d'oies (dont 39 en Hongrie), 4 pour les dindes, 2 pour les poules pondeuses, un élevage pour les poulets de chair et pour les poulets reproducteurs et 18 dans des élevages multi-productions.

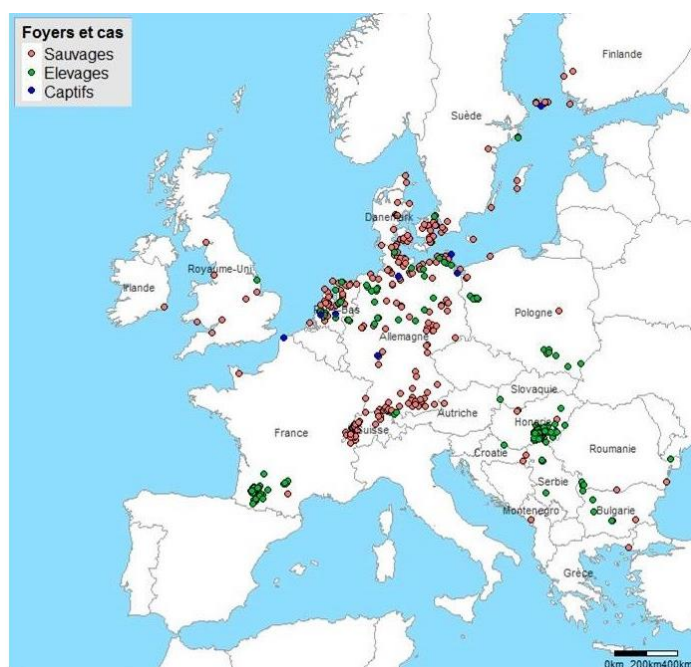


Figure 12 : Cas d'IAHP H5N8 en Europe entre le 20 Octobre 2016 et le 1 Janvier 2017, Source : OIE/FAO/ADNS/DGAL, 2017

## 2. H5N8 dans l'avifaune sauvage

Le premier cas d'oiseau sauvage infecté par H5N8 est rapporté en Hongrie (27/10/2016, *Cygnus olor*), environ une semaine avant la première crise d'H5N8 en élevage dans le pays. Un second cas d'avifaune sauvage est trouvé en Pologne le 12/11/2016. La semaine suivante, cinq pays de l'Union Européenne (Autriche, Allemagne, Croatie, Danemark, Pays-Bas) ainsi que la Suisse, déclarent des cas positifs sur leurs territoires respectifs. D'autres

pays tels que la Finlande, la France, la Serbie, la Suède et la Roumanie annoncent des cas dans l'avifaune sauvage. La figure 12 représente les 593 cas rapportés jusqu'à mi-décembre 2016. Cependant, le nombre de cas rapportés ne reflète pas entièrement le nombre de cas réel dans l'avifaune sauvage, car il ne s'agit que d'une fraction « visible », basée sur les oiseaux trouvés morts et détectés positifs pour le virus. De plus, quelques cas de mortalités de masse ont été répertoriés, notamment en Allemagne (Grand lac de Plön), en Suisse (Lac de Constance, *Aythya fuligula* et *A. ferina*), en Pologne (Poméranie) et aux Pays-Bas (Lac Markermeer)

La liste ci-dessous représente les espèces sauvages infectées par les VIAHP H5N8 en Europe entre 2014 et 2016 :

| <b>Wild birds reported by MSs:</b>                      | <b>2014-2015</b> | <b>2016</b> |
|---|------------------|-------------|
| Black-headed gull ( <i>Chroicocephalus ridibundus</i> ) | x                | x           |
| Common buzzard ( <i>Buteo buteo</i> )                   |                  | x           |
| Common coot ( <i>Fulica atra</i> )                      |                  | x           |
| Common eider ( <i>Somateria mollissima</i> )            |                  | x           |
| Common goldeneye ( <i>Bucephala clangula</i> )          |                  | x           |
| Common gull ( <i>Larus canus</i> )                      |                  | x           |
| Common magpie ( <i>Pica pica</i> )                      |                  | x           |
| Common moorhen ( <i>Gallinula chloropus</i> )           |                  | x           |
| Common pochard ( <i>Aythya ferina</i> )                 |                  | x           |
| Carrion crow ( <i>Corvus corone</i> )                   |                  | x           |
| Eurasian curlew ( <i>Numenius arquata</i> )             |                  | x           |
| Eurasian teal ( <i>Anas crecca</i> )                    | x                | x           |
| Eurasian wigeon ( <i>Anas penelope</i> )                | x                | x           |
| Great black-backed gull ( <i>Larus marinus</i> )        |                  | x           |
| Great crested grebe ( <i>Podiceps cristatus</i> )       |                  | x           |
| Great cormorant ( <i>Phalacrocorax carbo</i> )          |                  | x           |
| Green sandpiper ( <i>Tringa ochropus</i> )              |                  | x           |
| Grey heron ( <i>Ardea cinerea</i> )                     |                  | x           |
| Herring gull ( <i>Larus argentatus</i> )                |                  | x           |
| Hooded crow ( <i>Corvus cornix</i> )                    |                  | x           |
| Lesser black-backed gull ( <i>Larus fuscus</i> )        |                  | x           |
| Little grebe ( <i>Tachybaptus ruficollis</i> )          |                  | x           |
| Mallard ( <i>Anas platyrhynchos</i> )                   | x                | x           |
| Merganser ( <i>Mergus sp.</i> )                         |                  | x           |
| Mute swan ( <i>Cygnus olor</i> )                        |                  | x           |
| Peregrine falcon ( <i>Falco peregrinus</i> )            |                  | x           |
| Rails ( <i>Rallidae</i> )                               |                  | x           |
| Red-crested pochard ( <i>Netta rufina</i> )             |                  | x           |
| Shelduck ( <i>Tadorna tadorna</i> )                     |                  | x           |
| Swans ( <i>Cygnus spp.</i> )                            | x                | x           |
| Tufted duck ( <i>Aythya fuligula</i> )                  |                  | x           |
| White-tailed eagle ( <i>Haliaeetus albicilla</i> )      |                  | x           |
| Whooper swan ( <i>Cygnus cygnus</i> )                   |                  | x           |
| Wild ducks  |                  | x           |
| Wild goose  |                  | x           |

Tableau 4 : Liste des espèces sauvages infectées par les VAHP H5N8 en Europe en 2014/2015 et en 2016 avant le 11/12/2016, Source : EFSA Journal, 2016

### 3. H5N8 dans l'avifaune captive

Le virus H5N8 a été rapporté dans l'avifaune captive dans 8 cas : 4 en Allemagne, 2 aux Pays-Bas, un en France et un en Finlande. Le tableau suivant recense les espèces touchées.

| Captive birds reported by MSs:                       | 2014-2015 | 2016 |
|--|-----------|------|
| Gadwall ( <i>Anas strepera</i> )                     |           | X    |
| Eurasian Wigeon ( <i>Anas penelope</i> )             | X         | X    |
| Emu ( <i>Dromaius novaehollandiae</i> )              |           | X    |
| Great white pelican ( <i>Pelecanus onocrotalus</i> ) |           | X    |

Tableau 5 : Liste des espèces captives infectées par les VIAHP H5N8 en Europe en 2014/2015 et en 2016 avant le 11/12/2016, Source : EFSA Journal, 2016

#### c. Evolution de la situation européenne jusqu'à Mars 2017

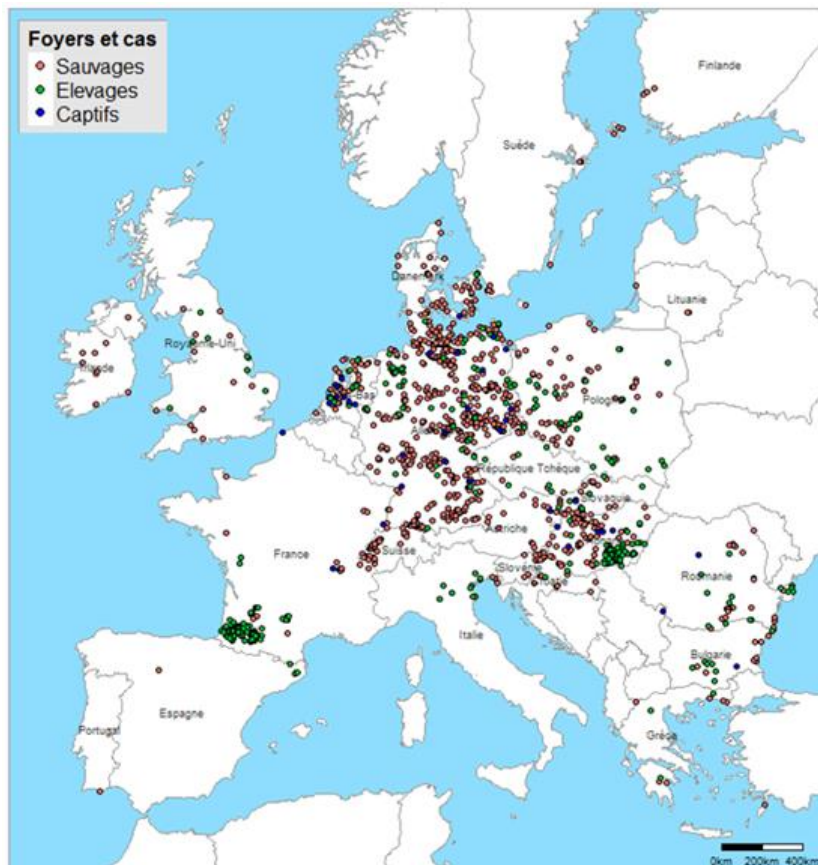


Figure 13 : Foyers d'IAHP H5N8 en Europe entre le 26/10/2016 et le 26/03/2017, Source : OIE/FAO/ADNS/DGAL, 2017

Les principaux foyers et cas en élevage sont situés en Hongrie et dans le Sud-Ouest de la France. Parallèlement, les principaux cas déclarés dans l'avifaune sauvage sont situés en Allemagne et en Suisse.

| PAYS               | H5N8      |            |              |
|--------------------|-----------|------------|--------------|
|                    | captif    | domestique | sauvage      |
| Allemagne          | 14        | 80         | 685          |
| Autriche           | 1         | 1          | 22           |
| Bulgarie           | 1         | 7          | 9            |
| Croatie            |           | 2          | 11           |
| Danemark           | 1         | 1          | 45           |
| Espagne            |           | 4          | 1            |
| Finlande           |           |            | 7            |
| France             | 3         | 331        | 33           |
| Grèce              |           | 5          | 8            |
| Hongrie            | 5         | 226        | 62           |
| Irlande            |           |            | 10           |
| Italie             |           | 10         | 3            |
| Lituanie           |           |            | 4            |
| Pays-Bas           | 8         | 9          | 46           |
| Pologne            |           | 43         | 66           |
| Portugal           |           |            | 1            |
| République Tchèque |           | 7          | 5            |
| Roumanie           | 2         | 32         | 84           |
| Royaume-Uni        |           | 8          | 15           |
| Slovaquie          | 1         | 6          | 48           |
| Slovénie           |           |            | 39           |
| Suède              |           | 1          | 13           |
| Suisse             |           |            | 87           |
| <b>TOTAL</b>       | <b>36</b> | <b>773</b> | <b>1 304</b> |

Tableau 6 : Nombre de foyers et cas d'IAHP H5N8 domestiques, sauvages et captifs par pays de l'UE entre le 26 octobre 2016 et le 26 mars 2017, Source : OIE/ADNS/DGAL 2017

*d. Epidémiologie descriptive : Etude du territoire français.*

La France compte parmi les premiers producteurs de viande de volailles en Europe et dans le monde. C'est en novembre 2016 que l'épizootie d'influenza aviaire débute en France.

Un virus du clade 2.3.4.4, H5N8, émerge dans le sud-ouest du pays. De novembre 2016 à mars 2017, 484 foyers d'influenza H5N8 seront confirmés dans 9 départements et 235 communes, provoquant des dommages socio-économiques importants sur le sol français. Cependant l'infection par le virus H5N8 n'a pas été constante dans le laps de temps considéré (Novembre 2016 à Mars 2017). En effet, la propagation virale a été bien plus intense et rapide durant les premiers mois de l'épidémie. La vitesse moyenne de la propagation virale est estimée à 5.5 km par semaine durant l'épidémie. (Guinat C., 2018)

Le premier cas est détecté le 28 novembre 2016. Malgré la mise en place de mesures dont la restriction de mouvement des animaux, notamment les animaux dits « prêt-à-gaver » vers les ateliers de gavage, l'établissement de périmètre de surveillance autour des élevages infectés (sur 3 à 10 km), l'influenza H5N8 à continuer à se propager de l'est vers l'ouest dans le Sud-ouest de la France. En effet malgré les mesures mises en place, la région est caractérisée par une très forte densité d'animaux d'élevages, nombre de ces élevages sont des élevages avec parcours extérieur, et la région étant forte productrice d'animaux prêt-à-gaver et d'animaux gras, les mouvements de canards restent très fréquents indépendamment des mesures mises en place.

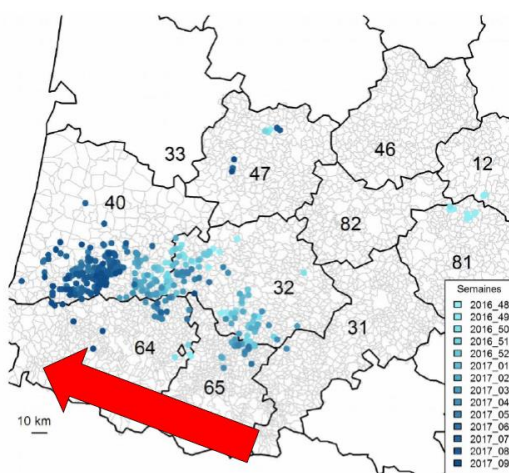


Figure 14: Evolution spatio-temporelle hebdomadaire des foyers d'IAHP déclarés dans les élevages de volailles entre le 28 novembre 2016 (déclaration du premier cas d'IAHP, semaine16-48) et le 6 mars 2017, Source : (Anne Bronner, Mars 2017)



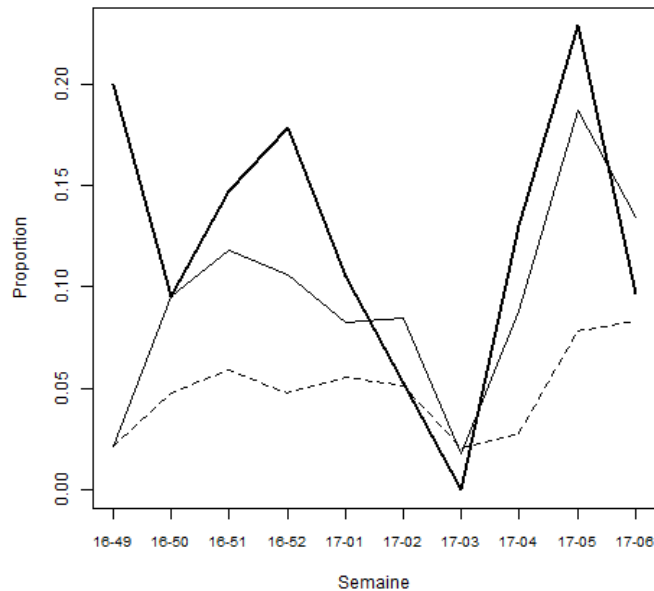


Figure 15 : Proportion d'établissements infectés autour des foyers cliniques (gras: 1km, normal: 3km, tirets: 10 km), Source : (Anne Bronner, Mars 2017)

D'un point de vue descriptif :

- 6.8 millions de volailles abattues par mesures de contrôles.
- Sur les 484 foyers, 59.1% (286) se situent dans le département des Landes, 19.8% (96) dans le Gers, 10.5% (51) dans les Pyrénées-Atlantiques et 5% (24) dans les Hautes-Pyrénées.
- A l'échelle communale, un à douze foyers au maximum sont localisés par commune, avec 43.4% (102 sur 235) des communes qui connaissent plus d'un foyer.
- Le type d'élevage majoritairement touché est éleveur-gaveur à 40.8% (155 sur 380 élevages), suivi par les éleveurs 34.5% (155) puis par les ateliers de gavage à 20.5% (78).
- Les canards d'élevage constituent la plus grande partie des animaux touchés avec 81.6% des foyers (395 sur 484) suivi par les poulets (12.2% soit 59 foyers) et par des foyers mixtes (population mixte canards-oies-poulets) à 5.8% (28 foyers).
- Sur les 484 foyers décrits, 464 foyers (95.9%) sont des élevages industriels.

On distingue deux périodes successives sur la période de Novembre 2016 à Mars 2017. De Novembre 2016 à la fin Janvier 2017, où 217 foyers sont détectés dont 63.1% (137) par des mesures de surveillance passive (par détection des signes cliniques), et de Février à Mars 2017,

où 267 foyers sont détectés dont 69.7% (186) par des mesures de surveillances actives (en collectant des échantillons dans les élevages avant l'apparitions de potentiels signes cliniques).

| Parameter  | Number of outbreaks | Total            | Percentage |
|--|---------------------|------------------|------------|
| <b>Type of poultry holdings in terms of commercial/backyard production</b> |                     |                  |            |
| Commercial poultry holdings  | 464                 | 484              | 95.9       |
| Backyard poultry holdings  | 20                  | 484              | 4.1        |
| <b>Type of species</b>   |                     |                  |            |
| Duck   | 395                 | 484              | 81.6       |
| Chicken  | 59                  | 484              | 12.2       |
| Multispecies   | 28                  | 484              | 5.8        |
| <b>Type of duck holding in terms of production stages</b>                  |                     |                  |            |
| Breeding + Force-feeding   | 155                 | 380 <sup>a</sup> | 40.8       |
| Breeding   | 131                 | 380 <sup>a</sup> | 34.5       |
| Force-feeding  | 78                  | 380 <sup>a</sup> | 20.5       |
| Other  | 16                  | 380 <sup>a</sup> | 4.2        |

<sup>a</sup> Information on production stages was available only for 380 outbreaks.

Tableau 7: Répartition des foyers à H5N8 par type de production, d'espèces en France sur la période de Novembre 2016 à Mars 2017. Source : Guinat, 2018

## DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

## *1. Objectif de l'étude*

Comme évoqué précédemment, les virus IAHP H5N8 peuvent entraîner des signes cliniques variés chez les canards et les poulets d'élevage et des pertes économiques désastreuses, pouvant aboutir à la perte complète des volailles de l'élevage.

Les virus influenza sont peu résistants dans le milieu extérieur. Ils sont responsables de signes cliniques divers tels que :

- Prostration et apathie extrême ;
- Chute soudaine de la production d'œufs et ponte de nombreux œufs à coquille molle ou sans coquille ;
- Caroncules et crêtes enflées et congestionnées ;
- Gonflement de la peau sous les yeux ;
- Toux, éternuement et signes nerveux ;
- Diarrhée ;
- Hémorragie au niveau des jarrets ;
- Il se peut que l'on constate quelques décès pendant plusieurs jours suivis d'une propagation rapide avec un taux de mortalité pouvant alors avoisiner les 100% dans les 48 heures.

Dans cette étude, nous allons étudier spécifiquement le tropisme tissulaire du virus chez le canard ainsi que les modalités de transmission du virus entre les individus durant une infection expérimentale.

La population ciblée pour l'étude est le canard mulard, pour plusieurs raisons :

- Les canards mulards sont la population d'élevage avicole la plus représentée dans le Sud-Ouest de la France (cf. tableau 4)

- Les canards sont habituellement résistants aux IAHP, pour la plupart asymptomatiques. Or, lors de la crise 2016-2017, les palmipèdes d'élevage ont été particulièrement touchés par une forte mortalité liée à l'infection par l'IAHP H5N8.

Cette étude s'inscrit dans la volonté d'une reproduction expérimentale de contamination virale dans des conditions dites terrains. Ainsi l'objectif principal de cette étude est de retranscrire les informations relatives au tropisme du virus au travers d'échantillonnages trachéaux, cloacaux et pulpe de plumes. Un deuxième objectif réside dans la réalisation d'autopsies complètes des animaux utilisés lors des infections expérimentales afin de réaliser de la PCR et de l'histologie, permettant de mieux caractériser le tropisme et le type de lésions cellulaires engendrées par le virus chez l'hôte.

*Ce dernier volet ne sera pas développé dans le cadre de cette thèse*

## II. Matériel et Méthode

### a. *Matériel expérimental*

Les 20 canards inclus dans cette étude répondent tous aux critères d'inclusions suivants :

- Canards mulards (croisement entre un mâle *Cairina moschata* et une femelle *Anas platyrhynchos*) âgés de 10 semaines,
- Sans aucune manifestation clinique,
- Négatif pour le virus H5N8 sur divers échantillons (trachéal, cloacal, pulpe de plume, sang),

Afin d'étudier les modalités de transmission du virus H5N8, les canards ont été répartis comme suit :

- 10 canards dans l'isolateur A dont 5 canards inoculés à J0 de la manipulation avec  $10^6$  EID<sub>50</sub> de virus H5N8 par voie choanale (50% narines et 50% fente palatine) et 5 canards non infectés,
- 5 canards non infectés dans l'isolateur B branché en série avec l'isolateur A,
- 5 canards dans un isolateur T indépendant représentant le lot témoin.

Une ventilation dynamique permet la circulation d'aérosols de l'isolateur A vers l'isolateur B. Chaque canard est bagué, permettant une numérotation de 1 à 20 de chaque oiseau permettant un suivi de l'animal tout au long de la manipulation. Durant les 10 jours d'étude, les canards ont, dans les 3 isolateurs, un accès illimité à l'eau et à la nourriture.

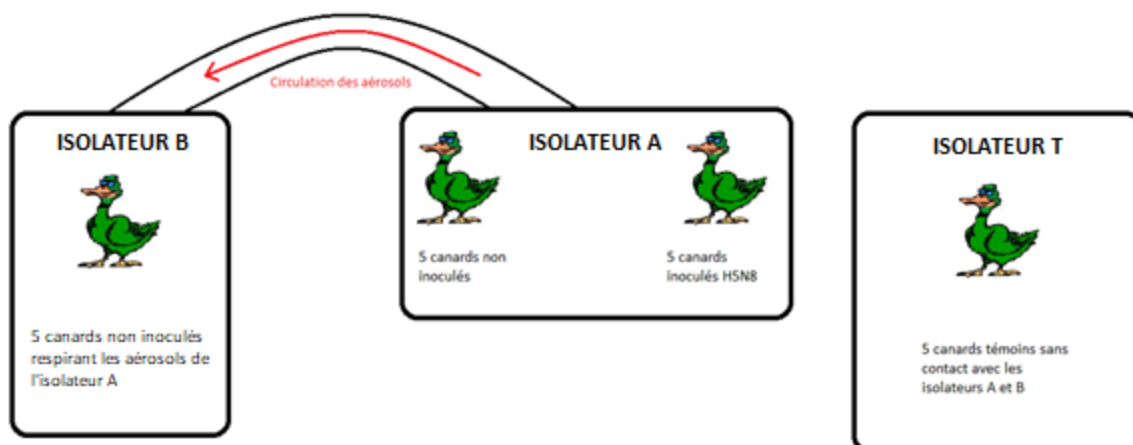


Figure 16: Modélisation de l'expérimentation durant les 10 jours.

#### b. Prélèvements réalisés

Les prélèvements réalisés sont de 4 types :

- Ecouvillon trachéal
- Ecouvillon cloacal
- Prélèvement de pulpe de plume
- Echantillon sanguin sur tube sec

Ces prélèvements ont pour objectif d'évaluer le tropisme viral et sa cinétique au cours du temps dans le milieu physiologique considéré.

Le tableau suivant récapitule les prélèvements réalisés sur chacun des individus durant les 10 jours de l'étude.

*PS : Prise de sang ; EC = Ecouvillon Cloacal ; ET = Ecouvillon trachéal ; PP = Pulpe de Plume*

|             | <b>Lots</b>  | <b>J0</b>            | <b>Prélèvements<br/>J1/J2/J3/J5/J7/J10</b> | <b>J5</b> | <b>J7 pour les lots<br/>A et B<br/>J10 pour le lot C</b> |
|-------------|--|----------------------|--|-----------|--|
| Isolateur A | 5 canards inoculés<br>( <b>lot A</b> : oiseaux A1 à<br>A5)<br>5 canards contact<br>( <b>lot B</b> : oiseaux B6 à<br>B10) | PS + EC +<br>ET + PP | EC + ET + PP                               | PS        | Autopsie   |
| Isolateur B | 5 canards exposés<br>aux aérosols : <b>lot C</b><br>(oiseaux C11 à C15)  | PS + EC +<br>ET + PP | EC + ET + PP                               | PS        | Autopsie   |
| Box Témoin  | 5 canards témoins<br>non infectés : <b>lot T</b><br>(oiseaux T1 à T5)  | PS + EC +<br>ET + PP | EC + ET + PP                               | PS        | Autopsie   |

*Tableau 8: Liste des types de prélèvements réalisés tel jour, durant la totalité de la manipulation*

### *c. Autopsie et prélèvements réalisés*

A la fin de l'essai, les individus ont été sacrifiés afin d'être autopsiés. Après réalisation d'une autopsie complète, des prélèvements étaient réalisés sur chaque individu en vue d'un examen histologique et virologique de l'organe (poumon, cœur, rate, reins, bourse de Fabricius, pancréas, duodénum, jéjunum, iléon, œil, encéphale, foie).

L'objectif de ces prélèvements était d'évaluer le tropisme viral dans les différents tissus et d'évaluer les lésions histologiques engendrées par l'infection. Ce dernier volet ne sera pas développé dans cette thèse.

### *d. Analyse virologique : (RT)-qPCR*

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR. Des amorces se fixent à une séquence d'ADN précis. Un fluorophore intercalant, le SYBR Green, ne fluoresce qu'une fois fixé à de l'ADN double brin. La mesure de la fluorescence permet de déterminer « en temps réel » si le fragment recherché (amplicon) est effectivement présent et donc amplifié. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.

La quantité d'amplicons est corrélée à la quantité initiale d'ADN de la matrice originale, ce qui permet pour d'autres applications de « doser » la matrice originale (ici le virus).

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction (figure 4). Plus il y a de matrices (« template ») à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Gibson, Oct 1996). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui



explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (Bustin, Oct 2000).

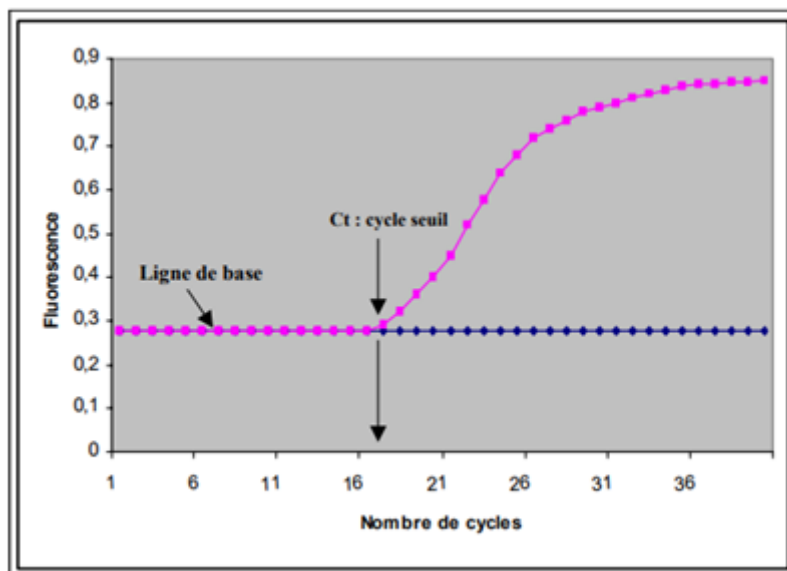


Figure 17: Représentation graphique d'une courbe d'amplification de PCR en temps réel. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis pour que le signal d'émission de fluorescence soit significativement plus élevé que la ligne de base.

### III. Résultats

Les résultats ainsi obtenus par méthode de PCR temps réel sont présentés selon trois modalités :

- Résultats représentés par jour post-infection
- Résultats cinétiques par type de prélèvement
- Résultats cinétiques par groupe d'individus (infectés, contacts, aérosols)

#### a. Résultats représentés par jour post-infection

Chaque graphique correspond à un jour de l'étude et chaque point représente le prélèvement d'un individu (figure 18). Les canards infectés expérimentalement sont

représentés par des ronds rouges, les canards en contact de ces derniers sont représentés par des carrés verts et les canards exposés aux aérosols sont représentés par triangles bleus.

Dès le premier jour post-infection, on retrouve, pour les canards infectés expérimentalement (lot A) du virus H5N8 dans les échantillons trachéaux des 5 individus, cloacaux pour 2 individus et dans la pulpe de plumes pour 2 individus (cf. *graphique J1 de la figure 9*). A J1 on ne retrouve pas de virus dans les différents prélèvements des individus en contact (lot B) et ceux soumis aux aérosols (lot C).

Au deuxième jour post-infection expérimentale, le virus est détecté dans les échantillons trachéaux, cloacaux et pulpe de plumes des canards du lot A et de ceux du lot B. Le virus n'est pas détecté dans les échantillons des individus du lot C.

A J3 et J5, tous les canards, quel que soit le lot, expriment du virus dans les différents types de prélèvements.

A J7, on retrouve encore du virus dans les échantillons des trois lots de canards, avec une baisse significative de virus détecté dans les échantillons trachéaux. Seuls les prélèvements de pulpe de plumes gardent des charges virales élevées. A J7, les canards du lot A et B sont sacrifiés afin de réaliser des autopsies pour évaluer des potentielles lésions histologiques et le tropisme viral pour les organes.

A J10, seuls les canards du lot C, exposés aux aérosols, sont suivis. On note seulement la détection du virus dans les prélèvements de pulpe de plumes. Les canards du lot C sont sacrifiés afin de réaliser des autopsies dans le même but que celles faites à J7 sur le lot A et B.

A noter que durant les 10 jours d'expérimentation, aucun signe clinique n'a pu être mis en évidence sur aucun sujet.

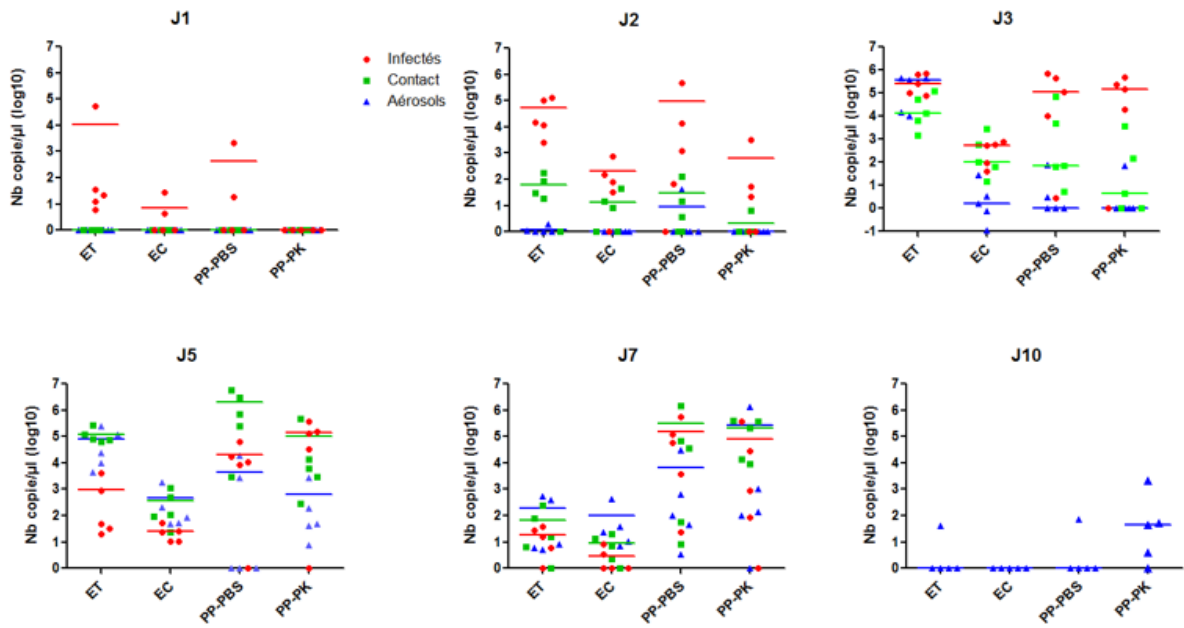


Figure 18: Etude de la cinétique virale selon le type d'échantillon. Chaque point correspond à un individu.

*b. Résultats cinétiques par type de prélèvement*

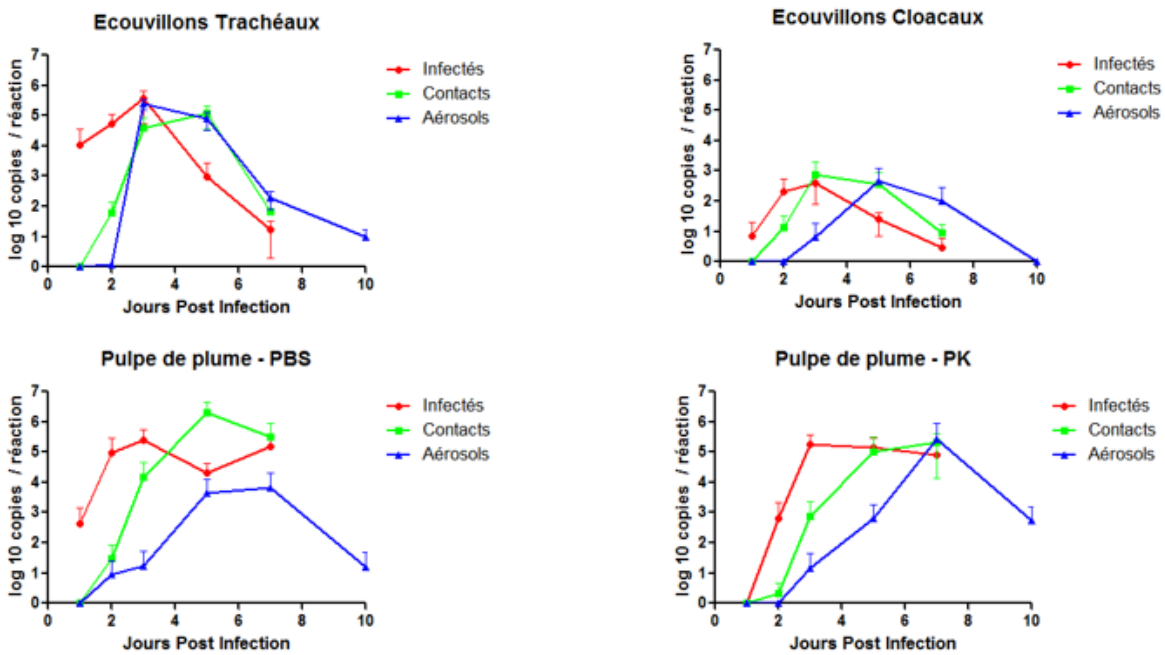


Figure 19: Résultats cinétiques selon le type de prélèvement. Chaque point représente la moyenne des valeurs par groupe de 5 canards.

Chaque graphique correspond à l'évolution cinétique au cours de l'étude par type de prélèvement. Chaque courbe correspond à un des 3 lots expérimentaux (figure 19). La courbe rouge correspond aux 5 canards infectés expérimentalement à J0 (lot A), la courbe verte correspond aux individus du lot B (animaux en contact avec le lot A) et la courbe bleue correspond aux individus soumis aux aérosols (lot C). L'axe des abscisses correspond au jour de prélèvement et l'axe des ordonnées à la quantité virale moyenne obtenue pour les 5 prélèvements en question.

Les résultats ainsi obtenus montrent une tendance générale : la charge virale obtenue quel que soit l'échantillon et le lot en question, augmente rapidement en 24-48h pour atteindre un « pic » de charge virale et décroît à partir de ce pic les jours suivants.

Des différences se dégagent alors suivant le type d'échantillonnage :

- Pour les écouvillons cloacaux, la charge virale, reste globalement faible, tout au long de l'infection comparativement aux échantillons trachéaux et aux pulpes de plumes.
- Pour les échantillons trachéaux, le « pic » de charge virale est obtenu rapidement à J3 pour les 3 lots. L'excrétion virale trachéale est élevée dans les premiers jours mais décroît rapidement les jours suivants. La persistance virale dans les échantillons trachéaux est donc faible.
- Pour les échantillons de pulpes de plumes, le « pic » de charge virale est lui plus tardif (J5 à J7), mais la persistance virale dans les pulpes de plumes semble plus élevée que dans les 2 autres méthodes de prélèvements (trachéal et cloacal).

### c. Résultats cinétiques par groupe

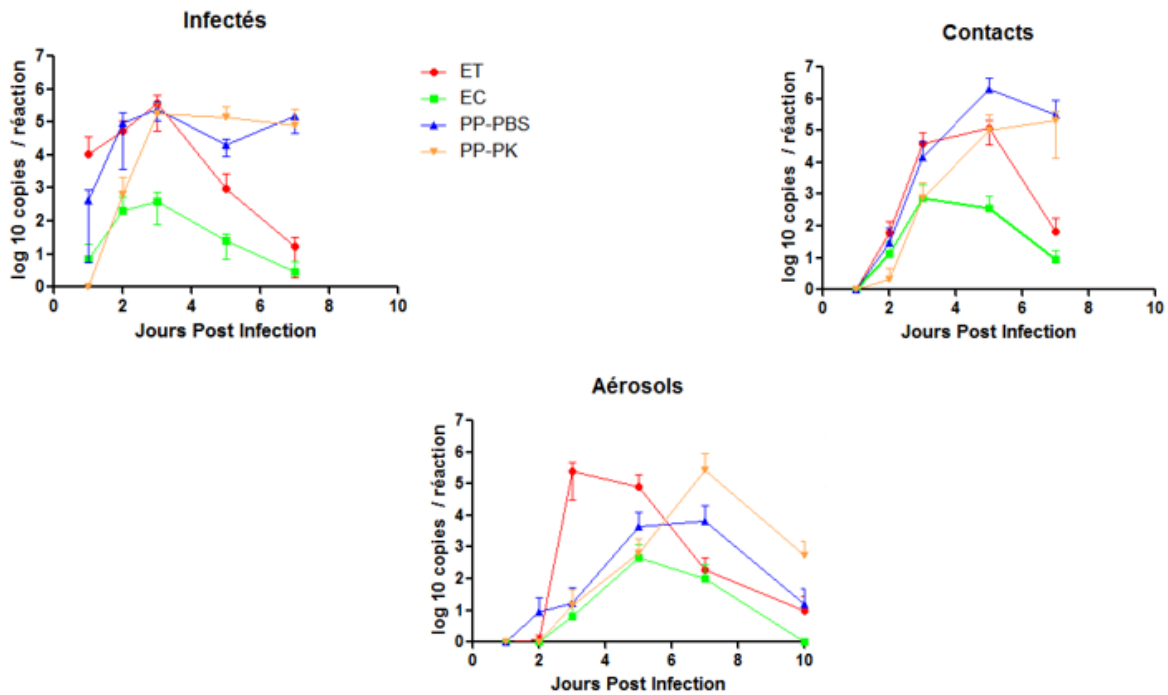


Figure 20: Résultats cinétiques par groupe de canards. Chaque point représente la moyenne des valeurs par groupe de 5 canards.

Chaque graphique correspond à l'évolution cinétique au cours de l'étude par lot de canards considéré : canards infectés expérimentalement à J0, canards au contact, et canards exposés aux aérosols (figure 20). Sur chaque graphiques, la courbe rouge correspond aux échantillons trachéaux, la courbe verte aux échantillons cloacaux, la courbe bleue aux échantillons de pulpes de plumes avec l'éluat en PBS et la courbe jaune aux échantillons de pulpes de plumes avec l'éluat en PK. L'axe des abscisses correspond au jour de prélèvement et l'axe des ordonnées à la quantité virale moyenne obtenue pour les 5 prélèvements du lot considéré.

La même tendance que sur la figure 10 est observable. Un « pic » de charge virale est obtenu pour chacun des lots puis cette charge virale diminue de manière différente selon le type d'échantillon.

Pour le lot infecté et le lot au contact :

- Les interprétations faites pour les résultats groupés par jours post-infection et ceux par type de prélèvement se retrouvent ici : un « pic » de charge virale atteint en 48-72h pour les échantillons trachéaux et cloacaux avec un « pic » plus faible pour les

échantillons cloacaux. La persistance virale dans ces deux types d'échantillons est faible : à J7 les charges virales retrouvées sont presque nulles.

- Pour les échantillons de pulpes de plumes, le « pic » de charge virale est atteint plus tardivement, aussi élevé que celui obtenu par échantillonnage trachéal mais la persistance est plus forte : à J7, les charges virales retrouvées dans les pulpes de plumes sont à peu près équivalentes à la valeur du « pic » de charge virale.

Pour le lot respirant les aérosols des lots A et B :

- Les « pics » de charge virale pour les échantillons cloacaux et de pulpes de plumes sont atteints plus tardivement mais sans réelle différence d'intensité par rapport aux individus de l'isolateur A.

#### IV. Discussion

##### a. *Méthode expérimentale*

La réalisation expérimentale s'est faite dans un laboratoire A3 dans des isolateurs eux-mêmes en pression négative et avec filtration absolue de l'air, de plus de 2 m<sup>2</sup> chacun. Il est clair que la population expérimentale et la densité animale expérimentale restent éloignées de la réalité en élevage selon des standards européens d'élevage (plusieurs milliers d'individus par élevage, avec une densité de l'ordre de 5 à 10 sujets au m<sup>2</sup>). Ainsi le groupe exposé aux aérosols n'est en fait éloigné que de quelques mètres des individus infectés expérimentalement. Dans un élevage classique, ces deux lots différents ne seraient en fait qu'un seul et même lot d'individus au sein du même bâtiment d'élevage. Nos expériences sont donc plus proches d'une contamination des individus par les aérosols d'un même bâtiment que d'une contamination par des aérosols entre deux bâtiments d'élevages différents. Cependant la réalisation d'une expérience se rapprochant au mieux des modalités d'infection inter-élevages et non intra-élevage semble irréalisable en conditions de laboratoires.

Le choix d'une étude sur 10 jours post-infection repose sur les données de la littérature. Il repose aussi sur des observations de terrain, où ce temps d'incubation apparaît largement suffisant pour observer une expression clinique sur des animaux d'une même bande d'élevage lorsqu'à l'arrivée en élevage quelques individus sont infectés et que quelques jours après la totalité ou la presque totalité de la bande exprime des signes cliniques.

Cependant les conditions expérimentales utilisées dans cette étude n'ont pas permis l'observation d'un moindre signe clinique lors des 10 jours. Aucun animal n'a montré d'abattement ou de signe neurologique. Aucune mortalité au cours de l'expérience n'a été observée. Il serait donc intéressant d'augmenter le temps expérimental afin de voir s'il est possible d'observer des signes cliniques, si oui, à partir de quel jour post infection, ils se manifestent.

Un point fort de cette étude réside sur la population expérimentale utilisée ici. Les canards mulards conventionnels sont représentatifs de la majeure partie de la population touchée par la crise H5N8 décrite dans cette étude. L'âge de 10 semaines correspond à l'âge de transport des animaux de l'élevage vers les salles de gavage.

### *b. Résultats*

Concernant les résultats obtenus suite à cette expérimentation, la cinétique virale montrée dans les figures 9, 10 et 11 confirme que l'infection expérimentale a permis d'atteindre des charges virales très élevées, très rapidement, au sein des isolateurs. En effet le virus est d'abord détecté chez les canards infectés expérimentalement à J0 (lot A) puis chez les canards vivant au contact du lot A (lot B) et enfin chez les canards respirant les aérosols du lot A et B (lot C). Ce modèle expérimental valide donc la transmission virale horizontale très rapide au sein d'une population de canards.

Concernant le tropisme viral, les résultats obtenus par type d'échantillons montrent un tropisme viral en accord avec d'autres articles réalisés jusqu'ici et avec des expérimentations faites avec des influenza virus issus de lignée asiatique (clade 2.3.4) :

- L'excrétion trachéale est forte, rapide et peu persistante.
- L'excrétion cloacale est faible à très faible, rapide et peu persistante.
- La réplication dans les pulpes de plumes est élevée, d'apparition plus lente et persistante.

Malgré une charge virale forte inoculée à J0, aucune mort expérimentale a été observée pendant toute la durée la manipulation. Aucun signe clinique n'a même été observé pendant

cette durée. L'absence de signe clinique et de mortalité, malgré l'infection et les charges virales élevées, confirme que le canard mulard peut-être réceptif au virus tout en étant cliniquement peu sensible. En pratique, cela suggère donc qu'une surveillance analytique est indispensable car la surveillance strictement clinique n'est pas suffisante pour détecter l'infection.

Ces résultats doivent être considérés comme valides pour une souche virale de VIAHP H5 : la souche issue de la lignée Sud Européenne. L'extrapolation aux autres virus influenza des résultats obtenus dans cette étude reste à modérer. Cependant, des travaux réalisés par l'ANSES (Ploufragan) sur des canards âgés de 5 à 6 semaines, non publiés à ce jour, montrent des résultats similaires aux nôtres : un tropisme respiratoire élevé, un tropisme cloacal faible et un tropisme dans la pulpe de plume persistant (données non montrées).

Ainsi, l'échantillonnage de pulpes de plumes pourrait être inclus dans les prélèvements en élevage et dans certains cas, améliorerait les performances de détection des VIAHP. En effet, ces échantillons apportent une information supplémentaire quant au statut vis-à-vis de l'infection par un VIAHP H5N8, notamment lorsque les échantillons trachéaux et cloacaux se révèlent négatifs ou faiblement positifs.



## Conclusion générale

Les influenza virus hautement pathogènes représentent une menace sanitaire et économique majeure pour l'industrie avicole mondiale. Leur fort pouvoir évolutif associé à leur forte virulence expliquent les épidémies rencontrées lors des vingt dernières années.

Nous avons montré que les virus influenza hautement pathogènes sont impliqués dans des mortalités massives à travers les pays touchés. Les signes cliniques d'une infection par ces virus, restent malheureusement peu spécifiques. L'abattement, l'apathie sont souvent les signes qui précèdent une mortalité massive et soudaine au sein des élevages touchés.

La surveillance passive, basée sur l'observation de signes cliniques ne constitue donc pas la solution à la gestion de telles épidémies.

Une surveillance active, basée sur des prélèvements sur des animaux d'apparence non malade, permet ainsi de détecter plus précocement le virus. Les prélèvements habituels sont souvent cantonnés à des écouvillonnages trachéaux et cloacaux, en plus de la réalisation d'autopsies. Nous avons montré dans cette étude, que les prélèvements de pulpe de plumes, constituent des marqueurs satisfaisant de l'infection par un VIAHP H5N8 de par la persistance dans le temps de la charge virale dans un échantillon de pulpe de plume par rapport aux échantillons trachéaux et cloacaux.

La mise en place de nouvelles stratégies de détection est également capitale. Elles passent par des mesures de prélèvements précoces dans les élevages d'apparence non infectés et par des mesures de biosécurité drastiques en limitant ou interdisant le transport d'animaux d'élevage dans des zones touchées par un VIAHP. Il est évident qu'une détection précoce des VIAHP dans les élevages minimise les risques de propagation et limite ainsi l'impact sanitaire et économique de l'épidémie.

Des investigations supplémentaires sont toutefois nécessaires pour comprendre tous les mécanismes de transmission et de pathogénie des VIAHP H5N8.

## Bibliographie

- Adlhoch, C. , Aaslav K. K., Coulombier D., Hallström L.P., Melidou A., Penttinen P. (November 2016). Rapid Risk Assessment: Outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) in Europe,. *Journal of Virology*.
- Anne Bronner, Marie-Cécile Moisson, Didier Calavas, Pascal Hendrikx, Mathilde Paul, Claire Guinat, Pierre Jabert , Guillaume Gerbier , Mathilde Saussac , Benoît Durand , Aurélie Courcoul. (Mars 2017). Highly pathogenic avian influenza in France due to the virus H5N8: first elements of epidemic and clinical interpretation. *Plateforme ESA*.
- Beato MS, Capua I. (2011). *Transboundary spread of highly pathogenic avian influenza through poultry commodities and wild birds: a review*. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 30: 51–61.
- Bourret. (2012). Genetic adaptation of an avian influenza A virus to swine cells. *Thèse soumise pour le degré de Docteur en Philosophie, sous la direction du Dr. Laurence S. TILEY*, Cambridge, University of Cambridge, Department of Veterinary Medicine.
- Büchen-Osmond. (2006). *International Committee on Taxonomy of Viruses Index Of Viruses - Orthomyxovirux*. Colombia University, New York: The Universal Virus Database, version 4.
- Buisson Y., É Nicand, P Saliou (2007). *La Grippe en Face*. Xavier Montauban.
- Bustin, S. (Oct 2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2):169-93.
- Conenello G., Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. (2007). *A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence*. J Virol; 3(10):1414-21.
- D. Kaye, Pringle CR. (2005). Avian Influenza Viruses and their Implication for Human Health. *Clinic Infect. Dis.*, 40, (1), 108-12.
- D.L. Nelson, M. C. Cox, W. H. Freeman (2005). *Lehninger's Principles of Biochemistry. 4e édition*.
- Delvallée, T. (2004). Avian flu and its transmission in man. *Grippe aviaire-synthèse documentaire, CNRS-Institut de l'Information Scientifique et Technique*.
- Ducousso. (2016). *Avian Flu : which risks for man*. Université de Lorraine.
- Ebrahim, G. (2004). Avian Flu and Influenza Pandemics in Human Populations. *J. Trop. Pediatr.*, 50, (4), 192-4.
- El-Shesheny, Subrata Barman, Mohammed M. Feeroz, M. Kamrul Hasan, Lisa Jones-Engel, John Franks, Jasmine Turner, Patrick Seiler, David Walker, Kimberly Friedman, Lisa Kercher, Sajeda Begum, Sharmin Akhtar, Ashis Kumar Datta, Scott Krauss, Ghazi Kayali, Pamela McKenzie, Richard J. Webby, and Robert G. Webster (2017). *Genesis of Influenza A(H5N8) Viruses*.
- Forrest L., Kim JK, Webster RG. (2010). *Virus Shedding and Potential for Interspecies Waterborne Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Sparrows and Chickens*. Journal of Virology p. 3718-3720.

- Garcia-Sastre A., Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T. (1998). *Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems*. J Virol. 252(2):324-30.
- Gibson U, Heid CA, Williams PM. (Oct 1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* , 6(10):995-1001.
- Guinat Claire., Gaëlle Nicolas, Timothée Vergne, Anne Bronner, Benoit Durand, Aurélie Courcoul, Marius Gilbert, Jean-Luc Guérin, Mathilde C. Paul (2018). Spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian.
- Hale B. G, Randall RE, Ortín J, Jackson D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of General Virology.*, Vol. 89, n° Pt 10, pp. 2359-2376.
- Landolt G. A, Olsen CW. (2007). Up to new tricks - a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, Vol. 8, n° 1, pp. 1-21.
- Lee D.-H, Bertran K, Kwon JH, Swayne DE. (2017). *Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4* . J Vet Sci. 18(S1):269-280.
- Mehle, A. (2014). *Unusual Influenza A Viruses in Bats*. *Viruses*. 6:3438-3439.
- Munster VJ, Schrauwen EJ, de Wit E, van den Brand JM, Bestebroer TM, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. (2010). *Insertion of a multibasic cleavage motif into the hemagglutinin of a low-pathogenic avian influenza H6N1 virus induces a highly pathogenic phenotype*. J Virol 84: 7953–7960.
- N. Eterradossi, A. L. (2002). Report of the study group on the risk of transmission to the man of the avian influenza viruses. *In : AFSSA, publications, éditions*.
- Pflug A, Lukarska M, Resa-Infante P, Reich S, Cusack S. (2017). *Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine*.
- Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8*. (Nov 2018). Science.
- Rosenberg, A. H. (1956). Inhibition of Influenza Virus Hæmagglutination by a Brain Lipid Fraction. *Nature.*, Vol. 177, n° 4501, pp. 234-235.
- Spickler, A. (2016). The Center for Food Security and Public Health.
- Webster R. G, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, Vol. 56, n° 1, pp. 152-179.

Toulouse, 2018

**NOM** : DUSSOT

**PRENOM** : CLEMENT

**TITRE** : Etude du tropisme des virus influenza aviaires hautement pathogènes de clade 2.3.4.4 chez le canard : applications potentielles du tropisme dans les plumes

**RESUME** :

Les virus influenza aviaires hautement pathogènes sont impliqués dans des mortalités massives chez oiseaux d'élevages et sauvages. Les signes cliniques d'une infection par ces virus sont frustrés et peu spécifiques : apathie, abattement puis mortalité soudaine. Les méthodes de surveillance active sont nécessaires pour détecter précocement le virus. Cette étude montre l'intérêt des prélèvements de pulpes de plumes comme marqueurs d'infection par un virus influenza hautement pathogène de clade 2.3.4.4. sous-type H5N8. Les pulpes de plumes sont des marqueurs satisfaisant de l'infection par un VIAHP H5N8 de par la persistance dans le temps de la charge virale dans un échantillon de pulpe de plume comparativement à un échantillon trachéal ou cloacal. Les résultats sont en lien avec les VIAHP H5N8, ainsi des investigations supplémentaires sont nécessaires pour comprendre tous les mécanismes de transmission et de pathogénie de ces virus.

**MOTS-CLES** : Influenza aviaire hautement pathogène, infection, VIAHP, H5N8, pulpes de plume, charge virale.

---

**TITLE** : Study of the tropism of the influenza avian highly pathogenic viruses of clade 2.3.4.4 to the duck : potential applications of the tropism in feathers

**SUMMARY** :

The influenza avian highly pathogenic viruses are involved in massive mortalities in birds (breedings and wild). The clinical signs of an infection by these viruses are low specific: apathy, then sudden mortality. Active surveillance methods are necessary to detect prematurely the virus. This study shows the interest of feathers pulps samples as markers of infection by highly pathogenic influenza virus of clade 2.3.4.4. subcategory H5N8. Feathers pulps are satisfying markers of the infection by a HPAIV H5N8 due to the obstinacy in the time of the viral level in a feather pulp sample compared with tracheal sample or cloacal. The results are good for the HPAIV H5N8, so additional investigations are necessary to understand mechanisms of transmission and pathogenesis of these viruses.

**KEYWORDS** : Highly pathogenic avian flu, infection, HPAIV, H5N8, feather pulp, viral level