

# ETUDE D'UNE PAIRE DE VIRUS INFLUENZA AVIAIRES FAIBLEMENT ET HAUTEMENT PATHOGENES DE SOUS-TYPE H5N8 (CLADE 2.3.4.4 GROUPE B) : PATHOGENIE ET INTERACTION INTRA-HOTE LORS DE CO-INFECTION CHEZ LE POULET ET LE CANARD

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**HOUFFSCHMITT Alexandre**  
Né le 19/12/1995 à SYDNEY (AUSTRALIE)

**Directeur de thèse : M. Romain VOLMER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Christophe PASQUIER**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Romain VOLMER**  
**M. Maxence DELVERDIER**

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation**  
**ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : **Professeur Pierre SANS**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

## PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

## MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*

- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### **CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS**

- M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
- Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

#### **ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES**

- Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

#### **ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

## REMERCIEMENTS

---

**Au président du jury de thèse,**

**A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse,  
*Maladies infectieuses*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,  
Hommage respectueux et sincères remerciements.

**Au jury de thèse,**

**A Monsieur Romain VOLMER, Directeur de thèse**

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Microbiologie et Infectiologie*

Qui m'a orienté vers ce sujet et m'a conseillé tout au long de ce travail,  
Sincères remerciements pour votre disponibilité et vos conseils.

**A Monsieur le Professeur Maxence DELVERDIER, Assesseur**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
*Anatomie Pathologique*

Qui a très aimablement accepté de participer à cette étude,  
Sincères remerciements pour votre intérêt porté à mon sujet.





# Table des matières

Table des illustrations .....	1
Table des tableaux .....	3
Table des abréviations .....	5
1. Introduction .....	7
1.1 Etiologie et écologie .....	7
1.2 Interaction hôte-influenza A .....	9
1.2.1 <i>Virus influenza A : souche faiblement ou hautement pathogène</i> .....	9
1.2.2 <i>Différences ansériformes/galliformes lors d'infection à IAFP</i> .....	10
1.2.3 <i>Différences ansériformes/galliformes lors d'infection à IAHP</i> .....	12
1.3 La lignée H5 Gs/GD.....	13
1.3.1 <i>Historique</i> .....	13
1.3.2 <i>Pathogénicité des virus H5N8 clade 2.3.4.4</i> .....	14
1.3.3 <i>Crise H5N8 clade 2.3.4.4 de groupe B en France</i> .....	16
1.4 Emergence de souches HP et rôle de l'espèce hôte .....	16
1.5 Objectifs de l'étude .....	17
1.5.1 <i>Quelle est l'origine des différences symptomatiques entre les ansériformes et galliformes lors d'infection à virus influenza A HP de lignée H5 Gs/GD clade 2.3.4.4 groupe B ?</i> .....	17
1.5.2 <i>Quelles sont les interactions intra-hôtes entre deux souches FP et HP apparentées ? Quelle est l'influence de l'hôte sur l'émergence de souches HP ?</i> .....	18
1.6 Contribution personnelle à l'étude .....	21
2. Résultats.....	21
2.1 Galliformes, essai n°1.....	21
2.1.1 <i>Design de l'étude</i> .....	21
2.1.2 <i>Taux de survie et signes cliniques</i> .....	22
2.1.3 <i>Lésions histologiques et IHC</i> .....	25
2.1.4 <i>Excrétion virale</i> .....	28
2.1.5 <i>Bilan de l'essai</i> .....	30
2.2 Galliformes, essai n°2 .....	32
2.2.1 <i>Design de l'étude</i> .....	32
2.2.2 <i>Taux de survie et signes cliniques</i> .....	33

2.2.3 Excrétion virale .....	35
2.2.4 Bilan de l'essai .....	36
2.3 Ansériformes .....	37
2.3.1 Design de l'étude .....	38
2.3.2 Taux de survie et signes cliniques .....	39
2.3.3 Histologie et IHC .....	40
2.3.4 Excrétion virale .....	43
2.3.5 Bilan de l'essai .....	44
3. Matériel et méthodes .....	45
3.1 Statut éthique.....	46
3.2 Virus.....	46
3.3 Animaux.....	47
3.4 Histologie.....	47
3.5 Immunohistochimie .....	49
3.6 qPCR .....	49
4. Conclusion/Discussion .....	49
4.1 Infection par une souche IAHP clade 2.3.4.4 de groupe B : pathogénie et origine des différences cliniques entre galliformes et ansériformes. ....	49
4.2 Interaction intra-hôte entre les souches FP et HP apparentées : un effet de compétition chez les ansériformes, de synergie chez les galliformes ? .....	52
4.3 Limites et nouvelles problématiques .....	53
Annexe 1 .....	55
Annexe 2 .....	56
Annexe 3 .....	57
Bibliographie.....	59

## Table des illustrations

**Figure 1.** Structure des virus influenza A. Ces virus appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae. Ils sont enveloppés et possèdent un génome à ARN constitué de 8 segments codant pour 10 protéines : deux protéines de surfaces qui sont l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), une protéine constituant la couche interne de l'enveloppe virale (M1), une protéine de membrane de canal ionique (M2), des protéines formant le complexe polymérase NP, PA, PB1 et PB2, et enfin deux protéines non structurales NS1 et NS2. Source : Jung et Lee, « Host Protective Responses against Influenza A Virus Infection » ..... 8

**Figure 2.** Mutation des virus influenza A de sous-type H5 ou H7 de la forme faiblement pathogène à la forme hautement pathogène. Lorsque le site de clivage présente des acides aminés basiques multiples (arginine, lysine), il est alors accessible à des protéases ubiquitaires. Ceci permet au virus d'infecter un plus grand nombre d'organes et l'infection devient systémique. Source : Taisuke Horimoto et Yoshiro Kawaoka « Influenza : lessons from past pandemics, warnings from current incidents » ..... 10

**Figure 3.** Carte géographique décrivant les mouvements des virus IAHP clade 2.3.4.4 depuis 2008. A partir de 2014, l'apparition de virus IAHP H5Nx clade 2.3.4.4 est rapportée en Chine, au Laos, au Vietnam (H5N6) ainsi qu'au Japon et en Corée du Sud (H5N8). Le groupe A est le premier virus de clade 2.3.4.4 détecté en Europe en 2014. Le groupe B est quant à lui détecté à partir de mai 2016 en Chine sur des oiseaux migrateurs retrouvés morts, puis en Sibérie au mois de juin 2016 et enfin en France fin 2016. Source : Lee et al., « Evolution, Global Spread and Pathogenicity of Highly Pathogenic Avian Influenza H5Nx Clade 2.3.4.4. » ..... 14

**Figure 4.** Interactions intra-hôtes entre deux souches FP et HP apparentées et issues possibles. Soit la souche HP (étoile rouge) parvient à se multiplier rapidement et cause alors des signes propres aux souches HP (cas n°1). Soit la souche HP ne parvient pas à se multiplier et cette souche s'éteint (cas n°3). Une situation intermédiaire peut être envisagée (cas n°2). Source : R. Volmer, ppt « Avian influenza virus evolution and pathogenesis » ..... 19

**Figure 5.** Résultats de l'équipe de Graaf et al. Le taux de survie des poulets infectés est en ordonnée. Le nombre de jour après infection est en abscisse. La courbe bleue représente les poulets mono-infectés par une souche H7N7 HP à une dose de 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>. La courbe rouge représente les poulets co-infectés par la souche HP (3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) et FP apparentée (6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>). La mortalité observée chez les poulets mono-infectés HP est significativement plus importante que chez les poulets co-infectés. Source : Graaf et al., « A Viral Race for Primacy » 20

**Figure 6.** Taux de survie des poulets après infection, essai n°1. Plus la dose administrée augmente, plus la morbidité et la mortalité augmentent lors de mono-infection. Les groupes co-infectés

réagissent différemment en fonction du ratio HP/FP administré. Comparé au groupe mono-infecté M3, le taux de survie du groupe C3 (ratio 1 :1000) est augmenté. C'est l'inverse pour le groupe C4 (ratio 1:100) comparé au groupe M4..... 24

**Figure 7.** Excrétion virale des poulets, essai n°1. (a) Excrétion oropharyngée de la souche HP. (b) Excrétion oropharyngée totale (souche HP et FP confondue). (c) Excrétion cloacale de la souche HP. (d) Excrétion cloacale totale (souche HP et FP confondue). ..... 29

**Figure 8.** Taux de survie après infection, essai poulet n°2. La mortalité et la morbidité liées à une mono-infection par la souche hautement pathogène sont ici aussi dose-dépendante. Le groupe M3' ne présente ni mortalité, ni morbidité. Le taux de survie à 7 jpi du groupe M4' est proche de 55%. Les groupes co-infectés C3' et C4' respectivement comparés au groupe M3' et M4' présentent un taux de survie diminué..... 34

**Figure 9.** Excrétion virale des poulets, essai n°2. (a) Excrétion oropharyngée totale (souche HP et FP). (b) Excrétion oropharyngée de la souche HP seule..... 36

**Figure 10.** Taux de survie des canards après infection. Le taux de survie observé chez le groupe mono-infecté par la souche hautement pathogène dosée à 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> chute à 12,5% en 6 jpi. Le groupe co-infecté avec la souche faiblement et hautement pathogène (C4c) présente un taux de survie de 62,5% à 7 jpi. .... 40

**Figure 11.** Excrétion virale des canards après infection. (a) Excrétion trachéale de la souche HP. (b) Excrétion trachéale totale (souche HP et FP confondue). (c) Excrétion cloacale de la souche HP. (d) Excrétion cloacale totale (souche HP et FP confondue). ..... 44

**Figure 12.** Différences génétiques entre la souche H5N8 HP et la souche H5N8 FP. Une délétion de 9 nucléotides est réalisée au niveau du site de clivage de l'hémagglutinine ainsi que deux substitutions de part et d'autre de la zone de délétion. .... 46

**Figure 13.** Illustration des lésions observées à l'histologie en coloration Hémalun-Eosine. « SE ++ » : Encéphalite subaigüe modérée, « SIP ++ » : Pneumonie interstitielle subaigüe modérée.48

**Figure 14.** Illustration de l'échelle d'annotation des lames IHC..... 49

**Figure 15.** Rôle de l'hôte dans l'émergence de souche HP. Deux types d'interaction entre les souches apparentées sont décrits lors de cette étude. La possible synergie observée chez les galliformes permettrait une émergence de souche HP facilitée chez cet ordre, tandis qu'une compétition chez les ansériformes serait un obstacle à l'émergence. Source : R. Volmer, ppt « Avian influenza virus evolution and pathogenesis »..... 53

## Table des tableaux

**Tableau 1.** Pourcentage d'individus présentant des lésions à l'histologie lors de l'essai poulet n°1. « SIP+ » : pneumonie interstitielle subaiguë légère, « SE » : encéphalite subaiguë. Un animal sur 5 du groupe mono-infecté présente une pneumonie à 3 jpi. Deux animaux sur 5 du groupe co-infecté présentent une pneumonie à 3 jpi. Ces lésions ne sont pas observées parmi les autres groupes. Aucune lésion au niveau de l'encéphale n'est observée, quel que soit le groupe.....27

**Tableau 2.** Pourcentage d'individus présentant des lésions à l'histologie lors de l'essai canard. « SIP+ » : pneumonie interstitielle subaiguë légère, « SE+ » : encéphalite subaiguë légère. Quatre animaux sur 5 du groupe mono-infecté présentent une encéphalite à 3 jpi. Un animal sur 5 du groupe co-infecté présente une encéphalite à 3 jpi. Ces lésions ne sont pas observées parmi les autres groupes.....42

**Tableau 3.** Glossaire lésionnel utilisé pour l'analyse histologique.....48



## Table des abréviations

**VIAHP** : Virus Influenza Aviaire Hautement Pathogène

**VIAFP** : Virus Influenza Aviaire Faiblement Pathogène

**HP** : Hautement Pathogène

**FP** : Faiblement Pathogène

**HA** : Hemagglutinine

**NA** : Neuraminidase

**PAMP** : Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PRR** : Pattern Recognition Receptors

**TLR** : Tool-like receptor

**MDA-5** : Melanoma Differentiation-Associated protein-5

**RIG-I** : Retinoic acid-Inductible Gene-I like receptor

**EID50** : 50% Egg Infectious Dose

**SIP** : Subacute Interstitial Pneumoniae

**SE** : Subacute Encephalitis

**ALMID** : Absence de Lésion Microscopique d'Intérêt Diagnostic

**qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction

**HE** : Hémalun Eosine

**IHC** : Immunohistochimie





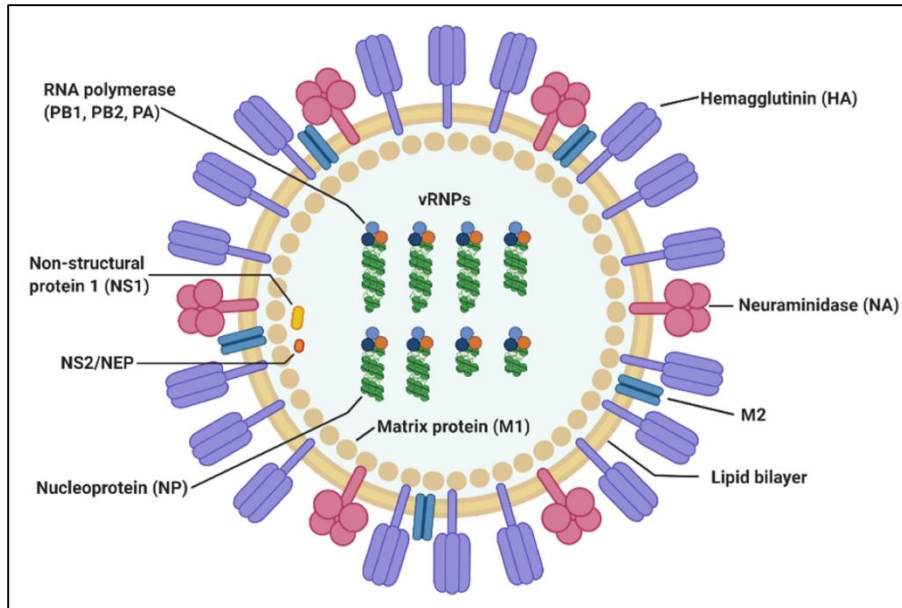
## **1. Introduction**

### **1.1 Etiologie et écologie**

Les virus influenza appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae. Il existe plusieurs genres différents : A, B, C et D. Le genre A a pour hôte exclusivement les oiseaux et les mammifères. Ce genre est déjà responsable de plusieurs pandémies chez l'Homme comme la « grippe espagnole » de 1918 (plusieurs millions de morts) ou les gripes aviaires plus récentes (H5N1 en 2005, H1N1 en 2009). Les genres B et C concernent principalement l'Homme et infectent rarement d'autres espèces (porc). Ces genres sont responsables de la grippe hivernale chaque année (estimation à 650 000 décès par an dans le monde). Le genre D se retrouve en majorité chez les ruminants.<sup>i</sup>

Les virus influenza A sont des virus enveloppés dont le génome est constitué d'ARN à polarité négative, simple brin et segmenté. Ces virus possèdent un génome constitué de 8 segments codant pour 10 protéines virales : deux protéines de surfaces qui sont l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), une protéine constituant la couche interne de l'enveloppe virale (M1), une protéine de membrane de canal ionique (M2), des protéines formant le complexe polymérase NP, PA, PB1 et PB2, et enfin deux protéines non structurales NS1 et NS2 (Fig. 1).<sup>ii</sup>

La protéine HA est responsable de l'attachement et de la pénétration du virus dans la cellule hôte. La protéine NA joue un rôle essentiel dans la dissémination des nouveaux virions suite à la réplication virale.<sup>iii</sup> La protection contre les virus influenza A réside essentiellement dans la réponse des anticorps de l'hôte vis-à-vis de ces protéines HA et NA. Ces glycoprotéines de surface présentent de nombreuses variations antigéniques définies sous le terme de sous-type antigénique. Les anticorps dirigés contre un sous-type particulier seront efficaces contre tous les virus de ce sous-type mais non les autres. Il existe 16 sous-types HA (H1 à H16) et 9 sous-types NA (N1 à N9) circulant chez les oiseaux, certains transmissibles aux volailles domestiques et aux mammifères. Les virus influenza A sont ainsi classés en différents sous types (exemple : H1N1, H5N8).<sup>iv</sup>



**Figure 1.** Structure des virus influenza A. Ces virus appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae. Ils sont enveloppés et possèdent un génome à ARN constitué de 8 segments codant pour 10 protéines : deux protéines de surfaces qui sont l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), une protéine constituant la couche interne de l'enveloppe virale (M1), une protéine de membrane de canal ionique (M2), des protéines formant le complexe polymérisant NP, PA, PB1 et PB2, et enfin deux protéines non structurales NS1 et NS2. Source : Jung et Lee, « Host Protective Responses against Influenza A Virus Infection »

Un système de nomenclature standardisé est défini pour toutes les souches virales influenza. 1) Une description du genre (A, B, C ou D). 2) L'animal hôte d'origine. S'il s'agit de l'Homme, il peut être omis. 3) L'origine géographique du virus. Il peut s'agir d'une ville, d'une région, d'un pays. 4) Le numéro de référence de la souche, créé par le laboratoire qui isole la souche. 5) L'année d'isolement de la souche. 6) Pour les virus influenza A, le sous-type HA et NA est ajouté entre parenthèses. Par exemple, la souche virale influenza H5N8 isolée en 2014 près de Washington sur un faucon gerfaut se nommera A/gyr-falcon/Washington/40188-6/2014(H5N8).<sup>v</sup>

L'avifaune sauvage aquatique est considérée comme principal réservoir des virus influenza A, et plus particulièrement les ansériformes (canards, oies, cygnes) et charadriiformes (goélands, mouettes). Les 16 sous-types d'hémagglutinine (HA) et 9 sous-types de neuraminidase (NA) sont

en effet retrouvés chez ces espèces aquatiques. Marginalement, les chiroptères semblent aussi prendre part à ce réservoir (2 sous-types HA et 2 sous-types NA sont décrits).

Plusieurs facteurs permettent d'expliquer le maintien de ces virus au sein des espèces aquatiques. Premièrement, le cycle de transmission du virus. La réplication des virus influenza s'effectue en premier lieu dans le tractus digestif. La contamination est donc principalement oro-fécale, ce qui est facilité par un milieu aquatique. De plus, certaines de ces espèces sont migratoires. Le virus est ainsi maintenu tout au long de l'année via des contaminations multi-espèces entre les espèces migratoires et celles endémiques. Ce réservoir est ainsi considéré comme la principale source de contamination des galliformes et ansériformes domestiques.<sup>vi</sup>

## **1.2 Interaction hôte-influenza A**

L'expression clinique lors d'infection par un virus influenza A varie en fonction de plusieurs facteurs. La souche virale et l'hôte en sont les principaux.

### ***1.2.1 Virus influenza A : souche faiblement ou hautement pathogène***

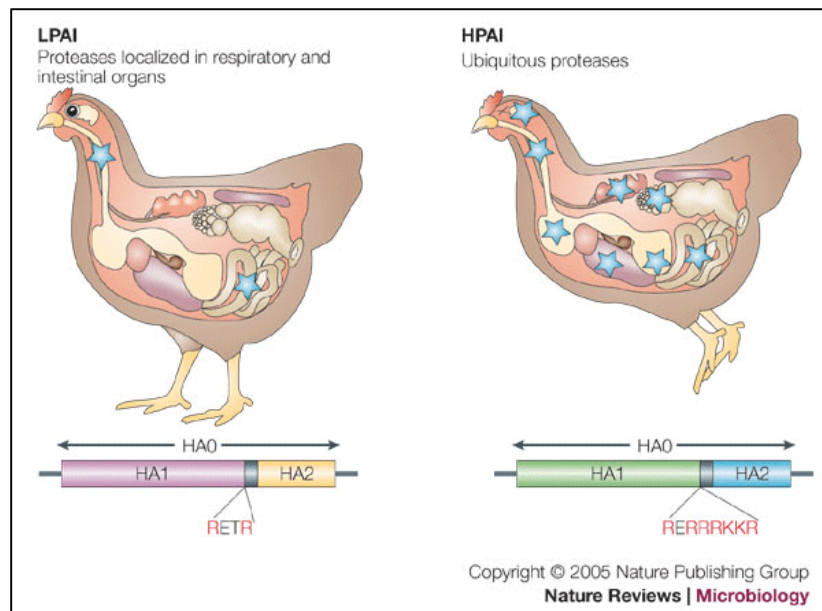
Parmi les virus influenza aviaires A, il existe deux types d'infections à différencier. D'un côté les infections à virus influenza aviaire dit « faiblement pathogènes » (VIAFP), localisées au niveau du tractus digestif et/ou respiratoire. Ces VIAFP concernent tous les sous-types. De l'autre les infections à virus influenza aviaire « hautement pathogènes » (VIAHP), systémiques. Ces VIAHP, pour des raisons encore inconnues, ne concernent que les sous-types H5 et H7.

La différence entre l'infection localisée des virus IAFP et l'infection systémique des virus IAHP s'explique principalement par l'aptitude du virus à pénétrer dans la cellule hôte. En effet, pour que le virus puisse pénétrer à l'intérieur de la cellule hôte et ainsi se répliquer, l'hémagglutinine HA de surface doit être clivée en deux sous-unités HA1 et HA2 (associées par un pont disulfure) par une protéase cellulaire. Le site de clivage de l'hémagglutinine est facilement accessible par des protéases de type trypsine présentes seulement au niveau du tractus respiratoire et intestinal, ce qui explique le tropisme privilégié des virus IAFP pour ces organes. Lorsque le site

de clivage présente des acides aminés basiques multiples (arginine, lysine), il devient alors accessible à des protéases ubiquitaires. Ceci permet au virus d'infecter un plus grand nombre d'organes (encéphale, cœur, pancréas, foie, muscles, vaisseaux sanguins, etc...) et l'infection devient systémique.

A la suite de mutations (insertions, recombinaisons et/ou substitutions) au niveau de la séquence codante du site de clivage de l'hémagglutinine, certains virus de sous-types H5Nx et H7Nx peuvent évoluer de la forme faiblement pathogène vers la forme hautement pathogène (Fig 2).

vii



**Figure 2.** Mutation des virus influenza A de sous-type H5 ou H7 de la forme faiblement pathogène à la forme hautement pathogène. Lorsque le site de clivage présente des acides aminés basiques multiples (arginine, lysine), il est alors accessible à des protéases ubiquitaires. Ceci permet au virus d'infecter un plus grand nombre d'organes et l'infection devient systémique. Source : Taisuke Horimoto et Yoshiro Kawaoka « Influenza : lessons from past pandemics, warnings from current incidents »

### 1.2.2 Différences ansériformes/galliformes lors d'infection à IAFP

L'infection des galliformes domestiques par un virus IAFP peut être à l'origine de troubles respiratoires (rhinites, sinusites, trachéites, aérosacculites et bronchopneumonies). Les lésions

microscopiques sont caractérisées par des infiltrats lymphoïdes au niveau de la trachée et des bronches. Ces troubles sont accompagnés d'une baisse de l'état général avec une chute des performances zootechniques. Les pondeuses et reproducteurs peuvent ainsi présenter une chute de ponte associée ou non à une salpingite. Un faible taux de mortalité peut être observé.

L'infection des ansériformes par des virus IAFP est principalement asymptomatique. Ces virus présentent un tropisme préférentiel pour les cellules épithéliales intestinales. Des troubles respiratoires peuvent toutefois être observés chez les ansériformes domestiques (canards, oies), le plus souvent associés à des co-infections bactériennes en lien avec les conditions d'élevage.<sup>viii</sup>

Les conséquences d'une infection d'un hôte naïf par un virus reposent sur les interactions clés virus-hôte. L'infection de l'hôte par un virus provoque en effet l'activation de la réponse immunitaire innée. La signature moléculaire du virus (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) est reconnue par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors, PRR). Une fois activés, ces PRR induisent une cascade réactionnelle à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons permettant de limiter la multiplication du virus. Il existe différents types de PRR présents chez les ansériformes tels que les TLRs (Toll-like receptor) et les MDA-5 (Melanoma Differentiation-Associated protein-5) et les RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene-I like receptor). La différence majeure avec les galliformes est l'absence de RIG-I chez ces derniers. L'expression de ces PRR est variable en fonction de l'hôte et pourrait être à l'origine des différences observées entre galliformes et ansériformes. C'est pourquoi en 2012, Cornelissen et al. s'intéressent à la réponse immunitaire de poulets et canards Pékins après infection par un virus IAFP H7N1. Plusieurs différences sont observées. Premièrement, la quantité d'ARN viral dans les poumons diffèrent (plus importante chez le poulet). Le niveau de cytokines pro-inflammatoires est nettement augmenté chez le poulet, beaucoup moins chez le canard. Les interférons IFN-alpha et IFN-beta semblent jouer un rôle prépondérant chez le poulet tandis qu'il s'agit principalement de l'IFN-gamma chez le canard. De plus, une forte augmentation des TLR et MDA-5 dans les poumons est observée chez le poulet alors que chez le canard, il s'agit majoritairement des RIG-I.<sup>ix</sup>

Quoi qu'il en soit, Cornelissen et al. montrent que la réponse immunitaire à une même souche virale ne suit pas le même schéma en fonction de l'espèce hôte, ce qui pourrait expliquer la différence symptomatique qu'il existe entre les poulets et les canards.

### **1.2.3 Différences ansériformes/galliformes lors d'infection à IAHP**

Les infections à virus influenza aviaire « hautement pathogènes » (IAHP) sont systémiques. Ces IAHP, pour des raisons encore inconnues, ne concernent que les sous-types H5 et H7.

Chez les galliformes, l'infection par un virus IAHP provoque un fort taux de mortalité associé à des lésions viscérales hémorragiques et nécrotiques, des lésions cardio-vasculaires (endothélium vasculaire altéré), des détresses respiratoires. La mortalité peut être très aiguë et survenir avant même l'apparition de signes cliniques. Des troubles nerveux (torticolis, tremblements, convulsions) sont observés lorsque les animaux survivent assez longtemps.<sup>x</sup>

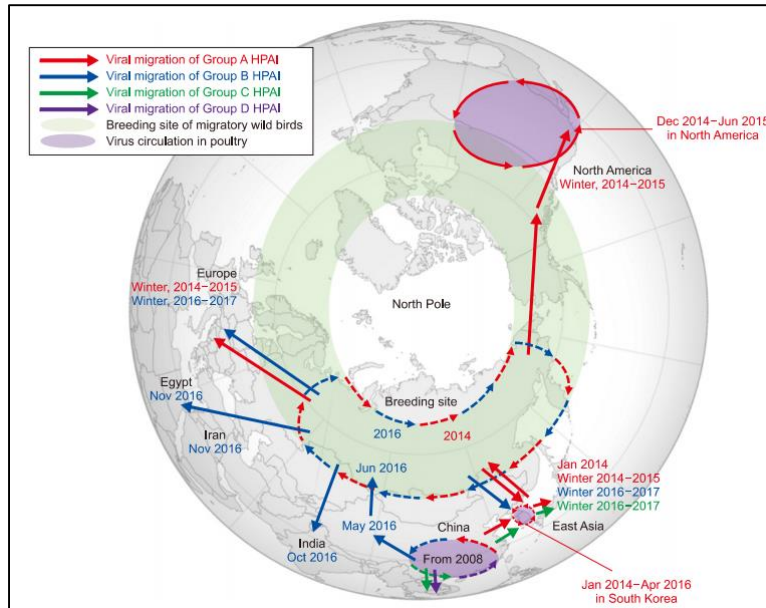
A l'inverse, les ansériformes sont généralement considérés comme résistants car peu de cas de mortalités sont décrits. En 2013, Cornelissen et al. démontrent cette résistance lors d'infection expérimentale par un virus IAHP H7N1. Cette équipe s'est là aussi intéressée au rôle de la réponse immunitaire lors de l'infection. La charge virale et la quantité de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons sont quantifiées après infection. Il apparaît alors deux types de réponses distinctes. Les galliformes présentent une réponse immunitaire tardive et forte (à partir de 24h post-infection), qui ne permet pas de contrôler la réplication virale. La charge virale est en effet importante dans les poumons et le cerveau. Les ansériformes présentent une réponse modérée mais plus précoce (dès 8h post-infection) qui semble être mieux adaptée. La charge virale des poumons et du cerveau est en effet réduite par rapport aux poulets.<sup>xi</sup>

Cependant, il apparaît que certains virus HP puissent provoquer des signes cliniques (troubles principalement neurologiques) et de la mortalité chez les ansériformes. C'est le cas du virus H5N3 HP de 1961 en Afrique du Sud et plus récemment d'une lignée de virus H5N1 apparue en Chine : la lignée H5 Gs/GD.

## **1.3 La lignée H5 Gs/GD**

### ***1.3.1 Historique***

Le souche influenza H5N1 isolée pour la première fois dans la province chinoise de Guangdong sur des oies en 1996, nommé A/Goose/Guangdong/1/1996(H5N1), est à l'origine de mortalité importante au sein de l'avifaune sauvage, des élevages de volailles et de l'Homme. En effet, ce virus est l'ancêtre commun de nombreux virus H5Nx responsables d'épidémies dans plusieurs pays d'Asie, d'Amérique du Nord, d'Europe ou d'Afrique. Tous ces descendants sont regroupés sous une lignée H5 nommée Gs/GD (Goose/Guangdong). Cette lignée se découpe en 10 clades (0 à 9) et de multiples sous-clades, composant l'arbre phylogénétique de la lignée H5 Gs/GD. Depuis 2008, plusieurs sous-types H5N2, H5N5 et H5N8 de lignée Gs/GD clade 2.3.4 ont été isolés chez des volailles domestiques en Chine. Ces virus ont eux-mêmes évolués en différents sous-clades incluant le sous-clade 2.3.4.4. En effet, à partir de 2014, l'apparition de virus IAHP H5Nx clade 2.3.4.4 est rapportée en Chine, au Laos, au Vietnam (H5N6) ainsi qu'au Japon et en Corée du Sud (H5N8). Ces virus se sont alors propagés dans le monde entier et ont évolués en 4 groupes génétiques différents (A, B, C et D). Les groupes A (« Buan-like ») et B (« Gochang-like ») concernent les virus H5N8 clade 2.3.4.4, les groupes C et D concernent les virus H5N6 clade 2.3.4.4. Le groupe A est le premier virus de clade 2.3.4.4 détecté en Europe en 2014. Le groupe B est quant à lui détecté à partir de mai 2016 en Chine (Qinghai Lake) sur des oiseaux migrateurs retrouvés morts, puis en Sibérie (Uvs-Nuur Lake) au mois de juin 2016 et enfin en France fin 2016, provoquant une mortalité importante dans les élevages de volailles (Fig. 3).<sup>xii</sup>



**Figure 3.** Carte géographique décrivant les mouvements des virus IAHP H5 lignée Gs/GD clade 2.3.4.4 depuis 2008. A partir de 2014, l'apparition de virus IAHP H5Nx clade 2.3.4.4 est rapportée en Chine, au Laos, au Vietnam (H5N6) ainsi qu'au Japon et en Corée du Sud (H5N8). Le groupe A est le premier virus de clade 2.3.4.4 détecté en Europe en 2014. Le groupe B est quant à lui détecté à partir de mai 2016 en Chine sur des oiseaux migrateurs retrouvés morts, puis en Sibérie au mois de juin 2016 et enfin en France fin 2016. Source : Lee et al., « Evolution, Global Spread and Pathogenicity of Highly Pathogenic Avian Influenza H5Nx Clade 2.3.4.4. »

### 1.3.2 Pathogénicité des virus H5N8 clade 2.3.4.4

La récurrence d'épizooties de virus influenza A H5N8 clade 2.3.4.4 dans de nombreux pays soulève le besoin de mieux connaître et comprendre la pathogénie et l'évolution de ces virus. Plusieurs infections expérimentales ont été réalisées pour évaluer la pathogénicité des virus H5N8 clade 2.3.4.4, la majorité concerne des virus asiatiques ou nord-américains. <sup>xiii</sup>

En revanche, peu d'études décrivent à ce jour la pathogénie associée à des souches H5N8 clade 2.3.4.4 européennes. Ces souches peuvent cependant être différentes des souches asiatiques ou nord-américaines. En effet, chaque souche est en constante évolution génétique ce qui peut être à l'origine de variation de la pathogénicité. Parmi les études les plus récentes :

En 2018, une équipe allemande (Grund *et al.*) compare les effets d'une souche IAHP de groupe A (A/turkey/Germany-MV/R2472/2014) et les effets d'une souche IAHP de groupe B (A/tufted-



duck/Germany/AR8444L01987/2016) chez le poulet et le canard Pékin. Quel que soit le groupe auquel appartient la souche, 100% (10/10) des poulets infectés par voie intraveineuse sont morts en moins de 72h. Les lésions histologiques associées sont essentiellement des lésions inflammatoires nécrosantes concernant plusieurs organes auxquelles s'ajoutent des encéphalites. A l'inverse, chez le canard Pékin adulte, la souche H5N8 de groupe A n'induit pas de mortalité tandis que la souche de groupe B induit une mortalité de 20% (2/10) en 4 à 5 jours. Les lésions histologiques associées sont des hépatites nécrosantes, des congestions pulmonaires modérées à sévères et parfois des encéphalites nécrosantes modérées.<sup>xiv</sup>

Une équipe néerlandaise (van den Brand *et al.*, 2018) a étudié une souche IAHP de groupe A (A/chicken/Netherlands/emc-3/2014) chez quatre espèces de canards : le Canard siffleur (*anas penelope*), la Sarcelle d'hiver (*anas crecca*), le Canard colvert (*anas platyrhynchos*) et la Fuligule miloin (*aythya ferina*). Les résultats concordent avec ceux vus précédemment. Après infection avec une dose de 4log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> (« 50% tissue culture infective dose »), aucun signe clinique n'est observé. L'histologie ne présente pas de lésions au niveau de l'encéphale.<sup>xv</sup>

En 2019, une équipe américaine et néerlandaise (Leyson *et al.*) s'intéresse à une souche IAHP de groupe B (A/tufted-duck/Denmark/11470/LWPL/2016) chez des canards colvert de 2 semaines et des poulets de 3 semaines. Le protocole d'infection est identique pour les deux espèces, par voie choanale avec une dose de 6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (« 50% egg infective dose »). La mortalité chez les poulets atteint 90% (9/10) en 3 jours avec 70% (7/10) des morts ne présentant aucun signe clinique. Il s'agit ici d'une mortalité foudroyante, l'animal meurt de sepsis avant même l'apparition de signes cliniques particuliers. Chez le canard colvert, l'infection provoque une léthargie, une anorexie et des signes neurologiques jusqu'à la mort (mortalité moins rapide que chez le poulet). La mortalité chez cette espèce est là aussi importante avec 8 canards morts sur 9 au total.<sup>xvi</sup>

Une équipe russe et coréenne (Prokopyeva *et al.*, 2018) décrit chez des poulets de 6 semaines les lésions histologiques provoquée par une souche IAHP de groupe B (A/domestic-duck/Siberia/49feather/2016) à une dose de 6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> par voie intraveineuse. La mortalité atteint 100% (3/3). Au niveau pulmonaire, les amas d'érythrocytes observés dans les parabronches et les capillaires aériens, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins

partiellement détruits et l'œdème périvasculaire indiquent une insuffisance respiratoire aiguë, compatible avec une mort rapide par asphyxie. Au niveau de l'encéphale, les vaisseaux sont congestifs, des manchons périvasculaires composés de lymphocytes sont observés.<sup>xvii</sup>

Ces études montrent des différences cliniques et histopathologiques entre les virus IAHP H5N8 clade 2.3.4.4 du groupe A et les virus du groupe B. Le poulet semble très sensible aux deux groupes. La mortalité apparaît en moins de 3 jours. Elle est associée à des insuffisances respiratoires aiguës, des septicémies, des foyers de nécroses sur plusieurs organes et des encéphalites. En revanche le canard semble réagir différemment en fonction du groupe de la souche. Alors que des souches de groupe A n'ont induit ni mortalité ni signes cliniques, des souches de groupe B ont conduit à de la mortalité (moins aiguë que chez le poulet) et à des signes principalement neurologiques.

### ***1.3.3 Crise H5N8 clade 2.3.4.4 de groupe B en France***

Entre le 28 novembre 2016 et le 23 mars 2017, la France fait face à une épizootie de virus IAHP H5N8 de lignée Gs/GD clade 2.3.4.4 groupe B. Au total, 484 foyers sont détectés, principalement dans le Sud-Ouest (59,1% des cas dans les Landes et 19,8% dans le Gers). Ces foyers concernent pour la plupart des élevages de canards (81,6%) et de poulets (12,2%), le reste étant des foyers multi-espèces. Comme décrit précédemment, les canards présentent en majorité une mortalité associée à des troubles neurologiques, les poulets une mortalité aiguë avec parfois des troubles respiratoires. Les conséquences pour la filière sont lourdes, 6,8 millions d'oiseaux abattus et une enveloppe de 78,4 millions d'euros provenant de l'Etat et de l'Union européenne (70 millions d'euros pour les producteurs et 8,4 millions d'euros pour les entreprises de l'aval des filières).<sup>xviii</sup>

## **1.4 Emergence de souches HP et rôle de l'espèce hôte**

L'émergence d'une souche HP sur le terrain est un événement rare. Entre 1959 et 2017, seulement 43 nouvelles lignées de virus IAHP sont enregistrées.

Une souche HP émerge suite à la mutation de la souche parent FP (cf.1.2.1). L'apparition de la souche HP est donc en lien direct avec les attributs génotypiques et phénotypiques de la souche FP initiale. Ce sont les facteurs intrinsèques. Parmi ces facteurs sont retrouvés et reconnus les sous-types, H5 et H7 uniquement. La séquence génétique du virus et notamment la séquence codant pour le site de clivage de l'hémagglutinine ou encore la configuration 3D du génome seraient ici aussi des facteurs majeurs. Ainsi, certains virus IAFP seraient plus sujet à mutation et au passage à la forme HP que d'autres. De nombreuses études s'intéressent à ces facteurs qui sont primordiaux.

En revanche, peu d'informations concernent l'influence de l'hôte (espèce, statut immunitaire, âge) et de l'environnement (conditions d'élevage, densité) sur l'émergence de la souche HP. Ce sont les facteurs extrinsèques. La souche HP nouvellement formées doit en effet se multiplier correctement au sein de l'hôte et pouvoir contaminer d'autres individus pour perdurer. Concernant l'espèce hôte, il est montré que la détection initiale de souche IAHP est le plus fréquemment observée chez les galliformes (81%).<sup>xix</sup> Cette prédominance des galliformes pourrait suggérer une émergence facilitée chez ces espèces plutôt que chez les ansériformes. Cependant, les galliformes domestiques étant plus nombreux (par rapport aux ansériformes domestiques) et montrant des signes cliniques marqués et/ou une forte mortalité, ils sont davantage sujets à la détection par surveillance. De plus, le rôle de l'avifaune sauvage est souvent inconnu. Il peut être envisagé une émergence de la souche HP dans une espèce ansériforme précédant la détection initiale dans une espèce galliforme.

## **1.5 Objectifs de l'étude**

### ***1.5.1 Quelle est l'origine des différences symptomatiques entre les ansériformes et galliformes lors d'infection à virus influenza A HP de lignée H5 Gs/GD clade 2.3.4.4 groupe B ?***

Les galliformes sont très sensibles aux virus hautement pathogènes. Ces animaux présentent une mortalité aiguë parfois associée à des signes respiratoires. Dans la majorité des cas, les souches HP ne provoquent pas de symptômes chez les ansériformes. Cette résistance décrite dans ces

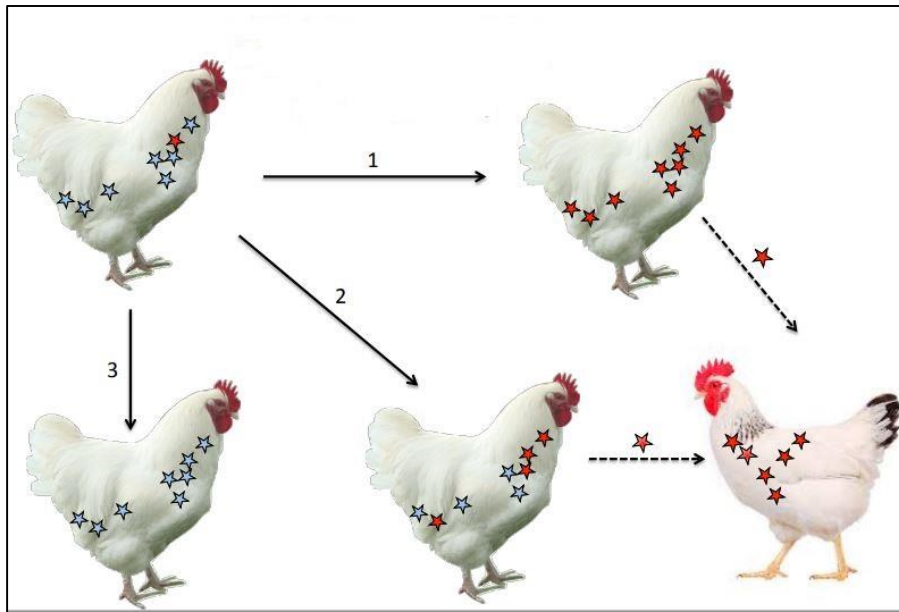
espèces est en partie liée à la réponse immunitaire qui semble plus adaptée que chez les galliformes. Il est montré en effet une réponse plus modérée mais plus précoce chez le canard que chez le poulet (cf. 1.2.3). Il existe cependant certaines souches HP capables de provoquer de la mortalité et des signes cliniques chez les ansériformes. C'est le cas des virus H5 de lignée Gs/GD clade 2.3.4.4 groupe B. Ces ansériformes présentent alors des troubles neurologiques. Comment expliquer la pathogénie nouvelle de ces souches ? Quelle est l'origine de la différence clinique observée sur le terrain entre galliformes (mortalité aiguë avec ou sans signes respiratoires) et ansériformes (signes neurologiques majoritaires) ?

Cette étude s'intéresse au virus hautement pathogène H5N8 clade 2.3.4.4 de groupe B isolé en France lors de la crise sanitaire de 2016. Des ansériformes (canards Pékins) et des galliformes (poulets White Leghorn) sont infectés expérimentalement. La clinique sera observée et mise en lien avec une analyse histologique d'organes cibles (trachée, poumons, encéphale) et une analyse immunohistochimique. Ces techniques permettront de mieux comprendre la pathogénie de ce virus et de mettre en évidence les différences qu'il peut y avoir à l'échelle microscopique entre les ansériformes et les galliformes. Cette étude se concentre sur des animaux de même âge, infectés par une même souche, dans un environnement similaire et contrôlé. Les conditions d'élevage, le statut immunitaire des oiseaux et l'origine de la souche virale sont en effet autant de facteurs pouvant moduler l'expression clinique des animaux observée sur le terrain. Ainsi, seul le rôle que peut jouer l'espèce-hôte dans l'expression clinique de l'infection est évalué et comparé ici.

### ***1.5.2 Quelles sont les interactions intra-hôtes entre deux souches FP et HP apparentées ? Quelle est l'influence de l'hôte sur l'émergence de souches HP ?***

L'émergence d'une souche HP est liée à deux mécanismes biologiques majeurs. Le premier est une évolution génétique de la souche FP initiale. Cette évolution est dépendante des caractéristiques génotypiques et phénotypiques de cette souche FP apparentée. Ce sont les facteurs décrits comme intrinsèques. Le deuxième mécanisme concerne la sélection intra-hôte de la souche HP émergente. Il s'agit ici des facteurs extrinsèques. Soit la souche HP ne parvient

pas à se multiplier et cette souche s'éteint. Soit elle parvient à se multiplier rapidement et cause alors des signes propres aux souches HP. Une situation intermédiaire peut être envisagée dans laquelle les deux souches persistent un certain temps au sein de l'hôte avant que ce dernier déclare les signes associés à la souche HP (Fig. 4).



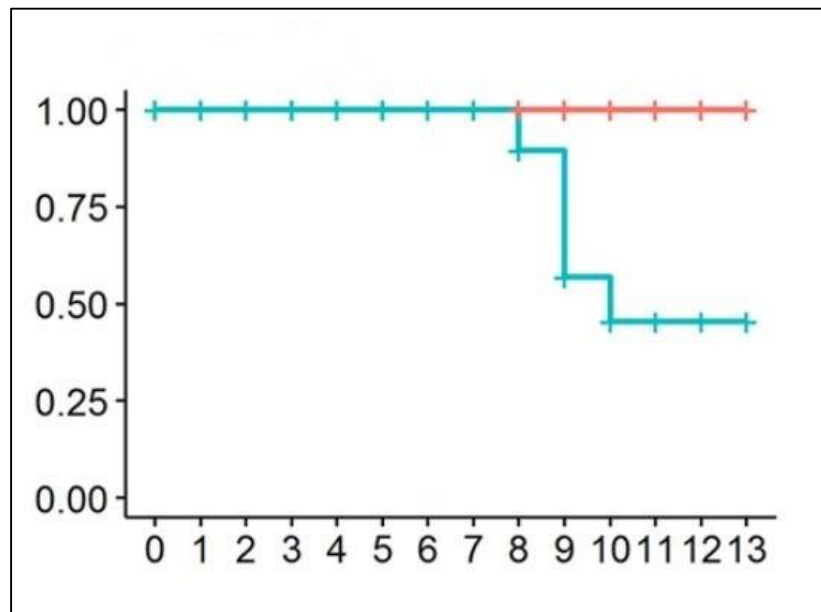
**Figure 4.** Interactions intra-hôtes entre deux souches FP et HP apparentées et issues possibles. Soit la souche HP (étoile rouge) parvient à se multiplier rapidement et cause alors des signes propres aux souches HP (cas n°1). Soit la souche HP ne parvient pas à se multiplier et cette souche s'éteint (cas n°3). Une situation intermédiaire peut être envisagée (cas n°2). Source : R. Volmer, ppt « Avian influenza virus evolution and pathogenesis »

La détection de nouvelles lignées HP, et donc le témoin d'émergence, se fait en majorité chez les galliformes domestiques (81% des détections depuis 1959 jusqu'en 2017) plutôt que chez les ansériformes. Il peut donc être envisagé une émergence facilitée chez les galliformes. Or, plusieurs biais apparaissent (population et sensibilité plus importante) qui rend les galliformes plus sujets à la détection (cf. 1.4).

Les souches HP émergent-elles donc majoritairement chez un ordre en particulier ? Les données du terrain ne sont pas suffisantes pour répondre à cette question. Les facteurs intrinsèques à l'émergence sont admis indépendants de l'espèce hôte car uniquement liés à la structure de la

souche FP initiale. S'il existe une différence entre les deux ordres, alors elle doit se retrouver au niveau des facteurs extrinsèques (l'hôte et son environnement).

Cette étude s'intéresse ainsi au rôle de l'espèce hôte sur l'émergence d'une souche HP. En 2018, l'équipe allemande de Graaf *et al.* tend à montrer l'existence d'une compétition chez le poulet entre 2 souches IAHP et IAFP H7N7 apparentées lorsque le ratio HP/FP est inférieur ou égal à 1:100. La mortalité observée chez les poulets mono-infectés HP avec un dose de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> est significativement plus importante que chez les poulets co-infectés HP (4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) et FP (6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>). La souche IAFP semble donc ici capable de freiner la multiplication de la souche HP et donc, par extension, de limiter son émergence (Fig.5).<sup>xx</sup>



**Figure 5.** Résultats de l'équipe de Graaf *et al.* Le taux de survie des poulets infectés est en ordonnée. Le nombre de jour après infection est en abscisse. La courbe bleue représente les poulets mono-infectés par une souche H7N7 HP à une dose de 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>. La courbe rouge représente les poulets co-infectés par la souche HP (3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) et FP apparentée (6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>). La mortalité observée chez les poulets mono-infectés HP est significativement plus importante que chez les poulets co-infectés. Source : Graaf *et al.*, « A Viral Race for Primacy »

En s'appuyant sur le modèle allemand, des co-infections sont réalisées avec un virus H5N8 IAHP et un virus H5N8 IAFP apparenté. Le virus IAHP utilisé correspond au virus sauvage H5N8 clade

2.3.4.4 de groupe B cité précédemment. Le virus IAFP utilisé est un mutant obtenu en laboratoire à partir du virus IAHP, par génétique inverse. Cette technique permet de se rapprocher au mieux du parent de la souche HP et de mimer une situation d'émergence. Les deux virus ne diffèrent que par leur séquence génétique codant pour le site de clivage de l'hémagglutinine. Ces co-infections seront réalisées chez le poulet White Leghorn et chez le canard Pékin de même âge afin de comparer deux espèces représentantes des galliformes et des ansériformes.

## **1.6 Contribution personnelle à l'étude**

Au cours de cette étude, l'apport personnel concerne dans un premier temps les expériences *in vivo* : soins aux animaux, infections, écouvillons trachéaux (ou oropharyngés) et cloacaux, euthanasies, autopsies, prélèvements d'organes. Ces expériences sont réalisées aux côtés de Thomas Figueroa, Pierre Bessière et Amélia Coggon.

De plus, une contribution aux techniques d'histologie et d'immunohistochimie est réalisée aux côtés du Professeur Maxence Delverdier et de l'ingénieur de recherche Marie-Noëlle Lucas : recoupe, mise en cassette, lecture de lames.

Les techniques de PCR sont réalisées par T. Figueroa et P. Bessière.

L'ensemble de cette étude est supervisé par Romain Volmer.

## **2. Résultats**

### **2.1 Galliformes, essai n°1**

#### ***2.1.1 Design de l'étude***

Cinq groupes de poulets White Leghorn âgés de 4 semaines sont infectés par la souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène et/ou la souche mutant faiblement pathogène apparentée. L'infection est réalisée par l'injection de 100 µl d'une solution virale au niveau des choanes. A ces 5 groupes s'ajoute un groupe témoin négatif constitué de 10 poulets

non infectés. Il sera nommé par la suite « NI ». Un groupe est mono-infecté avec la souche faiblement pathogène à une dose de 6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (18 poulets). Il sera nommé « FP6 ». Deux groupes sont mono-infectés avec la souche hautement pathogène à 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> et 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (20 poulets pour chaque groupe). Ils seront nommés respectivement « M3 » et « M4 ». Deux groupes sont co-infectés avec une dose commune de la souche faiblement pathogène (6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) auquel s'ajoute la souche hautement pathogène à une dose de 3 log<sub>10</sub> EID ou de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (20 poulets pour chaque groupe). Ils seront nommés respectivement « C3 » et « C4 » et correspondent respectivement à un ratio HP/FP de 1:1000 et 1:100. Le nombre de poulets par groupe est déterminé en fonction du nombre de poulets disponibles et de la densité autorisée par la réglementation sur l'expérimentation animale.

Le taux de survie est enregistré tous les jours et daté en jours post-infection (jpi). Soit le poulet meurt spontanément, soit il est euthanasié. Un poulet est euthanasié lorsque les points limites sont atteints pour éviter toute souffrance prolongée.

Une analyse histologique est effectuée sur les groupes NI, FP6, M4 et C4. Cinq poulets présélectionnés sont euthanasiés à 1 jpi et 5 autres à 3 jpi pour les groupes FP6, M4 et C4. Pour le groupe contrôle, uniquement 5 poulets sont euthanasiés à 2 jpi. L'encéphale, les poumons et la trachée sont prélevés sur chaque individu. Les lésions microscopiques observées après traitement des lames par coloration hémalum-éosine sont enregistrées. De l'immunohistochimie (IHC) est réalisée et permet d'identifier la présence du virus et donc a fortiori une estimation de la charge virale.

Le niveau d'excrétion virale de chaque groupe est quantifié par méthode qPCR ciblant l'hémagglutinine sur écouvillons oropharyngés et cloacaux. Chaque individu est prélevé chaque jour. Une qPCR utilisant une amorce commune à l'hémagglutinine des souches hautement et faiblement pathogène est réalisée, permettant de quantifier l'excrétion virale totale (HP et/ou FP). En parallèle, une qPCR utilisant une amorce spécifique de la souche hautement pathogène est réalisée pour quantifier uniquement cette souche lors de co-infection.

### ***2.1.2 Taux de survie et signes cliniques***



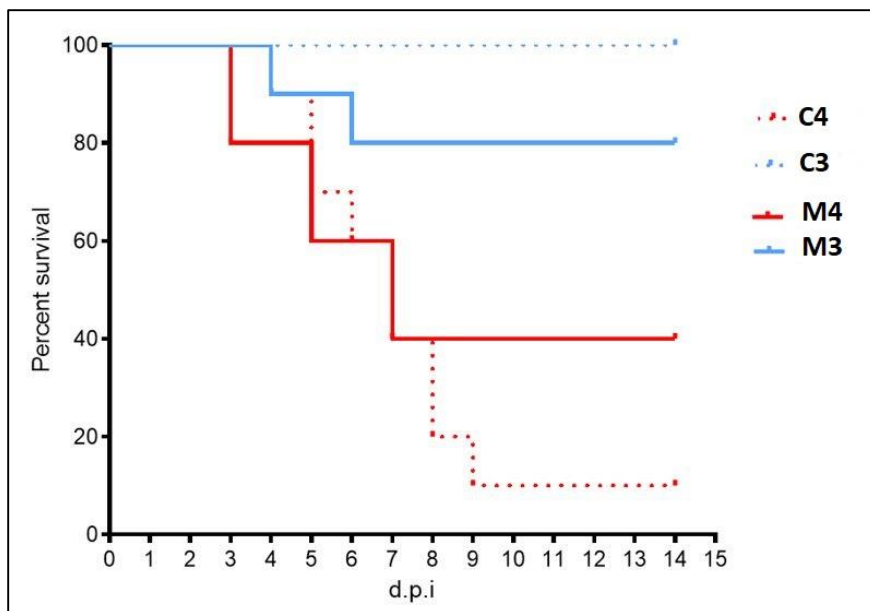
Le taux de survie et les signes cliniques sont observés afin de répondre aux questions suivantes : Est-il possible de reproduire expérimentalement les symptômes provoqués par la souche HP sur le terrain lors de la crise de 2016-2017 (mortalité, troubles respiratoires) ? Quel est l'effet d'une variation de la dose infectieuse ? Quelles sont les conséquences d'une co-infection et à quel ratio HP/FP ?

Le groupe témoin négatif (groupe NI) confirme le bon état sanitaire des poulets à l'arrivée et l'absence de co-morbidité éventuelle sur les autres groupes. Ni mortalité ni signe clinique ne sont observés chez les poulets de ce groupe.

Le groupe mono-infecté faiblement pathogène FP6 (6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) ne présente pas de mortalité et aucun signe clinique n'est observé. Ces résultats sont compatibles avec la pathogénicité réduite connue de ce type d'infection.

La mortalité et la morbidité des groupes mono-infectés hautement pathogènes sont dose-dépendantes. Plus la dose administrée augmente, plus la morbidité et la mortalité augmentent. Le taux de survie du groupe M3 (3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) est de 80% à 6 jpi. Deux poulets sont euthanasiés à 4 et 6 jpi. Le taux de survie du groupe M4 (4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) est de 80% à 3 jpi et chute à 40% à 7 jpi (morts spontanées) (Fig. 7). Dans les deux cas, les signes cliniques observés précédant la mort sont une détresse respiratoire (dyspnée et tachypnée), une anorexie et un abattement. Un œdème pulmonaire est parfois observé sur certains individus à la suite d'autopsie.

Les groupes co-infectés réagissent différemment en fonction du ratio HP/FP administré. Les poulets du groupe C3 (ratio 1:1000) ne présentent ni mortalité ni signes cliniques. Comparé au groupe mono-infecté M3, le taux de survie du groupe C3 est augmenté. Le groupe C4 (ratio 1:100) présente quant à lui un taux de survie de 40% à 7 jpi (ici identique au groupe M4) et chute à 10% à 9 jpi (Fig. 6). Une partie des poulets est euthanasiée (5/10), le reste fait suite à une mort spontanée (4/10). Dans les deux cas, les mêmes signes cliniques enregistrés sur le groupe M4 sont observés (détresse respiratoire, abattement, anorexie, œdème pulmonaire). Un individu présente des signes neurologiques à 9 jpi.



**Figure 6.** Taux de survie des poulets après infection, essai n°1. Plus la dose administrée augmente, plus la morbidité et la mortalité augmentent lors de mono-infection. Les groupes co-infectés réagissent différemment en fonction du ratio HP/FP administré. Comparé au groupe mono-infecté M3, le taux de survie du groupe C3 (ratio 1 :1000) est augmenté. C'est l'inverse pour le groupe C4 (ratio 1:100) comparé au groupe M4.

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène provoque chez le poulet une mortalité importante lorsque la dose atteint 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (60% en 7 jours post-infection). Le taux de mortalité est atténué lorsque la dose infectieuse est réduite (20% pour une dose de 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>). Cette mortalité peut survenir dès 3 à 4 jours post-infection. Quel que soit le groupe, les mourants présentent majoritairement des troubles respiratoires (dyspnée, tachypnée), une anorexie et un abattement. Ces symptômes correspondent à ceux décrits lors de la crise sanitaire de 2016-2017. Un individu parmi les 17 mourants de cette expérience présente toutefois des signes neurologiques tardifs (9 jpi).

La comparaison des courbes de mortalité entre le groupe mono-infecté M3 et co-infecté C3 (ratio HP/FP de 1:1000) montrent une amélioration du taux de survie lors de co-infection. Ce taux passe en effet de 80% lors de mono-infection à 100% lors de co-infection. Cette différence tend à montrer l'existence d'un effet de compétition entre les deux souches. Cependant, la différence entre les deux groupes n'est pas significative (test statistique de Mantel-Cox).

A l'inverse, la comparaison des courbes de mortalité entre le groupe mono-infecté M4 et co-infecté C4 (ratio HP/FP de 1:100) montrent une chute du taux de survie lors de co-infection. Ce taux passe en effet de 40% lors de mono-infection à 10% lors de co-infection. Ces résultats montrent une tendance à la synergie entre les deux souches. La différence entre les deux groupes n'est pas significative (test statistique de Mantel-Cox).

Les effets de la co-infection pourraient donc être ratio-dépendants. L'hypothèse suggérée ici est une compétition entre les deux souches lorsque le ratio HP/FP est de 1:1000. Lorsque celui-ci atteint 1:100, alors il pourrait y avoir synergie entre les deux souches. Cependant, en l'absence de tendance claire indépendante des ratios et parce que les différences observées n'étaient pas significatives, il est plus prudent de conclure à une absence d'effet de la co-infection par la souche FP inoculée à 6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> sur la réplique de la souche HP co-inoculée.

### ***2.1.3 Lésions histologiques et IHC***

Afin de mieux comprendre la pathogénie et d'explorer le tropisme du virus au sein de l'hôte, des analyses histologiques et immunohistochimiques sur encéphale, poumon et trachée sont réalisées sur les groupes NI, FP6, M4 et C4. Les différences entre galliformes et ansériformes dans la réponse à l'infection semblent être précoces (cf 1.2.3), c'est pourquoi les prélèvements d'organes se feront à 1 jour post-infection et 3 jours post-infection. De plus, 2 poulets représentatifs des mourants sont prélevés après leur mort spontanée pour illustrer l'effet maximum de l'infection. Les lésions microscopiques sont-elles en adéquation avec les signes cliniques vus précédemment ? La présence du virus peut-elle être démontrée et à quel niveau ? Est-il possible de montrer le passage en systémique de la souche HP ? La possible synergie lors de co-infection à ratio HP/FP de 1:100 est-elle identifiable dès les premiers jours post-infection ?

Les analyses histologiques réalisées sur les poulets du groupe non infecté (NI, groupe contrôle négatif) ne présentent aucune lésion microscopique à 2 jpi. L'immunohistochimie réalisée chez un individu est négative pour tous les organes (encéphale, poumon, trachée). Ces résultats permettent de confirmer le bon état sanitaire des poulets.

En lien avec un taux de survie de 100%, les poulets mono-infectés avec la souche faiblement pathogène (groupe FP6) présentent très peu de lésions histologiques dans les 3 premiers jours post-infection. Une hyperplasie lymphocytaire focale sur un animal (1/5) à 1 jpi et une hyperplasie lymphocytaire multifocale sur un autre (1/5) à 3 jpi sont observées au niveau des poumons. L'immunohistochimie ne permet pas de mettre en évidence le virus.

A 1 jour post-infection, aucune lésion n'est mise en évidence pour le groupe mono-infecté hautement pathogène M4 (4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>). L'immunohistochimie révèle la présence du virus sur un individu (1/3) au niveau des poumons. A 3 jours post-infection, une pneumonie interstitielle légère subaiguë avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique apparaît sur un individu (1/5) (Tab.1). L'immunohistochimie met en évidence la présence du virus dans le cerveau d'un individu (1/3) sans lésions microscopiques associées.

Un individu (1/5) du groupe co-infecté C4 présente une hyperplasie lymphocytaire associée aux bronches à 1 jpi. L'immunohistochimie ne détecte pas la présence du virus à ce moment. Des lésions histologiques sont observées sur trois poulets (3/5) à 3 jpi. Une hyperplasie lymphoplasmocytaire multifocale est observée sur un individu (1/5) et une pneumonie interstitielle légère subaiguë avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique est observée sur deux individus (2/5). L'immunohistochimie identifie la présence du virus dans les poumons de 3 poulets (3/4) et dans le cerveau d'un poulet (1/4).

Les 2 poulets représentatifs des mourants, issus du groupe M4 mort à J5 post-infection et du groupe C4 mort à 5 jpi, présentent à l'histologie une pneumonie interstitielle marquée. La présence du virus est révélée par immunohistochimie dans les poumons en très grande quantité. Le virus est aussi présent dans le cerveau, sans lésions microscopiques associées (Annexe 1).

	<b>SIP +</b>	<b>SE +</b>
<b>NI</b>	0%	0%
<b>FP7 J1</b>	0%	0%
<b>FP7 J3</b>	0%	0%
<b>M4 J1</b>	0%	0%
<b>M4 J3</b>	20%	0%
<b>C4 J1</b>	0%	0%
<b>C4 J3</b>	40%	0%

**Tableau 1.** Pourcentage d'individus présentant des lésions à l'histologie lors de l'essai poulet n°1. « SIP+ » : pneumonie interstitielle subaiguë légère, « SE » : encéphalite subaiguë. Un animal sur 5 du groupe mono-infecté présente une pneumonie à 3 jpi. Deux animaux sur 5 du groupe co-infecté présentent une pneumonie à 3 jpi. Ces lésions ne sont pas observées parmi les autres groupes. Aucune lésion au niveau de l'encéphale n'est observée, quel que soit le groupe.

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène peut donc provoquer en moins de 72h chez le poulet une pneumonie interstitielle légère subaiguë avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique. Aucune lésion n'est observée dans l'encéphale. Ces résultats sont en adéquation avec les signes cliniques respiratoires observés précédemment. Toutefois, les résultats apportés par l'immunohistochimie montrent que cette souche est capable en 72h de générer une infection systémique, de passer la barrière hémato-méningée et de se multiplier dans l'encéphale. Quoi qu'il en soit, les lésions histologiques associées à la mortalité sont respiratoires. Les individus représentatifs des mourants présentent en effet une pneumonie interstitielle marquée associée à une quantité importante de virus observée à l'IHC dans les poumons. La présence du virus est aussi révélée par IHC dans l'encéphale mais sans lésions microscopiques associées (encéphalite).

Peu de lésions microscopiques sont observées à 1 jpi sur les groupes M4 et C4. Cependant, à 3 jpi, le groupe co-infecté présente des lésions microscopiques pulmonaires sur 3 individus alors que le groupe mono-infecté ne présente ces lésions que sur un individu sur les 5 animaux prélevés. De plus, la présence du virus au niveau des poumons est plus facilement révélée pour

les animaux du groupe C4 (3/4 à 3 jpi) que ceux du groupe M4 (0/3 à 3 jpi). Ces résultats confortent l'idée d'une tendance à la synergie entre les souches HP et FP lors de co-infection à ratio HP/FP de 1:100.

La souche mutant faiblement pathogène induit très peu de lésions microscopiques et l'immunohistochimie ne permet pas de mettre en évidence une réplication virale. Ces résultats sont à ce stade problématiques. En effet, ils remettent en cause la capacité de cette souche à se multiplier et donc à entrer en compétition ou synergie avec la souche hautement pathogène.

#### **2.1.4 Excrétion virale**

Pour qu'une souche virale émerge à plus grande échelle que celle de l'hôte, il lui est nécessaire de pouvoir assurer une contamination inter-hôte. L'étude de ces contaminations justifie de s'intéresser à l'excrétion virale de l'hôte. Est-il possible d'observer une excrétion virale des hôtes après infection expérimentale ? Quelle est la cinétique d'excrétion ? Quelles sont les conséquences de la co-infection HP/LP sur l'excrétion de la souche HP ? Cette excrétion virale est ainsi quantifiée par qPCR sur écouvillons oropharyngés et cloacaux de J1 post-infection à J9 post-infection. Pour les groupes co-infectés, une distinction est faite entre l'excrétion virale totale (souche HP et FP) et l'excrétion virale HP seule (*cf.* 2.1.1.1).

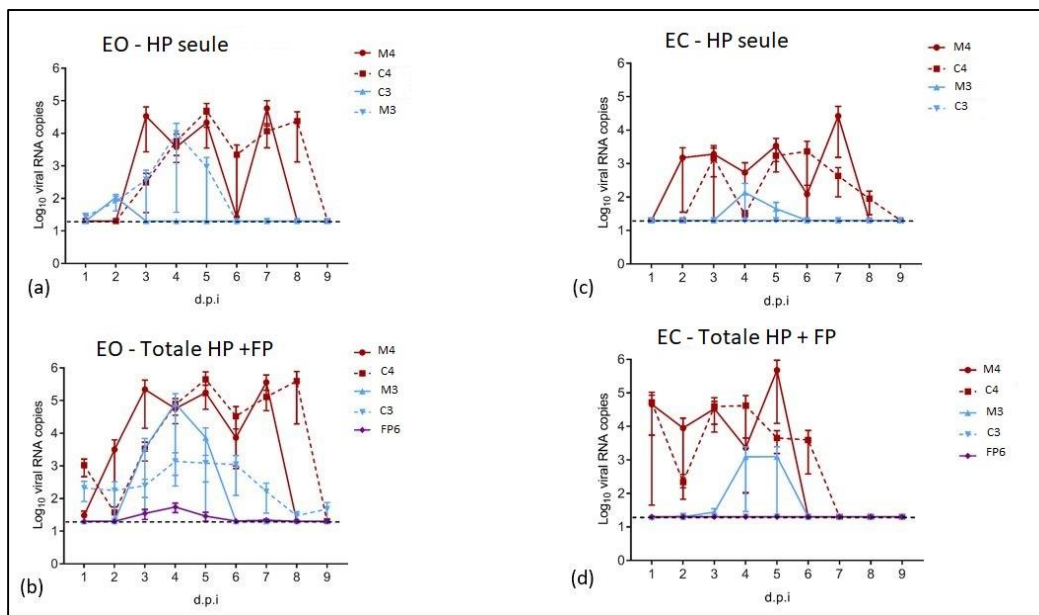
Le niveau d'excrétion virale du groupe mono-infecté par la souche faiblement pathogène (groupe FP6) est faible. Le niveau d'excrétion oropharyngée maximum, atteint à 4 jpi, ne dépasse pas  $10^2$  copies/ $\mu$ l. Les résultats obtenus à partir des écouvillons cloacaux confirment la faible excrétion de cette souche.

L'excrétion virale des groupes mono-infectés par la souche hautement pathogène est dose-dépendante. L'intensité et la durée d'excrétion augmente lorsque la dose infectieuse augmente. Le groupe M3 (3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) atteint un pic d'excrétion à 4 jpi. L'excrétion chute dès 6 jpi. Le niveau d'excrétion du groupe M4 atteint un plateau à partir de 3 jpi. L'excrétion persiste 8-9 jpi.

Au niveau cloacal, le niveau d'excrétion du groupe M3 n'atteint pas celui du groupe M4 et la durée d'excrétion est identique aux résultats obtenus sur écouvillons oropharyngés.

L'excrétion virale totale oropharyngée du groupe C3 est supérieure au groupe M3 à 1 jpi. Dans les jours post-infection suivants, les résultats s'inversent et le niveau d'excrétion du groupe C3 ne dépasse pas  $10^3$  copies/ $\mu$ l à 4 jpi tandis que celui du groupe M3 atteint  $10^5$  copies/ $\mu$ l. On observe en parallèle, via la qPCR à amorce spécifique à la souche hautement pathogène, une chute de l'excrétion virale HP du groupe co-infecté C3 dès 2 jpi. Ce phénomène ne se retrouve pas pour le groupe M3. Avec un ratio HP/FP de 1:1000, la souche hautement pathogène est moins excrétée que lors de mono-infection. Ces observations se retrouvent au niveau cloacal, la souche HP n'est pas détectée lors de la co-infection.

L'excrétion virale totale oropharyngée et cloacale du groupe C4 se rapproche de celle du groupe M4. Le niveau d'excrétion des deux groupes atteint un plateau proche de  $10^5$  copies/ $\mu$ l d'ARN. Un décalage de 24h est observé entre ces deux groupes. Le groupe M4 atteint ce plateau plus rapidement que le groupe C4. Avec un ratio de HP/FP de 1:100, le niveau d'excrétion de la souche hautement pathogène, mis en évidence par qPCR à amorce spécifique, des groupes co-infecté et mono-infecté est proche. Seul un décalage de 24h est observé au niveau cloacal (Fig. 7).



**Figure 7.** Excrétion virale des poulets, essai n°1. (a) Excrétion oropharyngée de la souche HP. (b) Excrétion oropharyngée totale (souche HP et FP confondue). (c) Excrétion cloacale de la souche HP. (d) Excrétion cloacale totale (souche HP et FP confondue).

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène atteint un niveau d'excrétion oropharyngée maximum en 3-4 jours post infection. Plus la dose infectieuse est élevée, plus le niveau d'excrétion maximal est atteint rapidement. L'excrétion cloacale est plus précoce, dès 1 à 2 jours post-infection lorsque la dose infectieuse est élevée. La durée d'excrétion est aussi dose dépendante. Elle atteint 8-9 jpi lorsque la dose infectieuse est de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>, 6 jpi lorsque la dose est de 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>.

Quel que soit le ratio, aucune différence significative (test statistique de Mann Whitney) n'est observée entre l'excrétion virale du groupe mono-infecté et celle du groupe co-infecté. La tendance à la synergie (couple M4/C4) ou à la compétition (couple M3/C3) observée via les précédentes analyses n'est pas confirmée ici.

La souche mutant faiblement pathogène excrète peu au niveau oropharyngé et cloacal. Associés aux observations histologiques et immunohistochimiques (peu de lésions microscopiques, absence de détection du virus à l'immunohistochimie), ces résultats étayent l'hypothèse d'une difficulté de répllication et de multiplication de la souche faiblement pathogène.

### ***2.1.5 Bilan de l'essai***

Les conséquences liées à l'infection par la souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène sont doses dépendantes. Une dose inoculée de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> provoque chez le poulet un taux de mortalité important (ici 60% au total). Cette mortalité est associée majoritairement à des troubles respiratoires (dyspnée, tachypnée, œdème), une anorexie et un abattement. A l'histologie, des pneumonies interstitielles légères subaiguës avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique sont observées dès 3 jours post infection. L'immunohistochimie révèle la présence du virus dans les poumons dès 1 jpi. A 3 jours post-infection, l'immunohistochimie permet de détecter le virus dans l'encéphale. Le virus est donc capable de passer en systémique et de traverser la barrière hémato-méningée en moins de 3



jours. L'analyse des poulets mourants permet de définir l'origine des signes cliniques : une pneumonie interstitielle marquée associée à une charge virale importante au niveau des poumons. Le virus est aussi présent au niveau de l'encéphale, sans lésions microscopiques associées. Le niveau d'excrétion virale oropharyngée augmente exponentiellement pendant 3 jours, se stabilise puis chute vers 8-9 jours post-infection. Une dose de 3 log EID50 provoque les mêmes signes cliniques sur certains individus mais la mortalité est beaucoup plus faible (taux de mortalité final à 20%). Le niveau d'excrétion oropharyngée atteint son maximum en 4 jours post infection puis chute rapidement au 6<sup>e</sup> jour.

Quelle que soit la dose infectieuse, lorsque la souche HP provoque de la mortalité, elle est associée à des troubles respiratoires. L'analyse histologique des individus représentatifs des mourants permet de définir l'origine des signes cliniques : une pneumonie interstitielle marquée associée à une charge virale importante au niveau des poumons. Il est important de noter que le virus est aussi présent au niveau de l'encéphale, mais ici sans lésion microscopique associée.

Les résultats obtenus suite aux co-infections HP et FP ne permettent pas de conclure à un effet quelconque de la co-infection de façon significative. Cependant, une tendance à la compétition entre les deux souches est observée lorsque le ratio HP/FP est de 1:1000 (souche HP inoculée à 3 log<sub>10</sub> EID50 et souche FP à 6 log<sub>10</sub> EID50) avec une augmentation du taux de survie. A l'inverse, lorsque le ratio HP/FP est de 1:100 (souche HP inoculée à 4 log<sub>10</sub> EID50 et souche FP à 6 log<sub>10</sub> EID50), une tendance à la synergie est observée avec une diminution du taux de survie et une proportion de lésions microscopiques augmentée à 3 jours post-infection par rapport au groupe mono-infecté.

La souche mutant faiblement pathogène présente un taux de survie de 100%. Aucun signe clinique n'est observé. Les analyses histologiques ne révèlent que très peu de lésions microscopiques (hyperplasie lymphocytaire au niveau des poumons). L'immunohistochimie est négative sur tous les individus testés. Le niveau d'excrétion virale oropharyngée et cloacale est faible. Tous ces éléments tendent à montrer une faible répllication virale. La souche mutant

faiblement pathogène semble présenter des difficultés à se multiplier. Il est donc nécessaire de reproduire l'expérience avec une infection plus effective des animaux par la souche FP.

## **2.2 Galliformes, essai n°2**

Pour obtenir une réplication plus importante de la souche mutant faiblement pathogène et ainsi pouvoir observer une possible compétition ou synergie avec la souche hautement pathogène lors de co-infection, un nouvel essai est mis en place. La souche faiblement pathogène utilisée reste la même et c'est sa dose qui est augmentée, passant de 6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> à 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>. Cet essai permettra aussi d'apporter de nouvelles données et d'appuyer ou non les résultats du premier essai.

### ***2.2.1 Design de l'étude***

Cet essai suit un schéma proche de l'essai précédent. Cinq groupes de poulets âgés 4 semaines sont infectés par la souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène et/ou de la souche mutant faiblement pathogène. L'infection est réalisée par l'injection de 100 µl de solution au niveau des choanes. A ces 5 groupes s'ajoute un groupe témoin négatif constitué de 5 poulets non infectés. Il sera nommé par la suite « NI' ». Un groupe est mono-infecté par la souche faiblement pathogène à une dose de 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (11 poulets). Il sera nommé « FP7 ». Deux groupes sont mono-infectés par la souche hautement pathogène dosée à 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> et 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (11 poulets pour chaque groupe). Ils seront nommés respectivement « M3' » et « M4' ». Deux groupes sont co-infectés par une dose commune de la souche faiblement pathogène (7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) auquel s'ajoute la souche hautement pathogène dosée à 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> ou 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (11 poulets pour chaque groupe). Ils seront nommés respectivement « C3' » et « C4' » et correspondent respectivement à un ratio HP/FP de 1:10000 et 1:1000. Le nombre de poulet par groupe est déterminé en fonction du nombre de poulet disponible et de la densité autorisée par la réglementation.

La taux de survie est enregistré tous les jours et daté en jours post-infection (jpi). Soit le poulet meurt spontanément, soit il est euthanasié. Un poulet est euthanasié lorsque les signes cliniques le suggèrent (point limite) pour éviter toute souffrance prolongée.

Les analyses histologiques (coloration hémalum-éosine des lames et immunohistochimie) ne sont pas réalisées sur cet essai.

Le niveau d'excrétion virale du groupe FP7, M4' et C4' est quantifié par méthode qPCR sur écouvillons oropharyngés. Chaque individu est prélevé chaque jour pendant 10 jours. Une qPCR utilisant une amorce commune aux souches hautement et faiblement pathogène est réalisée, permettant de quantifier l'excrétion virale totale (HP et FP). En parallèle, une qPCR utilisant une amorce spécifique de la souche hautement pathogène est réalisée pour quantifier uniquement cette souche lors de co-infection.

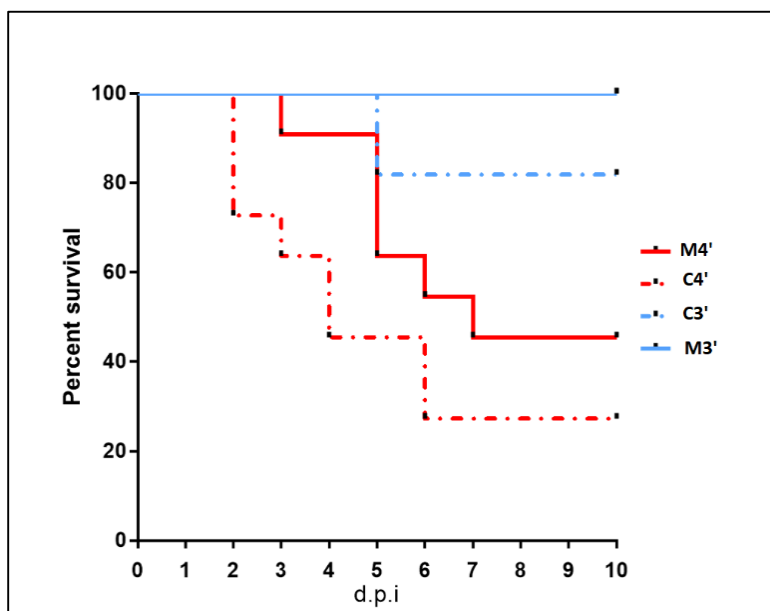
### **2.2.2 Taux de survie et signes cliniques**

Le groupe contrôle non infecté (groupe NI') ne présente ni mortalité ni signe clinique. Ces résultats confirment le bon état sanitaire des poulets à l'arrivée.

Tout comme le groupe FP6, la mono-infection par la souche faiblement pathogène à une dose de 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (groupe FP7) ne présente pas de mortalité. Aucun signe clinique n'est observé.

La mortalité et la morbidité liées à une mono-infection par la souche hautement pathogène sont ici aussi dose-dépendante. Le groupe M3' ne présente ni mortalité, ni morbidité. La mortalité chez le groupe M4' apparaît dès 3 jpi et son taux de survie à 7 jpi est d'environ 55% (5/11 poulets morts dont 4 euthanasiés). Les signes cliniques associés sont les mêmes que ceux observés lors de l'essai précédent (difficultés respiratoires, abattement, anorexie).

Les groupes co-infectés C3' et C4' respectivement comparés au groupe M3' et M4' présentent un taux de survie diminué. Le groupe C3' atteint près de 80% de taux de survie (2/11 poulets morts dont un euthanasié) à 5 jpi. La mortalité du groupe C4' apparaît dès 2 jpi (soit 24h plus tôt que le groupe M4') et le taux de survie chute à environ 25% (8/11 poulets morts dont 6 euthanasiés) à 6 jpi. Ici aussi, la mortalité est associée à des difficultés respiratoires, un abattement et une anorexie (Fig. 8).



**Figure 8.** Taux de survie après infection, essai poulet n°2. La mortalité et la morbidité liées à une mono-infection par la souche hautement pathogène sont ici aussi dose-dépendantes. Le groupe M3' ne présente ni mortalité, ni morbidité. Le taux de survie à 7 jpi du groupe M4' est proche de 55%. Les groupes co-infectés C3' et C4' respectivement comparés au groupe M3' et M4' présentent un taux de survie diminué, sans affirmation statistique.

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène inoculée à une dose de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> provoque lors de cet essai de la mortalité dès 3 jours post infection. Cette mortalité est associée aux mêmes signes cliniques décrits lors de l'essai précédent (troubles respiratoires, anorexie, abattement). Lorsque la dose infectieuse est de 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> aucune mortalité ni signe clinique ne sont observés. Ici, les résultats diffèrent de l'essai précédent (groupe M3) qui présentait un taux de survie de 80% pour une dose équivalente. En associant les deux essais, on observe bien un taux de survie dose-dépendant avec un taux moyen proche de 43% (9/21) pour le couple M4/M4' et proche de 90% (19/21) pour le couple M3/M3'.

Lors de co-infection, et quelle que soit la dose infectieuse HP, le taux de survie est diminué par rapport à la mono-infection. Cependant, ces différences ne sont pas significatives (test statistique de Mantel-Cox). Un effet de synergie entre les souches HP et FP est seulement suggéré ici pour les deux ratios HP/FP testés (1:1000 et 1:10000). Ces résultats associés à ceux de l'essai n°1

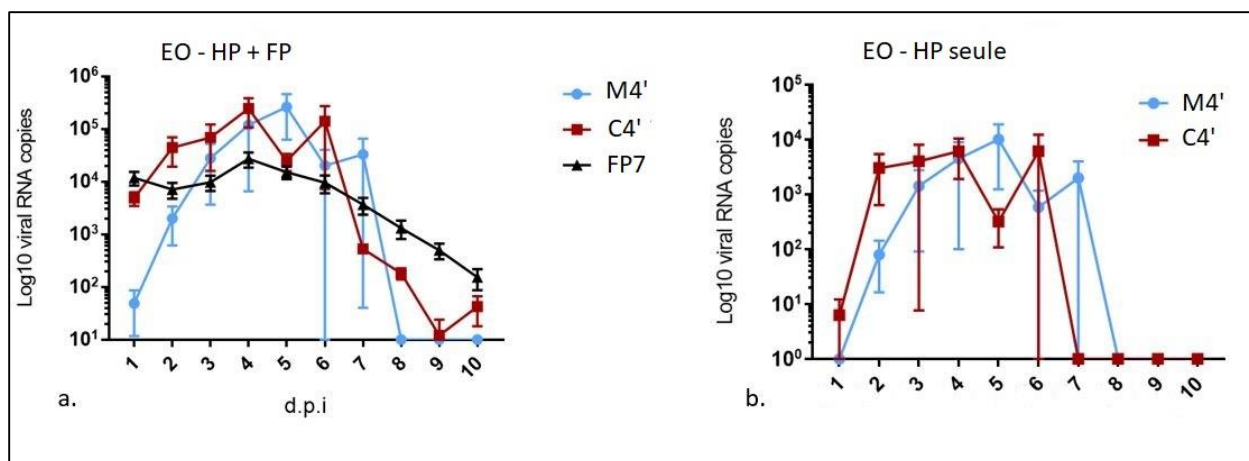
permettent donc d'observer une tendance à la synergie pour les ratios HP/FP de 1:100, 1:1000 et 1:10000, sans atteindre un niveau de significativité suffisant pour le confirmer.

### **2.2.3 Excrétion virale**

Le niveau d'excrétion virale de la souche faiblement pathogène inoculée à 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (groupe FP7) dépasse largement celle du groupe FP6. Le niveau d'excrétion détecté sur les écouvillons oropharyngés atteint son maximum à 4 jpi avec une moyenne proche de 10<sup>4</sup> copies/μl. A titre de comparaison, le groupe FP6 de l'essai précédent présentait un niveau d'excrétion moyen maximal (à 4 jpi) inférieur à 10<sup>2</sup> copies/μl. L'excrétion virale du groupe FP7 s'affaiblit ensuite et persiste jusqu'à 10 jpi.

Le niveau d'excrétion totale du groupe M4' au niveau oropharyngé atteint un pic plus tardivement et plus important que celui du groupe FP7 (résultat supérieur à 10<sup>5</sup> copies/μl à 5 jpi). Cependant, l'excrétion persiste moins longtemps que le groupe FP7 et s'effondre à 8 jpi.

Le niveau d'excrétion totale du groupe co-infecté C4' au niveau oropharyngé atteint un pic plus précocement que le groupe M4' et d'une intensité équivalente (supérieur à 10<sup>5</sup> copies/μl en 4 jpi). L'excrétion persiste jusqu'à 9-10 jpi. La méthode de qPCR à amorce spécifique de la souche hautement pathogène permet le même constat quant au pic d'excrétion virale du groupe C4' par rapport à celui du groupe M4'. Cependant, l'excrétion de la souche HP lors de co-infection ne persiste que 6-7 jours post infection (Fig. 9).



**Figure 9.** Excrétion virale des poulets, essai n°2. (a) Excrétion oropharyngée totale (souche HP et FP). (b) Excrétion oropharyngée de la souche HP seule.

Les résultats obtenus concernant la souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène lors de mono-infection se rapprochent de ceux observés suite à l'essai précédent. Le niveau maximal d'excrétion du groupe M4' (atteint à 5 jpi) est proche de celui du groupe M4 (atteint à 3 jpi). Pour les deux groupes, l'excrétion ne persiste pas plus de 8-9 jpi.

Les différences de niveau d'excrétion de la souche hautement pathogène entre les groupes M4' (mono-infecté) et C4' (co-infecté) ne sont pas statistiquement significatives (test de Mann Whitney). Tout comme l'essai n°1, l'excrétion virale ne permet pas de montrer un effet de la co-infection.

Le niveau d'excrétion enregistré pour la souche mutant faiblement pathogène à une dose de 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> montre une nette progression par rapport à l'essai précédent (dose à 6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>). La réplication de cette souche mutant mise en doute lors du premier essai est ici effective.

#### 2.2.4 Bilan de l'essai

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène confirme son niveau de pathogénicité dose-dépendant. Ici, une dose de 3 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (groupe M3') ne présente ni

mortalité ni signes cliniques. Le taux de survie du groupe M4' (dose de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>) chute à environ 55%. Les signes cliniques associés restent des troubles respiratoires, un abattement, une anorexie. La RT-qPCR réalisée sur écouvillons oropharyngés sur le groupe M4' montre un niveau d'excrétion maximal à 5 jours post infection. L'excrétion chute à 8 jpi.

La souche mutant faiblement pathogène inoculée à 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> ne présente pas de mortalité. Son niveau d'excrétion maximum (supérieur à 10<sup>4</sup> copies d'ARN) dépasse nettement celui du groupe FP6 (inférieur à 10<sup>2</sup> copies d'ARN). Ce niveau d'excrétion maximum est atteint à 4 jpi et la durée d'excrétion est de 10 jpi. La dose utilisée pour le groupe FP7 permet donc une réplication correcte de la souche mutant faiblement pathogène. Les résultats obtenus après co-infection sont donc plus à même de présenter un phénomène de compétition ou de synergie entre les deux souches utilisées.

Pour les couples M3'/C3' (ratio HP/FP de 1:10000) et M4'/C4' (ratio HP/FP de 1:1000), le taux de survie diminue lors de co-infection. Un effet de synergie est suggéré ici, sans affirmation statistiques. Ces résultats associés à ceux de l'essai n°1 permettent donc de montrer une tendance à la synergie pour les ratios HP/FP de 1:100, 1:1000 et 1:10000. La méthode de RT-qPCR réalisée sur le couple M4'/C4' ne montre cependant aucun effet de la co-infection sur le niveau d'excrétion viral.

### **2.3 Ansériformes**

Un modèle expérimental similaire à celui des galliformes est réalisé chez des ansériformes : des canards Pékins. Cet essai permettra *in fine* de répondre aux problématiques vues au 1.4 : Comment expliquer les différences symptomatiques entre les ansériformes et galliformes lors d'infection à virus influenza A HP de lignée H5 Gs/GD clade 2.3.4.4 de groupe B ? Quelles sont les interactions intra-hôtes entre deux souches FP et HP apparentées ? Quelle est l'influence de l'hôte sur l'émergence de souches HP ? Les résultats les plus démonstratifs sont obtenus chez le

poulet lorsque la souche HP est utilisée à une dose de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>. Ici, la souche HP administrée à une dose de 3 log EID<sub>50</sub> ne sera pas étudiée.

### **2.3.1 Design de l'étude**

Trois groupes de canards âgés de 4 semaines sont infectés par la souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène et/ou la souche mutant faiblement pathogène. L'infection est réalisée par l'injection de 100 µl de solution au niveau des choanes. A ces 3 groupes s'ajoute un groupe témoin négatif constitué de 10 canards non infectés. Il sera nommé par la suite « N1c ». Un groupe est mono-infecté par la souche faiblement pathogène à une dose de 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (16 canards). Il sera nommé « FP7c ». Un groupe est mono-infecté par la souche hautement pathogène à 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (18 canards). Il sera nommé « M4c ». Un groupe est co-infecté avec une dose de 7 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> de la souche faiblement pathogène auquel s'ajoute la souche hautement pathogène à une dose de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> (18 canards). Il sera nommé « C4c » et correspond à un ratio HP/FP de 1:1000. Le nombre de canard par groupe est déterminé en fonction du nombre de canards disponible et de la densité autorisée par la réglementation.

Le taux de survie est enregistré tous les jours et daté en jours post-infection (jpi). Soit le canard meurt spontanément, soit il est euthanasié. Un canard est euthanasié lorsque les signes cliniques le suggèrent pour éviter toute souffrance prolongée.

Une analyse histologique est effectuée sur tous les groupes. Cinq canards présélectionnés sont euthanasiés à 1 jpi et 5 autres à 3 jpi pour les groupes FP7c, M4c et C4c. Pour le groupe non infecté, 5 canards sont euthanasiés uniquement à 2 jpi. L'encéphale, les poumons et la trachée sont prélevés sur chaque individu. Les lésions microscopiques observées après traitement des lames par coloration hémalum-éosine (HE) sont enregistrées. De l'immunohistochimie (IHC) est réalisée et permet d'identifier la présence du virus et donc a fortiori une estimation de la charge virale. Comme pour l'essai sur les poulets, 2 canards représentatifs des mourants sont prélevés après leur mort spontanée pour illustrer l'effet maximum de l'infection.



Le niveau d'excrétion virale de chaque groupe est quantifié par méthode qPCR sur écouvillons trachéaux et cloacaux. Chaque individu est prélevé chaque jour. Une qPCR utilisant une amorce commune aux souches hautement et faiblement pathogène est réalisée, permettant de quantifier l'excrétion virale totale (HP et FP). En parallèle, une qPCR utilisant une amorce spécifique de la souche hautement pathogène est réalisée pour quantifier uniquement cette souche lors de co-infection.

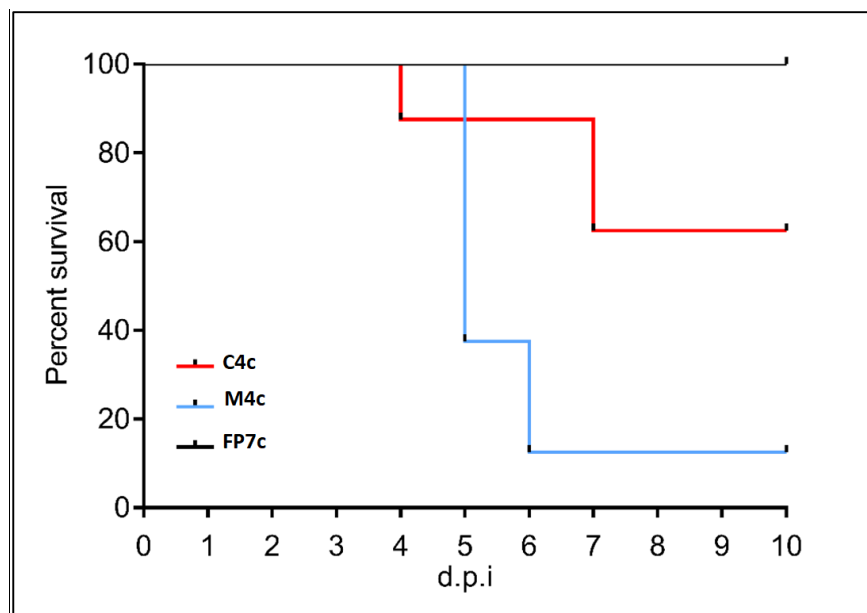
### **2.3.2 Taux de survie et signes cliniques**

Le groupe témoin négatif (NIc) ne présente ni morbidité ni mortalité. Les résultats obtenus sur ce groupe contrôle négatif permettent de s'assurer du bon état sanitaire des canards à l'arrivée et de l'absence de co-morbidité éventuelle sur les autres groupes.

Le groupe mono-infecté par la souche faiblement pathogène (FP7c) ne présente pas non plus de mortalité. Aucun signe clinique n'est observé sur ce groupe.

Le taux de survie observé chez le groupe mono-infecté par la souche hautement pathogène dosée à 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> chute à 12,5% (7/8 canards morts dont 4 euthanasiés) en 6 jpi. La mortalité de ce groupe M4c est associée principalement à des troubles neurologiques (convulsion, torticolis), un abattement et une anorexie.

Le groupe co-infecté avec la souche faiblement et hautement pathogène (C4c) présente un taux de survie de 62,5% (3/8 canards morts dont 2 euthanasiés) à 7 jpi. Cette mortalité est associée aux mêmes signes cliniques que le groupe M4c (troubles neurologiques, abattement, anorexie) (Fig. 10).



**Figure 10.** Taux de survie des canards après infection. Le taux de survie observé chez le groupe mono-infecté par la souche hautement pathogène dosée à 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> chute à 12,5% en 6 jpi. Le groupe co-infecté avec la souche faiblement et hautement pathogène (C4c) présente un taux de survie de 62,5% à 7 jpi.

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène, à une dose de 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>, provoque chez le canard un taux de mortalité important en moins d'une semaine (6 jpi). Cette mortalité est précédée majoritairement par des troubles neurologiques, un abattement, une anorexie.

La souche mutant faiblement pathogène ne provoque ni mortalité ni signe clinique.

Le taux de survie observé chez le groupe co-infecté (C4c) est plus important que chez le groupe mono-infecté M4c. Ce taux passe en effet de 12,5% pour le groupe M4c à 62,5% pour le groupe C4c. Cette différence est statistiquement significative (test de Mantel-Cox). Chez le canard, un ratio HP/FP de 1:1000 réduit donc la pathogénicité associée à la souche HP. Il est ici possible de conclure à un effet de compétition entre la souche FP inoculée à 6 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub> et la souche HP co-inoculée à 4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>.

### 2.3.3 Histologie et IHC

Les canards issus du groupe non infecté (NIc) ne présentent pas lésions microscopiques à 2 jpi. L'IHC réalisée sur l'encéphale, les poumons et la trachée d'un individu ne révèle pas la présence de virus.

Le groupe FP7c mono-infecté par la souche mutant faiblement pathogène provoque dès 1 jpi des pneumonies interstitielles légères subaiguës avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique sur 3 individus (3/5). Un canard présente en plus une trachéite subaiguë avec infiltration mononucléaire (lymphocytes, macrophages, plasmocytes) de la lamina propria. A 3 jpi, 3 canards présentent les mêmes lésions pulmonaires (3/5). L'immunohistochimie ne permet pas la détection du virus.

Aucune lésion microscopique n'est observée à l'histologie sur le groupe mono-infecté par la souche hautement pathogène (M4c) à 1 jpi. L'immunohistochimie révèle en revanche la présence du virus au niveau pulmonaire sur 3 individus (3/4). A 3 jpi, 3 canards présentent des pneumonies interstitielles similaires à celles observées sur le groupe FP7c. De plus, 4 individus (dont les trois atteints de pneumonie) présentent une encéphalite légère subaiguë associée à des manchons périvasculaires (lymphocytes et macrophages) et de la gliose (prolifération des cellules gliales : oligodendrocytes, astrocytes, microglies). Ici, l'immunohistochimie révèle la présence du virus dans les poumons (3/4) et dans l'encéphale (2/4).

Le groupe C4c co-infecté provoque à 1 jpi des pneumonies similaires à celles présentées précédemment (3/5). Un individu présente une légère trachéite subaiguë (1/5). L'immunohistochimie permet de détecter la présence du virus dans les poumons (2/4). A 3 jpi, des légères pneumonies sont observées sur 3 individus (3/5) et un individu présente une légère encéphalite (1/5) (Tab.2). L'immunohistochimie révèle la présence du virus dans les poumons (3/4) et l'encéphale (1/4) des canards.

Les 2 canards représentatifs des mourants (un du groupe M4c mort à J5 post-infection, l'autre du groupe C4c mort à 7 jpi) présentent à l'histologie une encéphalite subaiguë modérée. En lien, la présence du virus est révélée en grande quantité par immunohistochimie dans le cerveau sur un individu (l'autre n'est pas analysé). Le virus n'est pas mis en évidence dans les poumons pour ce même individu (Annexe 2).

	SIP +	SE +
<b>NI</b>	0%	0%
<b>FP7c J1</b>	60%	0%
<b>FP7c J3</b>	60%	0%
<b>M4c J1</b>	0%	0%
<b>M4c J3</b>	60%	80%
<b>C4c J1</b>	60%	0%
<b>C4c J3</b>	60%	20%

**Tableau 2.** Pourcentage d'individus présentant des lésions à l'histologie lors de l'essai canard. « SIP+ » : pneumonie interstitielle subaiguë légère, « SE+ » : encéphalite subaiguë légère. Quatre animaux sur 5 du groupe mono-infecté présentent une encéphalite à 3 jpi. Un animal sur 5 du groupe co-infecté présente une encéphalite à 3 jpi. Ces lésions ne sont pas observées parmi les autres groupes.

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène peut provoquer en moins de 72h chez le canard une pneumonie interstitielle légère avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique. De plus, les résultats apportés par l'immunohistochimie montrent que cette souche est capable dans ce même temps de générer une infection systémique, de passer la barrière hémato-méningée et de se multiplier dans l'encéphale. Des encéphalites sont observées sur la plupart des individus (4/5). Les individus représentatifs des mourants suggèrent que l'origine de la mortalité reste l'encéphalite. Il ne présente en effet aucune lésion pulmonaire au moment de la mort et l'IHC montre une charge virale importante dans l'encéphale associée à des lésions caractéristiques d'encéphalites (manchons périvasculaires, gliose).

La souche mutant faiblement pathogène provoque des lésions microscopiques pulmonaires chez les canards du groupe FP7c dès 1 jpi.

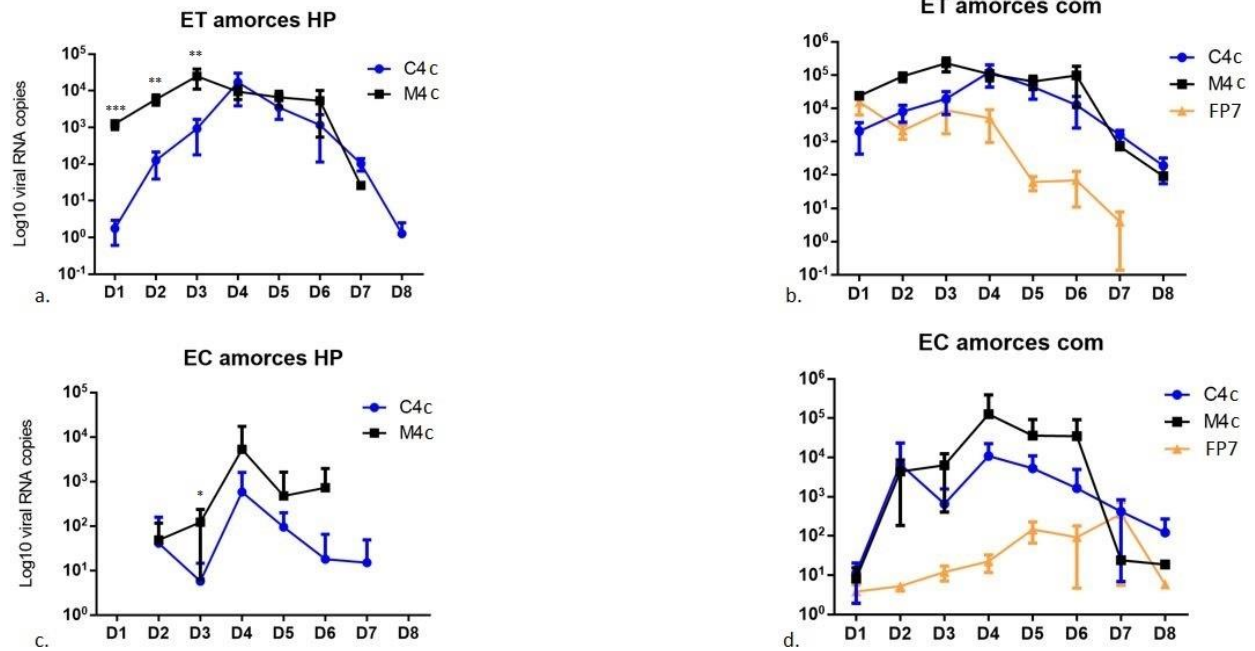
Lors de co-infection avec les souches FP et HP (groupe C4c), les mêmes lésions microscopiques sont observées et la présence du virus est aussi révélée dans l'encéphale. Cependant, le nombre d'individu présentant des lésions d'encéphalites est diminué dans le groupe C4c (1/5) par rapport au groupe M4c (4/5). Ces résultats s'accordent avec le taux de survie observé, plus important

pour le groupe C4c. L'hypothèse d'une compétition intra-hôte à la défaveur de la souche HP est appuyée chez le canard lorsque le ratio HP/FP est de 1:1000.

#### **2.3.4 Excrétion virale**

Le niveau d'excrétion trachéale (quantifié par qPCR sur écouvillon) de la souche mutant faiblement pathogène inoculée à  $7 \log_{10}$  EID<sub>50</sub> est supérieur à  $10^4$  copies/ $\mu$ l dès 1 jpi. Ce niveau chute à partir de 4 jpi et la durée d'excrétion atteint une semaine. Le niveau d'excrétion cloacale augmente jusqu'à 7 jpi puis chute 24h après.

Le niveau total d'excrétion trachéale maximum du groupe C4c est similaire à celui du groupe M4c (proche de  $10^5$  copies/ $\mu$ l). Le groupe M4c atteint ce maximum à 3 jpi, le groupe C4c l'atteint avec un retard de 24h. L'excrétion cloacale est plus importante pour le groupe M4c que pour le groupe C4c. Le niveau d'excrétion de la souche HP seule, quantifié par qPCR à amorce spécifique, suit le même tableau. Le niveau d'excrétion trachéale maximum est équivalent entre les 2 groupes. Ce pic est atteint plus tardivement pour le groupe C4c. L'excrétion cloacale de la souche HP est moins importante pour le groupe co-infecté C4c que pour le groupe mono-infecté M4c (Fig. 11).



**Figure 11.** Excrétion virale des canards après infection. (a) Excrétion trachéale de la souche HP. (b) Excrétion trachéale totale (souche HP et FP confondue). (c) Excrétion cloacale de la souche HP. (d) Excrétion cloacale totale (souche HP et FP confondue).

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène atteint un niveau d'excrétion trachéale et cloacale maximum en 3-4 jours post infection. L'excrétion virale chute vers 7-8j post-infection.

Le niveau d'excrétion trachéale de la souche mutant faiblement pathogène, associé aux résultats histologiques, permet de s'assurer d'une réplication effective de cette souche.

Le niveau d'excrétion de la souche hautement pathogène administrée en co-infection reste significativement inférieur (test de Mann Whitney) à celui de la souche HP administrée en mono-infection sur les 3 premiers jours post-infection. Ces résultats associés à ceux issus de l'analyse histologique (moins de lésions retrouvées sur le groupe C4c que sur le groupe M4c) soutiennent l'hypothèse d'une compétition intra-hôte limitant la multiplication de la souche HP chez le canard lorsque la co-infection présente un ratio HP/FP de 1:1000.

### 2.3.5 Bilan de l'essai

La souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène inoculée à la dose de  $4 \log_{10}$  EID50 provoque chez le canard Pékin de la mortalité (7/8 morts soit un taux de mortalité de 87,5% à 6 jpi). Cette mortalité est précédée majoritairement par des troubles neurologiques, un abattement et une anorexie. A la suite de mort spontanée, l'histologie révèle des lésions microscopiques cérébrales (encéphalite) associées à une charge virale importante mise en évidence par IHC. Des pneumonies interstitielles légères (infiltrations lymphoplasmocytaires alvéolaires et péribronchiques) sont toutefois observées dès les premières 72h en plus des lésions de l'encéphale. Cette souche HP provoque donc des lésions encéphaliques et pulmonaires précoces. Cependant, la cause de la mortalité semble liée majoritairement aux lésions cérébrales avec une charge virale plus importante dans l'encéphale que dans les poumons. L'excrétion virale trachéale et cloacale atteint son maximum à 4 jours post-infection et persiste jusqu'à 8 jpi.

La souche mutant faiblement pathogène provoque elle aussi des lésions pulmonaires. Les niveaux d'excrétion sur écouvillons (trachéaux et cloacaux) permettent de s'assurer de la capacité de réplication de la souche mutant. Une co-infection permettra de révéler les interactions intra-hôte s'il y en a. Le niveau d'excrétion virale reste moins important que pour la souche hautement pathogène et persiste jusqu'à 8 jpi.

Le groupe co-infecté C4c présente un taux de survie significativement plus important que le groupe mono-infecté M4c. De plus, le groupe C4c présente moins d'individu avec des lésions microscopiques au niveau de l'encéphale (1/5 contre 4/5 pour le groupe M4c à 3 jpi). Enfin, le niveau d'excrétion de la souche HP est moins important pour le groupe C4c que pour le groupe M4c sur les 3 premiers jours post-infection. Ces résultats montrent ainsi un effet de compétition chez le canard Pékin entre les deux souches HP et FP lorsque le ratio HP/FP est de 1:1000 avec une atténuation de la pathogénicité propre à la souche HP.

### **3. Matériel et méthodes**

### 3.1 Statut éthique

Cette étude est réalisée en accord avec la réglementation européenne sur le bien-être animal. Le protocole expérimental est approuvé par le Comité d’Ethique en Science et Santé Animale sous le numéro 13205-2018012311319709.

### 3.2 Virus

Ce projet utilise la technique de génétique inverse afin de modifier génétiquement un virus influenza aviaire hautement pathogène H5N8 pour obtenir un virus aviaire faiblement pathogène H5N8. Les deux virus ne différeront que par la séquence codant pour le site de clivage de l’hémagglutinine (Fig.12).

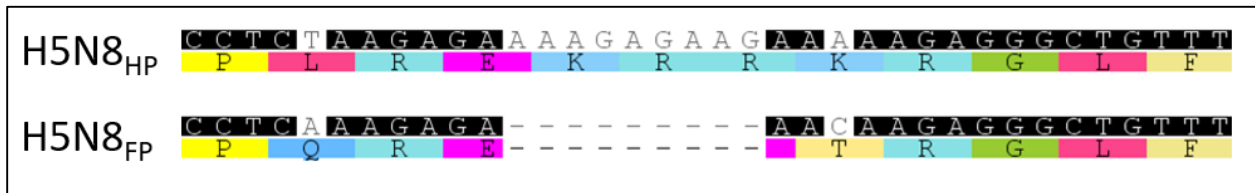


Figure 12. Différences génétiques entre la souche H5N8 HP et la souche H5N8 FP. Une délétion de 9 nucléotides est réalisée au niveau du site de clivage de l’hémagglutinine ainsi que deux substitutions de part et d’autre de la zone de délétion.

Le virus qui a servi de source de matériel génétique est un virus influenza aviaire hautement pathogène H5N8, isolé en France, dans le Tarn le 8 novembre 2016, séquencé par le laboratoire national de référence pour l’influenza aviaire ANSES Ploufragan et dont la séquence a été déposée par l’ANSES Ploufragan sur la banque de donnée GISAID (isolat A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) portant le numéro d’accession GISAID EPI\_ISL\_240012).

Le virus est amplifié sur œuf embryonné de poulet (10 jours d’âge). Le liquide allantoïque est récolté 72h post-inoculation. L’EID50 (50% Egg Infective Dose) par ml est déterminée via la méthode de Reed-Muench. Chaque animal reçoit 100µl de solution infectieuse par voie choanale.



### 3.3 Animaux

Les représentants des galliformes sont des poulets White Leghorn (*Gallus gallus domesticus*). Ces poulets ont pour origine le centre INRAE de Nouzilly. Ils sont reçus à 1 jour d'âge puis sont élevés jusqu'à l'âge de 3 semaines dans une animalerie de niveau 2 (A2). Ils sont ensuite transférés en animalerie de niveau 3 (A3) une semaine avant l'infection pour acclimatation. Les poulets sont infectés à l'âge de 28 jours.

Les représentants des ansériformes sont des canards Pékins (*Anas platyrhynchos domesticus*). Ces canards ont pour origine le couvoir ORVIA de la Seigneutière. De même, ils sont élevés de 1 jour d'âge à 3 semaines, puis transférés en A3 une semaine avant infection.

Chaque groupe infecté est réparti dans un caisson à pression négative. De l'eau et de la nourriture sont fournies à volonté tout le long de l'expérience, soit 14 jours. Passé ce délai, les survivants sont euthanasiés.

### 3.4 Histologie

L'autopsie et le prélèvement des organes (poumons, trachée et encéphale) sont réalisés sur des animaux à 1 ou 3 jours post-infection (2 jpi pour le groupe non infecté). Les organes entiers sont fixés par du formol. Après fixation, chaque organe est recoupé au laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) puis mis en cassette. Cette étape permet de cibler une zone précise de l'organe qui sera observée au microscope optique. Ces cassettes permettent l'inclusion en paraffine de l'organe qui est par la suite découpé au microtome. Les fines lamelles obtenues sont mises sur lame. Une coloration Hémalum-Eosine (HE) est finalement réalisée. La lecture des lames est réalisée aux côtés de Maxence Delverdier, Professeur d'Anatomie-Pathologique à l'ENVT. Chaque lame est annotée selon un glossaire lésionnel prédéfini (Tab.3)(Fig.13).

	Signification	Caractéristiques
<b>ALMID</b>	Absence de lésion microscopique d'intérêt diagnostique	
<b>SE</b>	Encéphalite subaigüe + : légère ++ : modérée +++ : marquée	Manchons périvasculaires lymphohistiocytaires et gliose (prolifération des cellules gliales : oligodendrocytes, astrocytes, microglies).
<b>SIP</b>	Pneumonie interstitielle subaigüe + : légère ++ : modérée +++ : marquée	Infiltration interstitielle lymphoplasmocytaire et macrophagique.
<b>ST</b>	Trachéite subaigüe + : légère ++ : modérée +++ : marquée	Infiltration par des cellules mononuclées de la lamina propria.

Tableau 3. Glossaire lésionnel utilisé pour l'analyse histologique.

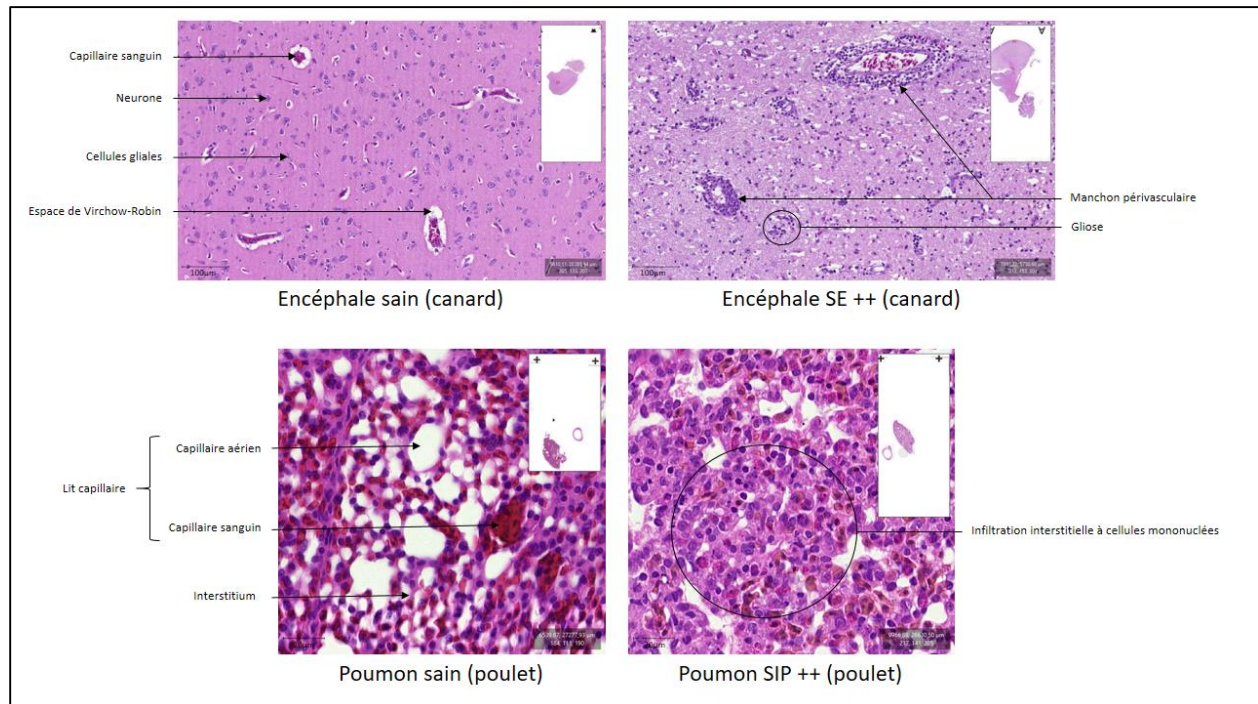
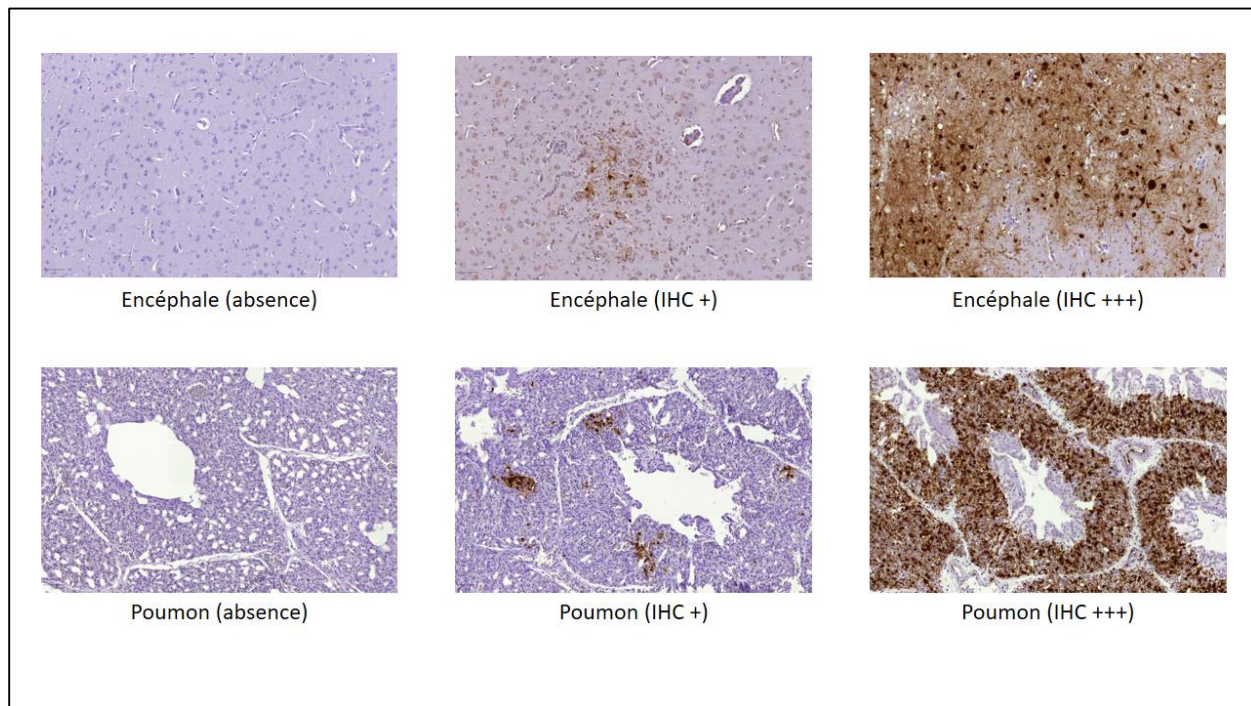


Figure 13. Illustration des lésions observées à l'histologie en coloration Hémalun-Eosine. « SE ++ » : Encéphalite subaigüe modérée, « SIP ++ » : Pneumonie interstitielle subaigüe modérée.

### 3.5 Immunohistochimie

Les techniques d'immunohistochimie sont réalisées par le laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'ENVT selon le protocole décrit en Annexe 3.

Les lames soumises aux techniques d'immunohistochimie sont annotées selon une échelle à 4 niveaux : absence, +, ++ et +++ (Fig.14).



*Figure 14. Illustration de l'échelle d'annotation des lames IHC.*

### 3.6 qPCR

Les techniques qPCR sont réalisées par Thomas Figueroa et Pierre Bessièrè selon les méthodes décrits dans l'article de Figueroa et al. publié dans « Journal of Virology » le 04/04/2020 <sup>xxi</sup>.

## 4. Conclusion/Discussion

**4.1 Infection par une souche IAHP clade 2.3.4.4 de groupe B : pathogénie et origine des différences cliniques entre galliformes et ansériformes.**

Les ansériformes sont généralement considérés comme résistants aux virus influenza car peu de cas de mortalités sont décrits. Cependant, certains virus HP provoquant des signes cliniques (troubles principalement neurologiques) et de la mortalité chez les ansériformes sont apparus. C'est le cas des virus influenza appartenant à la lignée H5 Gs/GD clade 2.3.4.4 de groupe B, responsables de la crise influenza en France en 2016-2017. Plusieurs études ainsi que les observations faites sur le terrain montrent une différence clinique entre galliformes et ansériformes suite à l'infection par un de ces virus. Les galliformes présentent en effet principalement une mortalité aigüe parfois associée à des troubles respiratoires tandis que les ansériformes présentent une mortalité associée à des troubles neurologiques (cf. 1.3.2). Afin de déterminer l'origine de ces différences, des poulets White Leghorn et des canards Pékins sont infectés expérimentalement par la souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) HP de lignée H5 Gs/GD clade 2.3.4.4 de groupe B isolée lors de la crise influenza de 2016-2017 en France.

A dose infectieuse équivalente (4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>), la souche A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) hautement pathogène provoque de la mortalité chez les deux espèces représentantes. Un taux de mortalité de 60% et de 55% sont observés chez le poulet (respectivement essai n°1 et n°2). Ce taux atteint 87,5% chez le canard Pékin. La différence se fait au niveau des signes cliniques précédents la mort de l'animal.

Les poulets présentent des troubles principalement respiratoires avec de la dyspnée et de la tachypnée. A 1 jour post-infection, aucune lésion microscopique sur les poumons ou le cerveau n'est révélée. Il faut attendre 3 jpi pour noter l'apparition de pneumonies interstitielles légères subaiguës avec infiltration lymphoplasmocytaire péribronchique (1 individu sur 5). L'IHC révèle la présence du virus dans les poumons à 1 jpi et dans l'encéphale à 3 jpi. Le virus est donc bien capable de passer en systémique. Cependant, l'analyse des individus représentatifs des mourants ne présente pas de lésions de l'encéphale. L'origine de la mortalité est une pneumonie interstitielle marquée, associée avec une charge virale importante dans les poumons.

A l'inverse, les canards présentent principalement des signes neurologiques (convulsions et torticolis). . A 1 jour post-infection, aucune lésion microscopique sur les poumons ou le cerveau

n'est révélée. Des lésions d'encéphalites légères (manchons périvasculaires et gliose) sont observées 72h post-infection (4 individus sur 5) ainsi que des pneumonies interstitielles légères subaigües (3 individus sur 5). La présence du virus est révélée par IHC dans les poumons et l'encéphale à 3 jpi. Comme chez le poulet, le virus est bien capable de passer en systémique. L'analyse des individus représentatifs des mourants montre uniquement des lésions au niveau de l'encéphale, en lien avec la charge virale importante révélée par IHC. Aucune lésion ni présence du virus dans les poumons n'est détectée à ce stade. Ces observations permettent de mieux comprendre la symptomatologie nerveuse associée aux canards infectés.

La cinétique d'excrétion virale à l'échelle du groupe est cependant semblable entre les deux espèces. Le niveau d'excrétion virale augmente exponentiellement pendant 3 jours, se stabilise puis chute vers 8-9 jours post-infection.

Finalement, cette étude montre que l'infection des galliformes et des ansériformes par une même souche H5N8 HP clade 2.3.4.4 de groupe B provoque des effets distincts et cela même dans des conditions où la souche virale, l'âge des animaux et l'environnement sont identiques. Au moment de la mort des poulets par détresse respiratoire, il est observé une forte charge virale dans les poumons, moins dans l'encéphale. C'est l'inverse au moment de la mort des canards, qui parallèlement présentent des signes neurologiques. Il peut être pertinent ici de s'intéresser au moment de la mort de l'animal. En effet, la mortalité chez les poulets apparaît dès 2-3 jours post-infection. La mortalité chez les canards n'apparaît qu'à partir de 4-5 jours post-infection. Les galliformes seraient-ils moins apte à contrôler le virus au niveau pulmonaire que les ansériformes ? Si c'est le cas, ces poulets n'auraient finalement pas le temps de déclencher les signes neurologiques. En appui de cette hypothèse, on retrouve le cas du poulet présentant des signes neurologiques mort à 9 jpi lors de l'essai n°1. Pour des raisons inconnues, ce poulet aurait résisté plus longtemps que les autres et a donc finalement déclenché des signes neurologiques. Ce cas n'est pas isolé et certains cas similaires ont été rapportés sur le terrain lors de la crise sanitaire de 2016-2017<sup>xxii</sup>. Quels pourrait-être les mécanismes immunitaires à l'origine de ces

différences ? Des travaux similaires à ceux réalisés par Cornelissen et al. sont nécessaires pour répondre à ces questions.

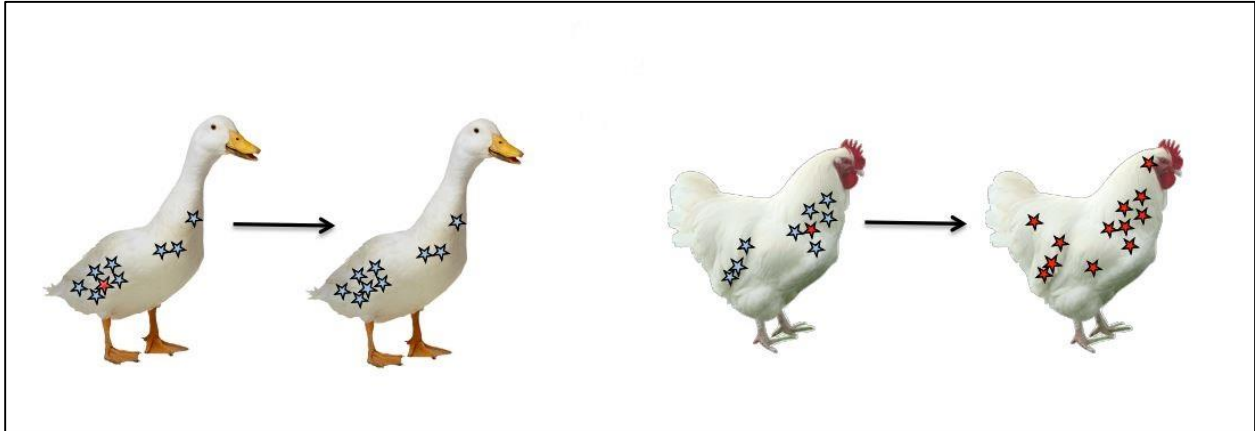
#### **4.2 Interaction intra-hôte entre les souches FP et HP apparentées : un effet de compétition chez les ansériformes, de synergie chez les galliformes ?**

Plusieurs co-infections sont réalisées chez le poulet avec un virus H5N8 IAHP et un virus H5N8 IAFP apparenté. Le virus IAHP utilisé correspond au virus sauvage H5N8 clade 2.3.4.4 de groupe B cité précédemment. Le virus IAFP utilisé est un mutant obtenu en laboratoire à partir du virus IAHP, par génétique inverse. Cette technique permet de se rapprocher au mieux du parent de la souche HP et de mimer une situation d'émergence. Plusieurs ratio dose HP/dose FP sont testés, 1:100, 1:1000 et 1:10000. La comparaison de ces groupes aux groupes mono-infectés HP ne permet pas d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Cependant, il se dégage une tendance à la synergie entre les souches FP et HP lorsque celles-ci infectent simultanément l'hôte. En effet, l'essai n°2 décrit un taux de survie moins important lorsque les animaux sont soumis à une co-infection (ratio HP/FP de 1 :1000 et 1 :10000) par rapport à une mono-infection HP.

Les résultats de l'essai sur canards Pékins montrent au contraire un effet de compétition (ratio HP/FP de 1:1000) statistiquement significatif. En effet, le taux de survie est nettement amélioré lors de co-infection (12,5% lors de mono-infection contre 62,5% lors de co-infection). Les résultats des analyses histologiques suggèrent la même conclusion avec, à 3 jours post-infection, 4/5 canards présentant des lésions d'encéphalite lors de mono-infection contre 1/5 lors de co-infection. Enfin, le niveau d'excrétion virale trachéale à l'échelle du groupe est diminué pour le groupe co-infecté.

Finalement, cette étude tend à montrer l'importance du rôle que peut jouer l'hôte dans l'émergence d'une souche HP. Les résultats suggèrent que le VIAHP a un avantage sélectif plus important chez le poulet que chez le canard et soutiennent l'hypothèse selon laquelle

l'émergence de souche HP serait plus facilitée chez les galliformes que chez les ansériformes (Fig.15).



**Figure 15.** Rôle de l'hôte dans l'émergence de souche HP. Deux types d'interaction entre les souches apparentées sont décrits lors de cette étude. La possible synergie observée chez les galliformes permettrait une émergence de souche HP facilitée chez cet ordre, tandis qu'une compétition chez les ansériformes serait un obstacle à l'émergence. Source : R. Volmer, ppt « Avian influenza virus evolution and pathogenesis »

### 4.3 Limites et nouvelles problématiques

Les résultats obtenus ici diffèrent de ceux obtenus par *Graaf et al.* En effet, l'équipe allemande tend à montrer un effet de compétition chez le poulet. Or, il ne s'agit pas des mêmes souches (H7N7 contre H5N8 ici). De plus, un essai sur des ansériformes n'a pas été réalisé avec la souche H7N7. Il pourrait y avoir un effet de compétition plus important chez le canard que chez le poulet. L'attribution d'un effet de synergie ou de compétition à un ordre en particulier lors de co-infection nécessite donc des études répétées, sur galliformes et ansériformes, avec différentes souches virales, pour apporter une puissance statistique.

Les résultats des essais de co-infection tendent à montrer que l'interaction entre la souche FP et HP diffèrent selon l'hôte. Quels sont les mécanismes biologiques permettant d'expliquer un effet de synergie ou de compétition chez un individu lors de co-infection ? Comme décrit précédemment, la réponse immunitaire semble jouer un rôle important. Qu'en est-il des mécanismes d'exclusion de superinfection ? Il s'agit ici d'un phénomène dans lequel une

infection virale préexistante empêche une infection secondaire avec le même virus ou un virus étroitement apparenté.<sup>xxiii</sup> Est-il possible que ce mécanisme entre en jeu lors de co-infection entre deux souches IAFP et IAHP apparentées ?

Quoi qu'il en soit, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle que peut jouer l'hôte dans l'émergence de souches H5 HP. Ce sujet présente encore beaucoup d'inconnues qu'il est nécessaire de rechercher. En effet, les informations sur ce sujet ont des conséquences directes sur le terrain. L'Etat lance chaque année une campagne de dépistage influenza sur les élevages de galliformes et ansériformes domestiques. La détection de souches H5 FP et HP dans ce cadre sont soumis à déclaration obligatoire à l'OIE, ce qui peut avoir de lourdes conséquences sur les échanges internationaux. S'il est possible de démontrer que les souches H5 FP présentes chez les ansériformes domestiques ont une probabilité réduite de conduire à l'émergence d'une souche HP, peut-être sera-t-il possible de limiter ces déclarations. Il faut toutefois garder à l'esprit que l'intérêt porté à une souche H5 FP n'est pas uniquement lié à sa capacité de muter vers une souche HP chez l'espèce hôte. Premièrement, les élevages de canards et de poulets sont parfois très proches géographiquement. Un virus H5 FP détecté sur des canards peut se transmettre aux poulets de l'élevage voisin, et muter vers une souche HP chez ces derniers. De plus, un VIAFP reste un virus influenza qui à la suite de différents mécanismes d'évolutions peut être dangereux pour l'Homme. C'est le cas du virus influenza A H7N9 en Chine. Des cas sporadiques de contamination de l'oiseau vers l'Homme sont en effet déclarés en 2013. L'infection de l'Homme par ce virus peut provoquer de la mortalité. Des études ont montré que certains patients étaient contaminés par un H7N9 FP et d'autres par un HP (par séquençage du site de clivage de l'hémagglutinine)<sup>xxiv</sup>. La pathogénicité décrite chez une espèce peut donc être différente chez une autre. Cependant, le niveau d'excrétion d'un hôte infecté par un VIAFP est moins important que celui infecté par un VIAHP, le risque de transmission à l'Homme pourrait donc être réduit lorsqu'il s'agit d'un VIAFP. L'ensemble de ces éléments (liste non exhaustive) est aujourd'hui pris en compte lors des discussions autour de la législation des déclarations liées à la détection de VIAFP H5 ou H7.



## Annexe 1

Histologie	Cerveau	Poumons	Trachée
<b>NI</b>			
129	ALMID	ALMID	ALMID
139	ALMID	ALMID	ALMID
155	ALMID	ALMID	ALMID
816	ALMID	ALMID	ALMID
819	ALMID	ALMID	ALMID
<b>FP6-J1</b>			
153	ALMID	ALMID	ALMID
174	ALMID	ALMID	ALMID
182	ALMID	ALMID	ALMID
186	ALMID	<b>HL</b>	<b>HL</b>
712	ALMID	ALMID	ALMID
<b>FP6-J3</b>			
148	ALMID	ALMID	ALMID
176	ALMID	ALMID	ALMID
183	ALMID	ALMID	ALMID
198	ALMID	<b>HL</b>	ALMID
199	ALMID	ALMID	ALMID
<b>M4-J1</b>			
119	ALMID	ALMID	ALMID
134	ALMID	ALMID	ALMID
161	ALMID	ALMID	ALMID
175	ALMID	ALMID	ALMID
823	ALMID	ALMID	ALMID
<b>M4-J3</b>			
136	ALMID	ALMID	ALMID
162	ALMID	ALMID	ALMID
169	ALMID	<b>SIP +</b>	ALMID
803	ALMID	ALMID	ALMID
814	ALMID	ALMID	ALMID
<b>C4-J1</b>			
103	ALMID	ALMID	ALMID
166	ALMID	ALMID	ALMID
185	ALMID	<b>HL</b>	ALMID
806	ALMID	ALMID	ALMID
810	ALMID	ALMID	ALMID
<b>C4-J3</b>			
132	ALMID	<b>HL</b>	ALMID
154	ALMID	ALMID	ALMID
189	ALMID	<b>SIP +</b>	ALMID
190	ALMID	<b>SIP +</b>	ALMID
817	ALMID	ALMID	ALMID
<b>Autres</b>			
127 M4 J5	ALMID	<b>SIP +++</b>	ALMID
101 C4 J5	ALMID	<b>SIP++</b>	ALMID

IHC	Cerveau	Poumons	Trachée
<b>NI</b>			
129			
139			
155			
816			
819			
<b>FP6-J1</b>			
153			
174			
182			
186			
712			
<b>FP6-J3</b>			
148			
176			
183			
198			
199			
<b>M4-J1</b>			
119			
134			
161		+	
175			
823			
<b>M4-J3</b>			
136	+		
162			
169			
803			
814			
<b>C4-J1</b>			
103			
166			
185			
806			
810			
<b>C4-J3</b>			
132		+	
154		+	
189	++	++	
190			
817			
<b>Autres</b>			
127 HP4 J4	++	+++	
101 HP3 FP7 J4	++	+++	

**Annexe 1.** Histologie et immunohistochimie réalisées sur poulets, essai n°1. Partie histologie : ALMID = Absence de Lésions Microscopiques d'Intérêt Diagnostic, HL = Hyperplasie Lymphoïde, SIP = Pneumonie Interstitielle Subaigüe (+ = légère, ++ = modérée, +++ = marquée). Partie IHC : Uniquement les lames représentées en jaune sont analysées. Le système d'annotation suit une échelle subjective à 4 niveaux (absence, +, ++ et +++).

## Annexe 2

Histologie	Cerveau	Poumons	Trachée
<b>NI</b>			
18	ALMID	ALMID	ALMID
55	ALMID	ALMID	ALMID
62	ALMID	ALMID	ALMID
79	ALMID	ALMID	ALMID
81	ALMID	ALMID	ALMID
93	ALMID	ALMID	ALMID
<b>FP7-J1</b>			
6	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
16	ALMID	ALMID	ALMID
23	ALMID	ALMID	ALMID
59	ALMID	<b>SIP+</b>	<b>ST+</b>
63	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
<b>FP7-J3</b>			
2	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
64	ALMID	ALMID	ALMID
82	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
95	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
99	ALMID	<b>Abscès</b>	ALMID
<b>M4c-J1</b>			
8	ALMID	ALMID	ALMID
24	ALMID	ALMID	ALMID
67	ALMID	ALMID	ALMID
17	ALMID	ALMID	ALMID
94	ALMID	ALMID	ALMID
<b>M4c-J3</b>			
10	<b>SE+</b>	ALMID	ALMID
66	<b>SE+</b>	<b>SIP+</b>	ALMID
78	ALMID	ALMID	ALMID
89	<b>SE+</b>	<b>SIP+</b>	ALMID
98	<b>SE+</b>	<b>SIP+</b>	ALMID
<b>C4c-J1</b>			
9	ALMID	ALMID	ALMID
22	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
72	ALMID	ALMID	<b>ST+</b>
83	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
87	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
<b>C4c-J3</b>			
1	ALMID	ALMID	ALMID
13	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
19	<b>SE+</b>	ALMID	ALMID
57	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
96	ALMID	<b>SIP+</b>	ALMID
<b>Autres</b>			
75 HP4-J5	<b>SE++</b>	ALMID	ALMID
65 HP4			
FP7 J7	<b>SE++</b>	ALMID	ALMID

IHC	Cerveau	Poumons	Trachée
<b>NI</b>			
18			
55			
62			
79			
81			
93			
<b>FP7-J1</b>			
6			
16			
23			
59			
63			
<b>FP7-J3</b>			
2			
64			
82			
95			
99			
<b>M4c-J1</b>			
8			
24		+	
67		+	
17		+	
94			
<b>M4c-J3</b>			
10	+	+	
66			
78		+	
89	+	+	
98			
<b>C4c-J1</b>			
9		+	
22			
72			
83		+	
87			
<b>C4c-J3</b>			
1		+	
13		+	
19	+	+	
57			
96			
<b>Autres</b>			
75 HP4-J5	+++		
65 HP4			
FP7 J7			

**Annexe 2.** Histologie et immunohistochimie réalisées sur canards. Partie histologie : ALMID = Absence de Lésions Microscopiques d'Intérêt Diagnostique, SE = Encéphalite Subaigüe (+ = légère, ++ = modérée, +++ = marquée), SIP = Pneumonie Interstitielle Subaigüe (+ = légère, ++ = modérée, +++ = marquée). Partie IHC : Uniquement les lames représentées en jaune sont analysées. Le système d'annotation suit une échelle subjective à 4 niveaux (absence, +, ++ et +++).

### Annexe 3

#### Protocole IHC anti-influenza

1. Déparaffinage / réhydratation :

- 3x5 min toluène
- 2x5 min acétone
- 1x5 min eau courante

2. Démasquage :

- 10 min pronase 37 °c (0.05 % dans PBS 1X) - réf pronase : 10165921001 ROCHE

DIAGNOSTICS

- rinçage eau courante
- wash buffer – réf ZUC020-2500 ZYTOMED

3. réaction IHC :

- 5 min réactif blocage peroxydase endogène - réf S2023 AGILENT
- rinçage eau courante
- wash buffer
- 20 min sérum normal de chèvre (1/10 dans diluant anticorps) – réf sérum X0907

AGILENT

- éliminer excès sérum sans rincer
- anticorps I overnight à 4 °c (1/50 dans diluant anticorps) – réf anticorps I 11-030

ARGENE

- 3X5 min wash buffer
- 30 min envision peroxidase dual link – réf K4061 AGILENT
- 3X5min wash buffer
- 10 min DAB – réf DAB530 ZYTOMED
- rinçage eau courante
- contre coloration hématoxyline
- déshydratation (passage dans éthanol 95° puis 100°)
- toluène
- montage (collage lamelles)

**Annexe 3.** Protocole IHC réalisé au laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'ENVT. *Source : Céline Bleuart, Technicienne laboratoire histopathologie.*

- 
- <sup>i</sup> Brugère-Picoux, Vaillancourt, et Suarez, « Avian influenza virus »; Kuchipudi et Nissly, « Novel Flu Viruses in Bats and Cattle ».
- <sup>ii</sup> Brugère-Picoux, Vaillancourt, et Suarez, « Avian influenza virus ».
- <sup>iii</sup> Steinhauer, « Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus »; Matrosovich et al., « Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium ».
- <sup>iv</sup> Grund et al., « A Novel European H5N8 Influenza A Virus Has Increased Virulence in Ducks but Low Zoonotic Potential », 8; Brugère-Picoux, Vaillancourt, et Suarez, « Avian influenza virus ».
- <sup>v</sup> Brugère-Picoux, Vaillancourt, et Suarez, « Avian influenza virus »; « A Revision of the System of Nomenclature for Influenza Viruses ».
- <sup>vi</sup> Yoon, Webby, et Webster, « Evolution and Ecology of Influenza A Viruses ».
- <sup>vii</sup> Ganière, « Maladies réputées contagieuses ou à déclaration obligatoire INFLUENZA AVIAIRE »; Brugère-Picoux, Vaillancourt, et Suarez, « Avian influenza virus ».
- <sup>viii</sup> Yoon, Webby, et Webster, « Evolution and Ecology of Influenza A Viruses ».
- <sup>ix</sup> Cornelissen et al., « Differential Innate Responses of Chickens and Ducks to Low-Pathogenic Avian Influenza ».
- <sup>x</sup> Yoon, Webby, et Webster, « Evolution and Ecology of Influenza A Viruses ».
- <sup>xi</sup> Cornelissen et al., « Differences in Highly Pathogenic Avian Influenza Viral Pathogenesis and Associated Early Inflammatory Response in Chickens and Ducks ».
- <sup>xii</sup> Antigua et al., « The Emergence and Decennary Distribution of Clade 2.3.4.4 HPAI H5Nx »; Lee et al., « Evolution, Global Spread, and Pathogenicity of Highly Pathogenic Avian Influenza H5Nx Clade 2.3.4.4 ».
- <sup>xiii</sup> Lee et al., « Evolution, Global Spread, and Pathogenicity of Highly Pathogenic Avian Influenza H5Nx Clade 2.3.4.4 ».
- <sup>xiv</sup> Grund et al., « A Novel European H5N8 Influenza A Virus Has Increased Virulence in Ducks but Low Zoonotic Potential ».
- <sup>xv</sup> van den Brand et al., « Wild Ducks Excrete Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N8 (2014-2015) without Clinical or Pathological Evidence of Disease ».
- <sup>xvi</sup> Leyson et al., « Pathogenicity and Genomic Changes of a 2016 European H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (Clade 2.3.4.4) in Experimentally Infected Mallards and Chickens ».
- <sup>xvii</sup> Prokopyeva et al., « Pathology of A(H5N8) (Clade 2.3.4.4) Virus in Experimentally Infected Chickens and Mice ».
- <sup>xviii</sup> Guinat et al., « Spatio-Temporal Patterns of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N8 Spread, France, 2016 to 2017 »; « Grippe aviaire : Fin des indemnisations pour l'épizootie H5N8 »; Bronner et al., « Description de l'épisode d'influenza aviaire hautement pathogène en France en 2016-2017 ».
- <sup>xix</sup> Erasmus Medical Centre (NL) et al., « Mechanisms and Risk Factors for Mutation from Low to Highly Pathogenic Avian Influenza Virus ».
- <sup>xx</sup> Graaf et al., « A Viral Race for Primacy ».
- <sup>xxi</sup> Figueroa et al., « The Microbiota Contributes to the Control of Highly Pathogenic H5N9 Influenza Virus Replication in Ducks ».
- <sup>xxii</sup> Brown et al., « Avian Influenza Overview October 2016–August 2017 ».
- <sup>xxiii</sup> Folimonova, « Superinfection Exclusion Is an Active Virus-Controlled Function That Requires a Specific Viral Protein ».
- <sup>xxiv</sup> Ke et al., « Human Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, China ».

---

## BIBLIOGRAPHIE

- « A Revision of the System of Nomenclature for Influenza Viruses: A WHO Memorandum ». *Bulletin of the World Health Organization* 58, n° 4 (1980): 585-91.
- Antigua, Kristine Joy C., Won-Suk Choi, Yun Hee Baek, et Min-Suk Song. « The Emergence and Decennary Distribution of Clade 2.3.4.4 HPAI H5Nx ». *Microorganisms* 7, n° 6 (29 mai 2019). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060156>.
- Brand, Judith M. A. van den, Josanne H. Verhagen, Edwin J. B. Veldhuis Kroeze, Marco W. G. van de Bildt, Rogier Bodewes, Sander Herfst, Mathilde Richard, et al. « Wild Ducks Excrete Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N8 (2014-2015) without Clinical or Pathological Evidence of Disease ». *Emerging Microbes & Infections* 7, n° 1 (18 avril 2018): 67. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0070-9>.
- Bronner, Anne, Eric Niqueux, Audrey Schmitz, Sophie Le Bouquin, Adeline Huneau-Salaün, Claire Guinat, Mathilde Paul, Aurélie Courcoul, et Benoît Durand. « Description de l'épisode d'influenza aviaire hautement pathogène en France en 2016-2017 », s. d., 5.
- Brown, Ian, Paolo Mulatti, Krzysztof Smietanka, Christoph Staubach, Preben Willeberg, Cornelia Adlhoch, Denise Candiani, et al. « Avian Influenza Overview October 2016–August 2017 ». *EFSA Journal* 15, n° 10 (2017): e05018. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5018>.
- Brugère-Picoux, Jeanne, Jean-Pierre Vaillancourt, et D Suarez. « Avian influenza virus ». In *Manual of Poultry Diseases*, s. d.
- Cornelissen, J. B. W. J., J. Post, B. Peeters, L. Vervelde, et J. M. J. Rebel. « Differential Innate Responses of Chickens and Ducks to Low-Pathogenic Avian Influenza ». *Avian Pathology* 41, n° 6 (décembre 2012): 519-29. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.732691>.
- Cornelissen, J. B. W. J., L. Vervelde, J. Post, et J. M. J. Rebel. « Differences in Highly Pathogenic Avian Influenza Viral Pathogenesis and Associated Early Inflammatory Response in Chickens and Ducks ». *Avian Pathology* 42, n° 4 (août 2013): 347-64. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.807325>.
- Erasmus Medical Centre (NL), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IT), Mathilde Richard, Ron Fouchier, Isabella Monne, et Thijs Kuiken. « Mechanisms and Risk Factors for Mutation from Low to Highly Pathogenic Avian Influenza Virus ». *EFSA Supporting Publications* 14, n° 10 (octobre 2017). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1287>.
- Figueroa, Thomas, Pierre Bessière, Amelia Coggon, Kim M. Bouwman, Roosmarijn van der Woude, Maxence Delverdier, Monique H. Verheije, Robert P. de Vries, et Romain Volmer. « The Microbiota Contributes to the Control of Highly Pathogenic H5N9 Influenza Virus Replication in Ducks ». Édité par Stacey Schultz-Cherry. *Journal of Virology* 94, n° 10 (26 février 2020): e00289-20, /jvi/94/10/JVI.00289-20.atom. <https://doi.org/10.1128/JVI.00289-20>.
- Folimonova, Svetlana Y. « Superinfection Exclusion Is an Active Virus-Controlled Function That Requires a Specific Viral Protein ». *Journal of Virology* 86, n° 10 (15 mai 2012): 5554-61. <https://doi.org/10.1128/JVI.00310-12>.
- Ganière, J.P. « Maladies réputées contagieuses ou à déclaration obligatoire INFLUENZA AVIAIRE », s. d. <http://www.avicampus.fr/PDF/PDFmrc/ENVInfluenza.pdf>.

- 
- Graaf, Annika, Reiner Ulrich, Pavlo Maksimov, David Scheibner, Susanne Koethe, Elsayed M. Abdelwhab, Thomas C. Mettenleiter, Martin Beer, et Timm Harder. « A Viral Race for Primacy: Co-Infection of a Natural Pair of Low and Highly Pathogenic H7N7 Avian Influenza Viruses in Chickens and Embryonated Chicken Eggs ». *Emerging Microbes & Infections* 7, n° 1 (5 décembre 2018): 204. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0204-0>.
- « Grippe aviaire : Fin des indemnisations pour l'épizootie H5N8 ». Consulté le 19 avril 2020. <http://www.lafranceagricole.fr/actualites/elevage/grippe-aviaire-fin-des-indemnisations-pour-lepizootie-h5n8-1,5,2910336709.html>.
- Grund, Christian, Donata Hoffmann, Reiner Ulrich, Mahmoud Naguib, Jan Schinköthe, Bernd Hoffmann, Timm Harder, et al. « A Novel European H5N8 Influenza A Virus Has Increased Virulence in Ducks but Low Zoonotic Potential ». *Emerging Microbes & Infections* 7, n° 1 (19 juillet 2018): 132. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0130-1>.
- Guinat, Claire, Gaëlle Nicolas, Timothée Vergne, Anne Bronner, Benoit Durand, Aurélie Courcoul, Marius Gilbert, Jean-Luc Guérin, et Mathilde C. Paul. « Spatio-Temporal Patterns of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N8 Spread, France, 2016 to 2017 ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 23, n° 26 (2018). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.26.1700791>.
- Ke, Changwen, Chris Ka Pun Mok, Wenfei Zhu, Haibo Zhou, Jianfeng He, Wenda Guan, Jie Wu, et al. « Human Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, China ». *Emerging Infectious Diseases* 23, n° 8 (août 2017): 1332-40. <https://doi.org/10.3201/eid2308.170600>.
- Kuchipudi, Suresh V., et Ruth H. Nissly. « Novel Flu Viruses in Bats and Cattle: “Pushing the Envelope” of Influenza Infection ». *Veterinary Sciences* 5, n° 3 (6 août 2018). <https://doi.org/10.3390/vetsci5030071>.
- Lee, Dong-Hun, Kateri Bertran, Jung-Hoon Kwon, et David E. Swayne. « Evolution, Global Spread, and Pathogenicity of Highly Pathogenic Avian Influenza H5Nx Clade 2.3.4.4 ». *Journal of Veterinary Science* 18, n° S1 (31 août 2017): 269-80. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.S1.269>.
- Leyson, Christina, Sung-Su Youk, Diane Smith, Kiril Dimitrov, Dong-Hun Lee, Lars Erik Larsen, David E. Swayne, et Mary J. Pantin-Jackwood. « Pathogenicity and Genomic Changes of a 2016 European H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (Clade 2.3.4.4) in Experimentally Infected Mallards and Chickens ». *Virology* 537 (novembre 2019): 172-85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.020>.
- Matrosovich, Mikhail N., Tatyana Y. Matrosovich, Thomas Gray, Noel A. Roberts, et Hans-Dieter Klenk. « Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium ». *Journal of Virology* 78, n° 22 (novembre 2004): 12665-67. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004>.
- Prokopyeva, Elena A., Vsevolod A. Zinserling, You-Chan Bae, Yongkuk Kwon, Olga G. Kurskaya, Ivan A. Sobolev, Peter M. Kozhin, et al. « Pathology of A(H5N8) (Clade 2.3.4.4) Virus in Experimentally Infected Chickens and Mice ». *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2019 (2019): 4124865. <https://doi.org/10.1155/2019/4124865>.
- Steinhauer, D. A. « Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus ». *Virology* 258, n° 1 (25 mai 1999): 1-20. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9716>.

---

Yoon, Sun-Woo, Richard J. Webby, et Robert G. Webster. « Evolution and Ecology of Influenza A Viruses ». In *Influenza Pathogenesis and Control - Volume I*, édité par Richard W. Compans et Michael B. A. Oldstone, 359-75. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, 2014.  
[https://doi.org/10.1007/82\\_2014\\_396](https://doi.org/10.1007/82_2014_396).

**Auteur : HOUFFSCHMITT Alexandre**

**Résumé :**

Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP) sont responsables d'une mortalité importante et de lourdes pertes économiques au sein de la filière volaille. Lors de la crise sanitaire de 2016-2017 en France (H5N8 HP), une mortalité aiguë associée ou non à des troubles respiratoires chez les galliformes et des troubles neurologiques chez les ansériformes sont observés. Des poulets et canards sont infectés expérimentalement par une souche virale isolée lors de cette crise afin d'explorer la pathogénie de ces virus et de déterminer l'origine de ces différences cliniques. Les résultats montrent chez les galliformes mourants une charge virale importante dans les poumons, associée à des pneumonies interstitielles marquées, sans lésion encéphalique. Les ansériformes mourants présentent quant à eux une charge virale importante dans l'encéphale, associée à des encéphalites, sans lésion pulmonaire. Les observations effectuées sur le terrain ont donc été reproduites expérimentalement dans des conditions où la souche virale, l'âge des animaux et l'environnement sont identiques entre galliformes et ansériformes.

Un VIAHP est issu de mutations génétiques d'une souche faiblement pathogène (FP). Par la suite, il peut y avoir ou non émergence de la souche HP. Des co-infections VIAHP et VIAFP apparentés sont réalisées sur les deux espèces afin de mimer une situation d'émergence et d'étudier l'interaction entre ces deux souches au sein de l'hôte. Une nette compétition entre les deux souches est observée chez les ansériformes tandis qu'une tendance à la synergie se dégage chez les galliformes. Ces résultats suggèrent que le VIAHP a un avantage sélectif plus important chez le poulet que chez le canard et soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'émergence de souche HP serait plus facilitée chez les galliformes que chez les ansériformes.

INFLUENZA – AVIAIRE – H5N8 – POULET – CANARD – PATHOGENIE – EMERGENCE

**Resume :**

Highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infections in poultry cause mortality and major economic losses. During the 2016-2017 outbreak in France (H5N8 HP), high mortality was observed with or without respiratory disorders in galliform birds and neurological disorders in anseriform birds. Chickens and ducks are experimentally infected with a viral strain isolated during this outbreak in order to explore the pathogenesis of these viruses and determine the origin of these inter-species differences. Results show in dying chickens a important viral load in the lungs, associated with marked interstitial pneumonias, without brain damage. Dying ducks have a high viral load in the brain, associated with encephalitis, without lung damage. Observations made in the field have therefore been reproduced experimentally under conditions where the virus strain, the age of the animals and the environment are identical between galliforms and anseriforms.

HPAIV strain arises from genetic mutations of low pathogenic (LP) strain. Subsequently, there may or may not be emergence of the HP strain. Related HPAIV and LPAIV co-infections are performed on chickens and ducks in order to mimic an emergence situation and to study interactions between these two strains within the host. A clear competition between the two strains is observed in anseriforms while a tendency for synergy appears in galliform birds. These results suggest that HPAIV has a greater selective advantage in chickens than in ducks and supports the hypothesis that emergence of the HP strain is more likely in galliforms than in anseriforms.

INFLUENZA – AVIAN – H5N8 – CHICKEN – DUCK – PATHOGENESIS - EMERGENCE