



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4658](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4658)

**To cite this version :**

BERNARD, Marina. *Analyse de la réponse sérologique de canards (Anas platyrhynchos) infectés expérimentalement par des virus influenza H7N1 faiblement pathogènes : comparaison de trois méthodes d'analyses sérologiques* . Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2011, 132 p.

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

---

# Analyse de la réponse sérologique de canards (*Anas platyrhynchos*) infectés expérimentalement par des virus influenza H7N1 faiblement pathogènes : *Comparaison de trois méthodes d'analyses sérologiques*

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2011  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Marina BERNARD**  
Née, le 20 Mai 1985 à THIONVILLE (Moselle)

---

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

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jacques IZOPET**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Jean-Luc GUERIN**  
**M. Stéphane BERTAGNOLI**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

**Directeur** : M. A. MILON

**Directeurs honoraires** : M. G. VAN HAVERBEKE.  
M. P. DESNOYERS

**Professeurs honoraires** :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*  
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*  
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*  
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*  
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*  
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*  
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

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

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

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

- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*  
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

**A NOTRE PRESIDENT DE THESE,**

**Monsieur le Professeur Jacques IZOPET**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Virologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre thèse.  
Remerciements et hommages respectueux.

**A NOTRE JURY DE THESE,**

**Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN**

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Elevage et Santé avicoles et cunicoles*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse.  
Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mes remerciements  
Et de mon respect le plus sincère.

**Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI**

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie infectieuse*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer au jury de cette thèse.  
Sincères remerciements.



## REMERCIEMENTS

### **A mes parents,**

Pour leur soutien sans faille et leur présence dans les moments difficiles. Vous avez fait de votre mieux pour m'aider à réaliser ce rêve. Ma réussite est aussi la vôtre et je vous en serai toujours reconnaissante.

### **A Babka et Dziadek,** mes grands-parents adorés

Pour tout l'amour que vous m'avez donné, votre immense gentillesse et votre simplicité. Pour votre optimisme à toute épreuve et votre courage. Merci pour tous ces souvenirs. Vous êtes admirables !

### **A ma famille,**

Pour tous ces moments de convivialité, de complicité et de fêtes.

### **A Manu,**

Comment résumer en deux lignes ces 5 années de complicité et de tendresse ? Les moments passés avec toi font partie des plus beaux de ma vie. Merci pour tout le bonheur et l'amour que tu me donnes.

### **A Alexis et Johann,** mes amis les plus fidèles

A tous ces moments passés ensemble, à nos fous rires, à nos erreurs...Merci de m'être resté fidèles malgré la distance. Surtout ne changez pas !

### **A Kevin,**

Pour notre duo de choc pour le meilleur et le pire de ces années toulousaines ! A tous ces tt et ppt ridicules, à ton sens unique de l'autodérision. Tu fais partie de mes meilleurs souvenirs de l'ENVT !

### **A Elodie K.,**

Pour nos aventures québécoises et new-yorkaises ! Et pour tous nos souvenirs d'équine.

### **A Elodie P.,**

Pour l'univers passionnant que tu m'as fait découvrir. Merci à toi et à toute ta famille pour votre accueil chaleureux et votre générosité.

### **A Vincent, Mathilde et Marjorie,**

Et à tous ceux qui ont marqué mes années toulousaines.

**Au Docteur Romain Volmer,**

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et m'avoir encadrée au cours de sa réalisation.

**A Jacqueline Gelfi,**

Pour son aide précieuse et sa contribution à la réalisation de ce travail expérimental. Merci pour votre disponibilité.

**A Brigitte et Josianne,**

Pour leur bonne humeur, leur sympathie et l'aide qu'elles ont pu m'apporter au cours de mes travaux au laboratoire de l'ENVT.

**A toute l'équipe de la clinique vétérinaire des Açores,**

Pour m'avoir accordé votre confiance et m'avoir permis de réaliser ma première expérience professionnelle. Merci à tous pour votre bonne humeur et votre grande sympathie ! Merci à Véronique et Christian pour leur patience et leur pédagogie.

**A Smoothie,** petite boule de poils survoltée qui partage mon quotidien

Et à tous les autres compagnons à quatre pattes, à plumes ou à écailles qui m'ont donné envie de faire ce métier.

# SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES .....	15
LISTE DES TABLEAUX .....	16
LISTE DES GRAPHIQUES .....	17
LISTE DES ANNEXES .....	18
LISTE DES ABREVIATIONS .....	19

INTRODUCTION .....	21
--------------------	----

## **PARTIE I : Synthèse sur les virus influenza et leurs interactions avec le canard .....**

23

### **I. Brève présentation des virus influenza .....**

25

<b>A. <u>Classification et nomenclature</u> .....</b>	25
<b>1. Classification des virus influenza .....</b>	25
<b>2. Nomenclature des virus influenza .....</b>	25
a. Nomenclature générale .....	25
b. Cas particulier du virus A H5N1 HP .....	26
<b>B. <u>Structure virale et implication dans la réponse immunitaire à médiation humorale</u> .....</b>	26
<b>1. Structure générale des virus influenza A .....</b>	26
<b>2. Les protéines de surface .....</b>	27
a. L'hémagglutinine .....	27
b. La neuraminidase .....	28
c. La protéine de matrice M2 .....	29
<b>3. Les protéines internes .....</b>	29
<b>4. La protéine non structurale NS1 .....</b>	30
<b>C. <u>Déroulement de l'infection virale</u> .....</b>	30
<b>D. <u>Variations génétiques des virus influenza A</u> .....</b>	31
<b>1. La dérive génétique .....</b>	31
<b>2. La cassure antigénique .....</b>	32

### **II. Les interactions entre le virus influenza aviaire et le canard .....**

34

<b>A. <u>Une relation hôte/parasite en évolution</u> .....</b>	34
<b>1. La théorie du réservoir .....</b>	34
a. Découverte des premiers indices .....	34
b. Le canard : principal réservoir des sous-types viraux .....	34
c. Preuves de l'adaptation du virus à son hôte .....	35
<b>2. Evolution du pouvoir pathogène pour le canard .....</b>	35
<b>B. <u>Déroulement de l'infection chez le canard</u> .....</b>	36
<b>1. Cas des virus influenza A isolés avant fin 2002 .....</b>	36
a. Une infection entéritique silencieuse à transmission fécale-orale pour les VIA FP .....	36

b. Particularité des virus influenza hautement pathogènes pour le poulet .....	37
<b>2. Cas des virus influenza A H5N1 HP de génotype Z+ isolés à partir de fin 2002</b> .....	37
a. Une infection systémique létale .....	37
i. Observations de terrain lors de l'épizootie de Hong-Kong .....	37
ii. Description d'infections expérimentales .....	37
b. Transmission du virus par la voie orale-orale .....	38
c. Acquisition d'un neurotropisme et d'un cardiotropisme .....	38
<b>C. <u>Structure et fonction des immunoglobulines du canard</u></b> .....	39
<b>1. Les IgM</b> .....	39
<b>2. Les IgY et les IgY (<math>\Delta</math> Fc)</b> .....	40
a. Adoption d'une nouvelle nomenclature .....	40
b. Particularité structurale des IgY ( $\Delta$ Fc) .....	40
c. Origine génétique de la diversité structurale des IgY du canard .....	40
d. L' IgY ( $\Delta$ Fc) : immunoglobuline prédominante du canard au rôle inconnu .....	41
e. Origine évolutive des IgY et conséquences fonctionnelles .....	41
<b>3. Les IgA</b> .....	42
a. Expression du système IgA du canard .....	42
b. Description de l'IgA biliaire du canard .....	42
c. Hypothèses sur l'origine des IgA biliaires du canard .....	43
<b>4. Ontogénie des immunoglobulines du canard</b> .....	43
<b>D. <u>Réponse sérologique du canard face au virus influenza</u></b> .....	43
<b>1. Réponse sérologique systémique</b> .....	43
a. Résultats d'études d'infections expérimentales .....	43
i. Une réponse anticorps indétectable face aux anciens virus .....	43
ii. Apparition d'une réponse sérologique face aux nouveaux virus H5N1 HP pour le canard .....	44
b. Résultats d'études d'essais vaccinaux .....	44
i. Comparaison avec la réponse sérologique du poulet .....	44
ii. Comparaison avec la réponse sérologique de différentes espèces d'oiseaux exotiques .....	45
iii. Hypothèses sur l'origine de la protection des canards en l'absence de réponse sérologique .....	46
<b>2. Réponse sérologique mucoale</b> .....	46
<b>III. <u>Les méthodes d'analyse de la réponse sérologique</u></b> .....	47
<b>A. <u>La réaction d'inhibition de l'hémagglutination</u></b> .....	47
<b>1. Principe de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination</b> .....	48
<b>2. Réalisation pratique</b> .....	49
<b>B. <u>Le test ELISA indirect</u></b> .....	50
<b>1. Principe de l'ELISA et utilisations pratiques</b> .....	50
<b>2. Principe de fonctionnement des kits ELISA influenza commerciaux</b> .....	50
<b>3. Réalisation pratique d'un test ELISA indirect en laboratoire</b> .....	51
<b>C. <u>La réaction de séroneutralisation</u></b> .....	51
<b>1. Principe de la réaction de séroneutralisation</b> .....	51
<b>2. Réalisation pratique</b> .....	52

**PARTIE II : Etude expérimentale**..... 53

**I. Matériel et méthode**..... 57

**A. Animaux de laboratoire** ..... 57

**B. Virus influenza** ..... 57

**C. Infection des canards et prélèvement des échantillons de sang et de bile** ..... 57

**D. Sérum positif standard**..... 58

**E. Détection des anticorps anti-hémagglutinine par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)** ..... 59

**1. Mise au point d'un test IHA sur sérum** ..... 59

**2. Validation d'un protocole d'IHA sur sérum**..... 61

        a. Titrage du virus par la réaction d'hémagglutination ..... 61

        b. Titrage des anticorps hémagglutinants par la réaction d'IHA ..... 62

            i. Protocole ..... 62

            ii. Condition d'analyse des sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 . 63

**3. Validation d'un protocole d'IHA sur bile** ..... 63

**F. Détection des anticorps anti-influenza par un test ELISA H7N1 E**..... 64

**1. Mise au point d'un test ELISA H7N1 E sur sérum**..... 64

**2. Validation d'un protocole ELISA Influenza sur sérum**..... 67

        a. Protocole ..... 67

        b. Condition d'analyse des sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 ..... 70

**3. Validation d'un protocole ELISA Influenza sur bile** ..... 70

        a. Description de la démarche expérimentale ..... 70

        b. Condition d'analyse des biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 ..... 71

**G. Détection des anticorps neutralisants par la réaction de séroneutralisation**... 71

**1. Mise au point d'un test de séroneutralisation sur sérum**..... 71

**2. Validation d'un protocole de séroneutralisation sur sérum**..... 73

        a. Protocole ..... 73

        b. Condition d'analyse des sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 ..... 75

**3. Essai de séroneutralisation sur bile** ..... 75

**H. Analyses statistiques**..... 76

**II. Résultats expérimentaux**..... 77

**A. Analyse des échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination** ..... 77

**1. Etude selon le virus inoculé** ..... 77

        a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux..... 77

        b. Comparaisons statistiques..... 78

**2. Etude virus E et R confondus** ..... 78

        a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux..... 78

        b. Comparaisons statistiques..... 79

**B. Analyse des échantillons de bile de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination** ..... 79

**1. Etude selon le virus inoculé** ..... 79

        a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux..... 79

        b. Comparaisons statistiques..... 80

**2. Etude virus E et R confondus** ..... 80

a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux.....	80
b. Comparaisons statistiques.....	81
<b>C. <u>Comparaison de l'évolution des titres IHA dans les sérums et dans les biles des animaux de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours du temps</u></b> .....	81
1. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux selon le virus inoculé .....	81
2. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus.....	82
<b>D. <u>Analyse des échantillons de sérum de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par un test ELISA</u></b> .....	82
1. Etude selon le virus inoculé .....	82
a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux.....	82
b. Comparaisons statistiques.....	83
2. Etude virus E et R confondus .....	83
a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux.....	83
b. Comparaisons statistiques.....	84
<b>E. <u>Analyse des échantillons de bile de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par un test ELISA</u></b> .....	84
1. Etude selon le virus inoculé .....	84
a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux.....	84
b. Comparaisons statistiques.....	85
2. Etude virus E et R confondus .....	85
a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux.....	85
b. Comparaisons statistiques.....	86
<b>F. <u>Comparaison de l'évolution des titres ELISA dans les sérums et dans les biles des animaux de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours du temps</u></b> .....	87
1. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux selon le virus inoculé .....	87
2. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus.....	87
<b>G. <u>Analyse des échantillons de sérum de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par la réaction de séroneutralisation</u></b> .....	88
1. Etude selon le virus inoculé .....	88
a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux.....	88
b. Comparaisons statistiques.....	88
2. Etude virus E et R confondus .....	89
a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux.....	89
b. Comparaisons statistiques.....	89
<b>H. <u>Comparaison des résultats obtenus par les trois méthodes de dosage</u></b> .....	90
1. Pour les sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	90
2. Pour les biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	90

**PARTIE III : Discussion**..... 93

**I. Réponse sérologique du canard face à des virus influenza A H7N1 faiblement pathogènes** ..... 95

**A. Réponse sérologique systémique** ..... 95

**1. Divergence des résultats obtenus à l'IHA par rapport aux deux autres tests** ..... 95

**2. Manque de sensibilité du test d'IHA chez le canard** ..... 95

**3. Hypothèses concernant le manque de sensibilité de l'IHA** ..... 96

a. Importance de l'espèce de provenance des globules rouges ..... 96

b. Rôle de la séquence en acides aminés de l'hémagglutinine ..... 96

c. Implication des IgY ( $\Delta$ Fc) ? ..... 97

i. Description de notre hypothèse ..... 97

ii. Apports de l'étude de Higgins *et al* (1987) dans l'interprétation de nos résultats expérimentaux ..... 98

iii. Nécessité d'investigations supplémentaires ..... 99

**B. Réponse sérologique mucoale** ..... 99

**C. Conséquences du pouvoir de réplication du virus inoculé sur l'intensité de la réponse sérologique** ..... 100

**II. Limites de l'étude** ..... 101

**A. La réponse sérologique est-elle protectrice ?** ..... 101

**B. Quels sont les rôles de l'immunité innée et de l'immunité à médiation cellulaire ?** ..... 102

**C. Limites liées aux protocoles expérimentaux** ..... 103

**1. Effectifs d'animaux limités et absence de suivi au cours du temps** ..... 103

**2. Un protocole d'IHA discutable** ..... 104

a. Utilisation d'un virus intact et vivant ..... 104

b. Absence de traitement des sérums pour l'élimination des inhibiteurs non spécifiques ..... 104

**III. Bilan des avantages et inconvénients des trois techniques d'analyses sérologiques** ..... 106

**A. Bilan personnel et conséquences pratiques** ..... 106

**B. Analyse d'autres investigateurs** ..... 106

**CONCLUSION** ..... 109

**BIBLIOGRAPHIE** ..... 111

**ANNEXE** ..... 119



## LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Illustration de la structure externe et interne d'un virus influenza A vu en coupe..	27
<u>Figure 2</u> : Représentation schématique de l'hémagglutinine d'un virus influenza A avec ses deux sous-unités HA1 (en vert) et HA2 (en rouge) .....	28
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique de la neuraminidase d'un virus influenza A.....	28
<u>Figure 4</u> : Illustration d'une ribonucléoprotéine de virus influenza A.....	29
<u>Figure 5</u> : Illustration du cycle de réplication du virus influenza.....	31
<u>Figure 6</u> : Les trois mécanismes d'évolution génétique des virus influenza A.....	33
<u>Figure 7</u> : Représentation schématique des deux formes d'IgM du canard .....	39
<u>Figure 8</u> : Représentation schématique des trois formes d'IgY du canard.....	40
<u>Figure 9</u> : Représentation schématique des deux formes d'IgA du canard.....	42
<u>Figure 10</u> : Principe de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination .....	49
<u>Figure 11</u> : Principe du test ELISA indirect .....	51
<u>Figure 12</u> : Principe de la réaction de séroneutralisation .....	52
<u>Figure 13</u> : Représentation schématique de la répartition des sérums sur une plaque ELISA.....	66
<u>Figure 14</u> : Organisation des microplaques de séroneutralisation lors de la détermination de la concentration optimale en virus .....	72

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Organisation des groupes et sous-groupes de canards de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	58
<u>Tableau 2</u> : Résumé des différentes étapes du protocole de réaction d'hémagglutination .....	61
<u>Tableau 3</u> : Résumé des différentes étapes du protocole de réaction d'inhibition de l'hémagglutination .....	63
<u>Tableau 4</u> : Résumé des différentes étapes du protocole du test ELISA indirect H7N1 .....	69
<u>Tableau 5</u> : Résumé des différentes étapes du protocole de séroneutralisation .....	75
<u>Tableau 6</u> : Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	77
<u>Tableau 7</u> : Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus.....	78
<u>Tableau 8</u> : Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	79
<u>Tableau 9</u> : Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus.....	80
<u>Tableau 10</u> : Comparaison des titres IHA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux .....	81
<u>Tableau 11</u> : Comparaison des titres IHA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus.....	82
<u>Tableau 12</u> : Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	82
<u>Tableau 13</u> : Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus .....	83
<u>Tableau 14</u> : Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	84
<u>Tableau 15</u> : Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus .....	85
<u>Tableau 16</u> : Comparaison des titres ELISA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux .....	87
<u>Tableau 17</u> : Comparaison des titres ELISA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus .....	87
<u>Tableau 18</u> : Titres moyens en séroneutralisation pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 .....	88
<u>Tableau 19</u> : Titres moyens en séroneutralisation pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus .....	89
<u>Tableau 20</u> : Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de sérums de canards selon la méthode de détection d'anticorps, virus E et R confondus .....	90
<u>Tableau 21</u> : Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de biles de canards selon la méthode de détection d'anticorps, virus E et R confondus .....	90

## LISTE DES GRAPHIQUES

<u>Graphique 1</u> : Comparaison des titres IHA moyens entre les sérums d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection .....	78
<u>Graphique 2</u> : Comparaison des titres IHA moyens des sérums de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus .....	79
<u>Graphique 3</u> : Comparaison des titres IHA moyens entre les biles d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection .....	80
<u>Graphique 4</u> : Comparaison des titres IHA moyens des biles de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus .....	81
<u>Graphique 5</u> : Comparaison des titres ELISA moyens entre les sérums d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection .....	83
<u>Graphique 6</u> : Comparaison des titres ELISA moyens des sérums de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus .....	84
<u>Graphique 7</u> : Comparaison des titres ELISA moyens entre les biles d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection .....	85
<u>Graphique 8</u> : Comparaison des titres ELISA moyens des biles de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus .....	86
<u>Graphique 9</u> : Comparaison des titres moyens en séroneutralisation entre les sérums d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection .....	88
<u>Graphique 10</u> : Comparaison des titres moyens en séroneutralisation des sérums de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus .....	89
<u>Graphique 11</u> : Evolution supposée des taux d'IgM, IgY et IgY( $\Delta$ Fc) dans le sérum des canards à la suite d'une infection à VIA FP .....	98

## LISTE DES ANNEXES

<u>Annexe 1</u> : Titres IHA obtenus pour un échantillon de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours de quatre manipulations.....	119
<u>Annexe 2</u> : Titres IHA moyens des échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29.....	121
<u>Annexe 3</u> : Titres IHA obtenus pour un échantillon de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29.....	122
<u>Annexe 4</u> : Titres ELISA obtenus pour un échantillon de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours de six tests .....	123
<u>Annexe 5</u> : Titres ELISA moyens des échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29.....	125
<u>Annexe 6</u> : Titres ELISA obtenus pour un échantillon de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours de 3 tests .....	127
<u>Annexe 7</u> : Titres obtenus par la réaction de séroneutralisation pour un échantillon de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29.....	128
<u>Annexe 8</u> : Comparaison des titres obtenus pour chaque sérum de canard selon la méthode de détection d'anticorps .....	129
<u>Annexe 9</u> : Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de sérums de canard selon la méthode de détection d'anticorps .....	130
<u>Annexe 10</u> : Comparaison des titres obtenus pour chaque bile de canard selon la méthode de détection d'anticorps .....	131
<u>Annexe 11</u> : Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de biles de canard selon la méthode de détection d'anticorps.....	132

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AC** : anticorps  
**Afssa** : Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
**ARN**: acide ribonucléique  
**ARNm** : acide ribonucléique messenger  
**BSA** : bovine serum albumin (albumine sérique bovine)  
**BSL**: biosafety level (niveau de biosécurité)  
**CMH**: complexe majeur d'histocompatibilité  
**CNR Grippe** : Centre national de référence de la grippe  
**DMEM** : Dulbecco's modified Eagle's medium (milieu de culture cellulaire dérivé de l'EMEM (Eagle's minimal essential medium))  
**DO** : densité optique  
**ELISA** : Enzyme-linked immunosorbent assay (dosage immunoenzymatique sur support solide)  
**ENVT** : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse  
**FP** : faiblement pathogène  
**GMT**: geometric mean titre (titre géométrique moyen)  
**H** ou **HA** : hémagglutinine  
**HP** : hautement pathogène  
**IA** : influenza aviaire  
**IDG** : immunodiffusion double en gélose  
**IFN**: interféron  
**Ig**: immunoglobuline  
**IgA** : immunoglobuline A (anticorps de défense des surfaces externes de l'organisme chez les oiseaux et les mammifères)  
**IgE** : immunoglobuline E (immunoglobuline de mammifère, impliquée dans les réactions anaphylactiques)  
**IgG** : immunoglobuline G (anticorps circulant majeur des mammifères ; ancien nom donné aux IgY du canard)  
**IgM** : immunoglobuline M (anticorps circulant présent chez tous les vertébrés)  
**IgX** : immunoglobuline X (ancien nom donné aux immunoglobulines biliaires du canard)  
**IgY** : immunoglobuline Y (anticorps circulant majeur des oiseaux)  
**IgY ( $\Delta$ Fc)** : IgY tronquée, dépourvue de la région Fc  
**IHA** : inhibition de l'hémagglutination  
**IL**: interleukine  
**INRA** : Institut national de la recherche agronomique  
**M1** : protéine de matrice 1 (assure la rigidité de l'enveloppe virale)  
**M2**: protéine de matrice 2 (canal ionique enchâssé dans l'enveloppe virale)  
**MDCK** : Madin-Darby canine kidney (cellules tumorales de reins de chiens)  
**N** ou **NA** : neuraminidase  
**NP**: nucléoprotéine  
**NS1** : protéine non structurale 1  
**NS2** : protéine non structurale 2  
**OIE** : ancien Office international des épizooties, désormais appelé Organisation mondiale de la santé animale (World organization for animal health)

**OMS (WHO)** : Organisation mondiale de la santé (World health organization)

**PA, PB1, PB2**: sous-unités de la polymérase virale

**PBS** : phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)

**RDE** : receptor destroying enzyme (neuraminidase du vibrion cholérique)

**RT-PCR** : reverse transcription - polymerase chain reaction (transcription inverse - polymérisation en chaîne)

**SA** : acide sialique

**TPCK** : L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone (inhibe l'activité de la chymotrypsine sans affecter celle de la trypsine)

**UHA**: unité hémagglutinante

**UV** : ultraviolets

**VIA** : virus influenza de type A

**VIA FP** : virus influenza de type A faiblement pathogène

**VIA HP** : virus influenza de type A hautement pathogène

# Introduction

Les virus influenza, agents des gripes des mammifères et de l'influenza aviaire, appartiennent au genre *Influenzavirus* et à la famille des *Orthomyxoviridae*. On distingue trois types de virus (A, B et C) parmi lesquels seuls les virus de type A infectent à la fois l'Homme ainsi qu'une grande diversité de mammifères et d'oiseaux. Ce sont également les seuls à être subdivisés en sous-types définis selon la nature antigénique de deux protéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA).

L'influenza aviaire (IA) désigne l'infection de la volaille causée par un virus de type A. La législation européenne définit deux formes de la maladie : l'IA hautement pathogène et l'IA faiblement pathogène. Tous les virus influenza A (VIA) hautement pathogènes (HP) pour la volaille sont à déclaration obligatoire. Jusqu'à ce jour, seuls les sous-types H5 et H7 ont été impliqués dans la forme hautement virulente. Cependant, en raison d'un risque de mutation des souches faiblement pathogènes (FP) vers une forme HP, l'OIE a étendu la déclaration obligatoire à toute forme d'IA causée par des virus appartenant aux sous-types H5 et H7.

L'ensemble des VIA dériverait d'un réservoir sauvage constitué par les oiseaux aquatiques appartenant aux ordres des Ansériformes et des Charadriiformes. En effet, des sous-types porteurs de chacune des HA (H1 à H16) et des NA (N1 à N9) ont été isolés chez de nombreuses espèces appartenant à ces deux ordres. Les canards de surface appartenant au genre *Anas* (canard colvert, canard pilet, sarcelle) représentent le réservoir le plus important de VIA.

Jusqu'à l'émergence, fin 2002, du virus H5N1 HP d'origine asiatique, seuls des VIA FP étaient hébergés par les oiseaux sauvages. Cependant, lorsqu'un VIA issu du réservoir sauvage est transmis à des volailles, ce changement d'hôte se traduit par une évolution rapide du virus pouvant aboutir, dans certains cas, à l'acquisition d'un pouvoir pathogène plus élevé.

En raison des conséquences économiques désastreuses causées par une épizootie à VIA HP pour les filières avicoles, l'avifaune sauvage fait l'objet d'une surveillance virologique permanente. Parallèlement, de nombreuses infections expérimentales sont menées en laboratoire sur des canards afin de comprendre les mécanismes immunitaires qui sous-tendent la relation hôte/parasite qui lie les VIA à leur principale espèce réservoir.

Le canard dispose de différents mécanismes immunitaires pour lutter contre une infection à VIA : l'immunité innée, l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Très peu d'études ont été effectuées sur ce sujet et la plupart des publications disponibles traitent de l'immunité humorale. Néanmoins, ces travaux ont abouti à un même constat : face à des VIA FP, les canards ne développeraient pas de réponse anticorps systémique ou uniquement une réponse faible et non persistante, en comparaison avec le poulet. Cependant, de nombreux facteurs sont susceptibles de faire varier la réponse sérologique, parmi lesquels le sous-type du VIA inoculé et la méthode d'analyse.

L'objectif de cette étude a été d'analyser la cinétique d'apparition des anticorps dans le sérum et dans la bile chez des canards infectés expérimentalement par des VIA FP, en prenant en compte les deux facteurs de variation cités ci-dessus. Ainsi, le virus que nous employons

appartient à un sous-type (H7N1) qui n'a pas encore été utilisé jusqu'à ce jour dans les travaux d'analyse de la réponse humorale des canards face aux VIA FP. Les animaux de notre étude sont inoculés avec des virus issus de génétique inverse à partir de la souche mère H7N1. Ces deux virus recombinants ont des pouvoirs de réplication différents chez le canard dont les conséquences sur l'intensité de la réponse sérologique sont examinées.

D'autre part, toutes les publications scientifiques attestant de la faible réponse humorale systémique des canards face aux VIA FP utilisent la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) comme technique de dosage des anticorps. Ce test est en effet la méthode de référence, recommandée par l'OIE, pour la détection des anticorps anti-influenza dans les sérums aviaires. Afin de tester la fiabilité de l'IHA dans la détection des anticorps hémagglutinants chez le canard, les échantillons biologiques issus des animaux de notre expérimentation ont également été testés par deux autres méthodes de diagnostic sérologique mises au point dans notre laboratoire : un test ELISA H7N1 indirect et un test de séroneutralisation.

La première partie de cette étude réalise une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur les interactions entre le VIA et le canard. Après un bref rappel des caractéristiques essentielles du virus influenza, les différents aspects de la relation hôte-parasite et de son évolution récente sont abordés. Le déroulement d'une infection à VIA chez le canard ainsi que les particularités de la réponse anticorps sont ensuite détaillés en décrivant le cas des anciens virus et celui des nouveaux virus asiatiques HP. Enfin, les méthodes d'analyse de la réponse sérologique du canard sont présentées en insistant sur les trois techniques mises au point au cours de ce travail.

La seconde partie est consacrée à l'étude expérimentale. Les protocoles ainsi que les étapes successives de leur mise au point y sont détaillés. Les résultats issus des trois techniques de détection d'anticorps sont ensuite exposés et comparés grâce à des tests statistiques.

La dernière partie est une analyse critique des résultats expérimentaux conduite à la lumière des données d'autres travaux scientifiques réalisés sur le sujet. Des hypothèses sont avancées afin d'expliquer les résultats obtenus tout en tenant compte des limites de cette étude.

# **PARTIE I**

## **Synthèse sur les virus influenza et leurs interactions avec le canard**



# **I. Brève présentation des virus influenza**

## **A. Classification et nomenclature**

### **1. Classification des virus influenza**

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, qui regroupe les virus enveloppés avec un génome segmenté à ARN simple brin de polarité négative (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

Les règles de classification et de dénomination au sein du genre *Influenzavirus* sont proposées par le WHO Expert Committee (World Health Organization Expert Committee). Ainsi, on distingue trois types de virus influenza en fonction de la nature antigénique des protéines de la nucléocapside et de la matrice : Influenzavirus de type A, B et C (Alexander, 1993). Les virus influenza de type B et C infectent uniquement l'Homme alors que les virus de type A sont capables d'infecter les mammifères ainsi qu'une large variété d'oiseaux sauvages et domestiques. Cependant, on considère que les hôtes normaux des virus de type A sont les oiseaux aquatiques sauvages, les goélands et les oiseaux de rivage (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

Les virus de type A sont divisés en différents sous-types définis par la nature des deux protéines d'enveloppe : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) (Alexander, 1993). On dénombre à ce jour 16 variants de la protéine HA et 9 variants de la protéine NA. 144 combinaisons sont théoriquement possibles entre les variants respectifs de ces deux protéines mais dans la réalité, seules 23 associations H-N sont connues (Albina *et al*, 2006).

### **2. Nomenclature des virus influenza**

#### **a. Nomenclature générale**

La désignation des souches virales obéit à des règles internationales d'écriture. Ainsi, leur nomenclature doit comprendre les éléments suivants (rapport Afssa, février 2008):

- (1) le type antigénique (A, B ou C)
- (2) l'hôte d'origine (pour les souches animales uniquement)
- (3) la localisation géographique de la première isolation
- (4) le numéro d'ordre de la souche
- (5) l'année d'isolement de la souche
- (6) pour les virus influenza de type A : la désignation du sous-type H et N

Par exemple, la dénomination A/turkey/England/199/79 (H7N7) signifie que la souche virale fait partie des virus influenza de type A, qu'elle a été isolée à partir d'une dinde en Angleterre en 1979, qu'elle est référencée sous le numéro 199 et qu'elle appartient au sous-type H7N7 (Murphy *et al*, 1995).

## **b. Cas particulier du virus A H5N1 HP**

La nomenclature du virus influenza A/H5N1 hautement pathogène a fait apparaître, à cause de son importance particulière, un autre élément : son « génotype ». Le génotype d'un virus fait référence à sa séquence génétique spécifique. Ainsi, pendant longtemps, le gène codant pour l'HA H5 n'avait pas été remplacé chez les virus influenza A H5N1 HP isolés depuis 1996, alors que les autres gènes avaient subi des réassortiments génétiques à l'origine d'une série de génotypes (Kim *et al.*, 2008). En 2001, six génotypes étaient connus (les génotypes A, B, C, D, E et X<sub>0</sub>), tous venant de la volaille. Au début de 2002, huit nouveaux génotypes furent découverts, appelés V, W, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, Y, Z et Z<sup>+</sup>, remplaçant les anciens génotypes (A-E). A l'exception des génotypes X<sub>0</sub> à X<sub>3</sub>, tous les nouveaux portaient une mutation sur une des protéines internes (la protéine NS2). En plus, tous les génotypes à l'exception des B, W et Z<sup>+</sup> avaient perdu vingt acides aminés sur la protéine NA. Le génotype Z est maintenant le génotype dominant en Indonésie, en Thaïlande, au Vietnam et dans le sud de la Chine.

Petit-à-petit, le gène codant pour l'HA H5 a évolué pour donner lieu à des virus antigéniquement distincts. C'est pourquoi le génotype Z a ensuite été subdivisé en 10 sous-groupes antigéniques, appelés « clades » 0 à 9. Parmi ces 10 clades, le clade 2 est divisé en 5 sous-clades (2.1 à 2.5). Les sous-clades 2.1 et 2.3 sont à leur tour partagés en sous-clades : 2.1.1 à 2.1.3 et 2.3.1 à 2.3.4 respectivement. La majorité des virus influenza A H5N1 circulant en 2010 (en incluant à la fois les cas aviaires et humains) appartiennent aux clades 1 et 2 ([http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/nomenclature/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/)).

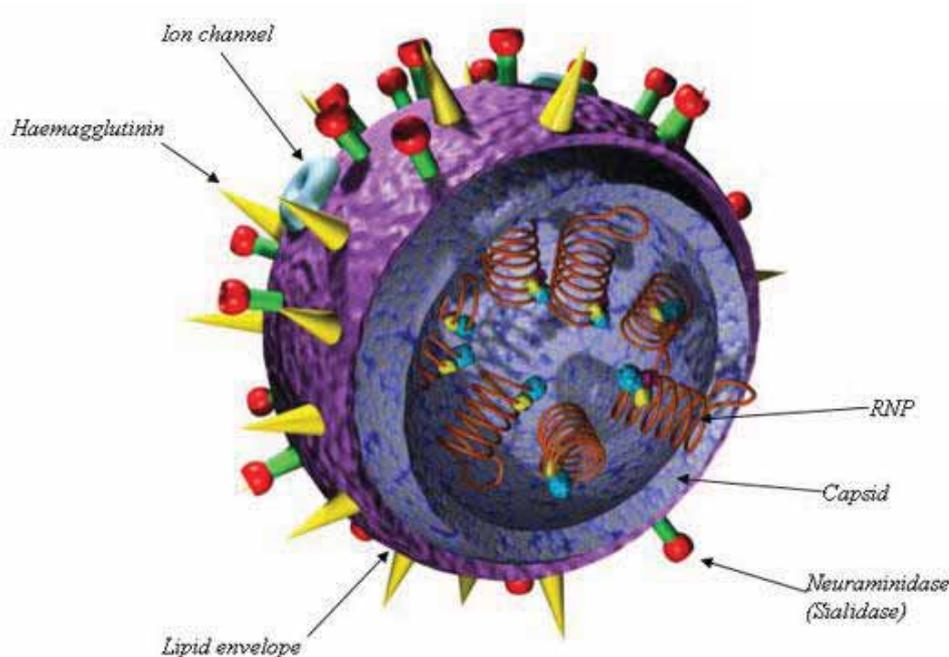
## **B. Structure virale et implication dans la réponse immunitaire à médiation humorale**

### **1. Structure générale des virus influenza A**

Les virus influenza de type A sont enveloppés, de forme sphérique ou filamenteuse, leur diamètre variant de 80 à 120 nm. En microscopie électronique, ils apparaissent comme des sphères recouvertes de spicules correspondant aux deux glycoprotéines d'enveloppe. Cette enveloppe est dérivée de lipides de membranes cellulaires et entoure la capsid virale (Murphy *et al.*, 1995).

Le génome du virus est constitué de 8 fragments d'ARN indépendants codant pour 10 protéines différentes. Ces protéines peuvent être classées en trois catégories : les protéines de surface, les protéines internes et les protéines non structurales qui ne sont pas contenues dans la particule virale.

Les protéines de surface sont au nombre de trois : l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA) et la protéine de matrice M2. Les protéines internes sont constituées de trois polymérases (protéines PA, PB1 et PB2), de la nucléoprotéine (NP), de la protéine de matrice M1 et de la protéine non structurale NS2. La protéine non structurale NS1 est la seule à ne pas être contenue dans la particule virale. Elle est cependant produite en grande quantité dans les cellules infectées (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).



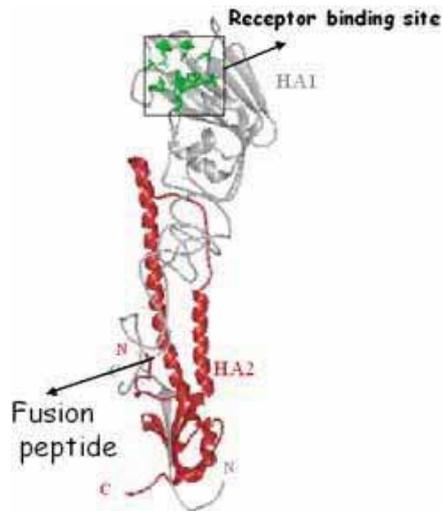
**Figure 1 :** Illustration de la structure externe et interne d'un virus influenza A vu en coupe ([www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/))

Lorsqu'un organisme est infecté par un virus influenza, les anticorps produits par le système immunitaire peuvent être dirigés contre chacune des protéines virales. Cependant, chaque type d'anticorps n'a pas la même importance en terme de protection de l'hôte. Ainsi, les protéines de surface sont les seules capables d'induire la production d'anticorps neutralisants à l'origine d'une réponse immunitaire protectrice (Suarez et Schultz-Cherry, 2000 ; Alexander, 1993).

## 2. Les protéines de surface

### a. L'hémagglutinine

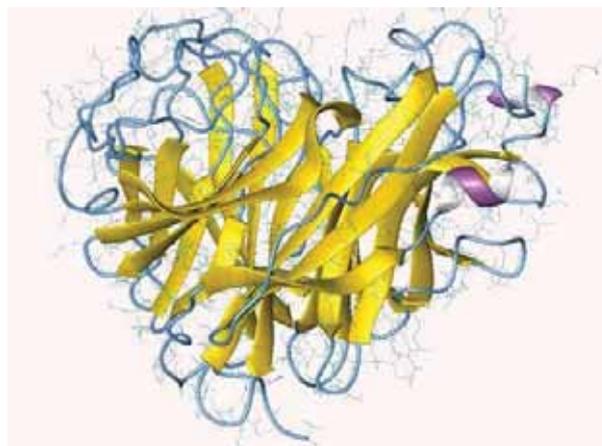
L'hémagglutinine virale est une protéine trimérique composée de deux sous-unités à l'origine de ses deux principales fonctions : la sous-unité HA1 constitue le site de liaison du virus au récepteur acide sialique des glycolipides de la cellule cible ; la sous-unité HA2 constitue le domaine de fusion qui permet l'entrée du génome viral à l'intérieur de la cellule hôte ([www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/)). Cette protéine virale est l'antigène le plus important en terme d'induction d'une immunité protectrice. Au moins 5 sites antigéniques ont été identifiés pour les virus influenza humains, chaque site étant capable d'induire la production d'anticorps neutralisants. Des observations similaires ont été faites pour un virus aviaire de sous-type H5 (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).



**Figure 2 :** Représentation schématique de l'hémagglutinine d'un virus influenza A avec ses deux sous-unités HA1 (en vert) et HA2 (en rouge) ([www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/))

### **b. La neuraminidase**

La neuraminidase est une protéine tétramérique à activité enzymatique. Elle permet aux nouveaux virions bourgeonnant à la surface cellulaire d'être libérés de leur attache en clivant les liaisons osidiques formées entre l'hémagglutinine et les résidus d'acide sialique. Cet antigène est également à l'origine de la production d'anticorps neutralisants (Suarez et Schultz-Cherry, 2000). Cependant, Johansson *et al* ont montré que des souris immunisées uniquement avec la protéine NA excrétaient moins de virus, alors que celles vaccinées avec la protéine HA n'excrétaient pas du tout de virus (Johansson *et al*, 1989). Il semble donc que les anticorps dirigés contre la neuraminidase soient moins protecteurs que ceux dirigés contre l'hémagglutinine.



**Figure 3 :** Représentation schématique de la neuraminidase d'un virus influenza A ([www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/))

### **c. La protéine de matrice M2**

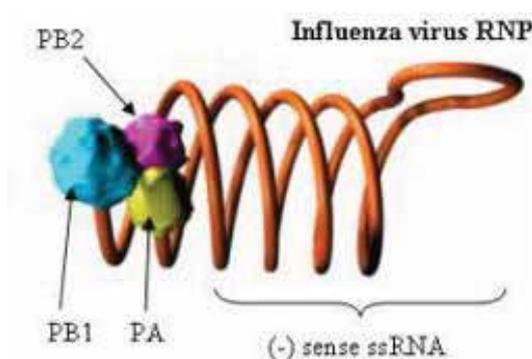
La protéine de matrice M2 se présente comme un pore enchâssé dans l'enveloppe virale. Elle se comporte comme un canal ionique et régule le pH interne du virus par le transport d'ions  $H^+$ . Elle agit en association avec l'hémagglutinine dans les processus de décapsidation qui permettent la libération du génome viral dans le cytoplasme de la cellule hôte ([www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/)). Chez la souris, des anticorps dirigés contre la protéine M2 ne protègent pas complètement mais permettent de diminuer la quantité de virus excrété. Le principal avantage de ces anticorps est lié au fait que la protéine M2 est un antigène bien conservé pour tous les virus influenza de type A. Ils pourraient donc potentiellement fournir une protection immunitaire contre tous les sous-types viraux. Cependant, aucune étude n'a été réalisée afin de déterminer si ces anticorps seraient protecteurs chez le poulet (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

### **3. Les protéines internes**

La protéine M1 ou protéine matricielle est la plus abondante des protéines virales. Elle s'associe à la partie intracellulaire des protéines de surface et à la nucléoprotéine, et assure la rigidité de l'enveloppe virale. Elle est également impliquée dans l'assemblage des virions (rapport Afssa, février 2008).

Les nucléoprotéines (NP) s'associent à chaque segment d'ARN viral pour former huit nucléocapsides (ou ribonucléoprotéines) à symétrie hélicoïdale qui emballent l'ARN.

Les protéines PA, PB1 et PB2 forment un complexe polymérase qui s'associe avec les nucléocapsides et interviennent dans le contrôle de la transcription et la réplication de l'ARN viral.



**Figure 4 : Illustration d'une ribonucléoprotéine de virus influenza A** ([www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/))

La protéine NS2 assure le transport des ribonucléoprotéines nouvellement formées du noyau vers le cytoplasme ([www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/)).

La réponse anticorps peut être dirigée contre ces protéines internes dont la séquence est très bien conservée. Cependant, ces anticorps ne sont pas protecteurs (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

#### **4. La protéine non structurale NS1**

La protéine NS1 est produite directement dans la cellule infectée et n'est pas incorporée dans les nouveaux virions. Elle joue un rôle dans l'échappement du virus à l'action antivirale de l'interféron (Kamps *et al*, 2006).

### **C. Déroulement de l'infection virale** (Murphy *et al*, 1999 ; Alexander, 1993)

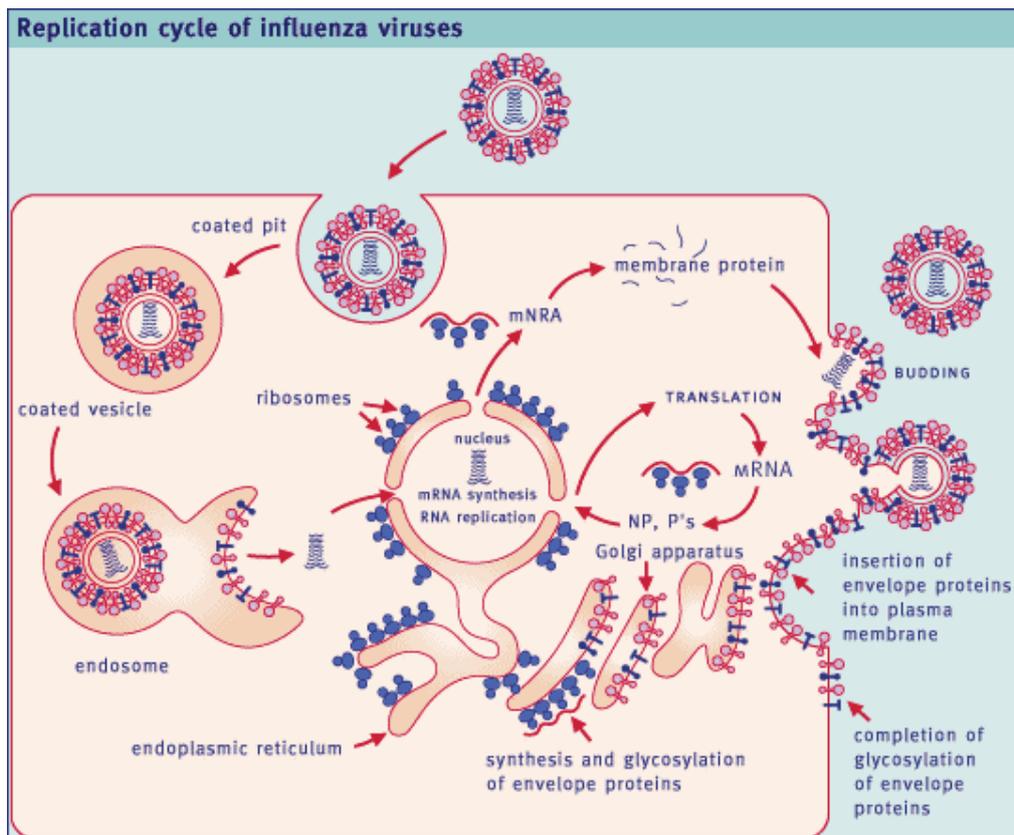
L'adsorption du virus à une cellule cible implique la reconnaissance des récepteurs acides sialiques par l'hémagglutinine virale. L'extrémité distale de chaque sous-unité de l'HA se fixe à l'acide sialique lié à une molécule de galactose. Les virus de type A sont capables de reconnaître deux variétés d'acide sialique (SA) : l'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) et l'acide N-glycolylneuraminique (NeuGc) qui s'attachent à une molécule de galactose voisine par deux types de liaisons,  $\alpha 2,3$  (chez les oiseaux) ou  $\alpha 2,6$  (chez l'Homme).

L'entrée dans la cellule se fait grâce au clivage de l'HA en ses deux sous-unités par une protéase cellulaire. Ce processus permet l'exposition du peptide de fusion responsable de l'entrée du virion dans la cellule par endocytose.

L'endosome contenant la particule virale migre vers l'intérieur de la cellule. Au cours de cette migration, le pH endosomal devient acide. Grâce à l'action de la protéine M2, la baisse de pH se répercute à l'intérieur de la particule virale, ce qui provoque un changement de conformation de la protéine HA à l'origine de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale.

Le génome viral est alors libéré dans le cytoplasme puis transporté dans le noyau où la transcription et la réplication de l'ARN prennent place. La synthèse des protéines virales se déroule dans le cytoplasme ou dans le réticulum endoplasmique granuleux en utilisant des mécanismes de traduction cellulaires.

Enfin, les nouveaux virions sont assemblés puis bourgeonnent à la surface cellulaire. Leur libération se fait grâce à la neuraminidase qui détruit les récepteurs acides sialiques auxquels est fixée l'HA.



**Figure 5: Illustration du cycle de réplication du virus influenza**  
(Murphy et Webster, 1996)

#### **D. Variations génétiques des virus influenza A**

(OMS, janvier 2005; Albina *et al*, 2006 ; [www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/))

Les virus influenza sont pourvus d'une grande plasticité génétique responsable de leur survie à plus ou moins long terme. Trois mécanismes d'évolution génétique sont possibles : la dérive antigénique, la cassure antigénique et les recombinaisons génétiques. Ce dernier mode d'évolution est cependant rare parmi les virus influenza.

##### **1. La dérive génétique**

La dérive génétique est la conséquence du caractère peu fidèle de l'enzyme ARN polymérase ARN dépendante dont les erreurs de lecture commises au cours de la réplication virale ne sont pas réparées. Elle résulte également de la pression de sélection exercée par les anticorps neutralisants sur les sites antigéniques de l'HA. Ces erreurs aboutissent à des mutations ponctuelles au niveau des bases nucléotidiques des gènes viraux et par conséquent à des modifications au niveau des protéines pour lesquelles ils codent.

Ces variations antigéniques sont mineures, surviennent environ tous les deux à trois ans et apparaissent essentiellement pour l'hémagglutinine et à moindre titre pour la neuraminidase. Cependant, des erreurs répétées lors de la copie de l'ARN par la polymérase virale (mécanisme dit de « bégaiement ») sont responsables de l'insertion de résidus basiques au site de clivage de l'hémagglutinine, principal mécanisme d'acquisition de la virulence (rapport Afssa, février 2008). Tous les gènes codant pour les autres protéines virales peuvent à priori subir des mutations, dans la limite où les protéines codées par ces gènes conservent des fonctions compatibles avec la réplication virale.

La dérive ou glissement antigénique concerne un sous-type, pour lequel apparaissent des variants successifs qui diffèrent progressivement de la souche d'origine. Ce mécanisme d'évolution génétique assure la survie du virus à court terme. La vitesse d'apparition des petites variations fait que les populations restent sensibles à l'infection. Ces remaniements du génome concourent à l'apparition d'épidémies annuelles limitées en raison de l'échappement partiel du virus à la réponse immunitaire de l'hôte. Il apparaît que chaque nouveau variant de virus grippal A, capable de réinfecter un individu préalablement exposé, présente au moins quatre substitutions d'acides aminés au niveau d'au moins deux sites antigéniques de l'hémagglutinine.

Le taux d'évolution des virus influenza aviaires est beaucoup plus élevé chez les volailles que chez l'hôte naturel, représenté par les oiseaux sauvages. Les erreurs dans les gènes codant la neuraminidase et l'hémagglutinine sont les plus fréquentes.

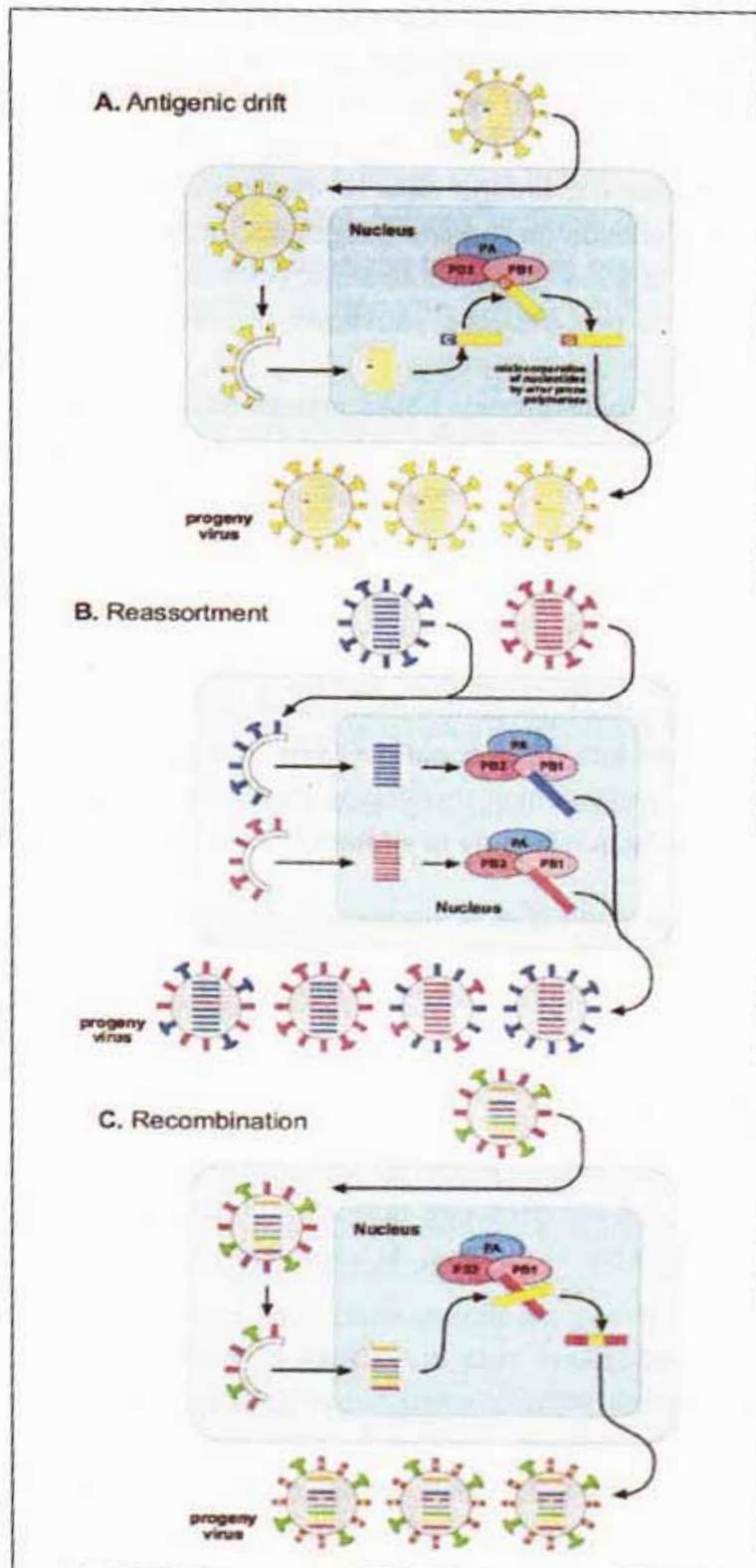
## **2. La cassure antigénique**

La cassure antigénique est rendue possible par le caractère fragmenté du génome des virus grippaux. Ceci facilite l'échange de segments d'ARN au cours de la co-infection par des virus grippaux de génotypes différents, qui peut alors faire apparaître un nouveau sous-type viral, entièrement ou en grande partie inconnu du système immunitaire de l'hôte. Ce mode d'évolution génétique permet la survie à long terme du virus: le système immunitaire de l'hôte est naïf par rapport à un nouveau sous-type viral et ce dernier peut alors toucher une population très importante d'hôtes sensibles.

Ce phénomène de réassortiment est particulièrement important pour l'évolution antigénique des virus influenza, dans la mesure où il peut conduire au changement complet d'une molécule de surface telle l'HA ou la NA. Cet événement est caractérisé par le remplacement de l'HA et/ou de la NA par une HA et/ou une NA d'un type moléculaire différent. Il n'existe que chez les virus influenza de type A, au sein desquels il peut aboutir à l'apparition de nouveaux sous-types.

Deux espèces animales domestiques peuvent jouer un rôle particulier dans le réassortiment des VIA : un oiseau, la caille et un mammifère, le porc. En effet, ces deux animaux possèdent des récepteurs à la fois aux virus influenza d'origine aviaire (acides sialiques liés au galactose par une liaison  $\alpha$ -2,3) et humaine (acides sialiques liés au galactose par une liaison  $\alpha$ -2,6).

La caille peut donc, comme le porc, constituer un environnement favorable à l'émission de virus influenza recombinants et constituer un hôte intermédiaire potentiel (rapport Afssa, février 2008).



**Figure 6 :** Les trois mécanismes d'évolution génétique des virus influenza A (Webster et Hulse, 2004)

## **II. Les interactions entre le virus influenza aviaire et le canard**

### **A. Une relation hôte/parasite en évolution**

#### **1. La théorie du réservoir**

Les virus influenza A sont capables d'infecter une grande variété d'espèces animales. Cependant, c'est parmi les oiseaux sauvages qu'ont été retrouvées la plus grande diversité et la plus importante quantité de virus (Alexander, 1993). Les recherches effectuées depuis une quarantaine d'années permettent aujourd'hui de considérer que les hôtes-réservoirs principaux des virus influenza A aviaires faiblement pathogènes sont les oiseaux aquatiques sauvages appartenant à deux ordres : les Ansériformes et les Charadriiformes (rapport Afssa, février 2008).

#### **a. Découverte des premiers indices**

1955 fut l'année où l'on réalisa pour la première fois que les virus influenza A pouvaient infecter les oiseaux. Cependant, le premier isolement d'un virus influenza aviaire chez des oiseaux sauvages a été fait en 1961 chez des sternes pierregarins (ordre des Charadriiformes), à la suite d'une importante mortalité apparue en Afrique du Sud. Il s'agissait d'une souche hautement pathogène H5N3 (rapport Afssa, février 2008). Les isollements occasionnels de virus parmi les oiseaux sauvages furent considérés comme non usuels et peu significatifs jusqu'en 1972, date à laquelle des canards sauvages furent impliqués pour la première fois dans l'écologie des virus influenza (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

Ces premiers isollements fournirent les premiers indices concernant le réservoir énorme (autant en nombre qu'en variété) de virus influenza maintenus parmi la population d'oiseaux sauvages (Alexander, 1993).

#### **b. Le canard : principal réservoir des sous-types viraux**

Depuis ces premières découvertes, de nombreuses études d'épidémiologie ont été menées. Ainsi, les 16 types antigéniques de l'HA et les 9 types antigéniques de la NA ont été retrouvés parmi les oiseaux sauvages (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

Stallknecht et Shane ont établi la liste des espèces aviaires excrétaant du virus. Ces espèces sont réparties en 12 ordres parmi lesquels se trouve l'ordre des Ansériformes. Les isollements viraux provenant des autres ordres ont été complètement éclipsés devant le nombre, la variété et l'étendue de la distribution des virus influenza chez les Ansériformes (Stallknecht et Shane, 1988). D'autres études ont montré que les canards hébergeaient la plupart des sous-types de l'HA et tous les sous-types de la NA (Stallknecht, 1998). Les canards de surface appartenant au genre *Anas* (canard colvert, canard pilet, sarcelle) représentent le réservoir le plus important de virus influenza A (prévalence supérieure à 10%). Les canards plongeurs et les tadornes sont moins souvent trouvés infectés (prévalence respectivement de 10 et 2%), de même que les cygnes et les oies (prévalence respectivement de 2 et 1%) (rapport Afssa, février 2008).

Les limicoles européens, quant à eux, ne joueraient pas de rôle dans l'écologie des virus influenza aviaires, contrairement aux limicoles d'Amérique du Nord (rapport Afssa, février 2008).

Les différents sous-types HA et NA ne sont pas distribués de façon égale à l'intérieur de la population de canards. Ainsi, dans une étude, il apparaît que les sous-types H6, H3 et H4 de l'HA et les sous-types N8, N2 et N6 de la NA y sont prédominants (Sharp *et al*, 1997). Inversement, certains sous-types de l'HA ne sont typiquement isolés qu'en faible nombre chez les canards sauvages, notamment les sous-types H5 et H7. Cette observation a d'ailleurs conduit un chercheur à émettre l'hypothèse que les canards sauvages ne seraient peut-être pas le principal réservoir pour tous les sous-types HA des virus influenza (Sharp *et al*, 1993). Cependant, les virus influenza provenant des oiseaux aquatiques migrants sont toujours considérés comme la première source d'infection de la volaille (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

### **c. Preuves de l'adaptation du virus à son hôte**

D'autres arguments soutiennent cette théorie du réservoir représenté par les oiseaux aquatiques sauvages. En effet, chez d'autres espèces animales comme le poulet, la dinde ou les mammifères, les virus influenza A ont un taux d'évolution rapide. Ceci est supposé être la conséquence de changements adaptatifs du virus pour survivre chez des espèces hôtes anormales. En revanche, chez les canards, le taux d'évolution des virus influenza est lent. Ces derniers semblent avoir atteint un état de stase évolutive chez cette espèce, avec aucune preuve d'évolution nette au cours des 60 dernières années. Cette constatation semble être liée au fait que le virus est bien adapté à cette espèce et que des changements de nucléotides ne lui confèrent aucun avantage sélectif (Murphy et Webster, 1996).

D'autre part, les canards infectés par les virus influenza A ne présentent généralement aucun signe clinique alors que ces mêmes virus peuvent être responsables d'épidémies de maladies sévères lorsqu'ils sont transmis à d'autres espèces aviaires ou à des mammifères, incluant l'Homme (Sturm-Ramirez *et al*, 2004). La nature non virulente des infections à virus influenza aviaire chez les canards peut être le résultat d'une adaptation du virus à cet hôte au cours des siècles, créant un réservoir qui assure la perpétuation du virus (Murphy et Webster, 1996).

Les canards domestiques, qui sont communément infectés par les virus influenza aviaires, jouent probablement un rôle important dans la transmission des virus à partir du réservoir naturel sauvage aux autres espèces aviaires et aux mammifères (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

## **2. Evolution du pouvoir pathogène pour le canard** (Sturm-Ramirez *et al*, 2004)

Les virus influenza ont longtemps été dans un état de stase évolutive chez les oiseaux aquatiques sauvages, provoquant habituellement une infection silencieuse. Jusque fin 2002, tous les sous-types, y compris les virus H5N1 hautement pathogènes pour la volaille, ne causaient aucun signe clinique chez les canards. Cependant, cet équilibre a été rompu avec l'émergence, en décembre 2002 à Hong-Kong, d'un génotype unique du virus H5N1 hautement pathogène. Ce nouveau génotype, nommé Z+, a causé la mort de nombreux oiseaux aquatiques sauvages, dont des canards. L'épizootie a débuté dans deux parcs de Hong-Kong (Penfold Park et Kowloon Park) abritant des populations d'oiseaux aquatiques résidents ainsi que des oiseaux sauvages en migration venant régulièrement s'alimenter dans les bassins. A Penfold Park, 31 oiseaux aquatiques succombèrent au virus ; les autres furent abattus pour des raisons de protection sanitaire. A Kowloon Park, l'ensemble des oiseaux

résidents furent isolés et placés en quarantaine dès que le virus H5N1 fut identifié. Au total, 105 oiseaux décédèrent. Pour la première fois depuis 1961, on enregistra de la mortalité causée par un virus influenza parmi les oiseaux aquatiques, en particulier les canards. La plupart des oiseaux touchés par l'infection sont décédés rapidement sans signe clinique mais dans 40% des cas des signes d'atteinte sévère du système nerveux central ont été notés.

Par la suite, des études d'infections expérimentales menées sur des canards sont venues confirmer ces observations.

Selon certains auteurs (Webster, cité par van Den Berg, 2006), la plupart des souches de virus H5N1 HP isolées au Vietnam, en Indonésie et en Thaïlande après 2002 sont devenues hautement pathogènes pour le canard domestique. Selon d'autres (Pantin-Jackwood *et al.* 2006 ; Pantin-Jackwood et Swayne, 2007), ces souches, après être devenues hautement pathogènes pour le canard en 2002, auraient ensuite retrouvé un caractère peu pathogène pour cette espèce, en liaison avec une durée d'excrétion prolongée de quelques jours et une charge virale plus élevée.

## **B. Déroulement de l'infection chez le canard**

### **1. Cas des virus influenza A isolés avant fin 2002**

Avant l'émergence des nouveaux virus H5N1 lors de l'épizootie de Hong-Kong, les canards étaient considérés comme peu sensibles à tous les virus influenza A y compris les souches hautement pathogènes pour le poulet et la dinde. Les signes cliniques produits par une infection à un virus influenza sont cependant susceptibles de varier en fonction de l'âge des animaux, de la présence d'une infection bactérienne concomitante et des facteurs environnementaux (Alexander, 1993).

#### **a. Une infection entéritique silencieuse à transmission fécale-orale pour les VIA FP**

Des canards (*Anas platyrhynchos* et *Cairina moschata*) infectés expérimentalement par voie orale et intra-trachéale avec différents VIA FP isolés à partir d'écouvillons cloacaux de canards sauvages ne déclarent jamais de signe de maladie. Dès la première heure suivant l'inoculation, du virus peut être détecté dans des écouvillons cloacaux sans jamais être détecté dans le sang ou d'autres organes. A partir du deuxième jour, le virus est détectable dans les poumons et avec un titre élevé dans le rectum. Il reste ensuite présent uniquement dans le caecum et le rectum et est excrété à forte concentration dans les fèces. Cela suggère que les virus influenza passent dans le tube digestif des canards et se répliquent dans les portions intestinales distales. Le site précis de réplication a été localisé aux cellules mucosales bordant tous les segments d'intestin postérieurs au duodénum (Webster *et al.*, 1978). Certains auteurs ont identifié les cellules épithéliales non différenciées des cryptes intestinales comme le site de réplication privilégié des VIA FP (Kida *et al.*, 1980). D'autres ont cependant récemment montré que les cellules épithéliales intestinales différenciées étaient le site de réplication majeur de virus influenza H7N1 faiblement pathogènes (Soubies *et al.*, 2010). Il est en réalité probable que la localisation histologique précise de réplication des VIA FP dans l'intestin des canards soit influencée par la souche virale ou par des déterminants dépendants de l'hôte (Soubies *et al.*, 2010).

Ces observations ont été vérifiées pour les virus influenza faiblement pathogènes et sont également vraies pour le poulet (Wood *et al*, 1995). D'autre part, la forte concentration virale dans les fèces des canards ainsi que la longue stabilité des virus dans une eau non chlorée (plus de 30 jours à 4°C) offre un mode de transmission logique des virus influenza par la voie fécale-orale (Webster *et al*, 1978).

### **b. Particularité des virus influenza hautement pathogènes pour le poulet**

L'infection de canards avec des virus influenza hautement pathogènes pour le poulet ne provoque pas non plus de signe clinique. En revanche, les sites de réplication des virus ne sont plus limités au tube digestif distal et à l'appareil respiratoire mais à la plupart des tissus de l'organisme. La quantité de virus détecté dans les tissus des canards est similaire à celle observée chez les poulets avec une exception notable, le cerveau. Cet organe est en effet le tissu le plus sévèrement infecté chez le poulet alors qu'il est celui présentant la charge virale la plus faible chez le canard. Cette association entre le pouvoir pathogène et la charge virale dans le cerveau peut probablement expliquer la faible pathogénicité chez le canard de virus influenza hautement pathogènes chez le poulet (Wood *et al*, 1995).

## **2. Cas des virus influenza A H5N1 HP de génotype Z+ isolés à partir de fin 2002**

### **a. Une infection systémique létale**

#### **i. Observations de terrain lors de l'épizootie de Hong-Kong**

Les virus H5N1 HP qui ont émergé à Hong-Kong en décembre 2002 ont provoqué des signes cliniques sévères ainsi qu'une forte mortalité parmi les canards de Penfold Park et Kowloon Park. De nombreux animaux sont décédés rapidement sans symptôme. Les autres ont présenté une perte d'appétit, de la léthargie, une perte de poids, des difficultés à se déplacer ainsi que des dysfonctions sévères du système nerveux central (dépression, paralysie, convulsion, port de tête anormal). Une minorité d'oiseaux a présenté du jetage, de l'épiphora et de la diarrhée. Dans tous les cas, les canards qui ont manifesté des signes cliniques sont morts en l'espace d'une journée (Sturm-Ramirez *et al*, 2004).

#### **ii. Description d'infections expérimentales**

Les observations cliniques faites sur des canards infectés expérimentalement varient légèrement selon les études (Sturm-Ramirez *et al*, 2004 ; Löndt *et al*, 2008 ; Vascellari *et al*, 2007). Tous les auteurs enregistrent cependant un taux de morbidité et de mortalité important (proche ou égal à 100%). Les rares animaux survivants présentent des séquelles neurologiques irréversibles incompatibles avec la survie en milieu naturel. Les premiers symptômes observés débutent entre le deuxième et le quatrième jour post-infection. Ils consistent en de la léthargie, de l'ataxie, une perte de poids importante (Sturm-Ramirez *et al*, 2004) ou en une légère dépression accompagnée d'une conjonctivite (Vascellari *et al*, 2007). La maladie progresse ensuite rapidement en 1 à 3 jours vers des symptômes neurologiques sévères (torticolis, incoordination, convulsions, secouements de tête incontrôlés). Le temps de survie varie entre 3 et 7 jours. Une étude rapporte une progression plus rapide de l'infection avec l'apparition d'emblée de signes neurologiques suivie d'une détérioration rapide de l'état général nécessitant l'euthanasie des canards dès le lendemain de l'apparition des signes cliniques (Löndt *et al*, 2008).

### **b. Transmission du virus par la voie orale-orale**

Des écouvillons cloacaux et trachéaux réalisés sur les canards infectés révèlent une charge virale très basse dans les écouvillons cloacaux. Cette charge virale est en revanche significativement plus élevée dans les écouvillons trachéaux (Löndt *et al*, 2008 ; Sturm-Ramirez *et al*, 2004). L'excrétion cloacale disparaît rapidement (dès quatre jours post-infection) alors que les canards survivants excrètent du virus par la trachée pendant 10 jours (Sturm-Ramirez *et al*, 2004). Une étude d'immunofluorescence indirecte réalisée sur les organes de canards touchés par le virus H5N1 en Thaïlande montre 10 à 30% de positivité dans les tissus respiratoires alors qu'aucun antigène viral n'est détecté dans le rectum et que la positivité dans le duodénum n'est que de 5% (Antarasena *et al*, 2006). Ces observations prouvent que la voie classique de transmission des virus influenza par la voie fécale-orale a changé avec les nouveaux virus H5N1. Ainsi, la transmission par aérosol et par la voie orale-orale est devenue le mode principal de transmission (Antarasena *et al*, 2006 ; Sturm-Ramirez *et al*, 2004 ; Löndt *et al*, 2008).

### **c. Acquisition d'un neurotropisme et d'un cardiotropisme**

L'étude du tropisme tissulaire montre des pics de présence du virus dans de nombreux organes durant la phase précoce de l'infection suivie d'une chute rapide de la charge virale. En revanche, à partir du troisième jour, une charge virale élevée est détectée dans le cerveau et le cœur. La présence du virus augmente de façon continue dans ces deux organes jusqu'à la mort des animaux (Sturm-Ramirez *et al*, 2004 ; Löndt *et al*, 2008). Aucun signal n'est en revanche détecté dans les entérocytes mais le virus est présent dans les neurones du plexus myenterique chez certains animaux (Löndt *et al*, 2008). Ces résultats montrent que les virus H5N1 HP émergents ont une dissémination systémique massive chez le canard et ont acquis des caractéristiques neurotropiques marquées. La mort des animaux est probablement la conséquence du développement rapide d'une insuffisance des deux organes les plus touchés que sont le cœur et le cerveau (Löndt *et al*, 2008). L'analyse histopathologique des différents organes montre des lésions d'encéphalite avec dégénérescence neuronale et nécrose multifocale chez tous les animaux (Löndt *et al*, 2008 ; Sturm-Ramirez *et al*, 2004). Le cœur et les muscles squelettiques font également partie des organes les plus touchés avec des lésions de nécrose multifocale des cardiomyocytes et des myofibrilles (Löndt *et al*, 2008). Une étude rapporte également le pancréatotropisme marqué d'un virus H5N1 isolé au Vietnam en 2005 (Vascellari *et al*, 2007). A l'analyse histopathologique, les canards infectés par ce virus présentent essentiellement des lésions de nécrose multifocale dans le cerveau (60% des cas) et le pancréas (40% des cas).

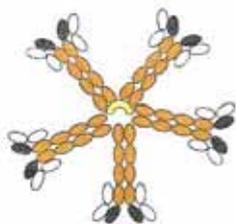
Les canards sont donc le principal réservoir des VIA FP avec lesquels ils entretiennent une relation stable caractérisée par l'absence de signe de maladie. Quels mécanismes immunitaires rendent possible une telle relation ? Le paragraphe suivant s'intéresse à l'immunité à médiation humorale et expose une synthèse des connaissances actuelles sur la structure et le rôle des immunoglobulines du canard. Afin de comprendre comment les virus influenza interagissent avec ce système anticorps, les données scientifiques traitant de la réponse sérologique des canards face aux VIA seront ensuite présentées.

### **C. Structure et fonction des immunoglobulines du canard**

Les oiseaux possèdent trois classes d'anticorps : les IgM, les IgY et les IgA. Le canard (tout comme les autres espèces de l'ordre des Anseriformes) possède en plus une version tronquée de l'IgY : l'IgY ( $\Delta$ Fc) (Lundqvist *et al*, 2006). Ces anticorps sont présents dans le sérum et les sécrétions des canards avec une distribution tissulaire différente. Les IgM, les IgY et les IgY tronquées se trouvent dans le sérum alors que les IgA sont exprimées dans diverses sécrétions (Magor *et al*, 1998 ; Higgins *et al*, 1987).

#### **1. Les IgM**

Les IgM sont la seule classe d'anticorps retrouvée chez tous les vertébrés. Elles sont présentes sous deux formes : une forme polymérique circulante, sécrétée et soluble, ainsi qu'une forme monomérique qui sert de récepteur membranaire aux antigènes pour les lymphocytes B (Lundqvist *et al*, 2006).



IgM circulante



IgM transmembranaire

**Figure 7** : Représentation schématique des deux formes d'IgM du canard (Lundqvist *et al*, 2006)

L'IgM circulante du canard a un poids moléculaire d'environ 800 kDa. Les chaînes lourdes font 86 kDa et les chaînes légères 23-25 kDa (NG et Higgins, 1986). Comme chez d'autres espèces, elle est le premier anticorps sérique produit au cours de la réponse immunitaire (Parham, 1995). Ainsi, on la détecte dès 5 jours suivant une infection (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

## **2. Les IgY et IgY ( $\Delta$ Fc)**

Les IgY sont les anticorps circulants majeurs des oiseaux (Lundqvist *et al*, 2006 ; Parham, 1995). Ce sont des protéines bifonctionnelles : les sites de liaison des bras se fixent à l'antigène tandis que les sites effecteurs du pied assurent le transport de l'antigène aux éléments du complément et aux phagocytes (Parham, 1995).

### **a. Adoption d'une nouvelle nomenclature**

Les deux formes d'IgY du canard étaient anciennement désignées par leur coefficient de sédimentation (7,8S pour l'IgY la plus grande et 5,7S pour l'IgY tronquée). Cependant, Magor *et al* ont proposé une nouvelle nomenclature basée sur les caractéristiques structurales de ces deux immunoglobulines. Ainsi, du fait de la forte ressemblance de la région constante de la chaîne lourde de l'IgY du canard avec celle du poulet (plus de 50% d'acides aminés identiques, conservation absolue du nombre et de la position des résidus cystéine et tryptophane, deux sites potentiels de N-glycosylation), il a semblé approprié de dénommer cette immunoglobuline « IgY ». Pour faire apparaître l'absence de la région Fc au niveau de l'IgY tronquée, il a été choisi de l'appeler « IgY ( $\Delta$ Fc) » (Magor *et al*, 1992).

### **b. Particularité structurale des IgY ( $\Delta$ Fc)**

L'apparition des IgY dans le sérum au cours de la réponse immunitaire est différée par rapport à celle des IgM. De plus, chez le canard, au fur et à mesure du développement de la réponse immunitaire, les IgY bifonctionnelles laissent la place aux IgY tronquées, plus petites, qui peuvent lier les antigènes mais n'ont pas de site effecteur (Parham, 1995). En effet, les IgY et les IgY tronquées diffèrent dans la taille de leurs chaînes lourdes (Magor *et al*, 1992). La chaîne lourde des IgY consiste en un domaine à région variable et quatre domaines à région constante, tandis que la chaîne lourde des IgY tronquées possède un domaine à région variable et seulement deux domaines à région constante. L' IgY tronquée est donc un anticorps privé des domaines correspondant à la région Fc, siège de la fonction effectrice (Magor *et al*, 1992 ; Parham, 1995).

### **c. Origine génétique de la diversité structurale des IgY du canard**

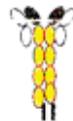
Les canards possèdent donc en tout trois formes d'IgY : une forme circulante avec quatre domaines à région constante, une forme récepteur membranaire et une forme tronquée avec seulement deux domaines à région constante (Magor *et al*, 1992 ; Parham, 1995 ; Magor *et al*, 1994).



IgY circulante



IgY ( $\Delta$ Fc)



IgY transmembranaire

**Figure 8** : Représentation schématique des trois formes d'IgY du canard (Lundqvist *et al*, 2006)

La base génétique de la diversité structurale observée parmi les chaînes lourdes des IgY du canard est à présent élucidée. Magor *et al* ont tout d'abord montré qu'il existait deux messages matures et indépendants, correspondant à chacune des chaînes lourdes des deux immunoglobulines circulantes (Magor *et al*, 1992). Puis, ces mêmes chercheurs ont prouvé qu'il existait un gène unique codant pour les chaînes lourdes des trois formes d'IgY du canard (Magor *et al*, 1994). Les régions constantes des trois isoformes de chaînes lourdes sont codées par sept exons qui subissent des voies alternatives de traitement des ARN pré-messagers afin de générer les trois sortes d'ARNm codant pour les chaînes lourdes.

#### **d. L' IgY ( $\Delta$ Fc) : immunoglobuline prédominante du canard au rôle inconnu**

Le ratio IgY/IgY ( $\Delta$ Fc) dans le sérum est d'environ 3/5. Cependant, la forme tronquée prédomine dans la réponse immunitaire tardive. Alors que les IgY et les IgY ( $\Delta$ Fc) sont toutes deux transmises du jaune de l'œuf à l'embryon, la forme non tronquée est transmise majoritairement (Lundqvist *et al*, 2006).

Aucune étude ne s'est rigoureusement interrogée sur l'importance fonctionnelle des IgY ( $\Delta$ Fc). Cependant, certains scientifiques qualifient la réponse immunitaire du canard d'« incompétente ». En effet, ses anticorps sont produits en quantité suffisante et sont capables de lier efficacement les antigènes. Ils peuvent donc participer à l'activité de neutralisation. En revanche, ils sont déficients dans les fonctions effectrices biologiques secondaires comme la précipitation, l'agglutination, la fixation du complément et l'opsonisation (Humphrey *et al*, 2004). Cette déficience s'explique par la prédominance dans le sérum de l' IgY ( $\Delta$ Fc) qui ne possède pas de région Fc (Magor *et al*, 1992). Humphrey *et al* ont notamment montré que l'augmentation du taux sérique d' IgY ( $\Delta$ Fc) en réponse à une exposition répétée à un antigène diminuait de façon marquée la phagocytose des complexes immuns par les phagocytes mononucléés (Humphrey *et al*, 2004). Or, ce mode de clairance des complexes immuns est à médiation Fc.

Malgré cet handicap apparent, les canards survivent relativement bien dans leur environnement humide et sale. Il est donc tout à fait possible que l' IgY ( $\Delta$ Fc) joue un rôle dans l'immunité qui n'a pas encore été élucidé.

#### **e. Origine évolutive des IgY et conséquences fonctionnelles**

Les IgY étaient anciennement appelées IgG du fait de leur ressemblance avec les IgG de mammifères. Cependant, les IgY diffèrent des IgG car elles possèdent un domaine à région constante supplémentaire (Lundqvist *et al*, 2006).

Il est probable qu'une molécule IgY-like ait été le précurseur évolutif des IgG et IgE de mammifères. Des arguments phylogénétiques ainsi que l'analyse des gènes codant pour les chaînes lourdes des IgY, IgG et IgE viennent appuyer cette hypothèse. D'autre part, l'IgY combine à la fois les fonctions de l'IgG et de l'IgE. En effet, tout comme l'IgG, l'IgY est l'anticorps systémique majeur impliqué dans la fixation du complément, l'opsonisation et le transfert maternel du jaune d'œuf à l'embryon. De même, tout comme l'IgE, l'IgY est un anticorps sensibilisant les tissus et est impliqué dans les réactions anaphylactiques du fait de la très forte affinité des domaines à région constante pour les récepteurs des mastocytes (Magor *et al*, 1994).

Si l'IgY combine à la fois les propriétés des IgG et des IgE, son rôle protecteur contre l'infection peut donc induire un risque mortel par choc anaphylactique. Cependant, grâce au

mécanisme d'épissage alternatif de l'ARNm, les canards peuvent augmenter la concentration de sites de liaison des antigènes sans augmenter parallèlement l'engagement de puissants effecteurs, par la production d' IgY ( $\Delta Fc$ ). Il est ainsi possible que la prédominance des IgY ( $\Delta Fc$ ) dans le sérum des canards explique qu'ils aient une relation plus « amicale » avec les virus que d'autres oiseaux, comme le poulet (Parham, 1995).

### **3. Les IgA**

#### **a. Expression du système IgA du canard**

Les IgA sont les anticorps impliqués dans les fonctions de défense au niveau des surfaces externes de l'organisme. Ils sont présents uniquement chez les mammifères et les oiseaux. Ces anticorps ont été retrouvés dans les sécrétions des tractus digestif, respiratoire et reproducteur ainsi que dans les sécrétions lacrymales et dans la bile (Lundqvist *et al*, 2006). Cependant, chez le canard, l'expression des IgA est la plus forte au niveau des tractus respiratoire, alimentaire et reproducteur (Magor *et al*, 1998). Très peu d'IgA sont excrétées par les glandes de Harder dans cette espèce. En comparaison, la glande de Harder est une source importante d'IgA orbitale chez le poulet. Il est donc probable que le système IgA du canard soit relativement peu développé (Magor *et al*, 1998).

#### **b. Description de l'IgA biliaire du canard**

Pamela L. K. NG et D. A. Higgins ont été les premiers à montrer que la bile du canard était une source d'immunoglobulines (NG et Higgins, 1986). Ces immunoglobulines biliaires, anciennement nommées IgX, sont des polymères de 890 kDa. Leurs chaînes lourdes représentent quant à elles 75 kDa. Des comparaisons antigéniques ainsi que la détermination du poids moléculaire de l'Ig biliaire et de ses chaînes lourdes indique des ressemblances avec l'IgM. Cependant, l'Ig biliaire possède des déterminants antigéniques supplémentaires et est sécrétée indépendamment des Ig sériques (NG et Higgins, 1986). Le clonage moléculaire de cette immunoglobuline suggère qu'elle est un véritable homologue de l'IgA (Magor *et al*, 1998). La structure exacte de ce polymère n'est pas connue bien qu'une organisation tétramérique soit plausible (Magor *et al*, 1998 ; NG et Higgins, 1986).



**Figure 9** : Représentation schématique des deux formes d'IgA du canard (Lundqvist *et al*, 2006)

### **c. Hypothèses sur l'origine des IgA biliaires du canard**

Dans la plupart des systèmes immunitaires mucosaux des mammifères, les IgA biliaires sont produites par des cellules plasmiques localisées dans la sous-muqueuse de l'intestin grêle et transportées par le foie du plasma vers la bile. Chez l'Homme, certaines IgA biliaires sont produites directement par la vésicule biliaire. Chez le rat, les IgM biliaires sont les produits d'une sous-population de cellules spléniques qui migre de la rate au foie après une stimulation antigénique. Quant au canard, on sait que son foie contient de nombreux lymphocytes mais leur origine et leur rôle dans la production d'IgA ne sont pas connus (Higgins *et al*, 1987).

### **4. Ontogénie des immunoglobulines du canard**

Les Ig du canard possèdent des schémas ontogéniques différents. Ainsi, les IgM sériques sont détectées à faible concentration chez le caneton de 1 jour. Leur niveau augmente jusqu'à 1-4 mg/ml à 20-25 jours d'âge et reste ensuite stable. Les IgY apparaissent chez le caneton de 1-2 jours à une concentration variant entre 2,7 et 7,6 mg/ml. Leur niveau chute ensuite à 1mg/ml à 10 jours d'âge puis ré-augmente progressivement pour se stabiliser vers 2 mg/ml (NG et Higgins, 1986).

Le système IgA du canard présente quant à lui un développement retardé en comparaison avec celui du poulet (Magor *et al*, 1998). Ainsi, les IgA sont détectées dans la rate du canard à partir de 14 jours d'âge, et dans le duodénum à partir de 7 jours. Cependant, dans cet organe, elles n'atteignent une concentration suffisamment haute qu'à partir de 3-4 semaines (1-10 mg/ml) (Magor *et al*, 1998 ; NG et Higgins, 1986). En comparaison, les IgA sont détectées dans le sérum du poulet dès 5 jours après l'éclosion et dès 8 jours dans la bile (Magor *et al*, 1998).

Ce développement tardif du système IgA chez le canard est probablement une des causes de la haute susceptibilité des canetons de moins de quatre semaines aux maladies infectieuses respiratoires et digestives (Magor *et al*, 1998).

## **D. Réponse sérologique du canard face au virus influenza**

### **1. Réponse sérologique systémique**

#### **a. Résultats d'études d'infections expérimentales**

##### **i. Une réponse anticorps indétectable face aux anciens virus**

Avant l'émergence, en 2002, des nouveaux virus H5N1 hautement pathogènes pour les canards, ces derniers entretenaient une relation calme et stable avec leurs virus influenza. Cette relation hôte/parasite semble être caractérisée par une absence apparente de réponse anticorps face aux virus.

En effet, dès 1980, Kida *et al* montrent que des canards infectés expérimentalement par le virus A/duck/Hokkaido/5/77 (H7N2) ne présentent pas de réponse anticorps détectable dans leur sérum par la technique d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), ou seulement une réponse transitoire et très faible (titre égal au seuil de positivité (1/16) deux à quatre semaines post-inoculation) (Kida *et al*, 1980). Lorsque ces canards sont ré-inoculés avec le même virus

dans les 28 jours suivant la première infection, la réponse sérologique reste là aussi indétectable. Les canards semblent donc résister à la réinfection malgré l'absence d'anticorps détectables dans leur sérum. En revanche, si les animaux sont ré-inoculés 46 jours ou plus après la première infection, une réponse anticorps secondaire évidente est détectée par IHA dans leur sérum (titres compris entre 32 et 256). Ceci suggère que le virus se réplique de nouveau chez ces canards. Pour tenter d'expliquer ces résultats, les auteurs émettent l'hypothèse d'une primo-infection dont la réponse anticorps serait masquée par la formation de complexes-immuns. Une autre possibilité serait de considérer que l'immunité protectrice face au virus ne provient pas de la réponse humorale mais de la réponse à médiation cellulaire ou d'une immunité locale dans le tube digestif (Kida *et al*, 1980).

#### ii. Apparition d'une réponse sérologique face aux nouveaux virus H5N1 HP pour le canard

Le profil de la réponse sérologique des canards face aux virus influenza semble avoir été modifié depuis l'apparition des nouveaux virus H5N1 HP pour le canard. En effet, après infection expérimentale par une souche H5N1 HP létale, les canards survivants présentent des taux d'anticorps hémagglutinants plus ou moins élevés 10 à 15 jours après l'infection (Kim *et al*, 2008 ; Webster *et al*, 2006 ; Middleton *et al*, 2007). Ces taux varient selon les études mais aussi selon la dose de virus inoculée (Middleton *et al*, 2007). Ainsi, Middleton *et al* montrent que des canards infectés expérimentalement avec  $10^{2.7}$  EID<sub>50</sub> du virus létal A/ Muscovy duck/Vietnam/453/2004 (H5N1) ne présentent ni signe clinique ni réponse anticorps à l'IHA 10 jours après l'infection. En revanche, avec des doses infectieuses plus fortes (allant de  $10^{3.7}$  à  $10^{6.7}$  EID<sub>50</sub>), le taux de mortalité est très élevé et les canards survivants présentent des titres anticorps allant de 8 (pour la dose de  $10^{3.7}$  EID<sub>50</sub>) à 128 (pour les doses les plus élevées) 10 jours après l'infection (Middleton *et al*, 2007).

### **b. Résultats d'études d'essais vaccinaux**

#### i. Comparaison avec la réponse sérologique du poulet

De nombreuses études destinées à tester l'efficacité et l'immunogénicité de nouveaux vaccins contre les sous-types H5 et H7 hautement pathogènes pour le poulet mettent en évidence la faible réponse sérologique du canard à la vaccination par rapport au poulet.

Ainsi, après une seule injection intra-musculaire d'un vaccin crée à partir d'un virus H7N7 réassortant, Sakabe *et al* détectent des anticorps hémagglutinants capables de conférer une immunité protectrice chez le poulet dès 8 jours (Sakabe *et al*, 2008). Les titres IHA sériques s'élèvent à plus de 256 à 21 jours puis atteignent un pic 6 semaines après la vaccination (titres compris entre 1024 et 2048). Ils restent ensuite supérieurs à 256 pendant 26 semaines.

Les études réalisées chez le canard montrent en revanche une réponse sérologique très faible, voire indétectable, à la suite de la vaccination, malgré une protection complète contre l'infection par des souches de virus létales pour l'espèce.

Ainsi, Kim *et al* testent l'efficacité de trois vaccins inactivés à virus H5 dérivés de la génétique inverse chez le canard par immunisation après une seule injection intra-musculaire contenant 1 µg de protéine HA (Kim *et al*, 2008). Trois semaines après la vaccination, les titres anticorps moyens induits par deux des vaccins sont détectables à l'IHA mais faibles (titres géométriques moyens de 20 et 35). Pour le troisième vaccin, les titres moyens induits

sont très bas voire indétectables (titres géométriques moyens de 14 chez 4 animaux sur 10). En dosant les anticorps par la technique de séroneutralisation, les auteurs obtiennent des résultats similaires avec des titres indétectables pour deux des vaccins et bas pour le troisième (Kim *et al*, 2008). Malgré cette très faible réponse sérologique, les trois vaccins confèrent une protection complète contre l'infection 3 semaines après vaccination par un virus H5N1 léthal pour le canard.

Middleton *et al* font des constatations similaires dans une étude visant à comparer l'efficacité d'un vaccin monovalent et d'un vaccin bivalent contre un virus H5N1 léthal chez le canard (Middleton *et al*, 2007). Ainsi, après deux immunisations à 3 semaines d'intervalle, les deux vaccins offrent une protection complète des canards contre l'infection par un virus H5N1 léthal trois semaines après la seconde injection vaccinale. Cependant, les titres anticorps détectés à l'IHA la veille de l'infection sont très bas pour le vaccin bivalent (titre de 4 pour 2 animaux, titre de 8 pour un animal sur un total de 15 animaux). Pour le vaccin monovalent, les titres sont plus hauts (compris entre 8 et 64 pour les 15 animaux) sans pour autant être associés à une protection plus élevée.

Dans une étude, l'efficacité et l'immunogénicité d'un vaccin H5 est comparée chez le canard et le poulet (Webster *et al*, 2006). Pour une même dose de vaccin, les titres IHA moyens sont 4 à 8 fois plus élevés chez les poulets que chez les canards 3 semaines après immunisation. Une seconde injection vaccinale réalisée 3 semaines après la première produit une élévation des titres anticorps sériques d'environ 10 fois chez le poulet. Chez le canard, les titres sont seulement multipliés par 4.

#### ii. Comparaison avec la réponse sérologique de différentes espèces d'oiseaux exotiques

Cette particularité des canards à produire une faible réponse sérologique systémique après vaccination contre un virus influenza est également visible par comparaison avec la réponse anticorps d'un large nombre d'espèces d'oiseaux exotiques. Ainsi, une étude publiée en 2007 fait état de la réponse sérologique de 550 oiseaux exotiques répartis dans trois zoos après vaccination avec un vaccin H5N9 inactivé (Bertelson *et al*, 2007). Les animaux sont immunisés à l'aide de deux injections sous-cutanées à 6 semaines d'intervalle puis leur réponse anticorps est analysée par IHA entre 4 et 6 semaines après la deuxième injection vaccinale. Les auteurs constatent des titres anticorps élevés pour la plupart des espèces avec un titre géométrique moyen (GMT) global de 137 et un taux de séroconversion global de 84%. Cependant, il existe des différences significatives de titre selon les espèces et les ordres. Ainsi, l'espèce qui présente la réponse sérologique la plus faible est le canard Mallard avec un GMT de 4 et un taux de séroconversion de 0%. Inversement, le perroquet Amazone est l'espèce qui a le mieux répondu au vaccin avec un GMT de 2195 et un taux de séroconversion de 100%. D'autre part, l'ordre des Ansériformes présente de façon homogène une faible réponse anticorps avec un GMT global de 33. Il partage ainsi le GMT le plus faible avec l'ordre des Sphenisciformes (GMT= 22) et l'ordre des Piciformes (GMT= 23).

### iii. Hypothèses sur l'origine de la protection des canards en l'absence de réponse sérologique

La raison d'une protection complète des canards en l'absence de réponse anticorps détectable pour la plupart des vaccins est encore inconnue aujourd'hui. Il est possible que cette protection provienne d'une immunité à médiation cellulaire (Kim *et al*, 2008 ; Webster *et al*, 2006).

Cependant, la grande majorité des études utilisant l'IHA comme méthode de détection d'anticorps, on peut également suspecter un manque de sensibilité de ce test (Kim *et al*, 2008 ; Webster *et al*, 2006).

Enfin, certains auteurs s'appuient sur le manque de connaissance de la communauté scientifique au sujet des immunoglobulines de canard pour suggérer d'éventuelles propriétés inconnues de ces protéines (Webster *et al*, 2006).

## **2. Réponse sérologique mucoale**

Les virus influenza faiblement pathogènes isolés chez le canard sont des virus épithéliotropes ayant pour cible principale le tube digestif distal de leur hôte. D'autre part, dans les conditions naturelles, les surfaces muqueuses sont les sites d'exposition initiale au virus (Suarez et Schultz-Cherry, 2000). Il est donc probable que les anticorps sécrétés par la réponse immunitaire associée aux muqueuses jouent un rôle important dans la protection contre l'infection.

Des canards (*Anas platyrhynchos*) infectés expérimentalement par voie orale avec différentes souches de virus influenza A H3N2 présentent une élévation de l'activité anticorps de leurs IgA biliaires détectable dès 3 jours post-infection (Higgins *et al*, 1987). Des tests de neutralisation virale indiquent que ces IgA atteignent un pic de concentration 12 jours suivant l'infection puis persistent à un taux relativement élevé pendant au moins 33 jours. D'autre part, la comparaison de la concentration en immunoglobulines et de l'activité anticorps entre le sérum et la bile des canards infectés montre que les IgA biliaires expriment plus d'activité anticorps par mg que les IgM ou les IgY sériques. Le développement de hauts titres anticorps dans la bile coïncide avec la fin de l'excrétion virale dans les fèces.

De plus, Higgins *et al* ont constaté que des canards infectés expérimentalement par des virus influenza isolés dans la même espèce excrètent le virus par voie orale et fécale pendant plusieurs jours. Cependant, ces virus stimulent moins l'activité anticorps des IgA biliaires que les virus influenza d'origine humaine ou porcine pour lesquels aucune excrétion n'est mise en évidence dans les écouvillons cloacaux et oraux. Ainsi, les IgA sont les premiers composants du système immunitaire du canard qui répondent différemment à des virus dont les capacités de réplication sont différentes (Higgins *et al*, 1987).

### **III. Les méthodes d'analyse de la réponse sérologique**

Au cours des 35 à 40 dernières années, de nombreuses techniques ont été développées afin de détecter la présence d'antigènes viraux ou d'anticorps dans les échantillons biologiques (Cross, 2002). Dans le cas d'une suspicion d'infection à influenza aviaire, des méthodes virologiques ou sérologiques peuvent être mises en œuvre en fonction de l'objectif et du contexte (rapport Afssa, février 2008). Si un diagnostic précoce est nécessaire, les méthodes virologiques seront privilégiées, notamment des tests de détection rapide RT-PCR. En effet, les méthodes sérologiques ne permettent pas de détecter l'infection à un stade précoce, la séroconversion ne se produisant qu'en cinq à dix jours au plus tôt. Sur le terrain, l'intérêt de la sérologie réside surtout dans la détection d'infections subcliniques par des virus influenza aviaires faiblement pathogènes, notamment dans le cadre des programmes annuels de surveillance (rapport Afssa, février 2008).

Il existe différentes méthodes de détection d'anticorps dirigés contre les virus influenza aviaires. La méthode la plus pratique, décrite dans le manuel de l'OIE, est le test d'immunodiffusion double en gélose (IDG) (Alexander, 1993). Ce test permet de détecter la présence d'anticorps anti-virus influenza de type A, quel que soit le sous-type viral. En effet, l'IDG détecte les anticorps précipitants dirigés contre les protéines de la nucléocapside (NP) et de la matrice (M1), ces deux antigènes étant communs aux virus influenza de type A (rapport Afssa, février 2008). L'IDG est uniquement qualitative, mais elle demeure la méthode de référence pour les espèces poule et dinde chez lesquelles elle permet une détection assez précoce des anticorps (dès 5-6 jours après infection) (rapport Afssa, février 2008). Cependant, cette technique ne peut pas être utilisée pour toutes les espèces aviaires car toutes ne produisent pas d'anticorps précipitants spécifiques à la suite d'une infection à virus influenza aviaire (OIE, 2009 ; Alexander, 1993). De nombreuses études suggèrent notamment que de tels anticorps seraient absents chez le canard, malgré la présence d'une excrétion virale chez les animaux infectés (Slemons et Easterday, 1972 ; Hinshaw *et al.*, 1980 ; Alexander *et al.*, 1981).

Les trois méthodes décrites ci-après sont celles qui ont été choisies pour l'étude expérimentale présentée dans ce manuscrit.

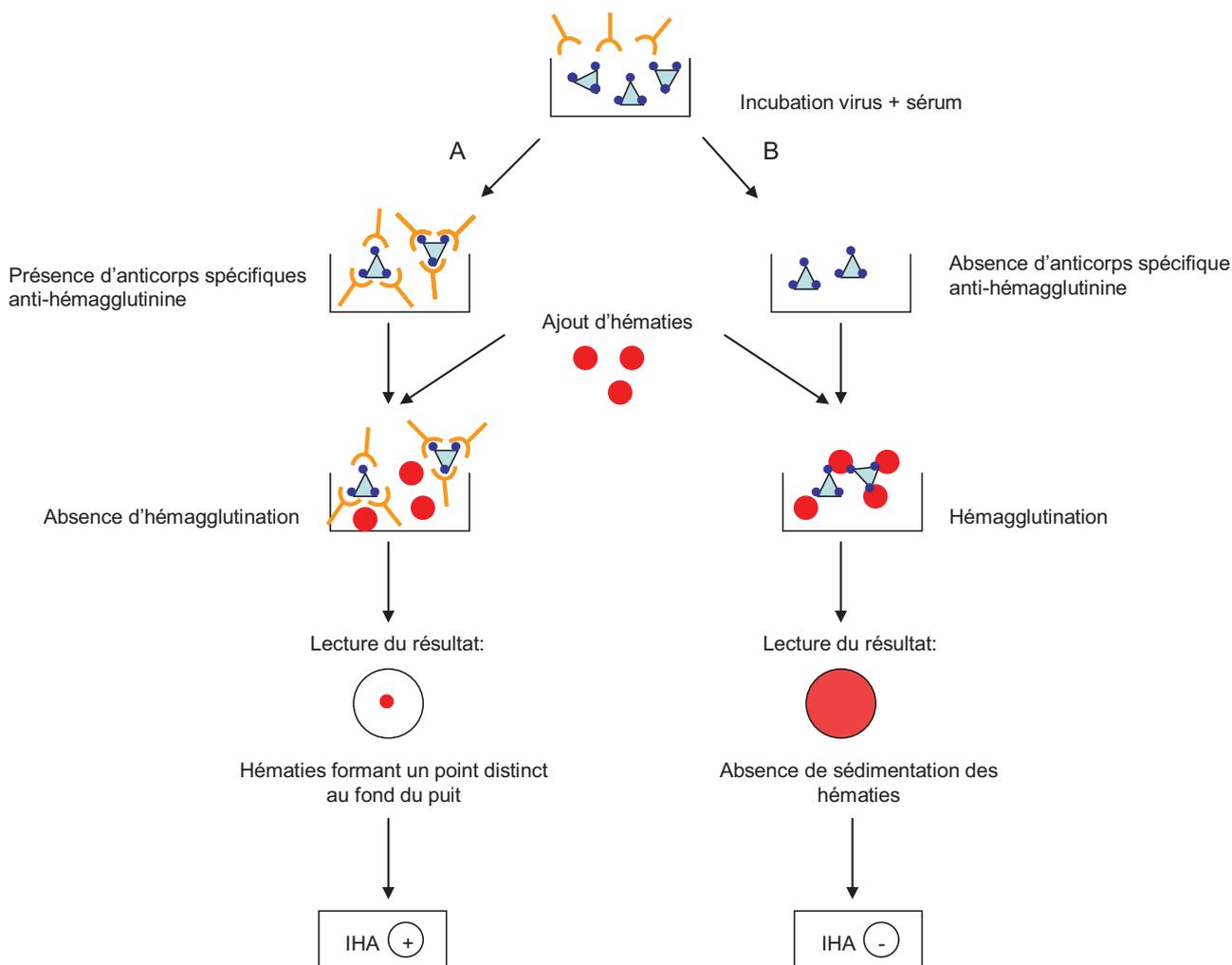
#### **A. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination**

Le test d'inhibition de l'hémagglutination a été développé dans les années 1940. Il est le test le plus fréquemment utilisé pour l'analyse antigénique des isolats de virus influenza et est également largement utilisé pour la détection et le dosage des anticorps dirigés contre de nombreux virus aviaires dont le virus de la maladie de Newcastle, le virus de la grippe aviaire, le virus de la bronchite infectieuse, l'adénovirus hémagglutinant (EDS'76) et le circovirus des Psittacidae (Cross, 2002).

**1. Principe de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination**  
(communications personnelles du CNR Grippe de l'Institut Pasteur)

Cette technique se base sur la propriété qu'ont certains virus d'agglutiner les hématies de différentes espèces animales de façon quantitative et visible macroscopiquement. Dans le cas du virus influenza, l'agglutination est due à l'attachement des molécules d'hémagglutinine par leur site de liaison aux récepteurs des hématies. Ces récepteurs sont des acides sialiques portés par des sialoglycoprotéines et des sialolipides ou gangliosides. Comme l'hémagglutinine est un antigène de surface de la particule virale, l'évaluation de sa quantité permet d'apprécier celle du virus grippal dans une suspension. C'est le principe de la réaction d'hémagglutination.

Des anticorps spécifiques de l'hémagglutinine virale peuvent inhiber la réaction d'hémagglutination. Cette propriété constitue la base du test d'inhibition de l'hémagglutination. Cependant, le sérum de la plupart des espèces animales contient un certain nombre d'inhibiteurs non spécifiques pouvant provoquer des résultats faux positifs. Ces inhibiteurs sont des glycoprotéines plus ou moins analogues aux récepteurs spécifiques du virus qui se trouvent sur la membrane des hématies ou des cellules sensibles. Pour titrer le taux d'anticorps spécifiques, il convient donc de se débarrasser auparavant des inhibiteurs non spécifiques. Notons cependant que les sérums aviaires contiennent rarement de tels inhibiteurs (Palmer *et al*, 1975). Il est également recommandé d'éliminer des sérums les agglutinines naturelles pour les globules rouges de l'espèce utilisée pour le test, par une étape d'adsorption.



**Figure 10 : Principe de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination**

## 2. Réalisation pratique

En pratique, la réaction d'IHA se déroule dans les puits d'une microplaque. Le principe du test est de déterminer, par des dilutions successives, le taux d'anticorps capable d'empêcher l'agglutination d'une concentration standard d'hématies, dans le sérum à tester. Ainsi, une suspension de virus influenza est tout d'abord mise en incubation avec le sérum à tester. Puis, des globules rouges sensibles au virus dans les conditions du test sont ensuite ajoutés dans les puits et l'incubation est poursuivie. Si une agglutination des hématies se produit, cela signifie que le sérum ne contient pas d'anticorps spécifiques du virus. Sur la microplaque de titrage, les hématies forment alors un film qui couvre les côtés et le fond des puits. Inversement, si l'on n'observe pas d'agglutination, le sérum contient des anticorps spécifiques. Les hématies qui n'ont pas été agglutinées tombent au fond des puits et l'observation de la microplaque montre des points distincts au fond des puits (Cross, 2002).

Il est important de noter que les virus influenza ne réagissent qu'avec les globules rouges de certaines espèces animales, et ceci seulement dans des conditions rigoureuses de pH, de force ionique et de concentration en globules rouges (Cross, 2002).

Le délai d'apparition des anticorps IHA post-infection est plus tardif qu'en IDG (environ 10 jours). D'autre part, chez certaines espèces aviaires, les canards en particulier, la réponse IHA est faible et concerne peu d'individus dans un troupeau (rapport Afssa, février 2008). Cependant, l'IHA est toujours considérée comme la méthode de référence pour la détection d'anticorps spécifiques anti-virus influenza aviaire dans les sérums d'oiseaux (Kampf *et al*, 2006) et est encore employée pour des diagnostics sérologiques de routine (OIE, 2009).

## **B. Le test ELISA indirect**

### **1. Principe de l'ELISA et utilisations pratiques**

([http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_immunosorbent\\_assaywikipedia](http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_immunosorbent_assaywikipedia))

ELISA est un acronyme qui signifie « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » c'est-à-dire dosage immunoenzymatique sur support solide. Le principe consiste à visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat, d'une enzyme préalablement fixée à un anticorps secondaire. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps, que pour détecter la présence d'un antigène. Il a également trouvé des applications dans l'industrie de l'alimentation, afin de détecter des allergènes alimentaires, comme le lait, les cacahuètes, les noix et les œufs.

### **2. Principe de fonctionnement des kits ELISA influenza commerciaux**

Il existe plusieurs protocoles ELISA. Dans le cadre de la détection d'anticorps anti-influenza aviaire, les kits ELISA disponibles dans les laboratoires de référence et dans le commerce détectent, pour la plupart, les anticorps dirigés contre la nucléocapside virale (Suarez et Schultz-Cherry, 2000 ; OIE 2009). Ces tests existent en deux formats différents : un ELISA indirect et un ELISA compétitif. L'ELISA indirect utilise des anticorps secondaires anti-immunoglobuline d'espèce, ce qui rend ce test spécifique d'espèce. L'ELISA compétitif, quant à lui, utilise des anticorps monoclonaux de souris qui entrent en compétition avec les anticorps du sérum à tester pour la liaison avec la nucléoprotéine virale. Des anticorps secondaires sont ensuite dirigés contre les anticorps monoclonaux de souris. Ainsi, un sérum positif aura une valeur d'absorbance plus faible. Le principal avantage de l'ELISA compétitif est qu'il peut analyser des échantillons de sérum de multiples espèces d'oiseaux et de mammifères, excepté la souris (Suarez et Schultz-Cherry, 2000).

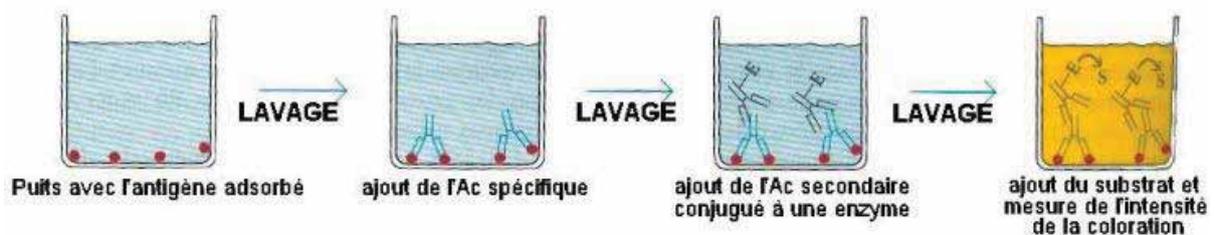
Des tests ELISA permettant la détection d'anticorps spécifiques H7 ou H5 ont également été mis au point (Kampf *et al*, 2006).

Enfin, des kits permettant de titrer les anticorps anti-neuraminidase (N1 en particulier) sont disponibles mais, à ce jour, ils n'ont pas fait l'objet d'une validation internationale. Les tests permettant de différencier des oiseaux vaccinés d'oiseaux infectés, fondés sur la détection des anticorps spécifiques de la protéine non structurale (NS) et de la protéine de matrice 2 (M2), restent encore expérimentaux ou à valider de manière plus approfondie (rapport Afssa, février 2008).

### **3. Réalisation pratique d'un test ELISA indirect en laboratoire**

En pratique, la réaction se déroule dans les puits d'une microplaque. L'échantillon biologique à tester est déposé dans un puit où sont adsorbés les antigènes viraux permettant ainsi aux anticorps spécifiques de se fixer aux antigènes. Un lavage de la plaque est ensuite réalisé afin d'éliminer les anticorps non liés. Des anticorps secondaires anti-partie constante des immunoglobulines de l'espèce sont ajoutés dans les puits afin de détecter les complexes immuns formés. Ces anticorps secondaires sont conjugués à une enzyme qui a pour propriété de réagir avec un substrat incolore pour donner un produit de réaction coloré. Les anticorps secondaires libres sont éliminés par lavage et le substrat chromogène de l'enzyme est ajouté. On obtient alors un signal lumineux qui est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon. Ce signal lumineux est mesuré par sa densité optique grâce à un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption du composé lumineux produit.

Le schéma suivant résume le protocole de l'ELISA indirect :



**Figure 11 : Principe du test ELISA indirect**

(<http://www.inrp.fr/Access/biotic/immuno/html/elisaind.htm>)

Dans ce type de test, le virus influenza peut être utilisé sous forme lysée. Ce sont donc les anticorps dirigés contre tous les types de protéines virales (hémagglutinine, neuraminidase, protéines M1, M2, NP...) qui sont détectés.

## **C. La réaction de séroneutralisation**

### **1. Principe de la réaction de séroneutralisation**

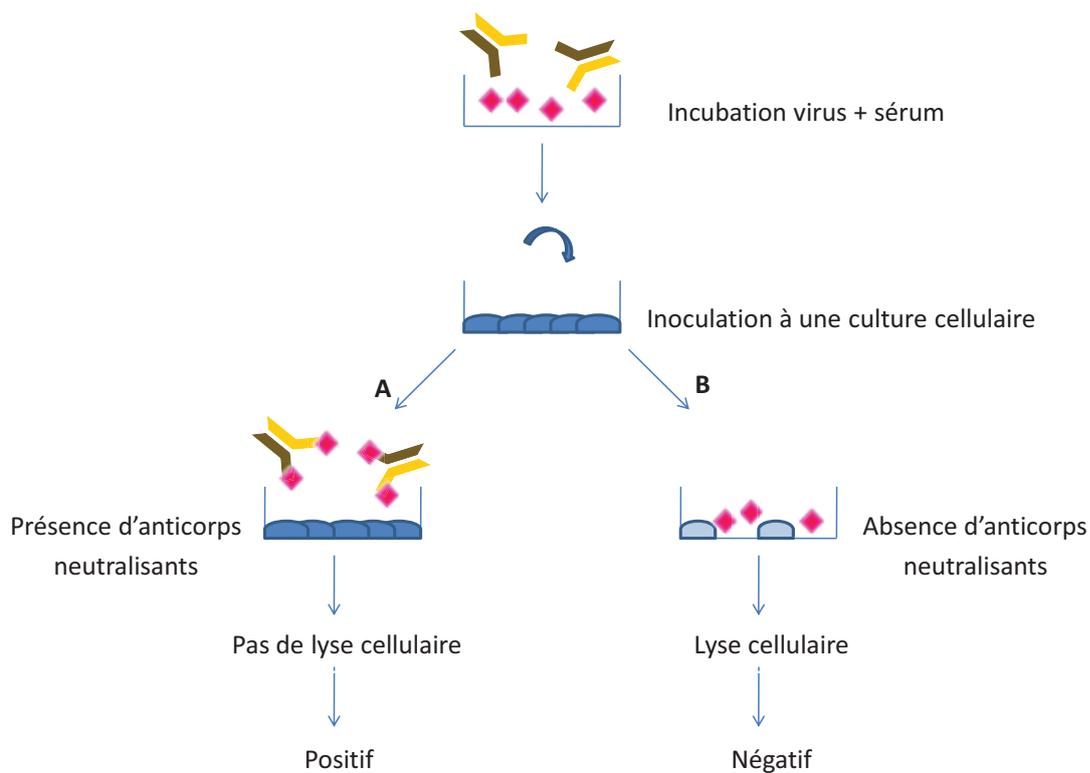
La séroneutralisation est une technique quantitative qui permet de mettre en évidence les éventuels anticorps neutralisants présents dans un sérum. Le principe repose sur l'interaction d'anticorps contre les protéines externes du virus. Ces anticorps préviennent la pénétration et donc la multiplication du virus dans les cellules sensibles.

La réaction de séroneutralisation n'est pas référencée dans le manuel de l'OIE. Pourtant, de nombreux auteurs l'utilisent comme méthode d'analyse de la réponse sérologique de différentes espèces animales ou de l'Homme à la suite d'une infection ou d'une vaccination contre des virus influenza A (Ninomiya *et al*, 2002 ; Jia *et al*, 2008 ; Stephenson *et al*, 2003 ; Meijer *et al*, 2006 ; Lu *et al*, 2001 ; Rowe *et al*, 1999 ; Kayali *et al*, 2008 ; Kim *et al*, 2008 ; Sakabe *et al*, 2008 ; Rao *et al*, 2008).

## 2. Réalisation pratique

Pour mettre en œuvre la réaction, des quantités constantes de virus sont mises en contact avec des dilutions en série du sérum à tester puis inoculées à une culture cellulaire sur microplaques et incubées 3 à 5 jours. Le virus appartient le plus souvent à une souche cytopathogène (c'est le cas du virus influenza). L'absence d'effet cytopathogène traduit donc la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum testé. Lorsque la souche virale n'est pas cytopathogène, la neutralisation virale est appréciée par l'absence de virus d'épreuve lors de détection par immunofluorescence par exemple.

Le schéma suivant résume le principe de la réaction :



**Figure 12 : Principe de la réaction de séroneutralisation**

# **PARTIE II**

## **Etude expérimentale**



Cette étude expérimentale, conduite au laboratoire de virologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), a eu pour objectif d'analyser la cinétique d'apparition des anticorps dans le sérum et dans la bile chez des canards infectés expérimentalement par des VIA H7N1 faiblement pathogènes. Elle s'inscrit, de façon plus large, dans un travail d'analyse des mécanismes immunitaires mis en jeu chez le canard face à une infection à VIA FP. La connaissance de ces mécanismes représente un intérêt majeur dans la mesure où cela permettrait de comprendre pourquoi les canards ont un rôle de réservoir de VIA FP.

En parallèle de l'analyse de la réponse sérologique, l'impact du pouvoir de réplication de la souche virale inoculée sur l'intensité de cette réponse sérologique a également été étudié. Pour cela, deux virus recombinants créés par génétique inverse à partir d'une souche virale mère H7N1 ont été utilisés. Ces deux virus ont fait l'objet d'une précédente étude qui a prouvé leur pouvoir de réplication différent chez le canard (Soubies *et al*, 2010).

Dans cette étude, la réponse anticorps des canards est détectée et quantifiée par trois méthodes d'analyse, entièrement mises au point dans le laboratoire de l'ENVT : la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), la séroneutralisation et un test ELISA indirect. Les résultats obtenus par les deux dernières techniques sont ainsi comparés avec ceux obtenus par la méthode de référence qu'est l'IHA. L'objectif de cette comparaison est d'explorer l'hypothèse selon laquelle la faible réponse sérologique des canards (constatée par de nombreux auteurs) en réponse à une infection par des VIA FP est peut-être due à un manque de sensibilité du test d'IHA. Si la fiabilité de ce test dans la détection des anticorps hémagglutinants chez le canard est mise en cause, il sera alors important pour les organismes officiels, comme l'OIE, d'en tenir compte dans leurs recommandations.

Cette seconde partie est subdivisée en deux chapitres. Le premier est consacré à la présentation du matériel biologique et animal utilisé pour l'étude ainsi qu'à la description du protocole d'infection expérimentale des canards. Il expose ensuite un résumé des différentes étapes de mise au point des trois techniques d'analyses sérologiques. La démarche expérimentale y est décrite et justifiée par des références aux données de la littérature scientifique. Enfin, un protocole final, validé à l'issue de l'étape de mise au point, est présenté pour chaque test, accompagné d'un résumé sous forme de tableau.

Le second chapitre expose un bilan, présenté essentiellement sous forme de graphiques et de tableaux, des résultats obtenus par les trois méthodes de dosage. Différentes comparaisons statistiques sont effectuées afin de répondre aux questions suivantes : Y-a-t-il une différence dans l'intensité de la réponse sérologique en fonction du pouvoir de réplication du virus ? Les évolutions de titre anticorps entre les différents temps d'infection sont-elles significatives ?

Une interprétation critique des résultats issus de cette expérimentation sera réalisée dans la troisième partie.



## **I. Matériel et méthode**

### **A. Animaux de laboratoire**

Des canards de Pékin (*Anas platyrhynchos*) exempts d'organismes pathogènes spécifiés ont été acquis à l'âge de 1 jour auprès du Couvoir de la Seigneurie à Vieilleville en France. Pour permettre leur identification, les animaux sont bagués. Ils sont ensuite placés dans des isolateurs sécurisés pendant toute la durée des expérimentations. De l'eau et de la nourriture leur sont fournies à volonté. Toutes les expérimentations animales réalisées ont été approuvées par le comité d'éthique local de l'INRA.

### **B. Virus influenza**

Deux virus différents ont été utilisés au cours des expérimentations. Ces virus, nommés « virus E » et « virus R », sont issus de génétique inverse à partir d'une même souche virale. Cette souche virale mère a été obtenue auprès du Dr. I. Capua (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie, Legnaro, Italy). Il s'agit du virus Influenza A/turkey/Italy/977/1999(H7N1).

Le virus E est identique à la souche mère. Le virus R diffère du virus E par 2 acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine NS1 : acides aminés ESEV pour le virus E, acides aminés RSKV dans le cas du virus R. Ces deux virus ont été créés initialement pour le besoin d'une étude destinée à tester l'influence du domaine C-terminal des protéines NS1 sur la virulence d'un virus influenza aviaire chez l'Homme (étude *in vitro*), le canard et la souris (études *in vitro* et *in vivo*) (Soubies *et al.*, 2010). La conclusion de cette étude est que le domaine C-terminal des protéines NS1 est un domaine de virulence spécifique d'espèce. Il a notamment été montré que, chez le canard, la présence du domaine RSKV augmentait la réplication virale. Sur le plan immunitaire, cette virulence accrue est associée à une augmentation de transcription du gène Mx, marqueur indirect de la production d'interféron de type I. Cependant, les auteurs n'ont pas étudié la réponse anticorps de l'hôte en fonction du virus inoculé.

Ainsi, les différents travaux menés dans le cadre de l'élaboration de ce manuscrit ont permis de comparer la réponse anticorps des canards, selon que ces derniers sont infectés par le virus E ou le virus R. D'autre part, l'intérêt de l'utilisation de ces deux virus est de pouvoir mesurer l'impact de la vitesse de réplication sur la réponse humorale.

Afin d'obtenir un stock viral plus important, les deux virus sont mis en culture par inoculation à des embryons de poulet par voie allantoïque sur des œufs de 11 jours placés en incubation à 35°C pendant 36 à 48 heures. Le liquide allantoïque est ensuite récolté et réparti en aliquots de 200µl stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **C. Infection des canards et prélèvement des échantillons de sang et de bile**

Les résultats exploités et présentés dans ce manuscrit proviennent d'une expérimentation nommée PX-ANI-A2-29, menée sur 73 canards de Pékin âgés de 17 jours. Les canards ont été répartis en 3 groupes maintenus dans des isolateurs différents : un groupe témoin (animaux non infectés), un groupe infecté par le virus E et un groupe infecté par le virus R.

Chacun de ces groupes a ensuite été divisé en sous-groupes correspondant à des temps d'infection différents (sauf pour les animaux à J0 qui sont les mêmes qu'à J16).

Le tableau suivant résume le schéma expérimental :

Nombre de jours post-infection	Canards témoins (T)	Canards infectés par le virus E (E)	Canards infectés par le virus R (R)
<b>J0</b>		251, 252, 253, 255, 256, 266	257, 260, 261, 262, 263, 267, 268
<b>J1</b>	A, B, C, D, E, F	A, B, C, D, E, F, G	A, B, C, D, E, F, G
<b>J3</b>	G, H, I, J, K, L	H, I, J, K, L, M, N	H, I, J, K, L, M, N
<b>J6</b>	M, N, O, P, Q, R	O, P, Q, R, S, T, U	O, P, Q, R, S, T, U
<b>J16</b>		251, 252, 253, 255, 256, 266	257, 260, 261, 262, 263, 267, 268

**Tableau 1 : Organisation des groupes et des sous-groupes de canards de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

Les canards sont infectés par inoculation intra-nasale de 0,5 ml de virus E ou R dilué dans du PBS et titrant à  $2.10^7$  pfu/ml.

A chaque temps d'infection considéré, des prélèvements sanguins sont réalisés sur tube sec sur les animaux correspondants par ponction dans le sinus veineux occipital puis les canards sont euthanasiés par injection de 1 ml de T61 dans le sinus occipital. Des prélèvements de bile sont alors réalisés. Pour les canards appartenant aux sous-groupes de J0, seuls des prélèvements de sang sont réalisés. Les animaux sont conservés jusqu'à J16 où de nouveaux prélèvements sanguins sont effectués avant de les euthanasier. Les prélèvements de bile sont ensuite effectués.

Enfin, les échantillons de sang sont centrifugés afin de récupérer les sérums puis tous les échantillons biologiques sont aliquotés et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

En raison du faible volume de sérum récolté sur chaque animal, les essais réalisés dans le cadre de la mise au point des différentes techniques d'analyses sérologiques ont parfois été menés à partir de sérums de canards provenant d'autres expérimentations conduites selon un protocole similaire à celui décrit ci-dessus.

#### **D. Sérum positif standard**

Un sérum témoin positif standard est incorporé à chacun des tests des réactions d'inhibition de l'hémagglutination, ELISA et de séroneutralisation. Il s'agit du sérum d'un canard infecté expérimentalement par le virus H7N1 dans un laboratoire italien (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie, Legnaro, Italy). Son titre IHA est de 128. Sa présence permet de contrôler la validité des résultats de chaque test et de vérifier la reproductibilité entre les différents tests d'une même technique de dosage.

Pour des questions de simplification, ce sérum sera nommé « témoin positif H7 ».

## **E. Détection des anticorps anti-hémagglutinine par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)**

### **1. Mise au point d'un test IHA sur sérum**

- **Choix de l'espèce de provenance des hématies**

Les virus influenza ne réagissent qu'avec les hématies de certaines espèces animales (Cross, 2002). Le protocole traditionnel de l'IHA, référencé dans le manuel terrestre de l'OIE, utilise des globules rouges de poulet. En effet, ces derniers offrent l'avantage de sédimenter rapidement car ce sont des cellules larges et nucléées (Stephenson *et al*, 2003). La lecture des résultats est alors aisée.

Cependant, il a été montré que l'utilisation d'hématies de poulet pouvait être responsable d'une relative insensibilité du test d'IHA (Stephenson *et al*, 2003). Le remplacement des globules rouges de poulet par des globules rouges de chevaux permet d'augmenter considérablement la sensibilité du test tout en conservant sa spécificité (Meijer *et al*, 2006 ; Jia *et al*, 2008 ; Stephenson *et al*, 2003). Ce résultat s'explique par l'affinité de liaison entre le virus et les récepteurs acides sialiques des hématies. En effet, les anticorps hémagglutinants sont détectés avec une plus forte sensibilité lorsque la liaison de plus faible affinité du virus aux hématies est exploitée (Meijer *et al*, 2006). Ainsi, l'agglutination des hématies de chevaux requière la reconnaissance de la liaison NeuGc $\alpha$ 2,3Gal alors que celle des hématies de poulet se fait grâce à la liaison NeuAc $\alpha$ 2,3Gal. Or, le virus influenza A(H7) se lie avec plus d'affinité à la liaison NeuAc $\alpha$ 2,3Gal qu'à la liaison NeuGc $\alpha$ 2,3Gal (Meijer *et al*, 2006).

Nous avons testé une batterie de sérums de canards positifs et négatifs sur des tests d'IHA utilisant le virus H7N1 E afin de comparer les résultats obtenus avec les hématies de poulet et les hématies de chevaux. Nous n'avons pas constaté de différence significative de titre liée à l'espèce de provenance des hématies. Cependant, nos résultats sont à considérer avec prudence du fait du faible nombre de sérums utilisé.

Pour prendre en compte les données de la littérature scientifique récente, nous décidons d'utiliser les hématies de chevaux pour notre protocole final d'IHA.

- **Détermination de la concentration optimale en hématies**

Contrairement aux globules rouges de poulets, les hématies de chevaux ne sont pas nucléées et sont plus petites (Stephenson *et al*, 2003). Elles ne séimentent donc pas aussi bien et la lecture des résultats est plus difficile. Avant de les utiliser dans un test d'IHA, il convient donc de déterminer au préalable la concentration optimale de la suspension d'hématies qui doit permettre d'obtenir des résultats facilement lisibles tout en conférant le maximum de sensibilité et de spécificité au test.

Selon les études, cette concentration optimale varie entre 0,75% (Jia *et al*, 2008) et 1% (Meijer *et al*, 2006 ; Stephenson *et al*, 2003).

Nous avons, pour notre part, testé des concentrations de 0,5% et 1%. Pour cela, nous avons choisi de réaliser un titrage du virus H7N1E par la réaction d'hémagglutination en utilisant les deux concentrations de globules rouges à tester. La concentration optimale est la concentration minimale permettant d'obtenir le titre viral connu de 256 UHA. Dans notre cas, la concentration optimale en hématies est de 1%.

- Evaluation de la nécessité d'un prétraitement des sérums de canard

Il n'est pas toujours nécessaire de traiter les sérums destinés à être testés à l'IHA. En effet, dans notre cas, il a été montré que les sérums aviaires ne contenaient que rarement des inhibiteurs non spécifiques (Palmer *et al*, 1975). D'autre part, la présence d'agglutinines naturelles dans les sérums peut être objectivée en mélangeant un échantillon de chaque sérum à tester avec les globules rouges de l'espèce en question. Si une agglutination des hématies se produit, cela signifie que le sérum contient des anticorps dirigés contre les hématies de l'espèce. Une étape d'adsorption est alors nécessaire afin d'éliminer les agglutinines des sérums.

Nous avons choisi, pour notre part, d'incorporer une colonne « contrôle sérum » sur les plaques d'IHA pour chaque sérum testé afin de détecter d'éventuelles hémagglutinations non spécifiques.

Afin d'évaluer la nécessité d'un prétraitement des sérums de canards contre les inhibiteurs non spécifiques, nous avons réalisé des tests d'IHA à partir d'une batterie de sérums positifs et négatifs n'ayant subi aucun traitement (hormis un traitement thermique pour la destruction du complément). Nous avons obtenu de nombreux résultats faux positifs, en particulier pour les sérums négatifs. Nous avons donc recommencé les titrages en traitant au préalable les sérums avec la neuraminidase du vibron cholérique (R.D.E.), ce qui représente la technique de choix pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques des sérums de canards. De façon étonnante, nous avons obtenu des titres encore plus élevés qu'en l'absence de traitement. Nous avons donc choisi de ne pas réaliser de prétraitement des sérums au R.D.E.

Afin de comprendre et de résoudre le problème des résultats faux positifs, nous avons recherché les conditions thermiques optimales de réalisation du test d'IHA.

- Détermination des conditions optimales de température

Afin d'expliquer les résultats faux positifs, nous avons émis l'hypothèse d'une activité enzymatique de la neuraminidase du virus influenza, capable d'altérer la liaison du virus aux hématies en clivant les récepteurs acides sialiques des globules rouges. Pour inactiver cette enzyme, nous avons réalisé des tests d'IHA au froid.

Cette stratégie a notamment été utilisée par Ito *et al* dans des tests d'agglutination destinés à tester la spécificité de liaison des virus influenza A aux récepteurs acides sialiques des hématies de différentes espèces animales (Ito *et al*, 1997). La réalisation des tests à 0°C leur a ainsi permis de réduire au minimum la variabilité expérimentale.

Dans notre cas, nous avons réalisé une série de dosages à partir de sérums positifs et négatifs en comparant les résultats obtenus pour chaque sérum à température ambiante et au froid à +4°C (plaques placées dans de la glace pilée). La réalisation de l'IHA au froid permet de faire disparaître les résultats faux positifs observés à température ambiante.

## 2. Validation d'un protocole d'IHA sur sérum

### a. Titrage du virus par la réaction d'hémagglutination

Pour la mise en oeuvre du test d'IHA, il est recommandé d'utiliser un virus titrant à 4UHA (OIE, 2009). Il faut donc préalablement titrer le virus H7N1E selon la réaction d'hémagglutination (HA) puis le diluer de façon à obtenir 4UHA. Le protocole que nous avons conçu est inspiré des recommandations du CNR Grippe de l'Institut Pasteur (données non publiées).

- ♦ Matériel : - microplaque à 96 cupules en U
  - pipette multicanaux
  - pipettes Eppendorf
  - bac de glace pilée
  - PBS isotonique, 1x
  - hématies de chevaux à 1% lavées 3 fois en PBS
  - 200µl de virus H7N1E à titrer (liquide allantoïque d'œufs embryonnés infectés non dilué)
  
- ♦ Méthode : - réaliser une dilution au ¼ de la solution virale
  - répartir 50µl de PBS dans chaque cupule sauf celles de la première colonne.
  - répartir 100µl de PBS dans les puits de la dernière colonne (« témoin globules rouges »).
  - répartir 100µl de la solution virale diluée dans chaque cupule de la première colonne
  - réaliser une dilution en série au demi (50µl) de la colonne 1 à la colonne 11.
  - répartir 50µl d'hématies de chevaux à 1% dans chaque cupule
  - placer les plaques à +4°C dans la glace pilée
  - attendre que les globules rouges de la colonne témoin (100µl PBS + 50 µl d'hématies) se soient déposés en formant un point distinct au fond des puits (environ 1h), puis lire le titre viral.

Le titre du virus est indiqué par la dilution la plus élevée donnant encore une hémagglutination complète.

N° des cupules	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12= témoin hématies
PBS	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	100
virus	100											0
		50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	rejeter 50µl
dilution	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	
hématies de chevaux à 1%	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

**Tableau 2 : Résumé des différentes étapes du protocole de réaction d'hémagglutination**

La colonne « témoin globules rouges » permet de déterminer le moment de lecture du titre. En effet, avec le temps les hématies ont tendance à sédimenter au fond des puits, et une lecture trop tardive est à l'origine d'un résultat sous-évalué.

♦ Résultat : le virus H7N1 E titre à 256 UHA. Il faut donc le diluer 64 fois pour l'utiliser dans les tests d'IHA.

## **b. Titrage des anticorps hémagglutinants par la réaction d'IHA**

### **i. Protocole**

- ♦ Matériel : - microplaques à 96 cupules en U
  - pipettes multicanaux
  - pipettes Eppendorf
  - bac de glace pilée
  - PBS isotonique, 1x
  - hématies de chevaux à 1% lavées 3 fois en PBS
  - virus H7N1 E
  - sérums à tester traités uniquement pour l'élimination du complément
  - sérum témoin négatif
  - sérum témoin positif H7
  
- ♦ Méthode : - diluer la solution virale dans le PBS pour obtenir un virus titrant à 4UHA
  - utiliser une microplaque à 96 cupules pour chaque sérum.
  - La colonne 11 est le « témoin sérum ».
  - La dernière colonne est le témoin « globules rouges ».
  - répartir 50µl de PBS dans toutes les cupules sauf celles de la première colonne et de la colonne « témoin sérum ».
  - répartir 100 µl de PBS dans les puits de la colonne témoin « globules rouges ».
  - répartir 100µl de sérum dilué au ¼ dans chaque cupule de la première colonne.
  - répartir 50µl de sérum dilué au ¼ dans chaque cupule de la colonne 11.
  - réaliser une dilution en série au demi (50µl) de la colonne 1 à la colonne 11.
  - répartir 50µl de suspension virale dans toutes les cupules affectées au titrage.
  - laisser 30 min à la température du laboratoire
  - répartir 50µl de la suspension de globules rouges de chevaux à 1% dans toutes les cupules.
  - placer les plaques à +4°C dans la glace pilée
  - attendre que les globules rouges de la colonne témoin (100µl PBS + 50 µl d'hématies) se soient déposés en formant un point distinct au fond des puits (environ 1h), puis lire le titre des sérums.

Le titre des sérums est donné par la dilution la plus élevée pour laquelle on observe encore une inhibition de l'hémagglutination. La technique du coulage facilite la lecture des titres. Pour cela, il suffit de pencher les plaques. Seuls les puits dans lesquels les hématies coulent au même niveau que les puits contrôles doivent être considérés comme montrant une inhibition.

Vérifier que le sérum témoin négatif présente un titre inférieur à 16 (seuil de positivité) et que le témoin positif H7 possède un titre égal à une dilution prêt au titre connu. La reproductibilité du titre de ce témoin positif au cours des différents dosages permet de vérifier la reproductibilité des différents dosages entre eux.

Vérifier l'absence d'hémagglutination non spécifique dans la colonne « témoin sérum ».

Les titres IHA doivent être considérés comme positifs s'il y a inhibition à partir d'une dilution de sérum supérieure ou égale à 1/16 en utilisant un virus titrant à 4UHA (OIE, 2009).

N° des cupules	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11= témoin sérum	12= témoin hématies
PBS	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0	100
sérum	100	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0
rejetter 50µl												
dilution	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4	
Virus à 4UHA	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0	0
Laisser 30min à la température du laboratoire												
hématies de poulet à 0,5%	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

**Tableau 3 : Résumé des différentes étapes du protocole de réaction d'inhibition de l'hémagglutination**

ii. Condition d'analyse des sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29

Un groupe représentatif d'échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 a été analysé au cours de quatre manipulations.

L'animal TM (témoin négatif à J6) a servi de témoin sérum négatif pour chacune des manipulations. Les animaux TO et TP sont d'autres témoins négatifs utilisés dans le même but. Cependant, en raison d'une quantité de sérum insuffisante, ils n'ont pas pu être utilisés pour la dernière manipulation.

De nombreux sérums ont été dosés plusieurs fois. Ceci a permis de comparer les titres obtenus entre chaque manipulation et de déterminer un titre moyen. Les manipulations n°2 et n°3 ont ainsi été réalisées à l'identique.

**3. Validation d'un protocole d'IHA sur bile**

Les anticorps spécifiques de l'hémagglutinine virale sont dosés dans les prélèvements de bile, de la même façon que pour les sérums, en suivant le protocole validé lors de l'étape de mise au point de l'IHA sur sérum.

Tous les échantillons de bile de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 ont été analysés au cours de la même manipulation.

La fiabilité des résultats est évaluée grâce à trois biles témoins négatives et au sérum témoin positif H7.

## **F. Détection des anticorps anti-influenza par un test ELISA H7N1 E**

### **1. Mise au point d'un test ELISA H7N1 E sur sérum**

- Production d'un stock de virus H7N1 E :

Afin d'augmenter la quantité de virus disponible, le virus H7N1 E est mis en culture sur des tapis de cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney), qui sont des cellules tumorales de reins de chiens. Ces tapis cellulaires sont contenus dans deux grandes flasques de 175 cm<sup>2</sup> chacune. 40 ml de milieu de culture sont ajoutés dans chaque boîte.

Lorsque la lyse des cellules par le virus est de 100%, le surnageant est récolté puis clarifié par centrifugation à 3000 tours/min. Puis, le titre viral est déterminé de la façon suivante : des cellules MDCK sont mises en culture sur des plaques P6 à la concentration de 10<sup>6</sup> cellules par puit. 200 µl de suspension virale sont déposés dans chaque puit en diluant le virus de 10 en 10. Après 3 jours d'incubation, on compte le nombre de plages de lyse cellulaire par puit, sachant que chaque plage de lyse correspond à une particule virale.

Dans notre cas, on dénombre 20 plages de lyse à la dilution 10<sup>-7</sup>. Ceci équivaut à un titre de 2.10<sup>8</sup> pfu/200 µl, soit 10<sup>9</sup> pfu/ml.

- Inactivation et stockage du virus :

Pour pouvoir être utilisé dans un test ELISA, le virus doit être lysé. Il est pour cela exposé à des rayons ultraviolets. Le temps d'exposition nécessaire pour l'inactiver doit être déterminé. Dans notre cas, deux situations sont testées : 10 min et 15 min. Après chaque temps d'exposition, le virus est titré selon la méthode décrite précédemment. Ainsi, une exposition de 10 min aux UV suffit à obtenir un titre viral de 0 pfu/ml. Par précaution, on fixe le temps d'exposition nécessaire à 12 min.

Le stock de surnageant clarifié est ensuite ultracentrifugé pour culotter le virus (100000 g pendant 2h à + 4°C). Puis, le culot est dilué dans 600 µl de PBS et stocké à -80°C.

- Coating d'une plaque ELISA :

Cette étape a pour but de fixer les antigènes viraux au fond des puits d'une microplaque ELISA à une concentration adaptée. La valeur communément choisie est de 100 ng de protéines virales par cupule. Pour cela, différentes dilutions de virus ultracentrifugé (et préalablement inactivé aux UV) sont testées afin de déterminer celle permettant d'obtenir la concentration la plus proche de la valeur idéale. Une batterie de sérums négatifs et positifs est testée en dilutions sur ces différentes concentrations d'antigènes et les rapports « densité optique positives sur densités optiques négatives » sont calculés respectivement et pour les différentes dilutions. La concentration d'antigènes choisie correspond à celle donnant les rapports les plus favorables (le plus élevé), tout en pondérant ce résultat de façon à rester "économique" en antigène. Ainsi, la dilution optimale du virus a été déterminée à 1/500.

Le virus dilué au 500<sup>e</sup> est alors réparti dans chacun des puits d'une microplaque à raison de 100 µl par puit. La première colonne de la plaque est le « blanc ». On n'y dépose donc pas de virus mais uniquement 100 µl de PBS par puit. La plaque est ensuite placée à incuber dans une étuve à 37°C pendant une nuit.

- Lavage de la plaque et saturation du plastique :

Après une nuit d'incubation, le surnageant est éliminé et la plaque est lavée 3 fois avec du PBS afin d'éliminer les antigènes non fixés. Puis, le plastique est saturé. Cette étape permet de combler les zones où les antigènes viraux ne se sont pas fixés. Du BSA (bovine serum albumin) est habituellement utilisé, mais en raison de son coût élevé nous l'avons remplacé par de la gélatine. La saturation est donc effectuée avec une solution de gélatine à 15 mg/ml à raison de 100 µl par puit. Afin d'éviter que la gélatine ne prenne en masse, la plaque est placée 1h à l'étuve à 37°C.

Puis, le surnageant est de nouveau éliminé et la plaque est lavée 3 fois avec du PBS-Tween à 0,1%. On utilise ici du PBS-Tween à la place du PBS car le Tween est un détergent non ionique permettant de limiter les liaisons non spécifiques lors de l'étape suivante.

- Mise en place des anticorps primaires :

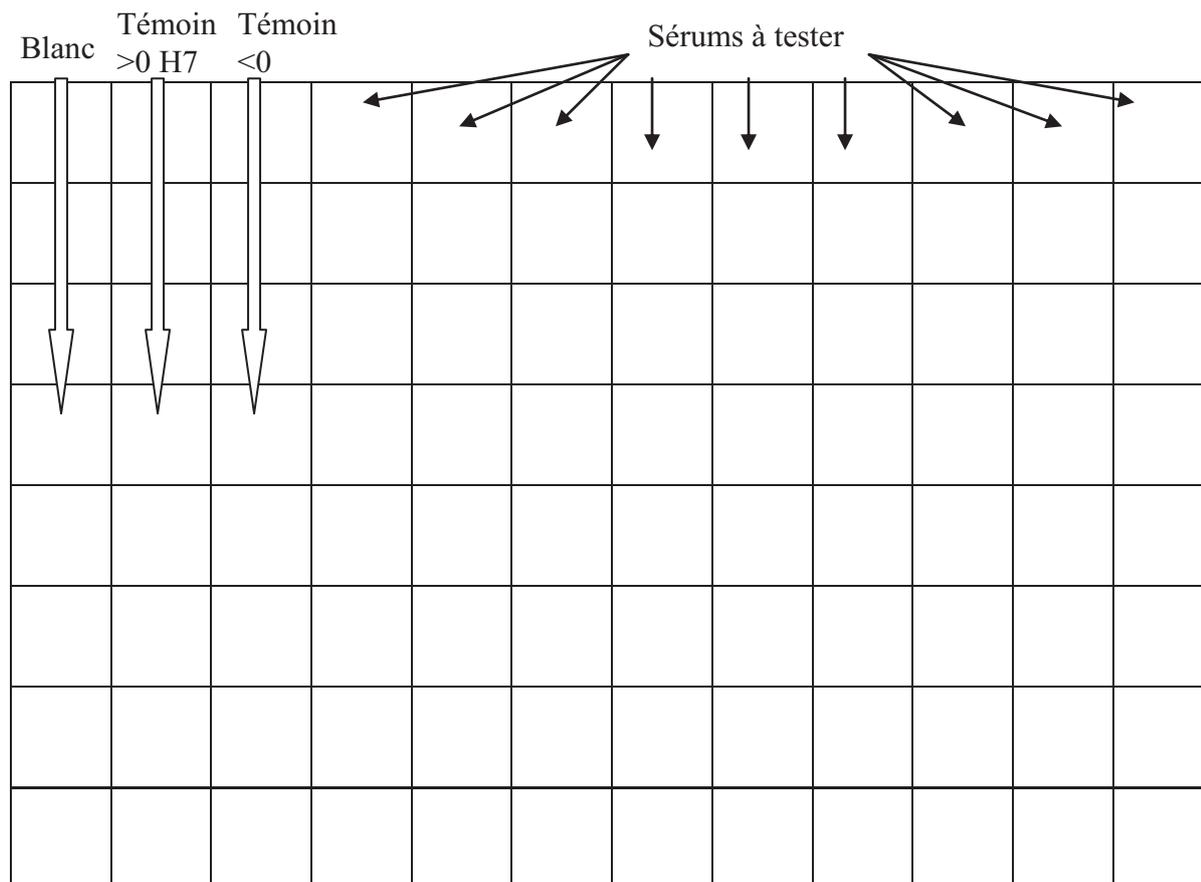
Au cours de cette étape, les sérums de canards à tester sont mis en contact avec les antigènes viraux. Il faut préalablement choisir la dilution initiale des sérums. L'ELISA étant un test très sensible, il n'est pas nécessaire de commencer les dilutions par une concentration initiale de sérum élevée. Cela entacherait de plus la fiabilité du test en lui faisant perdre de sa spécificité. C'est pourquoi, les sérums ne doivent pas être dilués en-dessous du 1/20<sup>e</sup>. Afin de garantir la spécificité du test, il a été choisi de diluer initialement les sérums au 1/50<sup>e</sup>.

Chaque colonne de la plaque ELISA est réservée au titrage d'un sérum (hormis la colonne 1). Ainsi, 200 µl de sérum dilué au 1/50<sup>e</sup> sont déposés dans les puits de la première ligne. 100 µl de PBS-Tween à 0,1% sont déposés dans tous les autres puits. Une dilution en série au demi (100 µl) des sérums est alors réalisée.

Afin de pouvoir évaluer la fiabilité du test, une colonne de la plaque est affectée au titrage d'un sérum témoin positif de titre connu: il s'agit du sérum témoin positif H7.

Une autre colonne est réservée à un témoin négatif à partir duquel le seuil de positivité sera déterminé.

Les sérums sont ensuite placés en incubation 1h à 37°C.



**Figure 13** : Représentation schématique de la répartition des sérums sur une plaque ELISA

- Mise en place des anticorps secondaires :

Ces anticorps sont spécifiques des anticorps de canards. Ils sont, de plus, couplés avec une enzyme (la phosphatase alcaline) qui permettra la révélation lors de l'étape suivante. Ces anticorps secondaires sont donc capables de se fixer spécifiquement aux anticorps de canards préalablement liés aux antigènes viraux.

Après l'incubation des anticorps primaires, le surnageant est éliminé et la plaque ELISA est lavée 4 fois avec du PBS-Tween. Les anticorps secondaires sont dilués au 200<sup>e</sup> dans du PBS-Tween à 0,1% puis déposés dans tous les puits de la microplaque à raison de 100 µl par puit. Les anticorps secondaires marqués sont ensuite placés en incubation 1h à 37°C.

- Mise en place du substrat :

Le substrat de la phosphatase alcaline est le PnPP (Alkaline Phosphatase Yellow). La réaction enzymatique est à l'origine de la production d'un catabolite dont la quantité est proportionnelle à celle de l'enzyme et donc à celle des anticorps primaires.

Après incubation des anticorps secondaires, le surnageant est éliminé et la plaque est lavée 4 fois en PBS-Tween à 0,1% puis une fois en PBS. Le dernier lavage avec le PBS permet d'éliminer les traces de détergent qui peuvent dégrader le substrat PnPP et donc gêner l'activité enzymatique.

Le substrat PnPP est préparé dans du tampon diéthanolamine de pH 9,8, à l'abri de la lumière, et à la concentration de 1 mg/ml. La solution de substrat est ensuite répartie dans chaque puit de la plaque ELISA à raison de 100 µl par puit. La plaque est ensuite placée en incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer le temps d'incubation optimal. En effet, le produit issu de l'activité enzymatique est de couleur jaune. Sa quantité dans chaque puit est évaluée par lecture de la densité optique à 405 nm. Le temps d'incubation optimal est celui permettant d'obtenir l'écart de densité optique le plus important entre le sérum témoin positif et le sérum témoin négatif. Ici, cet optimum est de 16 min.

- Lecture des résultats :

La réaction enzymatique est stoppée après 16 min par ajout de soude 2N à raison de 50 µl par puit. Puis, la lecture des résultats est effectuée dans un spectrophotomètre par détermination de la densité optique de chaque puit à 405 nm.

La colonne « blanc » permet de mesurer le bruit de fond. La densité optique des puits de cette colonne doit idéalement être nulle ou très proche de zéro.

Le seuil de positivité est déterminé à partir du témoin négatif à la dilution la plus faible permettant de conférer une sensibilité suffisante au test. Ce seuil permet de déterminer le titre des autres sérums testés. Pour prendre en compte la variabilité biologique, ce seuil de positivité doit être égal à au moins deux fois la valeur du témoin négatif à la dilution choisie. Dans notre cas, la sensibilité du test ELISA est suffisamment importante pour pouvoir augmenter sa spécificité. On détermine donc le seuil de positivité en multipliant par 3 la valeur du témoin négatif à la dilution choisie.

Afin de contrôler la validité du test, vérifier que le témoin positif H7 présente un titre sensiblement identique lors de chaque manipulation.

Ces différentes étapes de mise au point ont abouti à l'élaboration d'un protocole ELISA définitif à partir duquel les différents prélèvements de sérums ont été analysés.

## **2. Validation d'un protocole ELISA Influenza sur sérum**

### **a. Protocole**

- ♦ Matériel : - microplaque ELISA à 96 puits à fond plat (« Probind » de chez FALCON ref 3915)
  - boîte de pétrie FALCON 35×10 mm
  - erlenmeyer
  - lampe à ultraviolets
  - lecteur de plaques (spectrophotomètre)
  - pipettes multicanaux
  - pipettes Eppendorf
  - agitateur magnétique chauffant
  - balance
  - PBS isotonique 1×
  - PBS isotonique 10×
  - solution mère de Tween à 10%

- gélatine
- anticorps secondaires conjugués (anticorps canard AP [KPL lot ZF 069])
- substrat PnPP (sigma Tabs)
- tampon diéthanolamine de pH 9,8
- soude 2N
- virus H7N1 E « semi-purifié » ultracentrifugé et dilué dans 600 µl de PBS
- sérums de canards à tester
- sérum de canard témoin négatif
- sérum de canard témoin positif H7

♦ Méthode :

1) Tapissage d'une plaque ELISA

- diluer 20 µl de virus H7N1 E ultracentrifugé dans 1 ml de PBS 1× dans une boîte de pétrie FALCON 35×10 mm (dilution au 1/50<sup>e</sup>)
- inactiver le virus 12 min aux UV : placer la boîte de pétrie sans son couvercle sur un support situé à environ 15 cm de la lampe à UV
- diluer le virus inactivé dans 9 ml de PBS 1× (dilution finale au 1/500<sup>e</sup>)
- tapisser les puits de la microplaque avec le virus inactivé à raison de 100 µl par puit, à l'exception de la première colonne (« blanc »)
- remplir les puits de la première colonne avec du PBS 1× à raison de 100 µl par puit
- poser un couvercle sur la plaque et incuber une nuit à 37°C

2) Lavage de la plaque

- éliminer le surnageant
- laver 3 fois avec du PBS 1×

3) Saturation du plastique

- peser 0,30 g de gélatine et la diluer dans un erlenmeyer avec 20 ml de PBS 1× (solution à 15 mg/ml)
- dissoudre la gélatine en la chauffant légèrement sous agitation magnétique
- remplir tous les puits de la microplaque avec la solution de gélatine à raison de 100 µl par puit
- incuber 1h à 37°C

4) Lavage de la plaque

- éliminer le surnageant
- laver 3 fois avec du PBS-Tween à 0,1% (à préparer à partir de la solution mère à 10%)

5) Mise en place des anticorps primaires

- prélever 4 µl de chaque sérum à tester et les diluer dans 196 µl de PBS-Tween à 0,1% (dilution au 1/50<sup>e</sup>). Faire de même pour les témoins
- placer 100 µl de PBS-Tween dans tous les puits sauf ceux de la première ligne
- déposer les 200 µl de chaque sérum dilué dans les puits de la première ligne, sauf celui de la première colonne (« blanc »)
- réaliser une dilution en série au demi des sérums
- incuber 1h à 37°C

- 6) Lavage de la plaque  
 - éliminer le surnageant  
 - laver 4 fois avec du PBS-Tween à 0,1%
- 7) Mise en place des anticorps secondaires  
 - prélever 50 µl d'anticorps secondaires et les diluer dans 10 ml de PBS-Tween à 0,1% (dilution au 1/200<sup>e</sup>)  
 - placer 100 µl d'anticorps secondaires dans tous les puits  
 - incuber 1h à 37°C
- 8) Lavage de la plaque  
 - éliminer le surnageant  
 - laver 4 fois avec du PBS-Tween à 0,1% puis 1 fois avec du PBS
- 9) Mise en place du substrat  
 - dissoudre 2 pastilles de substrat PnPP dans 10 ml de tampon diéthanolamine de pH 9,8 à l'abri de la lumière (solution à 1 mg/ml)  
 - placer 100 µl de substrat dans tous les puits  
 - recouvrir la plaque de papier aluminium et incuber 16 min à température ambiante  
 - stopper la réaction par de la soude 2N à raison de 50 µl par puit
- 10) Lecture des résultats  
 - effectuer la lecture sur le lecteur de plaques à la DO de 405 nm  
 - le titre ELISA des différents sérums est déterminé à partir du seuil de positivité (égal à 3 fois la valeur du témoin négatif à la dilution choisie)  
 - la reproductibilité du titre du témoin positif H7 au cours des différents tests permet de vérifier la reproductibilité des tests ELISA entre eux.

N° des cupules	Virus au 1/500 <sup>e</sup>	I n c u b e r / l a v e r	Gélatine à 15 mg/ml	I n c u b e r / l a v e r	PBS Tween	Sérum au 1/50 <sup>e</sup>		AC II <sup>R</sup> au 1/200 <sup>e</sup>	I n c u b e r / l a v e r	Substrat Pnpp à 1mg/ml	I n c u b e r	Soude 2N
1	100		100		0	200	100	100		100		50
2	100		100		100			100		50		
3	100		100		100			100		50		
4	100		100		100			100		50		
5	100		100		100			100		50		
6	100		100		100			100		50		
7	100		100		100			100		50		
8	100		100		100			100		50		

Rejeter 100 µl

**Tableau 4 : Résumé des différentes étapes du protocole du test ELISA indirect H7N1**

## **b. Condition d'analyse des sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

Six tests ELISA ont été mis en œuvre afin d'analyser un groupe représentatif d'échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29. Les titres moyens ont ensuite été calculés pour chaque animal.

Le témoin positif H7 a été utilisé pour chaque test. Cependant, à partir du test 3, seule une demie colonne lui a été affectée afin d'économiser de la place sur la plaque ELISA. Ainsi, son titre exact n'a pas toujours été déterminé mais la lecture des densités optiques permet de dire qu'il est supérieur à 400. Ce témoin permet de vérifier la validité des tests. De plus, la comparaison de la décroissance des densités optiques le long de la colonne de titrage entre les différents tests permet de contrôler leur reproductibilité.

Le témoin négatif utilisé varie selon les tests. Pour les tests 1 et 2, deux témoins négatifs issus d'une autre expérimentation ont été utilisés. Cela a permis de vérifier la négativité du titre des témoins négatifs à J6 et à J1 de l'expérimentation PX-ANI-A2-29. Le seuil de positivité a donc été calculé à partir de la moyenne des densités optiques de ces deux témoins à la dilution choisie. Pour les autres tests, le témoin négatif est représenté par un mélange en mêmes proportions des sérums des animaux TM, TN, TO, TP, TQ et TR à J6.

## **3. Validation d'un protocole ELISA Influenza sur bile**

### **a. Description de la démarche expérimentale**

- Difficultés liées aux caractéristiques de l'échantillon

La détection des anticorps anti-influenza dans la bile par un test ELISA pose deux difficultés :

- le milieu de la bile est très alcalin et contient beaucoup d'autres molécules que les anticorps anti-influenza. Celles-ci sont susceptibles d'interférer dans la réaction antigène-anticorps.
- les anticorps secondaires utilisés dans le test ELISA ne sont pas dirigés spécifiquement contre les IgA mais contre les IgG. Or, il a été montré que la bile des canards ne contient pas d'IgG mais uniquement des IgA (Magor *et al*, 1998 ; Higgins *et al*, 1987 ; Lundqvist *et al*, 2006 ; NG et Higgins, 1986).

- Traitement des échantillons de bile

Pour pouvoir doser les anticorps anti-influenza dans les échantillons de bile, il faut donc tout d'abord modifier le pH du milieu et concentrer les anticorps.

La correction du pH se fait par ajout de PBS.

Pour concentrer les anticorps, des essais d'ultrafiltration de la bile sont réalisés. Pour cela, on utilise des unités d'ultrafiltration dont le seuil de coupure est de 300 kd. Il faut en effet utiliser un seuil de coupure inférieur au poids moléculaire de la molécule que l'on souhaite retenir. Ici, le poids moléculaire des IgA est de 890 kd, ce qui est bien supérieur au seuil de coupure.

Des échantillons de bile dilués dans du PBS sont donc centrifugés à travers les unités d'ultrafiltration. On utilise pour cet essai la bile des animaux TO et EO. La filtration doit normalement être terminée en 3 min. Or, ici, le temps nécessaire est de 1h30. D'autre part, la concentration finale des biles ultrafiltrées est ici égale à 1,5 fois la concentration initiale. Les prélèvements ont donc été très peu concentrés sur un temps de filtration très long.

- Détermination de la dilution initiale optimale des échantillons

Ces échantillons ultrafiltrés sont testés sur un test ELISA. Deux dilutions initiales sont testées (1/50 et 1/20) afin de déterminer celle qui permet de conférer le maximum de spécificité au test tout en conservant une sensibilité suffisante. Deux sérums d'animaux témoins négatifs provenant d'une autre expérimentation sont utilisés pour déterminer le seuil de positivité. Le sérum positif H7 sert de témoin positif. Il permet de vérifier la validité du test. La dilution au 1/50<sup>e</sup> est celle qui permet d'obtenir la spécificité maximale. Cependant, à cette dilution, le titre de l'animal EO est négatif. En revanche, il est positif à la dilution au 1/20<sup>e</sup>. Afin de garantir la sensibilité du test ELISA sur bile, on choisit donc une dilution initiale des prélèvements au 1/20<sup>e</sup>.

- Comparaison des résultats obtenus sans traitement des prélèvements et validation d'un protocole

En raison de la faible sensibilité du test sur la bile, un autre test ELISA est réalisé afin de comparer les résultats obtenus sur des échantillons ultrafiltrés ou non ultrafiltrés. De façon étonnante, il apparaît que la sensibilité est meilleure sur la bile non ultrafiltrée.

Suite à ces constatations, il est décidé d'analyser les prélèvements de bile de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 de la même façon que les sérums selon le protocole validé lors de l'étape de mise au point. Cependant, les biles sont diluées initialement au 1/20<sup>e</sup> dans du PBS-Tween.

#### **b. Condition d'analyse des biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

3 tests ELISA ont été nécessaires pour doser un groupe représentatif d'échantillons de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29. Une ou plusieurs biles témoins négatifs ont été utilisées pour chaque test. Le seuil de positivité au 1/20<sup>e</sup> a donc été déterminé à partir de la densité optique moyenne des différents témoins négatifs au 1/20<sup>e</sup>. Pour augmenter la sensibilité du test, cette valeur n'a pas été multipliée.

### **G. Détection des anticorps neutralisants par la réaction de séroneutralisation**

#### **1. Mise au point d'un test de séroneutralisation sur sérum**

- Détermination de la concentration optimale en cellules sensibles :

Les cultures cellulaires utilisées pour le test de séroneutralisation doivent être sensibles au virus influenza. Ici, nous avons choisi d'utiliser des cellules MDCK. Les cultures initiales sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal ainsi que deux antibiotiques : la pénicilline (10<sup>4</sup> U/mL) et la streptomycine (10 mg/mL).

Pour la séroneutralisation, des suspensions cellulaires vont être déposées dans les puits d'une microplaque à raison de 100 µl par puit. Il faut préalablement déterminer la concentration en cellules permettant d'obtenir des tapis cellulaires confluents non chevauchants en 24 à 48h. Pour cela, les cultures primaires sont trypsinées afin de rompre les liaisons intercellulaires,

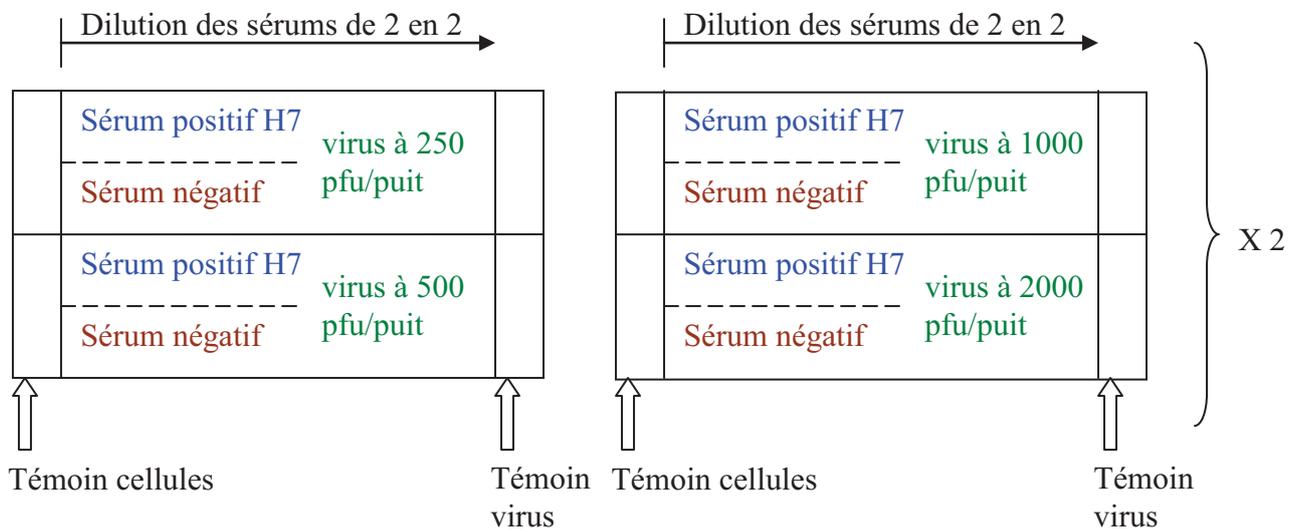
puis lavées avec du milieu de culture. La concentration de la suspension cellulaire ainsi obtenue est déterminée par comptage dans une cellule de Thomas. Des suspensions cellulaires de différentes concentrations sont ensuite créées à partir de la suspension primaire : 100 000 cellules/ml, 200 000 cellules/ml, 300 000 cellules/ml et 400 000 cellules/ml. Puis, chacune de ces suspensions est répartie dans les puits d'une microplaque à raison de 100 µl par puit, puis placée en incubation pendant 24h à 37°C dans une atmosphère enrichie avec 5% de CO<sub>2</sub>. A l'issue de l'incubation, les tapis cellulaires sont fixés et colorés avec du cristal violet à 1% avant d'être observés. Ainsi, seule la concentration de 400 000 cellules/ml permet d'obtenir des tapis cellulaires uniformes et sans chevauchement. Par précaution, une concentration de  $5.10^5$  cellules/ml sera utilisée pour les tests de séroneutralisation.

- Détermination de la concentration optimale en virus :

Afin de déterminer la concentration optimale en virus H7N1, un test de séroneutralisation est réalisé en testant 4 concentrations virales : 250 pfu/puit, 500 pfu/puit, 1000 pfu/puit et 2000 pfu/puit. Deux sérums de titre connu sont utilisés pour ce test : un sérum positif standard (le sérum positif H7) et un sérum négatif (sérum de l'animal J0 255).

Le virus H7N1 utilisé titre à  $3.10^8$  pfu/ml. Les solutions virales correspondant aux quatre concentrations à tester sont préparées à partir de cette solution mère, sachant que le virus sera déposé dans les plaques à raison de 50 µl/puit.

Les sérums sont soumis à un traitement thermique de 56°C pendant 30 min afin de détruire le complément, puis ils sont dilués en série au demi dans des microplaques vierges sous 50 µl final par cupule. Le virus est ensuite ajouté à raison de 50 µl/puit. Les microplaques sont divisées en deux de façon à tester 2 fois chaque concentration virale (cf schéma)



**Figure 14 : Organisation des microplaques de séroneutralisation lors de la détermination de la concentration optimale en virus**

La première colonne de chaque plaque sert de témoin cellules. Elle ne contient pas de sérum ni de virus mais uniquement du milieu de culture cellulaire.

La dernière colonne de chaque plaque sert de témoin virus. Elle contient uniquement du virus avec du milieu de culture cellulaire.

Les plaques sont ensuite placées en incubation pendant 1h à 37°C puis 1h à 4°C. Cette incubation au froid permet de stabiliser les complexes virus/anticorps. Le contenu de chaque plaque est ensuite transféré sur une microplaque contenant des tapis confluents de cellules MDCK. Les plaques sont placées 1h en incubation à 37°C puis l'inoculum est éliminé et les plaques sont lavées 3 fois avec un mélange de milieu DMEM + PBS. Du milieu de maintien (DMEM + 0,2% BSA (bovine serum albumin) + trypsine TPCK (L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone)) est déposé dans chaque puit à raison de 150 µl/puit puis les plaques sont de nouveau placées en incubation à 37°C.

Différents temps d'incubation sont testés. Le temps d'incubation optimal est fonction de la concentration virale choisie. Il est déterminé grâce à la colonne témoin virus : lorsqu'on obtient 100% de mortalité dans les puits de cette colonne, l'incubation est stoppée.

Les concentrations virales les plus élevées permettent d'obtenir un effet cytopathogène global plus précoce mais compromettent la sensibilité du test. Ici, la concentration virale de 250 pfu/puit est celle qui offre le meilleur compromis. Pour cette concentration virale, le temps d'incubation optimal a été déterminé à 2 jours.

A l'issue de l'incubation, les cellules sont fixées et colorées avec du cristal violet à 1% pour observation des effets cytopathogènes. Le titre des sérums est égal à l'inverse de la dilution la plus élevée pour laquelle la culture cellulaire est intacte (absence d'effet cytopathogène) indiquant une totale neutralisation du sérum.

La validité des résultats est évaluée grâce à la colonne témoin cellules qui doit montrer 100% de survie, et la colonne témoin virus qui doit montrer 100% de mortalité.

Cette étape de mise au point a permis d'aboutir à un protocole définitif de séroneutralisation à partir duquel les différents prélèvements de sérum ont été analysés.

## **2. Validation d'un protocole de séroneutralisation sur sérum**

### **a. Protocole**

- ♦ Matériel : - microplaques à 96 puits à fond plat
  - pipettes multicanaux
  - pipettes Eppendorf
  - microscope
  - cellule de Thomas
  - PBS isotonique, 1x
  - milieu DMEM
  - BSA
  - Trypsine TPCK
  - Hépès 1M
  - culture de cellules MDCK

- virus H7N1 E
- sérum témoin positif H7
- sérum témoin négatif
- sérums de canards à tester

♦ Méthode :

1) Préparation de microplaques de cellules MDCK

- éliminer le milieu de culture de la culture primaire de cellules MDCK
- laver les cellules avec 3 ml de trypsine. Cette étape permet à la trypsine de réagir avec les protéines du reste du milieu de culture et permet ainsi d'éviter l'inhibition de l'enzyme lors de la prochaine étape
- éliminer la trypsine puis ajouter 2 ml de trypsine afin de rompre les liaisons intercellulaires
- incuber à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à ce que les cellules soient totalement détachées les unes des autres
- laver la suspension cellulaire obtenue avec 8 ml de milieu de culture (milieu DMEM + 10% BSA) afin de neutraliser la trypsine
- déterminer la concentration de la suspension cellulaire par comptage dans une cellule de Thomas
- préparer une suspension cellulaire à  $5 \cdot 10^5$  cellules/ml en diluant la solution mère d'un facteur approprié avec du milieu de culture
- répartir 100 µl de cette suspension cellulaire dans chaque puit de microplaques à 96 puits à fond plat
- incuber 24h à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>

2) Mise en œuvre du test de séroneutralisation

- traiter les sérums à 56°C pendant 30 min afin de détruire le complément
- utiliser une microplaque par sérum à tester
- réserver une microplaque pour les sérums témoin négatif et témoin positif (diviser la microplaque en deux dans le sens de la longueur)
- placer 100 µl de sérum dans chaque puit de la deuxième colonne
- placer 50 µl de milieu DMEM + BSA 0,2% + Hépès 1M (250 µl/ 10 ml) dans tous les autres puits
- réaliser une dilution en série au demi des sérums jusqu'à la colonne 11
- diluer le virus H7N1 E dans du milieu DMEM + BSA 0,2% + Hépès 1M (250µl/10 ml) de façon à obtenir un titre de 250 pfu/puit
- ajouter 50 µl de virus dans chaque puit sauf ceux de la première colonne
- la première colonne de chaque plaque sert de témoin cellules. Elle ne contient que du milieu de culture.
- la dernière colonne de chaque plaque sert de témoin virus. Elle contient uniquement du virus et du milieu de culture.

N° des cupules	1= témoin cellules	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12= témoin virus
DMEM+ BSA + Hépès	50	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
sérum	0	100	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0
dilution		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	
Virus à 250 pfu/puit	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

**Tableau 5 : Résumé des différentes étapes du protocole de séroneutralisation**

- placer les plaques en incubation 1h à 37°C puis 1h à 4°C
- transférer le contenu de chaque plaque sur une microplaque de culture de cellules MDCK
- incuber 1h à 37°C
- éliminer l'inoculum puis laver les plaques 3 fois avec du milieu DMEM + PBS 1x
- placer 150 µl de milieu de maintien (DMEM + BSA 0,2% + trypsine TPCK à 1µg/ml) dans chaque puit puis incuber 2 jours à 37°C.
- fixer et colorer les cellules avec du cristal violet à 1%
- observer les plages de lyse
- le titre des sérums est égal à l'inverse de la dilution la plus élevée pour laquelle la culture cellulaire est intacte
- la validité des résultats est évaluée grâce à la colonne témoin cellules qui doit montrer 100% de survie, et la colonne témoin virus qui doit montrer 100% de mortalité.
- le sérum témoin positif doit montrer un titre constant au cours de chaque manipulation. La reproductibilité du titre permet de vérifier la reproductibilité des différents dosages entre eux.

#### **b. Condition d'analyse des sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

Un groupe représentatif d'échantillons de sérum de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 a été analysé par des tests de séroneutralisation au cours d'une seule manipulation. Les sérums appartenant au sous-groupe « J6 T » ont servi de témoins négatifs. Le sérum positif H7 a été utilisé comme témoin positif.

### **3. Essai de séroneutralisation sur bile**

Le test de séroneutralisation a été mis en œuvre sur les échantillons de bile de la même façon que pour les sérums. Cependant, la bile s'est révélée toxique pour les cultures cellulaires en provoquant une mortalité non spécifique proportionnelle à la concentration du prélèvement. Afin de supprimer cette toxicité, les échantillons de bile ont été dilués, puis de nouveaux tests de séroneutralisation ont été réalisés afin de déterminer la dilution minimale à partir de laquelle la toxicité disparaît.

La conclusion de ces différents essais est que la dilution nécessaire à la disparition de l'effet toxique est trop élevée pour rester compatible avec un dosage quantitatif des anticorps neutralisants.

Il n'a donc pas été possible d'analyser les prélèvements de bile par la réaction de séroneutralisation

## **H. Analyses statistiques**

Les données générées par les trois méthodes de dosage ont été analysées grâce à un fichier Excel. Ainsi, les titres moyens et les écart-types ont été calculés pour chaque sous-groupe d'animaux, ce qui a permis la réalisation d'histogrammes. Afin de rendre possible le traitement et la représentation graphique des données, les titres situés sous la limite minimale de détection de chaque technique de dosage ont été remplacés par une valeur arbitraire de 1. Pour une même méthode de détection d'anticorps, les différences de titres moyens entre deux temps d'infection différents ou entre les animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R ont été analysées par un test t de Student non apparié. Une *p-value* < 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

## **II. Résultats expérimentaux**

### **A. Analyse des échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination**

#### **1. Etude selon le virus inoculé**

Les résultats détaillés obtenus pour chaque animal au cours des quatre manipulations sont présentés en annexe 1. Les titres moyens calculés pour chaque sérum testé sont présentés en annexe 2.

#### **a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux**

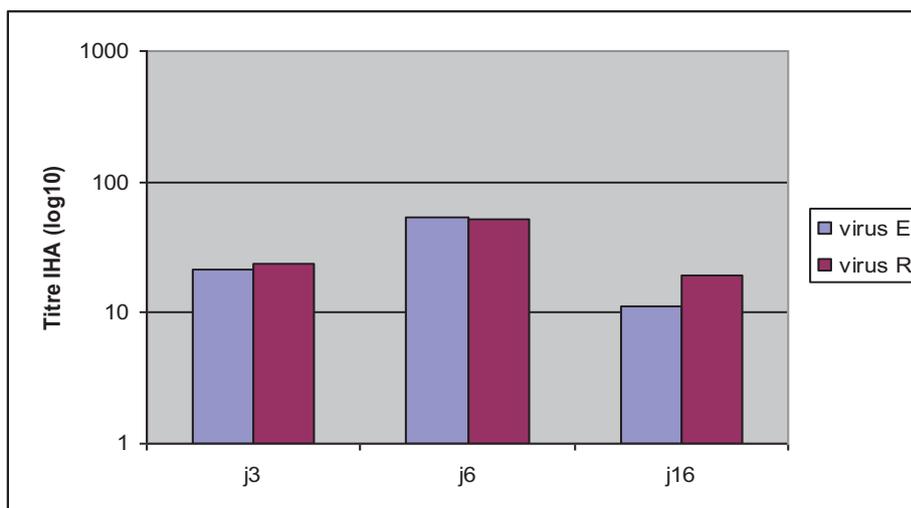
<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre IHA moyen</b>
<b>J0</b>	2
<b>J3 T</b>	8
<b>J3 E</b>	21
<b>J3 R</b>	24
<b>J6 T</b>	13
<b>J6 E</b>	53
<b>J6 R</b>	51
<b>J16 E</b>	11
<b>J16 R</b>	19
<b>Témoin positif H7</b>	128

**Tableau 6 : Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

On constate que chaque sous-groupe d'animaux témoins non infectés possède un titre moyen inférieur au seuil de positivité, ce qui est conforme aux résultats attendus.

Que les animaux soient infectés par le virus E ou le virus R, on constate une positivation des titres à J3. Ces titres augmentent encore pour atteindre leur maximum à J6 puis ils chutent à J16 à un niveau inférieur à celui de J3.

## **b. Comparaisons statistiques**



**Graphique 1:** Comparaison des titres IHA moyens entre les sérums d’animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d’infection

On constate qu’il n’y a pas de différence statistiquement significative entre les titres IHA des animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R quelque soit le temps d’infection.

Les animaux infectés par les deux virus sont alors regroupés en un seul et même ensemble afin d’améliorer la valeur statistique des tests

## **2. Etude virus E et R confondus**

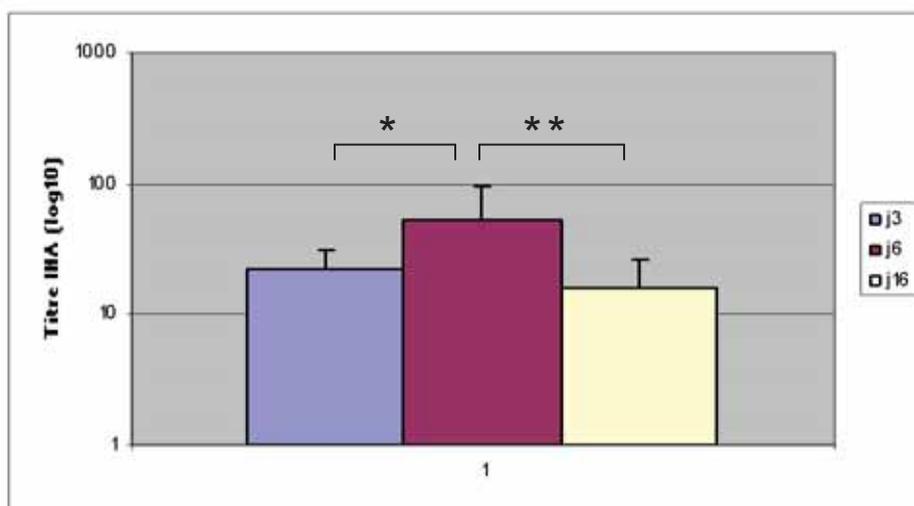
### **a. Résultats moyens par sous-groupe d’animaux**

Les nouveaux titres IHA moyens à j3, j6 et j16 sont présentés dans le tableau suivant :

<b>Sous-groupe d’animaux</b>	<b>Titre IHA moyen</b>
J3	22,5
J6	52
J16	15

**Tableau 7 :** Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l’expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus

## b. Comparaisons statistiques



**Graphique 2 : Comparaison des titres IHA moyens des sérums de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus**

\* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  par test t de Student

Les évolutions de titre IHA entre les différents temps d'infection sont significatives, excepté entre j3 et j16 où les titres ne sont pas statistiquement différents.

## B. Analyse des échantillons de bile de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination

### 1. Etude selon le virus inoculé

Les résultats détaillés obtenus pour chaque animal sont présentés en annexe 3.

#### a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux

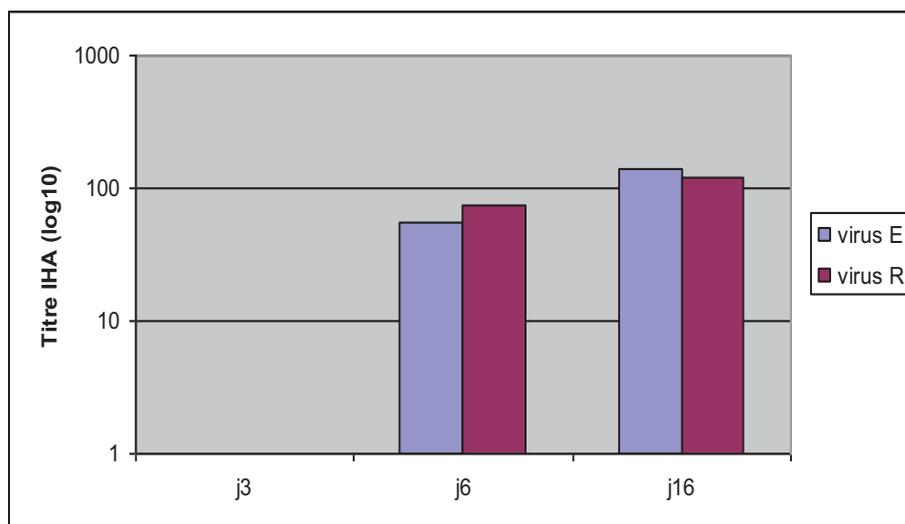
Sous-groupe d'animaux	Titre IHA moyen
J1	< 8
J3 E	< 8
J3 R	< 8
J6 T	< 8
J6 E	55
J6 R	73
J16 R	118
J16 E	138
Témoin positif H7	128

**Tableau 8 : Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

On constate que le titre IHA moyen des sous-groupes d'animaux témoins négatifs est inférieur au seuil de positivité. De même, le titre du témoin positif est conforme au titre connu. Ces résultats permettent de confirmer la validité des titres obtenus pour les autres prélèvements de la manipulation.

Que ce soit pour le virus E ou le virus R, les titres moyens sont négatifs à J3. Ils deviennent positifs à J6 puis continuent à augmenter à J16 (doublement du titre de J6).

### **b. Comparaisons statistiques**



**Graphique 3** : Comparaison des titres IHA moyens entre les biles d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection

De même que pour les sérums, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les titres IHA des biles des animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R quelque soit le temps d'infection.

Afin d'améliorer la valeur statistique des tests, les animaux sont donc mélangés en un même groupe.

## **2. Etude virus E et R confondus**

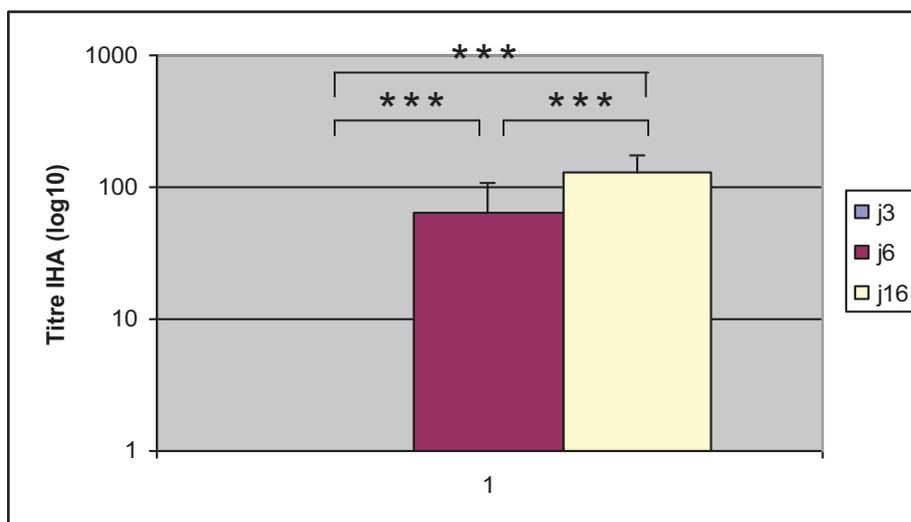
### **a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux**

Les nouveaux titres IHA moyens à j3, j6 et j16 sont présentés dans le tableau suivant :

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre IHA moyen</b>
J3	< 8
J6	64
J16	128

**Tableau 9** : Titres IHA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus

## b. Comparaisons statistiques



**Graphique 4:** Comparaison des titres IHA moyens des biles de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus

\*\*\* =  $p < 0,001$  par test t de Student

On constate que les évolutions de titre IHA sont statistiquement significatives entre les différents temps d'infection.

## C. Comparaison de l'évolution des titres IHA dans les sérums et dans les biles des animaux de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours du temps

### 1. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux selon le virus inoculé

Afin de comparer l'évolution des titres moyens en anticorps pour les sérums et pour les biles au cours du temps, les données ont été regroupées dans un même tableau.

Sous-groupe d'animaux	Titre IHA moyen des sérums	Titre IHA moyen des biles
J0 ou J1	2	< 8
J3 E	21	< 8
J3 R	24	< 8
J6 E	53	55
J6 R	51	73
J16 R	19	118
J16 E	11	138

**Tableau 10 :** Comparaison des titres IHA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux

On constate que les titres IHA n'évoluent pas de la même façon dans les sérums que dans les biles. Que ce soit pour le virus E ou le virus R, la positivation des titres est plus lente dans la bile. Puis, à J6, les taux d'anticorps atteignent sensiblement le même niveau dans le sérum que dans la bile. A J16, par contre, les évolutions sont totalement différentes : les taux d'anticorps chutent dans le sérum alors qu'ils augmentent de façon importante dans la bile.

## **2. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus**

Sous-groupe d'animaux	Titre IHA moyen des sérums	Titre IHA moyen des biles
<b>J3</b>	22,5	< 8
<b>J6</b>	52	64
<b>J16</b>	15	128

**Tableau 11 : Comparaison des titres IHA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus**

Les constatations sont les mêmes lorsque les animaux infectés par les deux types de virus sont regroupés en un seul ensemble.

## **D. Analyse des échantillons de sérum de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par un test ELISA**

### **1. Etude selon le virus inoculé**

Les résultats détaillés obtenus pour chaque animal au cours des 6 tests ELISA sont présentés en annexe 4. Les titres moyens calculés pour chaque sérum testé sont présentés en annexe 5.

#### **a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux**

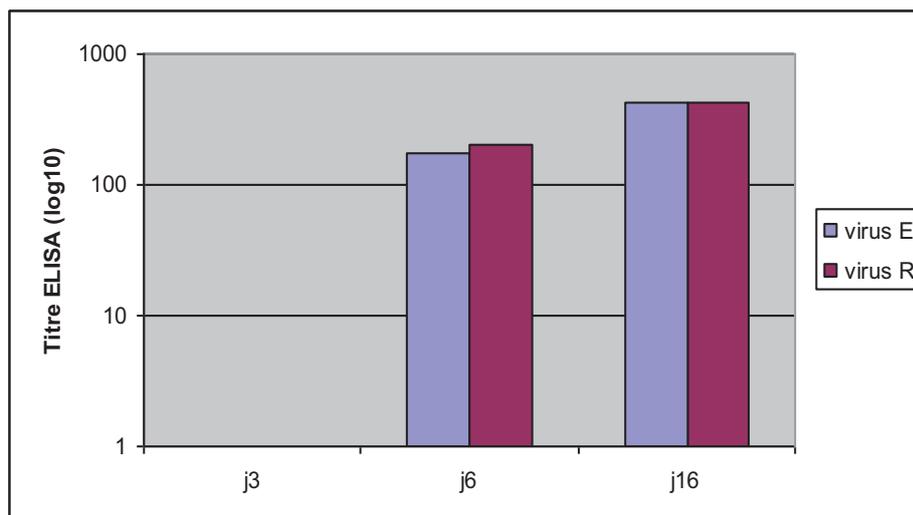
Sous-groupe d'animaux	Titre ELISA moyen
<b>J1 T</b>	25
<b>J3 E</b>	< 50
<b>J3 R</b>	< 50
<b>J6 T</b>	13
<b>J6 E</b>	171
<b>J6 R</b>	200
<b>J16 R</b>	428
<b>J16 E</b>	433
<b>Témoin positif H7</b>	2400

**Tableau 12 : Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

On constate que les sous-groupes d'animaux témoins à J1 et J6 possèdent des titres moyens légèrement positifs. Ceci est du à la présence de quelques animaux possédant un titre positif dans chaque groupe. Cependant, les titres de ces animaux ont été déterminés à partir d'autres témoins négatifs. On peut donc expliquer ces résultats par la variabilité biologique.

D'autre part, que les canards soient infectés par le virus E ou le virus R, on constate que les titres sont négatifs à J3. Ils deviennent positifs à J6 puis augmentent encore pour atteindre un maximum à J16 (doublement de la valeur de J6).

### **b. Comparaisons statistiques**



**Graphique 5:** Comparaison des titres ELISA moyens entre les sérums d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les titres ELISA des sérums des animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R.

Les animaux infectés par les deux types de virus sont alors mélangés en un même groupe afin d'augmenter la valeur statistique des tests.

## **2. Etude virus E et R confondus**

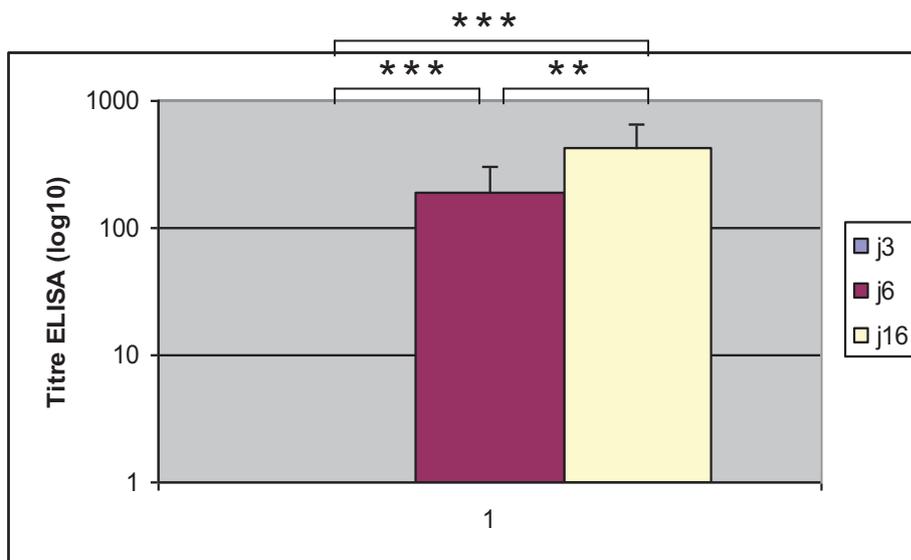
### **a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux**

Les nouveaux titres ELISA moyens à j3, j6 et j16 sont présentés dans le tableau suivant :

Sous-groupe d'animaux	Titre ELISA moyen
J3	< 50
J6	185
J16	430

**Tableau 13 :** Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus

## b. Comparaisons statistiques



**Graphique 6:** Comparaison des titres ELISA moyens des sérums de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus

\*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,001$  par test t de Student

On constate que les évolutions de titre entre les différents temps d'infection sont statistiquement significatives.

## E. Analyse des échantillons de bile de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par un test ELISA

### 1. Etude selon le virus inoculé

Les résultats détaillés obtenus pour chaque animal au cours des trois tests ELISA sont présentés en annexe 6.

#### a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux

Sous-groupe d'animaux	Titre ELISA moyen
J1 T	< 20
J3 E	52
J3 R	15
J6 T	< 20
J6 E	34
J6 R	40
J16 R	80
J16 E	173
Témoin sérum positif H7	> 400

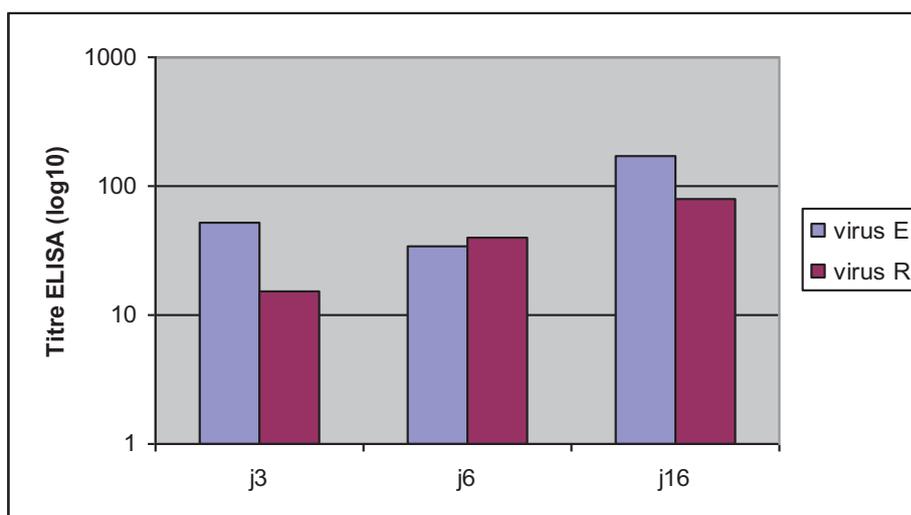
**Tableau 14 :** Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29

On constate que le titre ELISA moyen des sous-groupes d'animaux témoins négatifs à J1 et à J6 est inférieur au seuil de positivité, conformément aux résultats attendus.

Les évolutions sont ensuite différentes selon que les canards sont infectés par le virus E ou le virus R. En ce qui concerne le virus E, le titre moyen du sous-groupe d'animaux est positif à J3, puis il diminue à J6 avant d'augmenter fortement à J16. Cette baisse observée à J6 est due essentiellement à l'animal EL pour qui le titre à J3 est largement supérieur à celui des quatre autres animaux. Ainsi, le titre moyen du sous-groupe à J3 est supérieur à celui de J6.

Pour les animaux infectés par le virus R, le titre moyen est faiblement positif à J3 puis il augmente graduellement jusqu'à J16. Cependant, ce titre est plus de deux fois inférieur à celui du groupe infecté par le virus E.

### **b. Comparaisons statistiques**



**Graphique 7:** Comparaison des titres ELISA moyens entre les biles d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les titres ELISA des biles des animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R.

Les biles des animaux infectés par le virus E ou R sont alors regroupées en un même ensemble afin d'améliorer la valeur statistique des tests.

## **2. Etude virus E et R confondus**

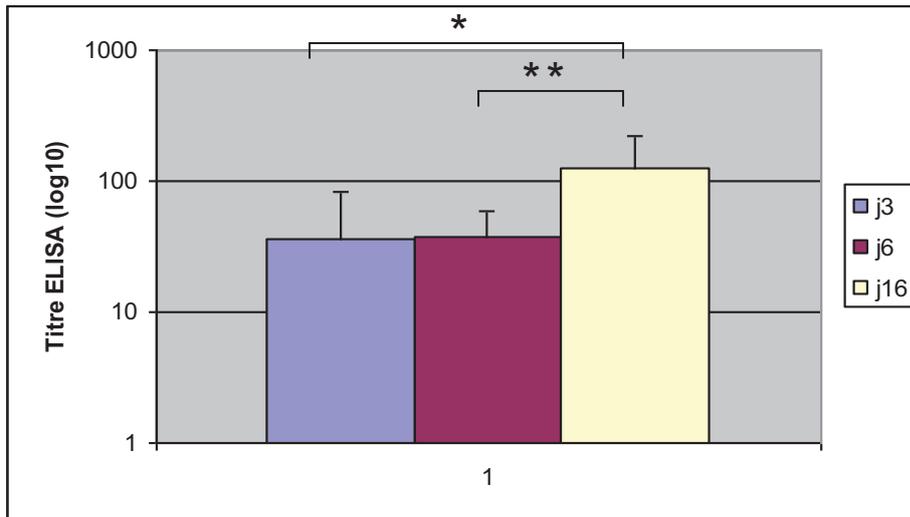
### **a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux**

Les nouveaux titres ELISA moyens à j3, j6 et j16 sont présentés dans le tableau suivant :

Sous-groupe d'animaux	Titre ELISA moyen
J3	35
J6	37
J16	123

**Tableau 15 :** Titres ELISA moyens pour chaque sous-groupe de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus

## **b. Comparaisons statistiques**



**Graphique 8: Comparaison des titres ELISA moyens des biles de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus**

\* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  par test t de Student

On constate qu'il n'y a pas de différence significative entre les titres ELISA à j3 et j6. En revanche, les différences sont statistiquement significatives entre j6 et j16 d'une part et entre j3 et j16 d'autre part.

## **F. Comparaison de l'évolution des titres ELISA dans les sérums et dans les biles des animaux de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours du temps**

### **1. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux selon le virus inoculé**

Afin de comparer l'évolution des titres moyens en anticorps pour les sérums et pour les biles au cours du temps, les données ont été regroupées dans un même tableau.

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre ELISA moyen des sérums</b>	<b>Titre ELISA moyen des biles</b>
<b>J1 T</b>	25	< 20
<b>J3 E</b>	< 50	52
<b>J3 R</b>	< 50	15
<b>J6 T</b>	13	< 20
<b>J6 E</b>	171	34
<b>J6 R</b>	200	40
<b>J16 R</b>	428	80
<b>J16 E</b>	433	173

**Tableau 16 : Comparaison des titres ELISA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux**

On constate que les titres ELISA n'évoluent pas de la même façon dans le sérum que dans la bile. Les anticorps sont détectables plus tôt dans la bile (dès J3) puis ils augmentent légèrement à j6 (sauf pour le virus E où on observe une baisse) et continuent d'augmenter à j16. Dans le sérum, les anticorps sont détectables à partir de j6 avec un titre élevé puis continuent d'augmenter à j16.

### **2. Comparaison des résultats moyens par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus**

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre ELISA moyen des sérums</b>	<b>Titre ELISA moyen des biles</b>
<b>J3</b>	< 50	35
<b>J6</b>	185	37
<b>J16</b>	430	123

**Tableau 17 : Comparaison des titres ELISA moyens des prélèvements de sérums et de biles par sous-groupe d'animaux, virus E et R confondus**

Lorsque l'on regroupe les animaux infectés par les deux types de virus en un même ensemble, on constate également que l'apparition des anticorps est plus précoce dans la bile (dès j3) que dans le sérum (dès j6). Cependant, le titre moyen reste constant et bas dans la bile jusqu'à j6 alors qu'il apparaît à un taux élevé dans le sérum. A j16, les titres augmentent fortement dans la bile comme dans le sérum mais le titre moyen est plus élevé dans le sérum.

## **G. Analyse des échantillons de sérum de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 par la réaction de séroneutralisation**

### **1. Etude selon le virus inoculé**

Les résultats détaillés obtenus pour chaque animal sont présentés en annexe 7.

#### **a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux**

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre moyen en séroneutralisation</b>
<b>J3 E</b>	< 8
<b>J3 R</b>	< 8
<b>J6 T</b>	< 8
<b>J6 E</b>	9
<b>J6 R</b>	7
<b>J16 R</b>	27
<b>J16 E</b>	29
<b>Témoin positif H7</b>	160

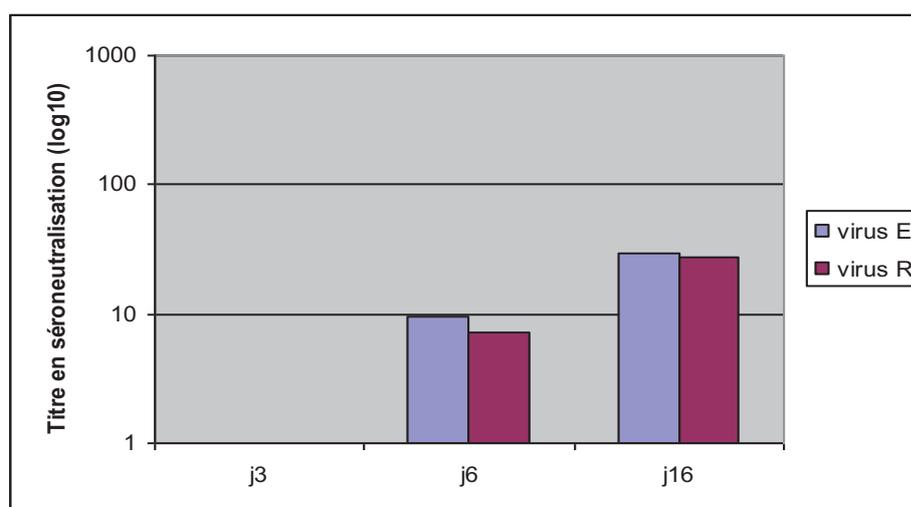
**Tableau 18 : Titres moyens en séroneutralisation pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

On constate que pour le sous-groupe d'animaux témoins négatifs à J6 aucune neutralisation des sérums n'est observée (titre inférieur à la dilution initiale de l'échantillon), ce qui est conforme aux résultats attendus.

D'autre part, que les canards soient infectés par le virus E ou le virus R, on constate que les titres sont négatifs à J3. Ils deviennent faiblement positifs à J6 puis augmentent fortement à J16.

Les titres sont en moyenne légèrement plus élevés chez les canards infectés par le virus E.

#### **b. Comparaisons statistiques**



**Graphique 9**: Comparaison des titres moyens en séroneutralisation entre les sérums d'animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R aux différents temps d'infection

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les titres des animaux infectés par le virus E et ceux des animaux infectés par le virus R.

Afin d'augmenter la valeur statistique des tests, les sérums sont regroupés en un même ensemble

## 2. Etude virus E et R confondus

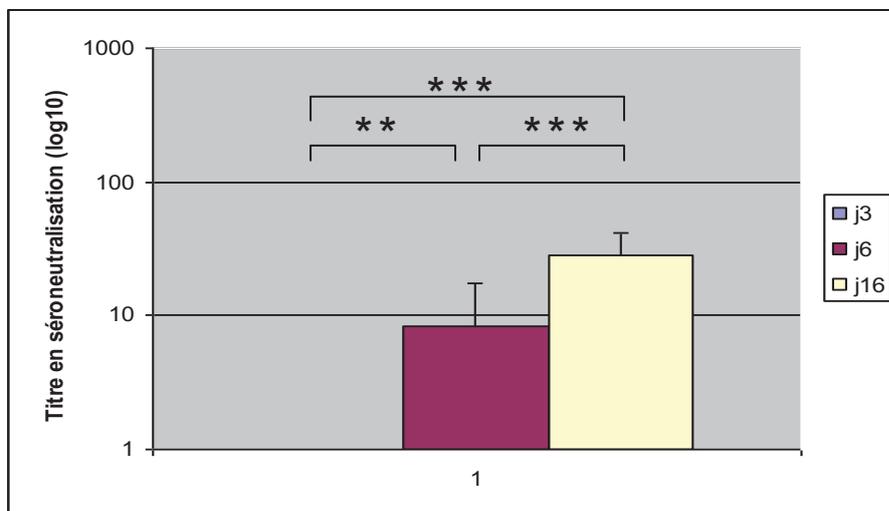
### a. Résultats moyens par sous-groupe d'animaux

Les nouveaux titres moyens en séroneutralisation à j3, j6 et j16 sont présentés dans le tableau suivant :

Sous-groupe d'animaux	Titre moyen en séroneutralisation
J3	< 8
J6	8
J16	28

**Tableau 19** : Titres moyens en séroneutralisation pour chaque sous-groupe de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29, virus E et R confondus

### b. Comparaisons statistiques



**Graphique 10**: Comparaison des titres moyens en séroneutralisation des sérums de canards entre les différents temps d'infection, virus E et R confondus

\*\* =  $p < 0,01$  ; \*\*\* =  $p < 0,001$  par test t de Student

On constate que les évolutions de titre entre les différents temps d'infection sont statistiquement significatives

## **H. Comparaison des résultats obtenus par les trois méthodes de dosage**

### **1. Pour les sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

Les échantillons de sérums n'ont pas tous été testés par les trois méthodes de dosage du fait de la faible quantité de prélèvement disponible pour certains animaux.

Afin de comparer les titres moyens obtenus en fonction de la technique utilisée, les échantillons dosés par les trois méthodes ont été regroupés dans un tableau comparatif présenté en annexe 8. Ainsi, seuls 33 prélèvements ont été analysés en commun.

Les titres moyens pour chaque sous-groupe d'animaux ont ensuite été calculés à partir des résultats obtenus pour ces 33 prélèvements. Un nouveau tableau comparatif a alors été réalisé (annexe 9).

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre IHA moyen</b>	<b>Titre ELISA moyen</b>	<b>Titre moyen en séroneutralisation</b>
<b>J3</b>	22,5	< 50	< 8
<b>J6</b>	52	185	8
<b>J16</b>	15	430	28

**Tableau 20 : Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de sérums de canards selon la méthode de détection d'anticorps, virus E et R confondus**

On constate que l'évolution des taux d'anticorps détectés au cours du temps est semblable par les méthodes ELISA et de séroneutralisation.

En revanche, la méthode d'inhibition de l'hémagglutination donne des résultats différents : la détection des anticorps est plus précoce (dès j3) par rapport aux autres techniques de dosage. De plus, alors que par les méthodes ELISA et de séroneutralisation le taux d'anticorps suit une courbe ascendante de j3 jusqu'à j16, on observe une chute importante de titre à l'IHA entre j6 et j16.

### **2. Pour les biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**

Les résultats obtenus pour les prélèvements de biles analysés par l'IHA et l'ELISA ont été regroupés dans un tableau comparatif présenté en annexe 10.

Les titres moyens pour chaque sous-groupe d'animaux ont ensuite été calculés et regroupés dans un autre tableau (annexe 11)

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre IHA moyen</b>	<b>Titre ELISA moyen</b>
<b>J3</b>	< 8	35
<b>J6</b>	64	37
<b>J16</b>	128	123

**Tableau 21 : Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de biles de canards selon la méthode de détection d'anticorps, virus E et R confondus**

On constate que l'évolution des taux d'anticorps détectés dans la bile au cours du temps par les méthodes d'IHA et ELISA est presque identique. Les anticorps sont détectés dès j3 par l'ELISA alors qu'ils ne sont pas détectés à l'IHA. Puis les titres augmentent de j6 à j16 dans les deux techniques de dosage.



# **PARTIE III**

## **Discussion**



# **I. Réponse sérologique du canard face à des virus influenza A H7N1 faiblement pathogènes**

Les résultats de cette étude montrent que, contrairement à ce qui avait été admis jusqu'à présent, les canards développent une réponse anticorps à la fois systémique et mucoale face à une infection par des VIA FP. Cette constatation n'est cependant pas valable lorsque les prélèvements, en particulier les sérums, sont analysés par le test d'IHA.

## **A. Réponse sérologique systémique**

### **1. Divergence des résultats obtenus à l'IHA par rapport aux deux autres tests**

La cinétique d'apparition des anticorps anti-influenza dans le sérum des canards diffère selon la technique de dosage utilisée. Le test ELISA et la réaction de séroneutralisation donnent des résultats similaires avec une réponse sérologique détectée à partir de j6 et qui suit une courbe ascendante pendant toute la durée de l'expérimentation (16 jours). Ces tests mettent donc en évidence une réponse humorale systémique persistante et d'intensité croissante pendant les 16 jours de l'expérimentation.

En revanche, la réaction d'IHA donne des résultats très différents. En effet, la réponse sérologique est détectée dès j3 puis atteint un niveau maximum à j6 avant de retomber sous le seuil de positivité à j16. Ce test fait donc apparaître une réponse anticorps très brève et de faible intensité. Ce résultat est en accord avec l'étude menée par Kida *et al*, où il a également été montré que des canards *Anas platyrhynchos* infectés par différents VIA FP présentaient une réponse indétectable ou très faible et uniquement transitoire (titres de 1/16 2 à 4 semaines post-infection) par le test d'IHA (Kida *et al*, 1980).

### **2. Manque de sensibilité du test d'IHA chez le canard**

Les résultats de cette étude montrent un manque de sensibilité de l'IHA par rapport aux deux autres tests dans la détection de la réponse sérologique du canard contre des VIA FP. Ce problème avait déjà été suspecté par d'autres auteurs (Webster *et al*, 2006 ; Kim *et al*, 2008). Webster *et al* avaient, de plus, constaté que l'utilisation d'hématies de chevaux en remplacement de celles du poulet ne permettait pas d'augmenter la sensibilité de leur test d'IHA.

A notre connaissance, une seule publication scientifique a déjà comparé le test d'IHA à une autre méthode diagnostique dans la détection de la réponse anticorps du canard suite à une infection par des VIA FP. Il s'agit d'une étude menée par Higgins *et al* en 1987. Les auteurs ont infecté expérimentalement des canards *Anas platyrhynchos* avec des VIA H3N2 FP et ont analysé leur réponse sérologique par le test d'IHA ainsi que par un test de neutralisation virale. Les résultats obtenus par les deux méthodes diagnostiques se sont révélés très différents : alors que le taux d'anticorps sérique augmente constamment pour atteindre un pic à j15 par le test de neutralisation virale, le test d'IHA fait apparaître un pic sérologique à j7 suivi d'une forte chute jusqu'à un niveau minimum à j15.

Ces résultats sont en parfait accord avec nos observations et révèlent, là aussi, un manque de sensibilité de l'IHA par rapport à une autre méthode diagnostique.

Chez l'Homme, il a également été montré que l'IHA était moins sensible que le test de séroneutralisation pour la détection sérologique d'une infection à virus influenza aviaire. Rowe *et al* ont ainsi constaté que les anticorps étaient détectés par IHA uniquement si les sérums présentaient de hauts titres en anticorps neutralisants (Rowe *et al*, 1999). Cependant, chez l'Homme, le problème semble avoir été résolu par l'utilisation d'hématies de chevaux à la place de celles d'autres espèces. Ainsi, Kayali *et al* obtiennent une forte corrélation entre les résultats obtenus par IHA et par le test de séroneutralisation dans la détection d'anticorps dirigés contre de nombreuses souches d'influenza aviaire chez l'Homme (sauf pour les souches H7) (Kayali *et al*, 2008).

### **3. Hypothèses concernant le manque de sensibilité de l'IHA**

#### **a. Importance de l'espèce de provenance des globules rouges**

De nombreux auteurs ont fait apparaître la relative insensibilité du test d'IHA dans la détection des anticorps animaux ou humains dirigés contre l'hémagglutinine aviaire, suite à une vaccination ou une infection naturelle ou expérimentale, ceci même en présence de hauts titres en anticorps neutralisants (Lu *et al*, 1982 ; Rowe *et al*, 1999 ; Stephenson *et al*, 2003 ; Webster *et al*, 2006 ; Middleton *et al*, 2007 ; Kim *et al*, 2008). Stephenson *et al* ont montré que chez l'Homme ainsi que d'autres mammifères, la sensibilité du test pouvait être considérablement améliorée en utilisant des hématies de chevaux à la place des hématies de poulet traditionnellement employées (Stephenson *et al*, 2003). Depuis, plusieurs publications sont venues confirmer cette observation (Meijer *et al*, 2006 ; Jia *et al*, 2008 ; Kayali *et al*, 2008).

Cependant, chez le canard, cette solution semble donner des résultats inconstants : alors que certains auteurs obtiennent une augmentation évidente des titres IHA avec les hématies de chevaux (Kim *et al*, 2008), d'autres ne constatent aucun gain de sensibilité (Webster *et al*, 2006 ; résultats de notre étude).

On peut donc en déduire que, chez le canard, il existe un autre facteur qui conditionne la sensibilité du test d'IHA.

#### **b. Rôle de la séquence en acides aminés de l'hémagglutinine**

Hoffmann *et al* ont récemment montré que des résidus acides aminés spécifiques de l'hémagglutinine, notamment l'acide aminé en position 223, pouvaient être reliés à la sensibilité du test d'IHA (Hoffmann *et al*, 2005). Les auteurs ont en effet mis au point différents vaccins H5 inactivés à partir de virus entiers qui diffèrent uniquement au niveau de un ou deux acides aminés de l'hémagglutinine. Ils ont ensuite testé le pouvoir immunogène de ces vaccins sur différents lots de furets en analysant la réponse anticorps induite par des tests de neutralisation virale et d'IHA. Ainsi, tous les sérums ont montré de hauts titres en anticorps neutralisants quelque soit le vaccin utilisé. En revanche, leurs taux d'anticorps hémagglutinants est resté invariablement bas, excepté pour les sérums d'animaux immunisés à partir d'un virus dont la sértonine en position 223 de l'HA a été remplacée par un résidu asparagine. Les auteurs ont par la suite évalué la contribution de cette unique substitution d'acide aminé dans la réactivité sérologique à l'IHA. Ils ont constaté que cela permettait d'augmenter considérablement les taux d'anticorps détectés (augmentation d'un facteur de 4 ou plus). Ce gain de sensibilité à l'IHA peut s'expliquer par un changement de conformation et une altération de la spécificité du récepteur provoqués par le changement de résidu.

La conclusion de cette étude est que l'évaluation de la réponse sérologique par IHA suite à une infection ou une vaccination par un virus influenza H5 peut être améliorée en remplaçant l'acide aminé en position 223 de l'antigène HA par un résidu asparagine. Les auteurs proposent d'étendre cette stratégie à d'autres sous-types de virus influenza aviaires, comme les sous-types H9 et H7.

Le virus A/turkey/Italy/977/1999(H7N1) que nous avons utilisé pour notre étude possède une valine en position 223. Afin de savoir si cet acide aminé est, comme la sérotonine, associé à la faible sensibilité du test d'IHA, il nous aurait fallu le substituer par un résidu asparagine puis déterminer si cela permettait d'améliorer la sensibilité du test.

Les deux hypothèses précédentes expliquent le manque de sensibilité de l'IHA par des particularités structurales et fonctionnelles liées aux virus influenza aviaires. Cependant, elles n'expliquent pas pourquoi, chez d'autres espèces aviaires comme le poulet ou la dinde, le test d'IHA réalisé dans les conditions standards (avec hématies de poulet) permet toujours d'obtenir de hauts titres anticorps, quelque soit le virus utilisé. D'autre part, ces hypothèses ne permettent pas non plus d'expliquer pourquoi nous constatons une chute des titres IHA à J16 alors que les deux autres tests font apparaître une hausse.

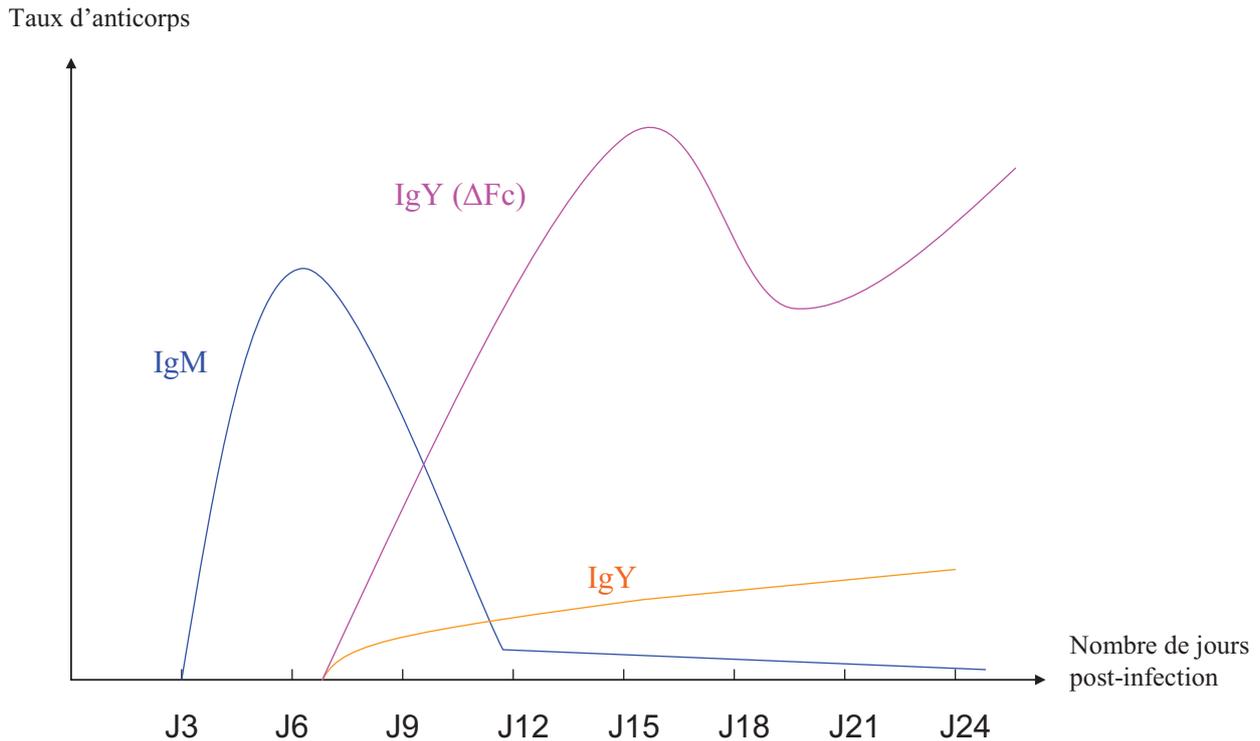
Il semblerait donc qu'une caractéristique liée à l'espèce « canard » serait capable de compromettre la détection des anticorps hémagglutinants par le test d'IHA.

### **c. Implication des IgY ( $\Delta$ Fc) ?**

#### **i. Description de notre hypothèse**

L'hypothèse que nous avançons s'appuie sur une particularité du système immunitaire humoral du canard : la présence des IgY ( $\Delta$ Fc). En effet, cette immunoglobuline est dépourvue de la région responsable des fonctions effectrices biologiques secondaires. Il est donc possible que cette particularité structurale soit également à l'origine d'une déficience concernant l'hémagglutination. D'autre part, les IgY ( $\Delta$ Fc) sont les immunoglobulines sériques prédominantes du canard (ratio IgY/IgY ( $\Delta$ Fc)  $\approx$  3/5) et remplacent petit à petit les IgY au fur et à mesure du développement de la réponse immunitaire (Parham, 1995 ; Lundqvist *et al*, 2006).

On peut donc émettre l'hypothèse que les IgY ( $\Delta$ Fc) ne sont pas détectées à l'IHA du fait de leurs déficiences fonctionnelles. Or, comme elles sont prédominantes dans le sérum, ceci expliquerait pourquoi les canards présentent une faible réponse sérologique à l'IHA en comparaison avec d'autres espèces aviaires comme le poulet. D'autre part, puisque les IgY ( $\Delta$ Fc) prennent la place des IgY dans la réponse immunitaire tardive, elles seraient alors responsables d'une baisse de la capacité hémagglutinante des sérums de canard, se traduisant par une brusque décroissance des titres anticorps à l'IHA à j16.



**Graphique 11:** Evolution supposée des taux d'IgM, IgY et IgY( $\Delta$ Fc) dans le sérum des canards à la suite d'une infection à VIA FP (graphique réalisé en prenant en compte les données publiées par Higgins *et al* (1987))

ii. Apports de l'étude de Higgins *et al* (1987) dans l'interprétation de nos résultats expérimentaux

L'étude menée par Higgins *et al* est en faveur de cette hypothèse (Higgins *et al*, 1987). Les auteurs ont infecté expérimentalement des canards *Anas platyrhynchos* avec des VIA H3N2 faiblement pathogènes puis ont réalisé des tests d'IHA sur les sérums ainsi que sur des fractions de sérums (correspondant aux différents types d'immunoglobulines) collectées par ultracentrifugation à différents temps post-infection. Ils ont constaté un pic d'anticorps à J7 attribué exclusivement aux IgM. Cette réponse IgM, transitoire, a ensuite été remplacée par les IgY. Aucune activité hémagglutinante n'a été détectée dans la fraction de sérum correspondant aux IgY ( $\Delta$ Fc).

Les constatations de cette étude peuvent servir de base d'interprétation de nos résultats. En effet, il est probable que le pic d'anticorps que nous avons obtenu à j6 à l'IHA corresponde à la réponse IgM. Le taux sérique d'IgY et d'IgY ( $\Delta$ Fc) augmenterait ensuite mais les IgY ( $\Delta$ Fc) deviendraient largement majoritaires, ce qui expliquerait la chute de l'activité hémagglutinante des sérums à j16. Nous pouvons supposer que la réponse sérologique des canards persiste au delà de 16 jours, notamment du fait de l'augmentation constante des titres à l'ELISA et en séroneutralisation. Cependant, cette réponse, associée majoritairement aux IgY ( $\Delta$ Fc), resterait indétectable ou faible par le test d'IHA.

Higgins *et al* ont analysé la réponse anticorps de leurs animaux jusqu'à 33 jours post-infection. Leur test de neutralisation virale enregistre une chute du taux d'anticorps après le pic à j15, suivie d'une nouvelle augmentation jusqu'à la fin de l'expérimentation. A l'IHA, la réponse sérologique réaugmente à partir de j15 mais de façon très lente et modérée.

Il est donc possible, d'après cette étude, que nous aillions pu détecter une hausse des titres IHA chez les canards de notre expérimentation si nous avons poursuivi notre étude au-delà de 16 jours.

### iii. Nécessité d'investigations supplémentaires

Afin d'explorer notre hypothèse selon laquelle le manque de sensibilité de l'IHA chez le canard serait lié à la présence des IgY ( $\Delta Fc$ ), nous aurions pu réaliser un prétraitement des sérums de canard dans le but de digérer le fragment Fc des immunoglobulines, puis comparer les résultats obtenus à l'IHA avec ces sérums et les sérums non digérés. Cela reviendrait à tester le rôle de la région Fc dans la capacité des anticorps à hémagglutiner et permettrait de confirmer si la baisse des titres constatée à j16 est effectivement due à une augmentation de la proportion d'immunoglobulines tronquées dans le sérum.

Dans l'état actuel des données scientifiques, des études supplémentaires sont nécessaires afin de préciser l'origine exacte du manque de sensibilité de l'IHA avec les sérums de canards.

## **B. Réponse sérologique mucoale**

Les infections à VIA FP chez le canard sont des maladies entéritiques et les muqueuses sont les sites d'exposition initiale au virus ainsi que son lieu de réplication (Suarez et Schultz-Cherry, 2000). Il est donc intéressant d'analyser la cinétique d'apparition des anticorps dans les sécrétions biliaires, qui sont une source importante d'immunoglobulines déversées dans le milieu intestinal.

Les résultats obtenus dans cette étude sont homogènes pour les tests IHA et ELISA. Tous deux montrent une augmentation constante des titres anticorps pendant les 16 jours de l'expérimentation, bien que la détection soit plus précoce à l'ELISA (dès j3).

Les canards possèdent donc une réponse sérologique locale persistante et d'intensité croissante pendant toute la durée de l'étude.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Higgins *et al* (Higgins *et al*, 1987). Ces chercheurs ont en effet montré que suite à l'infection par des VIA H3N2 FP, les canards présentaient une élévation de l'activité anticorps de leurs IgA biliaires dès 3 jours post-infection. Cette activité atteignait un pic à 12 jours et persistait pendant au moins 33 jours. Ils ont également montré que le développement de hauts titres anticorps dans la bile coïncidait avec la fin de l'excrétion du virus dans les fèces.

Il est donc probable que l'immunité locale digestive assurée par les IgA biliaires joue un rôle majeur dans l'élimination des VIA FP par le système immunitaire du canard. Le site de production de ces immunoglobulines est encore inconnu aujourd'hui.

### **C. Conséquences du pouvoir de réplication du virus inoculé sur l'intensité de la réponse sérologique**

Deux virus recombinants (virus E et virus R) issus d'une souche mère H7N1 ont été utilisés afin de mesurer l'impact du pouvoir de réplication du virus inoculé sur l'intensité de la réponse sérologique des canards. Le virus R, qui a le pouvoir de réplication le plus élevé, est associé à une augmentation de la production d'interféron de type I (Soubies *et al*, 2010).

Cependant, sur le plan de l'immunité humorale, cette étude montre qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le groupe d'animaux infecté par le virus E et celui infecté par le virus R, quelque soit la méthode de détection d'anticorps utilisée. Cette constatation est valable aussi bien pour la réponse sérologique systémique que pour l'immunité mucoale associée aux IgA biliaires.

Ces résultats sont malgré tout à considérer avec prudence dans la mesure où le nombre de prélèvements testés dans chaque sous-groupe d'animaux est très faible (entre 1 et 7 prélèvements) et la variabilité individuelle parfois très importante (cf résultats présentés dans les tableaux en annexe). Une étude menée sur un effectif de canards plus important est nécessaire pour apporter une conclusion définitive sur ce sujet.

## **II. Limites de l'étude**

### **A. La réponse sérologique est-elle protectrice ?**

Une des principales limites de cette étude est le temps d'expérimentation relativement court (16 jours) qui permet juste d'analyser la cinétique d'apparition des anticorps et non leur persistance dans le temps. Nos résultats montrent que les canards présentent une réponse sérologique systémique et mucoale face à des virus influenza H7N1 FP dont l'intensité augmente jusqu'au seizième jour de l'infection. Combien de temps persiste cette réponse sérologique ? La réponse à cette question est essentielle pour déterminer le mécanisme immunologique qui permet aux canards de jouer le rôle de réservoir de virus influenza A.

En effet, deux mécanismes sont possibles :

i) les canards présentent une infection persistante sans symptôme, ce qui signifie que les virus se répliquent et sont excrétés en permanence.

Nous savons aujourd'hui que cette hypothèse est fautive car les canards développent une réponse anticorps face aux virus influenza et sont capables de s'en débarrasser, comme en témoignent les études d'excrétion virale faites à partir d'écouvillons cloacaux et oraux (Higgins *et al*, 1987 ; Pantin-Jackwood *et al*, 2007 ; Mundt *et al*, 2009 ; Sturm-Ramirez *et al*, 2004 ; Beato *et al*, 2007 ; Tian *et al*, 2005 ; Steensels *et al*, 2008 ; Jeong *et al*, 2009 ; Webster *et al*, 1978 ; Kida *et al*, 1980 ; Webster *et al*, 2006 ; Kim *et al*, 2008).

ii) les canards sont capables d'être réinfectés souvent par les virus influenza. Ceci peut s'expliquer par le mode de vie de ces animaux (lacs, migrations...), propice à de fréquentes contaminations et à une exposition à de nombreux sous-types viraux. Une autre explication est également possible : celle d'une réponse immunitaire adaptative peu efficace, qui ne protégerait pas les canards contre les réinfections.

Pour explorer cette hypothèse sur le plan de l'immunité humorale, il faut tout d'abord analyser la persistance dans le temps de la réponse anticorps puis réinfecter les canards lorsque ces anticorps ont disparu. Si le virus influenza se réplique et est de nouveau excrété, cela signifie que la réponse sérologique n'est pas protectrice.

Une étude menée par Kida *et al* tend à invalider cette hypothèse (Kida *et al*, 1980). Les auteurs ont, en effet, infecté expérimentalement des canards *Anas platyrhynchos* par un VIA FP puis ont ré-inoculé les animaux à différents intervalles de temps suivant la primo-infection. La réponse sérologique, suivie par IHA, est très faible voir indétectable après la primo-infection, et est associée à une excrétion virale dans les fèces d'au moins 7 jours par l'ensemble des canards. Après ré-inoculation dans les 28 jours suivant la primo-infection, aucune réponse anticorps ni excrétion virale n'est détectée. En revanche, lorsque les oiseaux sont ré-infectés 46 jours ou plus suivant la primo-infection, une brusque réponse immunitaire secondaire apparaît de façon évidente à l'IHA, suggérant une nouvelle répllication du virus. Cependant, aucune excrétion virale n'est détectée dans les fèces de ces animaux, probablement en raison d'une rapide restriction de l'infection par la réponse immunitaire secondaire.

Les résultats de cette étude tendraient donc à prouver que la réponse sérologique des canards est capable de les protéger efficacement contre les réinfections. D'autres investigations seraient cependant souhaitables afin de confirmer ces observations. Si celles-ci se

confirmaient, il faudrait alors en déduire que c'est le mode de vie particulier des canards qui est responsable de leur caractère réservoir de VIA FP.

## **B. Quels sont les rôles de l'immunité innée et de l'immunité à médiation cellulaire ?**

Cette étude a été consacrée à l'analyse de la réponse immunitaire humorale des canards face aux VIA FP. De manière générale, c'est cette modalité de réponse du système immunitaire du canard qui a été le plus étudiée jusqu'à aujourd'hui.

Cependant, la réponse sérologique adaptative n'est peut-être pas le meilleur moyen de défense des canards pour lutter contre une infection à VIA. En effet, il est possible que l'immunité innée joue un rôle majeur dans la résistance à l'infection. Ceci pourrait notamment expliquer pourquoi les canards ne présentent pas de symptôme suite à une infection par des VIA FP ou HP pour le poulet, malgré une réponse sérologique faible ou indétectable, alors que des poulets infectés par les mêmes virus présentent des signes cliniques plus ou moins sévères malgré une forte réponse sérologique.

Une autre possibilité consiste à envisager l'intervention de l'immunité à médiation cellulaire. En effet, celle-ci tient habituellement un rôle important dans la défense contre les maladies virales. Son implication dans la lutte contre une infection à VIA chez le canard a été suspectée par Webster *et al* lors d'une étude vaccinale qui a montré que des canards pouvaient bénéficier d'une protection complète contre une souche létale de VIA H5N1 HP malgré l'absence d'anticorps neutralisants et de réponse sérologique détectée par IHA (Webster *et al*, 2006).

L'importance de cette modalité immunitaire lors d'infection à VIA a cependant fait l'objet de très peu d'investigation chez le canard (Suarez et Schultz-Cherry, 2000). Hormis chez le modèle murin, très peu de recherches se sont focalisées sur le rôle des lymphocytes T helper (CD4+) et des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) dans la pathogenèse de l'influenza aviaire. Une étude menée sur des souris dépourvues d'anticorps et de cellules B matures a montré que les anticorps n'étaient pas nécessaires à ces animaux pour éliminer des virus influenza B moyennement pathogènes (Epstein *et al*, 1998). Le mécanisme immunitaire protecteur dépendait dans ce cas des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et a permis de protéger les animaux contre une réinfection pendant 30 jours. Cette étude prouve l'importance de l'immunité à médiation cellulaire dans la lutte contre une infection à virus influenza.

Chez le canard, il a été montré qu'une infection par le virus A/Mallard/Ohio/184/86 (H5N1) était à l'origine d'une réponse à cellules T déprimée *in vitro*. En revanche, l'infection était associée à une augmentation de l'activité des monocytes et macrophages *in vivo* (Laudert *et al*, 1993). Cette étude prouve que les virus influenza sont capables de moduler la réponse immunitaire cellulaire des canards.

Récemment, une étude a comparé l'expression de gènes liés à l'immunité chez des cellules sanguines périphériques mononuclées de canards et de poulets infectées par le même VIA H11N9 FP (Adams *et al*, 2009). Plus particulièrement, l'expression différentielle des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et l'expression de cytokines telles l'IL-2 et l'IL-6 ont été analysées afin de déterminer si une réponse de type Th1 ou Th2 est initiée par les cellules en réponse à une infection à VIA. Les auteurs ont ainsi constaté que les poulets, à l'image des mammifères, présentent une expression accrue d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6

ainsi qu'une tendance vers une réponse de type Th2. Inversement, les canards montrent une expression inchangée des IL-1 $\beta$  et IL-6 avec une tendance vers une réponse de type Th1. De même, l'expression des IFN-1 est différente entre les deux espèces. Alors que les poulets présentent une forte induction des IFN, un faible niveau d'expression est observé chez les canards. Or, l'expression des IFN et des cytokines pro-inflammatoires influence à la fois la clairance virale et la présentation clinique de la maladie. Ces résultats fournissent donc une explication concernant la différence de comportement et de schéma pathogénique des VIA chez le poulet et le canard.

Ainsi, l'absence de signe de maladie chez le canard lors d'une infection à VIA peut être liée au faible niveau d'expression de cytokines pro-inflammatoires. De même, l'induction minimale d'IFN-1 reflète l'excrétion prolongée ainsi que la lente clairance virale observée chez le canard.

Chez le poulet, la présence de signes cliniques est corrélée au haut niveau d'expression de cytokines pro-inflammatoires tandis que la courte période d'excrétion ainsi que la clairance rapide du virus peuvent être associées à la forte induction d'IFN.

D'autre part, cette étude révèle une inhibition de l'expression des molécules du CMH II chez les cellules de canard, alors que chez le poulet l'expression est inchangée. Cette observation suggère que la réponse anticorps du canard face à une infection à VIA FP est plus faible que celle du poulet.

Comme le suggère l'étude d'Adams *et al*, la modulation de l'immunité cellulaire des canards lors d'une infection à VIA est probablement impliquée dans leur résistance à l'infection.

Ainsi, ce serait les modalités particulières de réponse de l'immunité innée et de l'immunité à médiation cellulaire du canard face à une infection à VIA qui lui permettraient de jouer le rôle de réservoir de VIA. Des investigations supplémentaires dans ce domaine sont cependant nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

## **C. Limites liées aux protocoles expérimentaux**

### **1. Effectifs d'animaux limités et absence de suivi au cours du temps**

Certaines limites de nos protocoles expérimentaux ont été évoquées précédemment (étude limitée dans le temps, faible effectif d'animaux). Le faible nombre de canards attribués à chaque sous-groupe (entre 6 et 7) peut remettre en question la fiabilité des résultats, d'autant plus que tous les prélèvements d'un même groupe n'ont pas forcément été analysés (valable pour les temps d'infection j0, j1 et j3). Ainsi, il devient difficile d'interpréter un résultat moyen pour un groupe d'animaux au sein duquel la variabilité individuelle est importante. Nous nous sommes retrouvés dans ce cas de figure lorsqu'il a fallu comparer les résultats obtenus entre les animaux infectés par le virus E et ceux infectés par le virus R.

Ce problème ne se pose pas pour l'interprétation globale des résultats, virus E et R confondus, car l'effectif alors atteint dans chaque groupe est suffisant pour garantir la fiabilité des résultats.

Une autre limite de notre protocole d'infection des canards est liée au fait que les animaux ne sont pas suivis au cours du temps. En effet, à chaque temps d'infection, les prélèvements sont effectués sur des individus différents. Ce schéma expérimental rend impossible certaines investigations comme par exemple le suivi de l'excrétion virale au cours du temps.

## **2. Un protocole d'IHA discutable**

### **a. Utilisation d'un virus intact et vivant**

Notre protocole de dosage des anticorps hémagglutinants par IHA peut être critiqué, dans la mesure où nous avons utilisé un virus intact et non une suspension d'hémagglutinine purifiée. En effet, certains auteurs soutiennent que les faibles titres anticorps détectés par IHA chez différentes espèces de mammifères ou d'oiseaux suite à l'infection par des virus influenza aviaires sont dus à l'utilisation de virus intact (Lu *et al*, 1982). L'emploi d'une suspension d'hémagglutinine purifiée permet d'augmenter la détection des anticorps dirigés contre ces virus. Ceci semble se vérifier uniquement pour les virus influenza aviaires et non les virus humains. Afin d'expliquer cette particularité des virus aviaires les auteurs avancent plusieurs hypothèses dont seules deux seront retenues. La première consiste à imaginer que l'hémagglutinine des virus influenza aviaires diffère de celle des virus de mammifères dans son accessibilité aux anticorps et/ou dans les conséquences biologiques de l'attachement des anticorps. La seconde suggère une implication de l'espèce de provenance des globules rouges dans la capacité des anticorps à inhiber l'hémagglutination.

Dans notre cas, nous avons pris en compte l'importance du rôle joué par l'espèce de provenance des hématies pour la sensibilité des tests d'IHA en utilisant des globules rouges de chevaux à la place des hématies de poulet classiquement employées.

D'autre part, il est important de noter que certains auteurs n'obtiennent pas de gain de sensibilité dans leur test d'IHA en remplaçant le virus aviaire intact par une suspension d'hémagglutinine purifiée. C'est le cas notamment de Rowe *et al* qui ont obtenu les mêmes résultats avec les deux techniques dans un test d'IHA destiné à détecter des anticorps humains dirigés contre l'hémagglutinine du virus influenza aviaire H5N1 (Rowe *et al*, 1999).

Le principal inconvénient de notre protocole est surtout lié à l'emploi d'un virus vivant, à l'origine initialement de résultats faux positifs dus à l'activité de la neuraminidase virale. Nous avons cependant résolu ce problème en inhibant l'enzyme par la réalisation des tests d'IHA au froid.

### **b. Absence de traitement des sérums pour l'élimination des inhibiteurs non spécifiques**

Avant de soumettre des sérums à un test d'IHA, il est préférable de leur faire subir un prétraitement destiné à éliminer d'éventuels inhibiteurs non spécifiques qui pourraient interférer avec le test en provoquant des résultats faux positifs. Dans notre cas, on peut s'interroger sur la nécessité d'une telle précaution étant donné que les sérums aviaires ne contiennent que rarement de tels inhibiteurs (Palmer *et al*, 1975). De plus, cette étape préalable n'apparaît pas dans les recommandations officielles de l'OIE au sujet du diagnostic d'une infection à influenza aviaire par IHA (OIE, 2009).

Cependant, les bénéfices d'un traitement par le Receptor Destroying Enzyme (R.D.E.) du vibron cholérique ont été démontrés pour les sérums humains (Jordan et Oseasohn, 1954). En effet, dans une étude, Jordan et Oseasohn analysent par IHA les sérums prélevés en phase aiguë et en phase de convalescence de 58 patients infectés par différents virus influenza. Ils comparent les résultats obtenus avec ou sans prétraitement des sérums par le R.D.E. en utilisant le test de fixation du complément comme référence. Leurs résultats montrent que les

deux protocoles d'IHA (avec ou sans R.D.E.) ne font pas toujours apparaître les mêmes évolutions de titre pour un même patient. Le traitement des sérums au R.D.E s'est révélé utile pour 22,4% des patients testés en dévoilant les augmentations spécifiques de titre et en supprimant les augmentations non spécifiques. Ainsi, les auteurs concluent que l'utilisation du R.D.E permet d'améliorer à la fois la sensibilité et la spécificité du test d'IHA.

Lors de la mise au point de notre protocole d'IHA, nous avons constaté que le prétraitement des sérums de canards contre les inhibiteurs non spécifiques provoquait la plupart du temps une augmentation des titres par rapport au lot non traité. Or, comme nous étions confrontés à un problème de résultats faux positifs, nous avons choisi de ne pas réaliser le prétraitement des sérums au R.D.E. afin de ne pas compliquer le problème. Cependant, d'après l'étude de Jordan et Oseasohn, il peut être normal d'observer une hausse des titres IHA après traitement au R.D.E. puisque l'enzyme permet de révéler les résultats positifs spécifiques.

Ainsi, il est possible que nous ayons, à tort, écarté le R.D.E. de notre protocole d'IHA et que son usage aurait pu nous permettre d'améliorer la sensibilité et la spécificité de notre test.

### **III. Bilan des avantages et inconvénients des trois techniques d'analyses sérologiques**

Une grande partie du travail expérimental de cette étude a été consacré à l'optimisation et à la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic sérologique. Nous pouvons donc apporter un jugement personnel quant aux avantages et inconvénients des trois techniques employées, tant sur le plan de la réalisation pratique que sur celui de la fiabilité des résultats.

#### **A. Bilan personnel et conséquences pratiques**

Sur le plan pratique, l'ELISA nous est apparu comme le test le plus avantageux. Il est en effet le plus rapide et le plus facile à mettre en oeuvre (même pour des personnes non expérimentées). De plus, il permet de tester simultanément jusqu'à une vingtaine d'échantillons. Par contraste, la réaction de séroneutralisation est la technique la plus fastidieuse et nécessite plusieurs jours avant de pouvoir lire les résultats. De plus, l'utilisation de cultures cellulaires vivantes rend impossible l'analyse de certains échantillons, trop toxiques, comme la bile.

Le test d'IHA bénéficie, selon nous, d'une praticité intermédiaire mais pose en revanche de nombreux problèmes de fiabilité. En effet, la lecture des résultats est soumise à un certain degré de subjectivité et un personnel expérimenté est nécessaire afin de garantir un maximum de fiabilité et de reproductibilité aux résultats. D'autre part, de nombreux facteurs (conditions de température, temps d'incubation, nature des hématies, présence ou non d'un prétraitement des sérums, nature de la souche virale...) peuvent influencer sur la sensibilité et la spécificité de ce test. C'est pourquoi, il est recommandé d'effectuer au préalable un travail d'optimisation en fonction de l'espèce de provenance des sérums et de la souche virale utilisée. Enfin, la qualité de la suspension d'hématies utilisée et surtout son ancienneté sont essentielles pour obtenir des résultats facilement lisibles. Notons également qu'en présence de sérums hémolysés, la fiabilité des résultats est remise en cause.

La comparaison des résultats obtenus par les trois méthodes décrites dans ce manuscrit nous a permis de constater que le test d'IHA ne reflète pas la réalité de la réponse sérologique des canards, par manque de sensibilité. Ceci mérite certainement d'être pris en compte pour les études d'épidémiologie. D'autre part, si l'IHA est encore aujourd'hui considérée comme la méthode de référence pour le sérodiagnostic d'une infection à virus influenza aviaire, il serait judicieux de ne plus la conseiller pour l'analyse des sérums de canards.

#### **B. Analyse d'autres investigateurs**

De nombreux auteurs ont exprimé leur point de vue au sujet des avantages et inconvénients respectifs des tests d'IHA, de séroneutralisation et ELISA. Ainsi, Kayali *et al* jugent le test d'IHA moins cher, moins laborieux et plus rapide que la réaction de séroneutralisation (Kayali *et al*, 2008). Jia *et al* soulignent aussi le faible coût du test d'IHA mais lui attribuent également de nombreux autres avantages par rapport au test de séroneutralisation. En effet, la séroneutralisation requière l'emploi d'un virus vivant, ce qui implique, pour les VIA HP, de travailler dans un laboratoire de niveau BSL-3. En revanche, le test d'IHA s'avère moins contraignant dans la mesure où il peut être réalisé avec des antigènes viraux purifiés issus de

virus inactivés. Ensuite, la réponse en anticorps neutralisants détectée en séroneutralisation implique d'autres antigènes viraux que l'hémagglutinine, ce qui peut compliquer les résultats. Enfin, les auteurs soutiennent que les résultats obtenus par le test de séroneutralisation sont habituellement plus variables que ceux obtenus par IHA (Jia *et al*, 2008).

D'autres investigateurs font apparaître les avantages de la séroneutralisation par rapport à l'IHA et au test ELISA. Ainsi, lorsqu'il s'agit de détecter des anticorps dirigés contre un nouveau virus influenza, le test de séroneutralisation s'avère plus avantageux car il détecte des anticorps anti-hémagglutinine fonctionnels, hautement spécifiques du sous-type en question. De plus, le fait qu'il nécessite un virus vivant lui permet d'être développé rapidement suite à la découverte d'un nouveau virus et le rend disponible avant que des protéines virales recombinantes ou purifiées ne soient disponibles pour les autres tests (Rowe *et al*, 1999).

Enfin, Sala *et al* mettent quant à eux l'accent sur les avantages de l'ELISA par rapport au test d'IHA. Contrairement au test d'IHA, l'ELISA est réalisable sans prétraitement des sérums (inactivation par la chaleur...). Ce test présente, ensuite, tous les avantages typiques d'une méthode immuno-enzymatique : utilisation de réactifs standardisés, possible automatisation de la procédure et lecture objective des résultats, test de plusieurs échantillons dans un court laps de temps, analyse possible même en présence de sérums hémolysés (Sala *et al*, 2003).



# Conclusion

Les canards, et plus particulièrement ceux du genre *Anas*, sont un réservoir majeur de virus influenza pour des raisons qui ne sont encore pas totalement élucidées. S'il est certain que leur mode de vie favorise largement cet état, des études scientifiques essayent de comprendre quelle est la base immunitaire de cette relation hôte/parasite. Jusqu'à présent, les travaux se sont essentiellement portés sur l'analyse de la réponse immunitaire humorale des canards, détectée par la méthode diagnostique de référence : le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA). Un constat est alors rapidement apparu : les canards présentent une réponse sérologique faible voire indétectable suite à une infection par des VIA FP. De nombreux essais vaccinaux témoignent également de cette situation en montrant que les canards bénéficient d'une protection complète contre des souches létales malgré une absence de réponse sérologique détectable après vaccination.

Notre étude a été consacrée à l'analyse de la réponse sérologique systémique et biliaire de canards infectés expérimentalement par deux souches de VIA H7N1 FP au pouvoir de réplication différent. Deux méthodes de sérodiagnostic (un test ELISA indirect et un test de séroneutralisation) ont été comparées à l'IHA. Un long travail de mise au point et d'optimisation de ces trois tests a été nécessaire avant de proposer un protocole définitif.

Nos résultats montrent que l'IHA ne détecte pas la réalité de la réponse sérologique systémique des canards, par manque de sensibilité. En revanche, une bonne corrélation est observée pour l'analyse de l'immunité locale digestive entre les tests ELISA et IHA. Le pouvoir de réplication du virus inoculé ne semble pas modifier l'intensité de la réponse sérologique.

L'hypothèse que nous émettons afin d'expliquer le manque de sensibilité de l'IHA s'appuie sur les particularités structurales et fonctionnelles de l'immunoglobuline sérique prédominante du canard : l'IgY ( $\Delta Fc$ ). Celle-ci présente en effet de nombreuses déficiences fonctionnelles liées à l'absence de la région effectrice. Il est donc probable que cette immunoglobuline soit incapable d'inhiber l'hémagglutination. Plusieurs études scientifiques confortent notre hypothèse mais des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de la confirmer.

Le manque de fiabilité de l'IHA dans la détection de la réponse anticorps des canards suggère que les études d'épidémiologie menées jusqu'à présent ont été faussées. Cela remet également en question les recommandations officielles de l'OIE concernant le diagnostic d'une infection à influenza aviaire chez le canard.

D'autre part, le test d'IHA nous est apparu bien plus contraignant à mettre en oeuvre que le test ELISA en raison de ses nombreux inconvénients (résultats soumis à interprétation subjective, nombreux facteurs de variation à maîtriser...). Ainsi, nous pensons que le test ELISA (rapide, efficace et fiable) est plus adapté pour le sérodiagnostic d'une infection à influenza aviaire chez le canard.

Une étude récente suggère que la relation particulière que les canards entretiennent avec les virus influenza trouve son explication au niveau des phénomènes immunitaires cellulaires et innés. Des travaux approfondis méritent d'être menés dans ce domaine qui détient probablement l'explication du mécanisme du réservoir.

Direction de l'Enseignement et de la Pédagogie

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**Mlle Marina BERNARD**

a été admis(e) sur concours en : 2005

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 16 Juin 2010

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, Jean-Luc GUERIN, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

**Mlle Marina BERNARD**

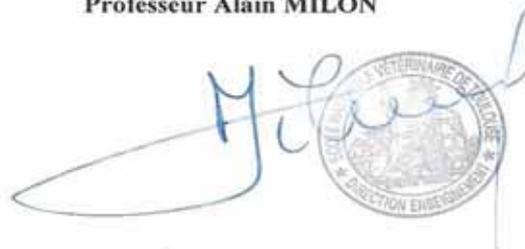
intitulée :

« Analyse de la réponse sérologique de canards (*Anas platyrhynchos*) infectés expérimentalement par des virus influenza H7N1 faiblement pathogènes : Comparaison de trois méthodes d'analyses sérologiques. »

**Le Professeur**  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
**Docteur Jean-Luc GUERIN**



**Vu :**  
**Le Directeur**  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
**Professeur Alain MILON**



**Vu :**  
**Le Président de la thèse :**  
**Professeur Jacques IZOPET**



**Vu le : 15 DEC. 2010**  
**Le Président**  
de l'Université Paul Sabatier  
**Professeur Gilles FOURTANIER**



Enseignement agricole  
Formations grandeur nature



## BIBLIOGRAPHIE

ADAMS S.C., XING Z., LI J. *et al*

Immune-related gene expression in response to H11N9 low pathogenic avian influenza virus infection in chicken and Pekin duck peripheral blood mononuclear cells.

*Molecular Immunology*, 2009; **46**: 1744-1749.

AFSSA (février 2008)

Rapport sur l'influenza aviaire hautement pathogène à virus H5N1 d'origine asiatique.

ALBINA E., BALANCA G., BENMANSOUR A. *et al*

Bird flu avian influenza 2006.

CIRAD, 2006, 48 p.

ALEXANDER D.J.

Orthomyxovirus infection.

In : McFERRAN J.B., McNULTY M.S.

Virus infection of birds.

London : Elsevier science publishers, 1993, 287-316.

ALEXANDER D.J., SPACKMAN D., GOUGH R.E. *et al*

Isolation of influenza A viruses from commercial ducks on a farm in Norfolk between August 1979 and March 1980.

*Avian Pathology*, 1981; **10**: 263-272.

ANTARASENA C., SIRIMUJALIN R., PROMMUANG P. *et al*

Tissue tropism of a Thailand strain of high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas spp.*).

*Avian Pathology*, 2006; **35(3)**: 250-253.

BEATO M.S., TOFFAN A., DE NARDI R. *et al*

A conventional, inactivated oil emulsion vaccine suppresses shedding and prevents viral meat colonisation in commercial (Pekin) ducks challenged with HPAI H5N1.

*Vaccine*, 2007; **25**: 4064-4072.

BERTELSEN F., KLAUSEN J., HOLM E. *et al*

Serological response to vaccination against avian influenza in zoo-birds using an inactivated H5N9 vaccine.

*Vaccine*, 2007; **25**: 4345-4349.

CROSS G.

Hemagglutination inhibition assays.

*Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 2002; **11(1)**: 15-18.

- EPSTEIN S.L., LO C-Y., MISPLON J.A. *et al*  
Mechanism of protective immunity against influenza virus infection in mice without antibodies.  
*The Journal of Immunology*, 1998; **160**: 322-327.
- HIGGINS D.A., SHORTRIDGE K.F., NG P.L.K.  
Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*). II. Antibody response in influenza A virus infections.  
*Immunology*, 1987; **62**: 499-504.
- HINSHAW V.S., WEBSTER R.G., TURNER B.  
The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl.  
*Canadian Journal of Microbiology*, 1980; **26**: 622-629.
- HOFFMANN E., LIPATOV A.S., WEBBY R.J. *et al*  
Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005; **102**: 12915-12920.
- HUMPHREY B.D., CALVERT C.C., KLASING K.C.  
The ratio of full length IgY to truncated IgY in immune complexes affects macrophage phagocytosis and the acute phase response of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*).  
*Developmental and Comparative Immunology*, 2004; **28**: 665-67.
- ITO T., SUZUKI Y., MITNAUL L. *et al*  
Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species.  
*Virology*, 1997; **227**: 493-499.
- JEONG O-M., KIM M-C., KIM M-J. *et al*  
Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus.  
*Journal of Veterinary Science*, 2009; **10(1)**: 53-60.
- JIA N., WANG S-X., LIU Y-X. *et al*  
Increased sensitivity for detecting avian influenza-specific antibodies by a modified hemagglutination inhibition assay using horse erythrocytes.  
*Journal of Virological Methods*, 2008; **153(1)**: 43-48.
- JOHANSSON B.E., BUCHER D.J., KILBOURNE E.D.  
Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection.  
*Journal of Virology*, 1989; **63**: 1239-1246.
- JORDAN W.S., OSEASOHN R.O.  
The use of RDE to improve the sensitivity of the hemagglutination-inhibition test for the serologic diagnosis of influenza.  
*Journal of Immunology*, 1954; **72(3)**: 229-235.

KAMPS B.S., HOFFMANN C., PREISER W. *et al*

Influenza report 2006.

Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla : Flying Publisher, 2006. 225 p.

KAYALI G., SETTERQUIST S.F., CAPUANO A.W. *et al*

Testing human sera for antibodies against avian influenza viruses: horse RBC hemagglutination vs. microneutralization assays.

*Journal of Clinical Virology*, 2008; **43**: 73-78.

KIDA H., YANAGAWA R., MATSUOKA Y.

Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response.

*Infection and Immunity*, 1980; **30(2)**: 547-553.

KIM J-K., SEILER P., FORREST H.L. *et al*

Pathogenicity and vaccine efficacy of different clades of Asian H5N1 avian influenza A viruses in domestic ducks.

*Journal of Virology*, 2008; **82(22)**: 11374-11382.

LAUDERT E., SIVANANDAN V., HALVORSON D.

Effect of an H5N1 avian influenza virus infection on the immune system of mallard ducks.

*Avian Disease*, 1993; **37**: 845-853.

LONDT B.Z., NUNEZ A., BANKS J. *et al*

Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A/turkey/Turkey/1/2005 H5N1 in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally.

*Avian Pathology*, 2008; **37(6)**: 619-627.

LU X., RENSHAW M., TUMPEY T.M. *et al*

Immunity to influenza A H9N2 viruses induced by infection and vaccination.

*Journal of Virology*, 2001; **75(10)**: 4896-4901.

LU B-L., WEBSTER R.G., HINSHAW V.S.

Failure to detect hemagglutination-inhibiting antibodies with intact avian influenza virions.

*Infection and Immunity*, 1982; **38(2)**: 530-535.

LUNDQVIST M.L., MIDDLETON D.L., RADFORD C. *et al*

Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck.

*Developmental and Comparative Immunology*, 2006; **30**: 93-100.

MAGOR K.E., HIGGINS D.A., MIDDLETON D.L. *et al*

One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck.

*The Journal of Immunology*, 1994; **153**: 5549-5555.

MAGOR K.E., WARR G.W., BANDO Y. *et al*

Secretory immune system of the duck (*Anas platyrhynchos*). Identification and expression of the genes encoding IgA and IgM heavy chains.

*European Journal of Immunology*, 1998; **28**: 1063-1068.

- MAGOR K.E., WARR G.W., MIDDLETON D. *et al*  
Structural relationship between the two IgY of the duck, *Anas platyrhynchos*: molecular genetic evidence.  
*The Journal of Immunology*, 1992; **149(8)**: 2627-2633.
- MEIJER A., BOSMAN A., VAN DE KAMP E.E.H.M. *et al*  
Measurement of antibodies to avian influenza virus A(H7N7) in humans by hemagglutination inhibition test.  
*Journal of Virological Methods*, 2006; **132**: 113-120.
- MIDDLETON D., BINGHAM J., SELLECK P. *et al*  
Efficacy of inactivated vaccines against H5N1 avian influenza infection in ducks.  
*Virology*, 2007; **359**: 66-71.
- MUNDT E., GAY L., JONES L. *et al*  
Replication and pathogenesis associated with H5N1, H5N2, and H5N3 low-pathogenic avian influenza virus infection in chickens and ducks.  
*Archives of Virology*, 2009; **154(8)**: 1241-1248.
- MURPHY F.A., FAUQUET C.M., BISHOP *et al*  
Orthomyxoviridae.  
In: Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses.  
Wien: Archives of virology, 1995, 293-299.
- MURPHY F.A., GIBBS E.P.J., HORZINEK M.C. *et al*  
Orthomyxoviridae.  
In: Veterinary Virology. Third edition.  
London: Academic Press, 1999, 459-468.
- MURPHY B.R., WEBSTER R.G.  
Orthomyxoviruses.  
In: FIELDS B.N., KNIPE D.M., HOWLEY P.M. *et al*  
Fields Virology, Vol 1.  
Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, 1397-1445.
- NG P.L.K., HIGGINS D.A.  
Bile immunoglobulin of the duck (*Anas platyrhynchos*). I. Preliminary characterization and ontogeny.  
*Immunology*, 1986; **58**: 323-327.
- NINOMIYA A., TAKADA A., OKAZAKI K. *et al*  
Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China.  
*Veterinary Microbiology*, 2002; **88**: 107-114.
- OIE (2009)  
Avian influenza.  
In: OIE Terrestrial Manual 2009, chapter 2.3.4. 1-20.

OMS (janvier 2005)

Grippe aviaire: évaluation du risque de pandémie.

PALMER D.F., COLEMAN M.T., DOWDLE W.R. *et al*

Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis.

*United States Department of Health, Education and Welfare: Atlanta USA, 1975, 135 p.*

PANTIN-JACKWOOD M.J., SUAREZ D.L., SPACKMAN E. *et al*

Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks.

*Virus Research, 2007; 130: 151-161.*

PANTIN-JACKWOOD M.J., SWAYNE D.E.

Pathobiology of asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks.

*Avian Diseases, 2007; 51: 250-259.*

PANTIN-JACKWOOD M.J., SWAYNE D.E., SUAREZ D.L.

Pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in ducks (abstract).

*International Symposium on avian influenza, 2006; p 20.*

PARHAM P.

The duck's dilemma.

*Nature, 1995; 374: 16-17.*

RAO S., KONG W-P., WEI C-J. *et al*

Multivalent HA DNA vaccination protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza infection in chickens and mice.

*Public Library of Science ONE, 2008; 3(6): e2432.*

ROWE T., ABERNATHY R.A., HU-PRIMMER J. *et al*

Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays.

*Journal of Clinical Microbiology, 1999; 37(4): 937-943.*

SAKABE S., SAKODA Y., HARAGUCHI Y. *et al*

A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens.

*Vaccine, 2008; 26: 2127-2134.*

SALA G., CORDIOLI P., MORENO-MARTIN A. *et al*

ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera.

*Avian Diseases, 2003; 47: 1057-1059.*

SHARP G.B., KAWAOKA Y., JONES D.A. *et al*

Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance.

*Journal of Virology, 1997; 71:6128-6135.*

- SHARP G.B., KAWAOKA Y., WRIGHT S.M. *et al*  
Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes.  
*Epidemiology and Infection*, 1993; **110**: 161-176.
- SLEMONS R.D., EASTERDAY B.C.  
Host response differences among five avian species to an avian influenza virus – A/turkey/Ontario/7732/66 (Hav 5 N?).  
*Bulletin of the World Health Organization*, 1972; **47**: 521-525.
- SOUBIES S.M., VOLMER C., CROVILLE G. *et al*  
Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence.  
*Journal of Virology*, 2010; **84 (13)**: 6733-6747.
- STALLKNECHT D.E.  
Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc.  
In: SWAYNE D.E., SLEMONS R.D.  
Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza.  
*United States Animal Health Association*, 1998, p 61-69.
- STALLKNECHT D.E., SHANE S.M.  
Host range of avian influenza virus in free-living birds.  
*Veterinary Research Communications*, 1988; **12 (2-3)**: 125-141.
- STEENSELS M., BUBLOT M., VAN BORM S. *et al*  
Prime-boost vaccination with a fowlpox vector and an inactivated avian influenza vaccine is highly immunogenic in Pekin ducks challenged with Asian H5N1 HPAI.  
*Vaccine*, 2008; **27(5)**: 646-654.
- STEPHENSON I., WOOD J.M., NICHOLSON K.G. *et al*  
Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin.  
*Journal of Medical Virology*, 2003; **70**: 391-398.
- STURM-RAMIREZ K.M., ELLIS T., BOUSFIELD B. *et al*  
Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong-Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks.  
*Journal of Virology*, 2004; **78(9)**: 4892-4901.
- SUAREZ D.L., SCHULTZ-CHERRY S.  
Immunology of avian influenza virus: a review.  
*Developmental and Comparative Immunology*, 2000; **24**: 269-283.
- TIAN G., ZHANG S., LI Y. *et al*  
Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics.  
*Virology*, 2005; **341**: 153-162.

VAN DEN BERG T.

Epidémiologie et surveillance de la grippe aviaire chez les oiseaux. Diagnostic et surveillance des maladies infectieuses.

*22<sup>e</sup> Séminaire de l'Institut scientifique de Santé Publique*, 23 novembre 2006, 31-34.

VASCELLARI M., GRANATO A., TREVISAN L. *et al*

Pathologic findings of highly pathogenic avian influenza virus A/duck/Vietnam/12/05 (H5N1) in experimentally infected Pekin ducks, based on immunohistochemistry and in situ hybridization.

*Veterinary Pathology*, 2007; **44**: 635-642.

WEBSTER R.G., HULSE D.J.

Microbial adaptation and change: avian influenza.

*Revue Scientifique et Technique – Office International des Epizooties*, 2004 ; **23(2)** : 453-465.

WEBSTER R.G., WEBBY R.J., HOFFMANN E. *et al*

The immunogenicity and efficacy against H5N1 challenge of reverse genetics-derived H5N3 influenza vaccine in ducks and chickens.

*Virology*, 2006; **351**: 303-311.

WEBSTER R.G., YAKHNO M., HINSHAW V.S. *et al*

Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks.

*Virology*, 1978; **84**: 268-278.

WOOD G.W., PARSONS G., ALEXANDER D.J.

Replication of influenza A viruses of high and low pathogenicity for chickens at different sites in chickens and ducks following intranasal inoculation.

*Avian Pathology*, 1995; **24**: 545-551.

### Références accessibles sur Internet

FUTURA-SANTE (page consultée le 3 octobre 2010)

La grippe aviaire et sa transmission chez l'homme [en ligne]

Adresse URL : [www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13\\_647/c3/221/p2/](http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/la-grippe-aviaire-et-sa-transmission-chez-lhomme-13_647/c3/221/p2/)

Institut national de recherche pédagogique (page consultée le 20 octobre 2010)

Modalités de l'ELISA indirect [en ligne]

Adresse URL : <http://www.inrp.fr/Access/biotic/immuno/html/elisaind.htm>

WIKIPEDIA (page consultée le 20 octobre 2010)

Enzyme-linked immunosorbent assay [en ligne]

Adresse URL : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked\\_immunosorbent\\_assaywikipedia](http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_immunosorbent_assaywikipedia)

World Health Organization (page consultée le 3 octobre 2010)

Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses [en ligne]

Adresse URL: [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/nomenclature/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/)



## ANNEXES

**1. Titres IHA obtenus pour un échantillon de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours de quatre manipulations** (les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de sérum inhibant l'hémagglutination par 4 UHA de virus) :

Animal	Manipulation 1	Manipulation 2	Manipulation 3	Manipulation 4
J0 255		< 8	8	
J0 266		< 8	< 8	
J0 262		< 8	< 8	
J3 TG				8
J3 TH				8
J3 TI				8
J3 EH				32
J3 EI				16
J3 EJ				16
J3 RH				32
J3 RI				16
J6 TM	16	16	32	16
J6 TO	8	< 8	8	
J6 TP	16	8	16	
J6 EO	128	64	128	
J6 ER	< 8	8	32	
J6 ES	16	16	128	
J6 ET	32	32	64	
J6 EU	16	< 8	256	
J6 EP		32	64	
J6 EQ		8	32	
J6 RO		64	256	
J6 RS	16	8	32	
J6 RQ		32	32	
J6 RT	16	16	64	
J6 RP		< 8	128	
J6 RR		32	32	
J6 RU	16	16	32	
J16 R261		< 8	64	
J16 R268		< 8	32	
J16 R260		16	32	
J16 R267		8	16	
J16 R263		< 8	32	
J16 R262		8	16	
J16 R257		16	32	
J16 E256		< 8	32	
J16 E251		8	8	

<b>J16 E266</b>		< 8	64	
<b>J16 E255</b>		< 8	16	
<b>J16 E253</b>		< 8	< 8	
<b>J16 E252</b>		< 8	< 8	
<b>Témoin positif H7</b>	128	128	256	128

**2. Titres IHA moyens des échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29**  
 (les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de sérum inhibant l'hémagglutination par 4 UHA de virus) :

<b>Animal</b>	<b>Titre IHA moyen</b>
J0 255	4
J0 266	< 8
J0 262	< 8
J3 TG	8
J3 TH	8
J3 TI	8
J3 EH	32
J3 EI	16
J3 EJ	16
J3 RH	32
J3 RI	16
J6 TM	20
J6 TO	6
J6 TP	13
J6 EO	106
J6 ER	13
J6 ES	53
J6 ET	42
J6 EU	91
J6 EP	48
J6 EQ	20
J6 RO	160
J6 RS	18
J6 RQ	32
J6 RT	32
J6 RP	64
J6 RR	32
J6 RU	21
J16 R261	32
J16 R268	16
J16 R260	24
J16 R267	12
J16 R263	16
J16 R262	12
J16 R257	24
J16 E256	16
J16 E251	8
J16 E266	32
J16 E255	8
J16 E253	< 8
J16 E252	< 8
<b>Témoin positif H7</b>	<b>160</b>

**3. Titres IHA obtenus pour un échantillon de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29** (les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de bile inhibant l'hémagglutination par 4 UHA de virus) :

<b>Animal</b>	<b>Titre IHA</b>
J1 TC	< 8
J3 EH	< 8
J3 EI	< 8
J3 EJ	< 8
J3 EK	< 8
J3 EL	< 8
J3 RH	< 8
J3 RI	< 8
J3 RK	< 8
J3 RL	< 8
J6 TP	< 8
J6 TQ	< 8
J6 EO	64
J6 ER	64
J6 ES	64
J6 ET	128
J6 EU	< 8
J6 EP	64
J6 EQ	< 8
J6 RO	128
J6 RS	64
J6 RQ	128
J6 RT	< 8
J6 RP	64
J6 RR	64
J6 RU	64
J16 R261	128
J16 R268	128
J16 R260	128
J16 R267	64
J16 R263	128
J16 R262	128
J16 R257	128
J16 E252	64
J16 E251	128
J16 E253	128
J16 E255	128
J16 E266	256
J16 E256	128
<b>Témoin positif H7</b>	128

**4. Titres ELISA obtenus pour un échantillon de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours de six tests (les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de sérum dont la densité optique reste supérieure ou égale au seuil de positivité):**

Animal	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	Test 6
J1 TA		< 50				
J1 TB		< 50				
J1 TC		50				
J1 TD		50				
J1 TE		< 50				
J1 TF		50				
J3 EH					< 50	
J3 EI					< 50	
J3 EJ						< 50
J3 EK						< 50
J3 EL						< 50
J3 RH					< 50	
J3 RI						< 50
J3 RK						< 50
J3 RL						< 50
J6 TM	100	50				
J6 TN		< 50				
J6 TO		< 50				
J6 TP		< 50				
J6 TQ		< 50				
J6 TR		< 50				
J6 EO	400				200	
J6 EP			100			
J6 EQ			100			
J6 ER	200		200			
J6 ES			100			
J6 ET			200			
J6 EU					200	
J6 RO			400			
J6 RP	200				200	
J6 RQ			100			
J6 RR					200	
J6 RS			400			
J6 RT			100			
J6 RU			< 50			
J16 R261				800		
J16 R268				400		
J16 R260				800		
J16 R267					200	
J16 R263				200		
J16 R262				400		
J16 R257					200	

<b>J16 E256</b>				400		
<b>J16 E251</b>				400		
<b>J16 E266</b>				400		
<b>J16 E255</b>				800		
<b>J16 E253</b>					400	
<b>J16 E252</b>				200		
<b>Témoïn positif H7</b>	3200	1600	> 400	> 400	> 400	> 400

**5. Titres ELISA moyens des échantillons de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29** (les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de sérum dont la densité optique reste supérieure ou égale au seuil de positivité):

<b>Animal</b>	<b>Titre ELISA moyen</b>
J1 TA	< 50
J1 TB	< 50
J1 TC	50
J1 TD	50
J1 TE	< 50
J1 TF	50
J3 EH	< 50
J3 EI	< 50
J3 EJ	< 50
J3 EK	< 50
J3 EL	< 50
J3 RH	< 50
J3 RI	< 50
J3 RK	< 50
J3 RL	< 50
J6 TM	75
J6 TN	< 50
J6 TO	< 50
J6 TP	< 50
J6 TQ	< 50
J6 TR	< 50
J6 EO	300
J6 EP	100
J6 EQ	100
J6 ER	200
J6 ES	100
J6 ET	200
J6 EU	200
J6 RO	400
J6 RP	200
J6 RQ	100
J6 RR	200
J6 RS	400
J6 RT	100
J6 RU	< 50
J16 R261	800
J16 R268	400
J16 R260	800
J16 R267	200
J16 R263	200
J16 R262	400
J16 R257	200

<b>J16 E256</b>	400
<b>J16 E251</b>	400
<b>J16 E266</b>	400
<b>J16 E255</b>	800
<b>J16 E253</b>	400
<b>J16 E252</b>	200
<b>Témoin positif H7</b>	2400

**6. Titres ELISA obtenus pour un échantillon de biles de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 au cours de 3 tests (les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de bile dont la densité optique reste supérieure ou égale au seuil de positivité):**

<b>Animal</b>	<b>Test 1</b>	<b>Test 2</b>	<b>Test 3</b>
J1 TC	< 20	< 20	
J3 EH			20
J3 EI			40
J3 EJ			20
J3 EK			20
J3 EL			160
J3 RH			< 20
J3 RI			20
J3 RK			20
J3 RL			20
J6 TM	< 20		
J6 TP		< 20	
J6 TQ		< 20	
J6 EO		40	
J6 EP	40		
J6 EQ	< 20		
J6 ER		40	
J6 ES	20		
J6 ET		80	
J6 EU	20		
J6 RO	40		
J6 RP		40	
J6 RQ		80	
J6 RR	40		
J6 RS	40		
J6 RT		20	
J6 RU	20		
J16 R267		40	
J16 R261		160	
J16 R260		80	
J16 R268		80	
J16 R263		80	
J16 R262		80	
J16 R257		40	
J16 E255		320	
J16 E251		160	
J16 E266		320	
J16 E256		80	
J16 E253		80	
J16 E252		80	
<b>Témoin sérum positif H7</b>	<b>&gt; 400</b>	<b>&gt; 400</b>	<b>&gt; 400</b>

**7. Titres obtenus par la réaction de séroneutralisation pour un échantillon de sérums de l'expérimentation PX-ANI-A2-29 (les titres sont exprimés comme l'inverse de la plus haute dilution de sérum qui neutralise l'infection de cellules MDCK par 250 pfu de virus) :**

<b>Animal</b>	<b>Titre en séroneutralisation</b>
J3 EH	< 8
J3 EI	< 8
J3 RH	< 8
J6 TM	< 8
J6 TP	< 8
J6 EO	< 8
J6 EP	8
J6 EQ	16
J6 ER	< 8
J6 ES	8
J6 ET	< 8
J6 EU	32
J6 RO	< 8
J6 RP	< 8
J6 RQ	< 8
J6 RR	8
J6 RS	16
J6 RT	8
J6 RU	16
J16 R261	16
J16 R268	64
J16 R260	32
J16 R267	32
J16 R263	16
J16 R262	16
J16 R257	16
J16 E256	32
J16 E251	32
J16 E266	16
J16 E255	32
J16 E253	32
J16 E252	32
<b>Témoin positif H7</b>	160

**8. Comparaison des titres obtenus pour chaque sérum de canard selon la méthode de détection d'anticorps :**

<b>Animal</b>	<b>Titre IHA moyen</b>	<b>Titre ELISA moyen</b>	<b>Titre en séroneutralisation</b>
J3 EH	32	< 50	< 8
J3 EI	16	< 50	< 8
J3 RH	32	< 50	< 8
J6 TM	20	75	< 8
J6 TP	13	< 50	< 8
J6 EO	106	300	< 8
J6 EP	48	100	8
J6 EQ	20	100	16
J6 ER	13	200	< 8
J6 ES	53	100	8
J6 ET	42	200	< 8
J6 EU	91	200	32
J6 RO	160	400	< 8
J6 RP	64	200	< 8
J6 RQ	32	100	< 8
J6 RR	32	200	8
J6 RS	18	400	16
J6 RT	32	100	8
J6 RU	21	< 50	16
J16 R261	32	800	16
J16 R268	16	400	64
J16 R260	24	800	32
J16 R267	12	200	32
J16 R263	16	200	16
J16 R262	12	400	16
J16 R257	24	200	16
J16 E256	16	400	32
J16 E251	8	400	32
J16 E266	32	400	16
J16 E255	8	800	32
J16 E253	< 8	400	32
J16 E252	< 8	200	32
<b>Témoin positif H7</b>	<b>128</b>	<b>2400</b>	<b>160</b>

**9. Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de sérums de canard selon la méthode de détection d'anticorps :**

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre IHA moyen</b>	<b>Titre ELISA moyen</b>	<b>Titre moyen en séroneutralisation</b>
<b>J3 E</b>	24	< 50	< 8
<b>J3 R</b>	32	< 50	< 8
<b>J6 T</b>	16	38	< 8
<b>J6 E</b>	53	171	9
<b>J6 R</b>	51	200	7
<b>J16 R</b>	19	428	27
<b>J16 E</b>	11	433	29
<b>Témoin positif H7</b>	128	2400	160

**10. Comparaison des titres obtenus pour chaque bile de canard selon la méthode de détection d'anticorps :**

<b>Animal</b>	<b>Titre IHA moyen</b>	<b>Titre ELISA moyen</b>
J3 EH	1	20
J3 EI	1	40
J3 EJ	1	20
J3 EK	1	20
J3 EL	1	160
J3 RH	1	1
J3 RI	1	20
J3 RK	1	20
J3 RL	1	20
J6 TP	1	1
J6 TQ	1	1
J6 EO	64	40
J6 ER	64	40
J6 ES	64	20
J6 ET	128	80
J6 EU	1	20
J6 EP	64	40
J6 EQ	1	1
J6 RO	128	40
J6 RS	64	40
J6 RQ	128	80
J6 RT	1	20
J6 RP	64	40
J6 RR	64	40
J6 RU	64	20
J16 R261	128	160
J16 R268	128	80
J16 R260	128	80
J16 R267	64	40
J16 R263	128	80
J16 R262	128	80
J16 R257	128	40
J16 E252	64	80
J16 E251	128	160
J16 E253	128	80
J16 E255	128	320
J16 E266	256	320
J16 E256	128	80

**11. Comparaison des titres obtenus pour chaque sous-groupe de biles de canard selon la méthode de détection d'anticorps :**

<b>Sous-groupe d'animaux</b>	<b>Titre IHA moyen</b>	<b>Titre ELISA moyen</b>
J3 E	<8	52
J3 R	<8	15
J6 T	<8	<20
J6 E	55	34
J6 R	73	40
J16 R	118	80
J16 E	138	173