



**HAL**  
open science

# Etude de la transmission du virus Influenza au sein de populations d'Anatidae

Aymen Mamlouk

► **To cite this version:**

Aymen Mamlouk. Etude de la transmission du virus Influenza au sein de populations d'Anatidae. Médecine vétérinaire et santé animale. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : . tel-00656003v1

**HAL Id: tel-00656003**

**<https://theses.hal.science/tel-00656003v1>**

Submitted on 3 Jan 2012 (v1), last revised 17 Mar 2012 (v2)

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

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

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**

Spécialité : "Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement"

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Aymen MAMLOUK**

Thèse préparée au sein du Laboratoire "Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité - Informatique, Mathématiques et Applications de Grenoble" (TIMC-IMAG) dans l'École Doctorale "Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement" (EDISCE)

**Etude de la transmission du virus  
Influenza au sein de populations  
d'*Anatidae***

Thèse soutenue publiquement le «20/12/2011», devant le jury composé de :

**Mr Régis DE GAUDEMARIS**

Professeur, CHU Michalon - Grenoble

*Président*

**Mme Nadia HADDAD**

Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

*Rapporteur*

**Mr Jean Claude MANUGUERRA**

Docteur, Institut Pasteur

*Rapporteur*

**Mme Michèle OTTMANN**

Maître de conférences, Université Claude Bernard Lyon

*Examineur*

**Mr Philippe SABATIER**

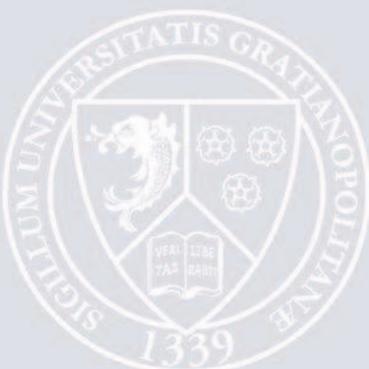
Professeur, Vetagro-Sup

*Directeur de thèse*

**Mr Marc ARTOIS**

Professeur, Vetagro-Sup

*Co-directeur de thèse*





## Avant-propos

Je tiens à remercier vivement les membres du jury :

Philippe Sabatier, qui m'a proposé ce sujet de thèse et m'a fait confiance malgré les circonstances organisationnelles particulières. Je le remercie pour son optimisme, sa disponibilité et son soutien permanent même dans les moments difficiles où le doute s'installe.

Marc Artois, qui a co-encadré cette thèse, pour m'avoir transmis son savoir en épidémiologie et en expérimentation animale, que j'espère pouvoir exploiter comme je le dois. Je le remercie pour ces encouragements, ses idées et son sens pratique.

Michèle Ottmann, qui a contribué significativement à la réalisation de ce travail grâce aux ressources humaines et matérielles de son laboratoire. Je la remercie pour son accueil et ses mots d'encouragement.

Régis de Gaudemaris, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Jean-Claude Manuguerra et Nadia Haddad, qui ont accepté de juger notre travail et d'être rapporteurs de thèse.

Ce projet a été financé dans le cadre du programme RIVERS (Resistance of Influenza Viruses in Environmental Reservoirs and Systems) ; programme de la commission européenne sous la référence SSP-5-B-INFLUENZA 044405.

Mon travail a été réalisé dans le laboratoire TIMC-IMAG, en particulier au sein de l'équipe EPSP de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon (Vetagro-Sup) dirigée par Philippe Sabatier. Je tiens donc à remercier tous les membres de cette unité devenue au fil des ans comme une seconde famille, particulièrement Fereshteh Firouzi, Martine Meyer et Dominique Bicout.

Je remercie également les responsables de l'Institut Claude Bourgelat de m'avoir permis de réaliser une partie de mon travail de thèse dans leur locaux, ainsi que Patrick Belli du service Anatomopathologie et Catherine Jamard de l'INSERM pour l'aide qu'ils m'ont apporté.

Je tiens aussi à remercier les membres du Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine de la Faculté de Médecine Laennec (Université de Lyon I), pour leur accueil et leur aide dans l'analyse de mes prélèvements.

Enfin je veux remercier les partenaires de terrain qui ont contribué à ce travail : Benoit Castanier et le personnel de la Fondation Verots, François Antoine et le personnel de la Fédération des chasseurs de l'Ain, pour leur aide dans la réalisation de la campagne de prélèvement en Dombes pendant l'hiver 2009 ; Abdelghani Benkhelil et la société Synbiotics pour nous avoir fourni les kits de diagnostic rapide des virus Influenza ; Nathalie Deboosere de l'Institut Pasteur de Lille.

Une pensée spéciale à ceux avec qui j'ai partagé le bureau des stagiaires et des doctorants à l'Unité Biomathématiques et Epidémiologie de Vetagro-Sup: Philippe Coné, Moussa Fané, Eva Petit, Delphine Doctrinal, Alina Macacu, Mali, Bilel et Saoussen.

Je tiens finalement à exprimer ma gratitude envers l'Ambassade de Tunisie en France pour le financement de ma bourse de thèse.

En dehors de toutes ces personnes, il y a ceux que je veux remercier simplement parce qu'ils sont ma raison d'être là où je suis aujourd'hui. Mes parents Salah et Jamila, ma sœur Arwa, ma fiancée Sahar ainsi que tous mes ami(e)s. Merci à vous tous et toutes pour votre patience, compréhension et soutien. Merci d'être dans ma vie.

## Table des matières

<b>Avant-Propos</b>	<b>1</b>
<b>Table des Figures</b>	<b>7</b>
<b>Table des Tableaux</b>	<b>9</b>
<b>Partie I. Introduction</b>	<b>11</b>
<b>1. Objectifs</b>	<b>14</b>
<b>2. Situation épidémiologique des influenza aviaires</b>	<b>15</b>
2.1 Origine antique des pestes aviaires	15
2.2 La panzootie d'influenza aviaire à virus H5N1	17
2.3 Surveillance des influenza aviaires hautement pathogènes	20
<b>3. Conditions d'émergence des virus influenza</b>	<b>24</b>
3.1 Variabilité génétique des virus	25
3.2 Impact des virus influenza sur l'hôte	28
3.3 Sensibilité différentielle des espèces hôtes	30
3.4 Variation spatio-temporelle de la prévalence des virus	33
3.5 Rôle spécifique des canards dans la transmission	35
3.6 Propagation des virus à la volaille domestique	40
<b>4. Conclusion</b>	<b>41</b>
<b>Partie II. Matériels et méthodes</b>	<b>43</b>
<b>1- Site de l'étude : La Dombes</b>	<b>45</b>
1.1 Avifaune	45
1.2 Milieu naturel	46
1.3 Climat	47
<b>2- Matériel de l'étude</b>	<b>48</b>
2.1 Animaux	48
2.1.1 Le Canard pekin ( <i>Anas platyrhynchos domestica</i> )	48

2.1.2 Le Fuligule morillon ( <i>Aythya fuligula</i> )	49
2.2 Virus	50
2.2.1 Virus circulants en Dombes	50
2.2.2 Virus utilisé en expérimentation	51
<b>3- Programme de l'étude</b>	<b>52</b>
<b>4- Publications</b>	<b>53</b>
<b>Partie III. Essai cliniques et étude environnementale</b>	<b>55</b>
<b>Chapitre I<sup>er</sup></b> : Excrétion et diffusion intestinale du virus Influenza aviaire H5N2 chez les canards de surface (étude préliminaire)	57
<b>Chapitre II</b> : Transmission d'un virus influenza faiblement pathogène H5N2 chez les canards plongeurs inoculés	75
<b>Chapitre III</b> : Les virus influenza aviaires dans l'environnement aquatique des oiseaux d'eau durant la migration d'automne en Dombes, France	97
<b>Partie IV. Discussion</b>	<b>113</b>
<b>1. Rôle de l'excrétion des VIA FP par les canards (de surface versus plongeurs)</b>	<b>115</b>
1.1 Excrétion des VIA FP par les canards de surface	116
1.2 Excrétion des VIA FP chez les canards plongeurs	117
1.3 Rôle de réservoir épidémiologique	119
<b>2. Rôle de l'environnement dans la transmission des VIA : cas de la Dombes</b>	<b>120</b>
2.1 Présence des VIA dans les fientes des bords des étangs	120
2.2 Présence des VIA dans l'eau des étangs	122
2.3 Persistance des VIA dans l'environnement des étangs	123
<b>3. Apport de la surveillance environnementale des VIA</b>	<b>123</b>
3.1 Etat des lieux de la surveillance des VIA en Dombes	124
3.2 Recommandations relatives à la surveillance des zones humides	126
3.3 Organisation de la surveillance en Dombes	128

<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>131</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>135</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>147</b>



## Table des figures

**Figure 1 :** Pays ayant déclaré une infection à virus H5N1 (mise à jour le 07/11/2011 pour l'année 2011). (Modifiée d'après : FAO EMPRES-i, OIE WAHID)

**Figure 2 :** Répartition des cas humains confirmés d'infection par le virus H5N1 depuis 2003 (OMS - Mise à jour du 16 mars 2011)

**Figure 3 :** Répartition des foyers de virus de sous-types H5 et ceux parmi eux qui sont confirmés de sous-types H5N1 déclarés entre 25 février et 25 août 2011 (FAO EMPRES-i)

**Figure 4 :** Structure d'un virus influenza aviaire

**Figure 5 :** Arbre phylogénétique du gène HA des virus influenza aviaires A. (A) Arbre affichant les différentes lignées génétiques isolées chez le canard (Anseriformes) et celles isolées du goéland (Charadriiformes). (B) Arbre affichant l'évolution du virus H7 allopatriques

**Figure 6 :** Mécanismes de migration des oiseaux d'eau (Modifiée d'après Kim et al., 2009)

**Figure 7 :** Région de la Dombes où se concentrent près de 1000 étangs. En Haut à droite, représentation des voies de migration traversant la France (axes Manche-Atlantique et Rhin-Rhône)



## Table des tableaux

**Tableau 1** : Principales étapes de l'histoire des pestes aviaires

**Tableau 2** : Déclarations des foyers d'influenza virus hautement pathogène



# Partie I

# INTRODUCTION



L'émergence de nouvelles maladies infectieuses humaines résultant des passages interspécifiques, est un phénomène qui a marqué l'histoire récente de l'infectiologie. Des études ont montré que les zoonoses constituent la part la plus importante des maladies émergentes chez l'homme [1]. Parallèlement, plusieurs revues bibliographiques récentes ont souligné l'importance de l'émergence ou de la réémergence de maladies infectieuses d'importance vétérinaire [2, 3]. Les agents pathogènes, touchant de nouvelles populations, évoluent par mutations, recombinaisons ou réarrangements génétiques, ce qui leur permet de s'adapter au polymorphisme génétique de leurs hôtes humains ou animaux. La faune sauvage peut présenter les caractéristiques de réservoirs de ces agents ou au contraire, celle de victimes d'une infection de l'animal domestique ou de l'homme. Or, les zones humides, constituent des points d'entrée privilégiés d'agents infectieux, transmis par l'avifaune et/ou par des vecteurs.

En abritant un important pool de virus zoonotiques, la classe des Oiseaux représente la clef de voûte de « l'écologie virale » de plusieurs maladies émergentes (Influenza aviaire, fièvre West-Nile, Encéphalite japonaise,...). La biologie des oiseaux, et tout particulièrement le phénomène migratoire, a un impact sur la circulation virale globale [4-8]. En quelques semaines, des milliards d'oiseaux transitent chaque année d'un continent à l'autre pour rejoindre, selon la saison, leur site d'hivernage ou de nidification [9]. Si au cours de ces déplacements, une très faible proportion était infectée, elle représenterait néanmoins une masse considérable d'animaux excréant un agent pathogène pouvant exposer les populations réceptives sur leur parcours de l'Eurasie vers l'Afrique. Ainsi, la migration, et la biologie des oiseaux qui lui sont associée, ont un impact potentiel sur la circulation de plusieurs agents pathogènes.

L'analyse du rôle des oiseaux sauvages dans les cycles épidémiologiques, en tant qu'hôtes, principaux ou secondaires, implique une compréhension des relations qu'ils entretiennent avec les agents pathogènes, les autres animaux hôtes et leur environnement. Notre étude se situe à la frontière entre l'épidémiologie, qui est l'étude des maladies et des facteurs de santé dans une

population, et de l'écologie, qui est l'étude des interactions d'une part entre différents organismes et d'autre part entre les organismes et leur milieu. Le modèle choisi pour notre étude est celui des virus influenza aviaires (VIA) qui appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*.

## 1. Objectifs

Notre travail visait l'analyse des modalités d'excrétion, de persistance et d'évolution spontanée des virus influenza aviaires au sein de populations naturelles de canards et de leur environnement. L'étude comportait trois volets : (i) Etude des caractéristiques de l'infection à la suite d'une inoculation expérimentale de canards (Chapitre I) ; (ii) Etude de la transmission des virus influenza A faiblement pathogènes (VIA FP) de canards « sauvages » inoculés à des canards-contacts domestiques (Chapitre II) ; (iii) Dépistage des virus Influenza dans l'environnement naturel et distribution locale des virus, au voisinage des étangs et des mares de la Dombes, Ain ; (Chapitre III).

En introduction à la présentation de ces études, nous résumerons la situation épidémiologique observée dans les Dombes depuis le début des années 2000, soulignerons les difficultés associées aux investigations sur les maladies de l'avifaune sauvage, dresserons une synthèse des connaissances actuelles sur le rôle des oiseaux sauvages et de leur environnement dans la circulation des virus influenza faiblement pathogènes et enfin suggèrerons de nouvelles perspectives de surveillance environnementale. Notre objectif ultime est l'analyse des conditions de persistance de VIA FP au sein des populations naturelles de canards de surface et de canards plongeurs, considérés comme les meilleurs candidats au rôle de réservoir du virus IA ; ceci doit nous permettre d'apprécier le risque de propagation de ces virus aux populations exposées de volailles domestiques élevées en plein air, notamment dans la Dombes. L'étude éco-épidémiologique des virus influenza faiblement pathogènes doit permettre de développer des modèles épidémiologiques prédictifs de la propagation du virus (en cours de développement au sein de l'équipe EPSP/TIMC-IMAG) et de cartographier les zones à risque (exemple d'une région humide : La Dombes) en

s'appuyant sur les connaissances de la dispersion locale des canards dans l'espace et dans le temps.

Notre problématique visait à apprécier les stratégies de contrôle des épizooties de VIA et de proposer des recommandations concrètes afin d'améliorer la surveillance des virus influenza dans les régions à haut risque de contamination et de propagation des virus à partir de l'avifaune sauvage. La connaissance des facteurs de risques environnementaux doit permettre, en effet, de : a) mesurer la durée ou l'étendue de l'infection au sein des populations sauvages ; b) proposer des mesures pour réduire ou accroître la transmission aux volailles domestiques ; c) comprendre les mécanismes qui limitent ou facilitent l'apparition de sous-types de VIA virulents pour l'homme et l'animal.

## **2. Situation épidémiologique des influenza aviaires**

Bien que certaines formes de pestes aviaires aient été décrites depuis l'antiquité, cette maladie était connue pour être assez rare, affectant relativement un faible nombre de volailles et pouvant être efficacement contenue à son apparition grâce aux méthodes de lutte et d'éradication conventionnelles. Toutefois au 20<sup>ème</sup> siècle, une sensible augmentation du nombre d'épizooties a attiré l'attention de la communauté scientifique.

Chez l'homme, trois pandémies de grippe ont été recensées au XX<sup>ème</sup> siècle: (i) la grippe espagnole de 1918-1919 à virus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> qui fit entre 40 et 100 millions de morts ; (ii) la grippe asiatique en 1957 à virus H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> qui fit entre 1 et 4 millions de morts ; (iii) la grippe de Hong Kong en 1968 à virus H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> qui fit entre 1 et 2 millions de morts.

### ***2.1 Origine antique des pestes aviaires***

Les premières descriptions des pestes aviaires, c'est-à-dire des épisodes de mortalité massive d'oiseaux [10], remontent à l'Antiquité (Tableau I). Plusieurs récits concernent les oiseaux sauvages. Pour les chroniqueurs, les épisodes de mortalité des oiseaux sauvages étaient généralement le résultat de batailles

rangées. Les dates de toutes ces batailles ont été relevées par George Fleming qui cite par exemple les épidémies survenues en 571, 942 ou 1366 [11]. Certains symptômes décrits dans ces récits, de même que certains traits épidémiologiques (premières manifestations de l'épizootie chez les oies ou les canards), évoquent bien l'influenza aviaire. En 1366 est évoquée une concomitance entre une épidémie humaine et une épizootie chez les oiseaux sauvages en Angleterre. Le même constat sera également fait en Bohême en 1614.

La peste aviaire a été identifiée pour la première fois en 1878 par un scientifique italien, Edoardo Perroncito, qui décrit l'émergence d'une maladie contagieuse affectant des volailles domestiques dans des fermes près de Turin, Italie [12]. En 1880, Rivolta et Delprato, considérant que les caractères cliniques de cette maladie étaient différents de ceux du choléra des poules à *Pasteurella multocida* [10], appelèrent «typhus exsudatif», cette nouvelle maladie. De nombreux microbiologistes européens tentèrent alors, sans succès, d'en isoler l'agent causal. Centanni et son élève Savonuzzi décrivent, en 1901, les particularités de l'agent causal de cette nouvelle maladie, baptisée "peste aviaria" [10]. La maladie de Newcastle ou « pseudo peste aviaire », décrite pour la première fois en 1926 aux Indes néerlandaises par Kraneveldt, puis en Angleterre à Newcastle, par Doyle, a été reconnue comme épidémiologiquement différente de la « vraie » peste aviaire. Toutefois, il faudra attendre 1955 pour que les deux virus soient bien différenciés : le virus de la peste aviaire vraie fut alors classé dans la famille des *Orthomyxoviridae*, genre *Influenza* (type A) et le virus de la maladie de Newcastle fut classé dans la famille des *Paramyxoviridae*, genre *Rubulavirus*.

**Tableau I : Principales étapes de l'histoire des pestes aviaires**

Date	Evènement	Référence
1200, 430, 218 et 43 av. J.C	Mortalité concomitante du bétail, de l'homme et des oiseaux	[10]
571	Mortalité d'oiseaux sauvages en Angleterre	[13]
671	Mortalité massive de volailles en Angleterre	
942	Mortalité d'oiseaux sauvages en Irlande	
1286	Mortalité subite des oiseaux en Autriche	
1366	Mortalité de moineaux suivie d'une épidémie humaine en Angleterre	[11]
1578	Epizootie frappant les poules à Paris	[14]
1614	Epidémie mortelle chez les hommes en République Tchèque, contemporaine d'une épizootie chez les poules	[14]
1656	Enorme mortalité de pélicans aux Antilles	[14]
1714	Epizootie chez les pigeons à Paris	[14]
1718 à 1721	Les oies sont particulièrement touchées en 1718 et 1719 en Pologne et la maladie s'étend aux cigognes en 1721	[14]
1769	Mortalité générale des oies à Hanovre en Allemagne	[14]
1774	600 oies seraient mortes aux bords de la Meurthe en Lorraine en présentant des symptômes de diarrhée et vertiges	[14]
1789	Epizootie chez les poules en Italie du Nord. Les symptômes décrits sont ceux d'une maladie infectieuse, les lésions affectant les appareils respiratoires et digestifs	[14]
1830 à 1831	Episodes de mortalité aviaire en Europe	
1841	Grande mortalité de canards sauvages dans les Landes (20 000)	[14]

## 2.2 La Panzootie d'influenza aviaire à virus H5N1

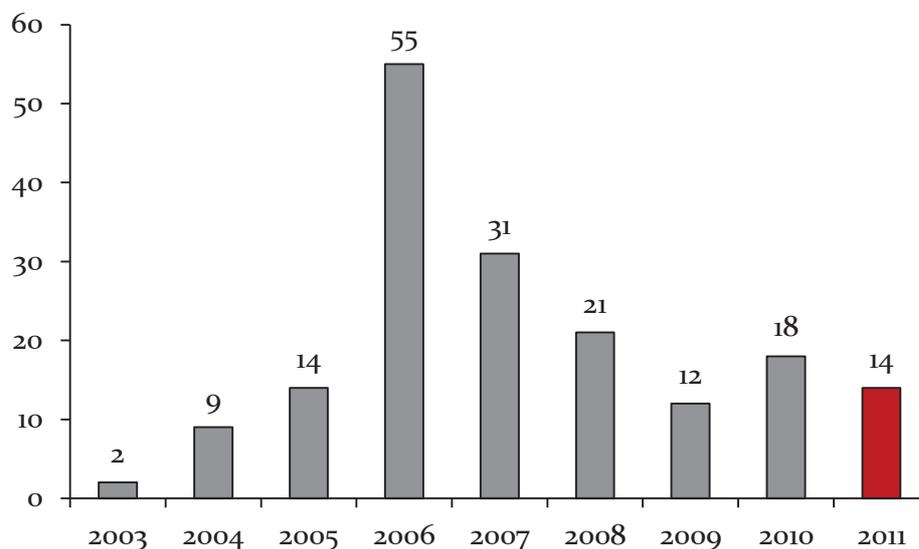
Entre 1959 et 1998, en quatre décennies, 23 millions d'oiseaux ont été infectés par des virus influenza hautement pathogènes (HP). Ce nombre a augmenté entre 1999 et 2004 pour atteindre 200 millions d'oiseaux [15]. Certaines de ces épizooties se sont traduites par des pertes considérables dans les cheptels

avicoles (exemple en Italie en 1999-2000 par le virus H7N1, au Canada en 2004 par le virus H7N3 et au Pays bas en 2003 par le virus H7N7).

Une épizootie d'influenza aviaire due à un virus H5N1 a été détectée pour la première fois en 1996, dans la province de Guandong, en Chine ; elle a tué dans un premier temps des oies sans attirer l'attention des autorités sanitaires de l'époque [16]. Le virus H5N1, sous la forme hautement pathogène, a effectué en 1997 une poussée épizootique dans les élevages de volailles industriels des zones rurales de Hong Kong. Il s'est caractérisé par une forte mortalité dans ces élevages avoisinant 100%, associé à une propagation relativement lente. L'infection s'est ensuite caractérisée par une transmission à d'autres espèces animales, et à l'homme. En mars 1999, le virus a été de nouveau isolé à Hong Kong sur un écouvillon fécal collecté sous des cages d'un marché de gibiers et de volailles, dans lesquelles avaient séjourné des oies. Le virus proche du virus isolé en 1996 en Chine continuera de muter pour passer de quatre variants en 1999 à 16 en 2000 et 18 dans les premiers mois de 2001 indiquant clairement que la souche H5N1 était une souche en pleine évolution. Entre février et mai 2001, cinq génotypes différents du virus influenza aviaire hautement pathogène (VIA HP) H5N1 ont été isolés sur plusieurs marchés. Tous les génotypes ont été isolés chez des poulets ou volailles terrestres ce qui n'avait jamais été observé entre 1998 et 2001 [17]. .

Depuis 2003, le virus H5N1 a tué ou conduit à l'abattage plus de 400 millions de volailles. Près de 20 milliards de dollars américain de dommages économiques dans le monde lui étaient imputables avant qu'il ne soit éliminé dans la plupart des 63 pays infectés lors de son pic en 2006. Néanmoins, le virus est demeuré endémique dans six pays en dépit du fait que le nombre de cas de volailles et d'oiseaux sauvages n'a cessé de reculer, passant de 4.000 à seulement 302 au milieu de l'année 2008. Mais ce nombre a de nouveau augmenté progressivement depuis, avec près de 800 cas recensés en 2010-2011. Dans un même temps, 2008 a vu les prémices d'une recrudescence de l'expansion géographique du H5N1 touchant à la fois volailles et oiseaux sauvages, qui semble liée aux mouvements migratoires des oiseaux. C'est ainsi qu'au cours des deux dernières années, le

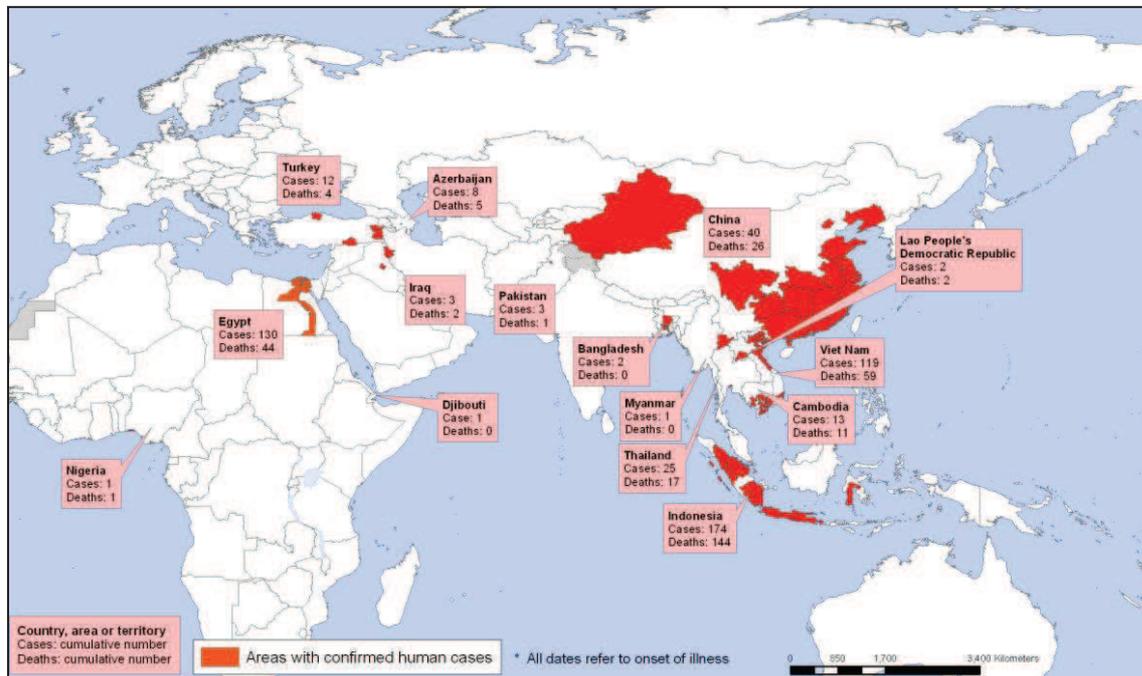
virus H5N1 est apparu chez les volailles et les oiseaux sauvages dans des pays où il avait disparu (Palestine, Bulgarie, Roumanie, Népal, Mongolie). La figure 1, montre une augmentation du nombre de pays déclarant des foyers de H5N1 entre 2009 et 2010.



**Figure 1 : Pays ayant déclaré une infection à virus H5N1 (mise à jour le 07/11/2011 pour l'année 2011). (Modifiée d'après : FAO EMPRES-i, OIE WAHID)**

Les risques pour la santé humaine de l'émergence de virus zoonotiques (notamment le virus H5N1 HP en 1997) ont été mis en exergue avec l'apparition de cas d'infection de l'homme par un virus aviaire : Des virus isolés au Canada et au Pays-Bas, caractérisés par un passage des oiseaux à l'homme, ont suscité par conséquent un intérêt important en santé publique [18]. D'après les chiffres de l'OMS, 565 personnes ont été infectées par le virus H5N1 depuis 2003, tuant 331 d'entre elles (Figure 2). Un décès est survenu au début de mois d'août 2011 au Cambodge où ont été enregistrés huit cas d'infection humaine cette année, tous mortels. Le risque de propagation à l'homme de virus influenza aviaire est donc devenu récemment une préoccupation de santé publique. L'isolement du virus chez l'homme a été le point de départ d'un mouvement d'opinion d'ampleur. Les médias ont relayé les informations relatives à la propagation du virus vers le Nord de l'Asie, le Moyen-Orient, l'Afrique et l'Europe. Les mesures sanitaires (réglementation des marchés et surveillance active par écouvillonnage d'oiseaux

vivants) prises après cet épisode, ont permis de faire disparaître le virus H5N1 de la production avicole des pays industrialisés.



**Figure 2 : Répartition des cas humains confirmés d'infection par le virus H5N1 depuis 2003 (OMS - Mise à jour du 16 mars 2011)**

### **2.3 Surveillance des influenzaes aviaires hautement pathogènes**

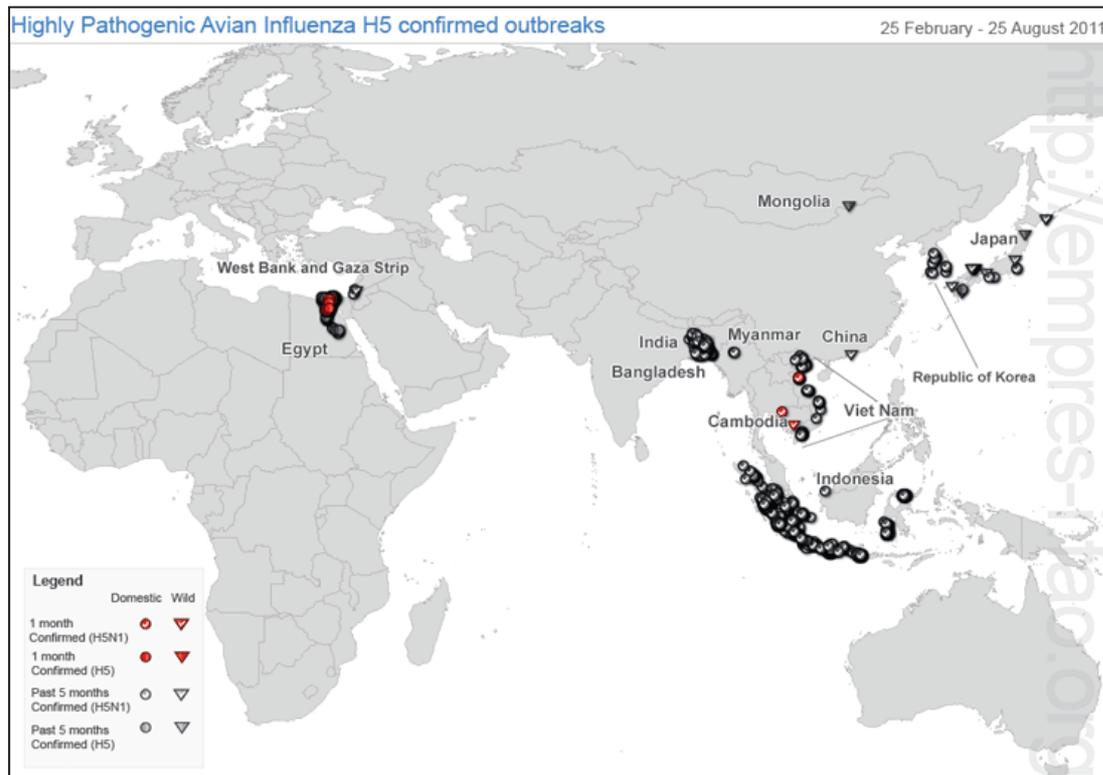
Depuis 1959, les épizooties de « pestes aviaires » rapportées par les services vétérinaires officiels distinguent clairement les épisodes d'influenza aviaire HP, et les épisodes de maladie de Newcastle, sur la base d'un diagnostic virologique. Les épisodes d'influenza aviaire hautement pathogène (à virus H5 ou H7) font l'objet d'une déclaration officielle à l'Organisation mondiale de la santé animale (l'OIE). C'est sur cette base que qu'ont pu être rassemblées les données figurant au Tableau II.

**Tableau II : Déclaration officielles récentes de foyers d'influenza aviaire hautement pathogène (source OIE)**

Date	Événement	Référence
Novembre 2002	Le génotype Z du virus H5N1, nouveau génotype mortel pour les oiseaux d'eau, est isolé dans l'avifaune sauvage	[19]
Décembre 2003 et Janvier 2004	Des foyers de H5N1 sont déclarés simultanément dans 8 pays d'Asie du Sud Est : la Chine, le Cambodge, l'Indonésie, le Japon, la Corée du Sud, le Laos, la Thaïlande et le Vietnam	[20]
Au cours de 2004 et jusqu'en début 2005	Au Vietnam, augmentation de l'incidence de l'infection par le virus H5N1 dans la population humaine et avicole. En Thaïlande, 750 élevages contaminés dans 51 provinces différentes. En parallèle, la Thaïlande déclarera pour la première fois des cas dans la population de chats domestiques et sauvages suite à l'ingestion de carcasses de poulets contaminés	[21]
2004	La Chine déclarera 50 foyers tous dans des élevages de volailles sur 4 semaines de temps. En Indonésie, le virus présent en 2003 se répand rapidement, les souches sont révélées proches des souches isolées en Chine et à Hong Kong	[22]
2005	Grande expansion géographique: mortalité importante d'oiseaux sauvages en Chine, Vietnam, Thaïlande, l'Indonésie. Déclaration de foyers en Russie, Kazakhstan, Mongolie, Roumanie, Turquie, Croatie et en Ukraine	
2006	Pic de distribution du virus à travers le monde. Il se répand par les oiseaux migrateurs à travers l'Europe (Suisse, Grèce, Italie, France) et atteint le Nigéria et la Cote d'Ivoire en Afrique. Au mois d'avril, 45 pays répartis sur 3 continents confirment la présence du virus H5N1. Au même moment, plusieurs pays asiatiques continuent à déclarer des foyers ainsi qu'en Egypte	

2007	Plusieurs pays d'Europe (l'Allemagne, la France, la Pologne, la Roumanie, le Royaume Uni, la Slovaquie, la République Tchèque, la Turquie, la Russie et l'Ukraine), d'Afrique et de Moyen Orient (l'Arabie Saoudite, le Bénin, la Côte d'Ivoire, Djibouti, l'Egypte, le Ghana et le Togo), et d'Asie (le Bangladesh, le Cambodge, la Chine, la Corée, l'Inde, le Japon, la Malaisie, le Myanmar, le Pakistan, la Thaïlande et le Vietnam) déclaraient des foyers de H5N1 HP
2008	Iran, Israël, le Nigeria et la Suisse déclaraient des infections par le H5N1 HP. Dans certains pays les cas humains étaient plus déclarés que les épizooties chez les volailles. Cela a été notamment le cas en Cambodge, en Egypte et en Chine
2009	Diminution du nombre de pays déclarant l'infection, le nombre de foyers a également baissé excepté pour l'Indonésie et l'Egypte, pour lesquelles la situation a empiré par rapport à 2008. Quatre pays (Vietnam, Indonésie, Egypte, Bangladesh) demeurent endémiques à l'infection. Les cas humains ont par contre subi une légère hausse ; 49 cas ont été déclarés à l'OMS dont 12 décès.
2010	L'influenza aviaire HP continue à être une pathologie importante particulièrement en Asie. Dans quatre pays de ce continent (Chine, Vietnam, Inde, Bangladesh, Indonésie) en plus de l'Egypte, le virus se trouve ancré dans les élevages de volaille. Une légère hausse du nombre de pays déclarant l'infection a été notée.
Jusqu'à Novembre 2011	14 pays ont déclaré des infections par un virus HP (Fig. 3)

Pour compléter cet historique, il faut mentionner que la FAO a récemment recommandé une vigilance accrue pour faire face à une possible réémergence de l'influenza aviaire hautement pathogène. En effet, un nouveau variant du virus, connu sous l'appellation (H5N1-2.3.2.1) a fait son apparition en Chine et au Vietnam. Ce virus serait capable de contourner les défenses fournies par les vaccins aviaires existants. Les services vétérinaires vietnamiens sont en état d'alerte élevée et étudieraient la possibilité d'une campagne de vaccination novatrice et ciblée. La circulation du virus au Vietnam menace directement le Cambodge, la Thaïlande, la Malaisie la Corée et le Japon. La migration des oiseaux sauvages pourrait aussi propager le virus à d'autres continents. En outre, les pays où le virus H5N1 est endémique pourraient faire face à de nouvelles épizooties, et les pays indemnes pourraient voir apparaître de nouveaux foyers. Après le déclin progressif de l'influenza aviaire hautement pathogène, entre 2006 et 2008, la surveillance épidémiologique relève une hausse du nombre de cas en 2009 et 2010. La FAO en conclut qu'une recrudescence de la circulation du virus H5N1 au cours de l'hiver 2011/2012 pourrait générer des risques imprévisibles pour la santé humaine. Aucun pays, particulièrement en Asie, ne peut aujourd'hui, se considérer à l'abri du retour de l'influenza HP (Figure 3).



**Figure 3 : Répartition des foyers d'influenza de sous-types H5 et ceux qui sont confirmés de sous-types H5N1, déclarés entre 25 février et 25 août 2011 (FAO EMPRES-i)**

### 3. Conditions d'émergence des virus influenza

L'introduction, en 1996, puis la propagation à travers l'Asie, le Moyen-Orient, l'Afrique et l'Europe de l'influenza aviaire hautement pathogène (IA HP) H5N1, a mis l'accent sur le rôle éventuels des oiseaux sauvages dans la propagation géographique de ces VIA HP. L'origine aviaire de cette pandémie et rétrospectivement celle de certaines autres au XX<sup>ème</sup> siècle a pu être établie par des études d'écologie virale. Le virus pandémique H1N1 (dit de grippe porcine) de 2009 possède une combinaison de gènes issues de trois espèces aviaires qui signe son origine animale. Les huit segments constituant le virus H1N1 de la grippe espagnole en 1918 sont tous issus d'un virus aviaire qui s'est adapté à l'homme [23]. Le virus de la grippe asiatique en 1957 avait trois segments de son génome (PB1, HA, et NA) issus d'un virus aviaire. Les cinq restants étaient issus du virus H1N1 circulant de manière saisonnière avant cette époque. Le génome du virus de

la grippe de Hong Kong est engendrée par un virus H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, dont provient une combinaison de deux segments d'origine aviaire (PB<sub>1</sub> and HA) et de six segments issus du virus H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> circulant de manière saisonnière entre 1957 et 1968 [24].

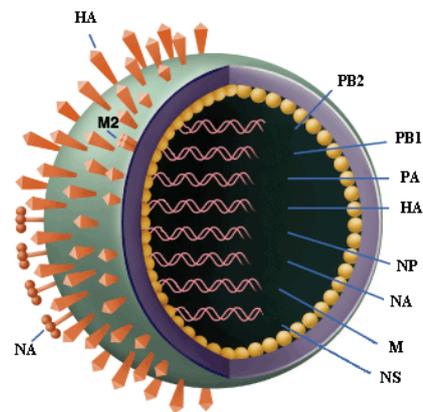
L'ampleur et la couverture sans précédent des programmes de surveillance de la faune sauvage, ont permis de recueillir plus de 300.000 prélèvements dans diverses régions du monde sur une période de 40 ans [8, 24-32]. Ces programmes de grandes échelles permettent de documenter de façon très détaillée le rôle des oiseaux migrateurs sauvages dans l'introduction et la propagation des virus influenza [33-35]. Les observations réalisées dans le cadre de ces programmes offrent aujourd'hui une opportunité unique d'élargir nos connaissances sur l'épidémiologie des virus influenza, qui dépend étroitement de l'écologie des espèces hôtes : alimentation et comportement alimentaire; utilisation de l'habitat, habitudes et comportements migratoires; taille de la population, taille des groupes et la fréquence d'agrégation, etc. Nous fournissons dans ce paragraphe une mise à jour des connaissances relatives à l'écologie des virus influenza A, qui est indissociable de l'écologie de leurs hôtes respectifs.

### **3.1 Variabilité génétique des virus**

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce sont des virus à ARN segmenté de polarité négative. Ils sont divisés en cinq genres : *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus* et *Isavirus*. Les virus du genre Influenza A sont les seuls connus pour infecter les oiseaux. Ces derniers sont répartis en sous-types sur la base antigénique de leurs glycoprotéines de surfaces, l'Hémagglutinine (HA) et la Neuraminidase (NA). Il a été identifié à ce jour, 16 sous-types d'HA et 9 sous-types de NA. Depuis un siècle, des virus portant à leur surface les HA des « types moléculaires » H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> et H<sub>3</sub> (et ponctuellement H<sub>5</sub> [24, 36, 37] et H<sub>9</sub> [38]) circulent chez l'homme, alors que des virus portant les HA des types H<sub>1</sub> à H<sub>15</sub> ont circulé chez les oiseaux. Quatorze des 16 types moléculaires d'HA ont été isolés chez les canards sauvages, H<sub>13</sub> n'ayant été détecté (à une exception près [39]) que chez les oiseaux marins [40-42]. Parallèlement, les NA de virus humains appartiennent aux types N<sub>1</sub> et N<sub>2</sub> tandis

que celles des virus aviaires se répartissent entre les types N<sub>1</sub> à N<sub>9</sub>. Ces sous-types peuvent être trouvés dans de nombreuses combinaisons possibles (par exemple, H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>) [37].

Les virus influenza (Fig. 4) sont des virus enveloppés dont le génome constitué d'ARN de polarité négative est segmenté en huit fragments ribonucléo-protéiques (pour les virus de l'influenza A) : trois segments génomiques codent pour les protéines du complexe réplicase/transcriptase : PB<sub>2</sub>, PB<sub>1</sub> et PA, le quatrième code pour l'hémagglutinine HA, le cinquième la nucléoprotéine ou NP, le sixième pour la neuraminidase ou NA, le septième M code la protéine de matrice M<sub>1</sub> et la protéine du canal à ions M<sub>2</sub> et enfin, le huitième, NS, code pour les protéines NS<sub>1</sub> et NS<sub>2</sub> [43-47].



**Figure 4 : Structure d'un virus influenza aviaire (modifié d'après medifix.org)**

Le caractère segmenté du génome viral permet, lors de co-infection, des réassortiments génétiques, c'est-à-dire l'encapsidation d'un mélange de segments d'ARN issus de l'un et l'autre de deux virus parentaux, générant un virus nouveau dont le génome est hybride. Ce mécanisme, appelé également cassure antigénique (*Antigenic shift*), permet l'échange de segments qui codent pour les protéines dites internes mais aussi des segments codant pour les deux glycoprotéines HA et NA de surface aboutissant, pour les virus de l'influenza A, à des formules antigéniques variées H<sub>x</sub>N<sub>y</sub>. Ce phénomène est particulièrement important pour l'évolution des virus influenza humains, dans la mesure où il peut conduire au remplacement complet de protéines de surface telles que l'HA et/ou la NA par des protéines d'un type moléculaire différent. C'est ce mécanisme qui a été à l'origine de l'émergence chez l'homme de nouveaux sous-types de virus pandémiques en 1957 et 1968.

Un second mécanisme participe à la variabilité génétique des VIA: les mutations ponctuelles que l'on qualifie également de glissement ou dérive

génétique (*Antigenic drift*) [48]. Ces mutations sont particulièrement importantes pour l'évolution antigénique des virus de grippe humaine sans changement d'identité du sous-type. En effet, elles affectent un site antigénique du virus et peuvent ainsi contribuer à son échappement à l'immunité humorale et cellulaire. Les mutations des virus influenza A sont très fréquentes, pouvant se traduire par une variation antigénique lorsqu'elles aboutissent à une substitution de certains acides aminés. Chez les VIA aviaires, les conséquences évolutives des mutations ponctuelles sont variables selon le gène et le type d'hôte considérés : dans la nature, chez les oiseaux aquatiques qui sont considérés comme leurs réservoirs, les VIA évoluent peu car ils ont atteint un niveau d'adaptation optimal et les mutations ne procurent pas d'avantage sélectif. Pour chacun des gènes, des sous-lignées se distinguent en fonction de l'origine géographique des virus isolés : la sous-lignée américaine et la sous-lignée eurasiennne, ce qui est en rapport avec les trajets migratoires des espèces sauvages contribuant au cycle des virus influenza aviaires (Fig. 5). Chez les volailles et les oiseaux sauvages terrestres, qui sont des hôtes occasionnels, une évolution rapide se produit. Elle concerne notamment les gènes codant l'HA et la NA. Ceci explique la faible infection des oiseaux aquatiques par les virus hautement pathogène comme le H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, alors que leurs épizooties caractérisent plutôt les volailles domestiques.

La virulence des virus influenza aviaire ne reposent pas seulement sur les caractéristiques des HA et NA, mais également selon les propriétés des autres constituant d'un virion. Les virus influenza A de sous-types H<sub>5</sub> et H<sub>7</sub>, mais pas les autres sous-types, peuvent ainsi devenir hautement pathogènes. Le passage d'un virus de pathotype FP à HP est obtenu par l'introduction d'acides aminés basique au niveau du site de clivage de l'hémagglutinine, qui facilite la réplication systémique du virus, provoquant une maladie aiguë généralisée chez les oiseaux chez qui la mortalité peut atteindre 100% [38, 39]. D'autres souches, y compris des sous-types H<sub>5</sub> et H<sub>7</sub>, dont l'HA ne présente pas un site de clivage multibasique, sont faiblement pathogènes. La dernière décennie a vu une augmentation marquée de ces foyers de VIA HP [40, 41]. Et alors que la plupart des foyers ont été contrôlés assez rapidement, le virus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> HP a circulé chez les

oiseaux depuis 1997. Cette circulation virale inhabituelle est caractérisée par son ampleur sans précédent, par la répartition géographique de l'épizootie, par la circulation chez des oiseaux sauvages et par sa transmission à une grande variété d'espèces, dont les mammifères et les humains [42, 49-53]. Cette émergence récente du virus H5N1 HP et sa propagation en Asie, au Moyen-Orient, en Afrique et en Europe a mis l'accent sur le rôle possible des oiseaux sauvages dans la propagation géographique de ces virus.

L'organisation mondiale de la santé animale (OIE) classe les virus influenza aviaires en : VIA HP à déclaration obligatoire ; et VIA FP qui ne sont pas à déclaration obligatoire, à l'exception des virus de sous-type H5 et H7. Les VIA HP sont les virus qui entraînent 75% de mortalité chez des poulets de 4 à 8 semaines d'âge soumis à un test de létalité par injection intraveineuse, ce qui correspond à un indice de pathogénicité intraveineuse supérieur à 1,2 chez les poulets âgés de 6 semaines. Les VIA FP de sous-type H5 et H7 causent moins de 75% de mortalité dans un test de létalité par injection intraveineuse, ce qui correspond à un indice de pathogénicité inférieur à 1,2. Ils doivent, par conséquent, être séquencés afin de déterminer si des acides aminés basiques sont présents au niveau du site de clivage de l'hémagglutinine (HA) ; si la séquence d'acides aminés observée est similaire à celle observée dans d'autres virus HP, le virus isolé devrait être considéré comme HP.

### ***3.2 Impact des virus influenza sur l'hôte***

Comme pour la plupart des maladies de la faune, peu de données sont disponibles sur l'impact du virus sur les comportements des oiseaux infectés tant au niveau individuel qu'au niveau populationnel. Chez les oiseaux domestiques, les signes cliniques de la maladie observés après une infection avec des VIA FP varient avec les espèces hôtes, l'âge, la présence d'autres micro-organismes et des facteurs environnementaux. Chez ces hôtes, le VIA FP peut causer une maladie bénigne. Lors de l'infection expérimentale de canards, il se réplique dans les cellules épithéliales de l'intestin des oiseaux et le virus peut être excrété à des concentrations élevées dans les fientes, sans signe apparent de la maladie [24, 54].

Il est difficile d'extrapoler l'effet de l'infection chez les oiseaux sauvages, où des infections bénignes ou infracliniques peuvent avoir de graves conséquences écologiques. On considère généralement que les VIA FP sont non-pathogènes lors de l'infection naturelle des oiseaux sauvages, mais les données sont rares. L'infection expérimentale de cygnes de Bewick (*Cygnus columbianus bewickii*) avec des VIA FP a indiqué que les infections à VIA FP chez des oiseaux sauvages ont un impact clinique, épidémiologique et écologique supérieur à ce qui a été précédemment reconnu [55]. L'impact des infections par les VIA FP ne devrait cependant pas être généralisé. Considérant que l'impact de l'infection par ces virus est plus subtil et non associé à une morbidité ou une mortalité, il est en partie analogue à l'impact de l'IAHP H5N1 sur des oiseaux sauvages. Le résultat d'infections à virus H5N1 HP chez les espèces d'oiseaux sauvages va généralement d'une morbidité minimale et d'une absence de mortalité d'un côté (espèces de canards barboteurs), à une morbidité et à une mortalité élevée (des oies et des espèces de cygne) [56-58].

Les infections par les VIA FP pourraient avoir un impact similaire sur le comportement général des différentes espèces d'oiseaux sauvages, qui serait plus important sur le comportement des espèces transitoirement infectées telles que les oies et les cygnes, et limité pour les espèces plus couramment trouvées infectées comme les canards barboteurs. Données à l'appui, cette hypothèse est venue d'une vaste étude longitudinale sur les canards colverts migrateurs en Suède. Cette étude a montré que l'infection à VIA FP a eu un impact négatif sur la masse corporelle des canards colverts infectés. Cependant, la perte de poids globale a été limitée et aucun effet sur la vitesse et la distance de migration n'a été observé, ce qui suggère que l'impact sur les individus infectés a été relativement limité [59]. Plus de données sont nécessaires pour être en mesure de comparer l'impact des infections à VIA FP selon les espèces, et pour être en mesure de comparer les infections réalisées en laboratoire et les infections naturelles des oiseaux à l'état sauvage.

### 3.3 *Sensibilité différentielle des espèces hôtes*

Le fait que des VIA aient été isolés chez plus de 105 espèces d'oiseaux appartenant à 26 familles différentes et à 12 ordres d'oiseaux [8, 60], ainsi que l'isolement de très nombreux sous-types représentant une multitude de combinaisons différentes des 16 types moléculaires d'HA et des 9 types moléculaires de NA [38], a conduit à les considérer comme réservoirs naturels des VIA. Les sous-types isolés sont essentiellement faiblement pathogènes (FP). En outre, les espèces dont l'habitat est aquatique sont apparues comme de «bons» réservoirs des VIA : la grande majorité des isollements ont eu lieu chez des oiseaux appartenant aux ordres des Ansériformes et, dans une moindre mesure, des Charadriiformes (limicoles en particulier) qui, malgré leur éloignement d'un point de vue taxinomique, ont en commun leur adaptation aux milieux humides [24]. À l'inverse, les isollements chez des oiseaux dont l'habitat est purement terrestre sont plus rares [61]. De nombreuses espèces d'oiseaux ont été trouvées porteuses de VIA, mais il est difficile d'estimer l'importance du rôle qu'elles jouent dans l'écologie de ces virus ; l'isolement d'un sous-type chez une espèce d'oiseau ne suffisant pas à déterminer si l'espèce concernée joue un rôle de réservoir. Le spectre d'espèces aviaires hôtes est probablement illimité. Les données d'infection, acquises avec les méthodes virologiques classiques (isolement viral) ont été confirmées par l'utilisation récente des méthodes moléculaires (RT-PCR) : ainsi, en Europe du Nord, la surveillance effectuée de 1998 à 2006 par RT-PCR sur plus de 36 000 oiseaux a permis de détecter des VIA chez seulement sept nouvelles espèces. Une preuve indirecte du rôle des oiseaux sauvages aquatiques comme réservoir des VIA provient d'études sur l'évolution de ces virus au cours du temps : les souches observées chez le canard ne présentent qu'une dérive génétique très limitée, ce qui a conduit certains auteurs [24, 62] à en déduire que les VIA sont, chez les espèces-réservoirs, dans un état d'équilibre ou « stase » évolutive. D'autres auteurs considèrent plutôt que l'évolution des VIA chez leurs hôtes naturels est lente, mais non négligeable [8].

L'éventail des espèces sensibles aux virus influenza aviaire s'accroît au fil des enquêtes épidémiologiques réalisées. Il est probable que tous les oiseaux soient

réceptifs à des degrés divers à toute la diversité des virus influenza. En effet, des virus influenza ont été isolés chez des oiseaux sauvages, et des volailles domestiques, appartenant à 12 ordres, 22 familles et 88 espèces d'oiseaux sauvages dont la plupart sont des ansériformes (canards, oies et cygnes) et des charadriiformes (goélands, mouettes, limicoles) [60]. Les espèces les plus étudiées sont les canards, et plus particulièrement le canard colvert (*Anas platyrhynchos*). Les données des études de qui ont été conduites à partir des années 1970, montrent que les espèces infectées sont différentes selon qu'il s'agit de l'Europe du nord ou de l'Amérique du nord (régions les plus étudiées). En Amérique du nord, essentiellement le canard colvert (*Anas platyrhynchos*), le canard pilet (*Anas acuta*) et la sarcelle à ailes bleues (*Anas discors*) et quelques espèces de Charadriiformes, ont été trouvés porteurs de VIA. En Europe du Nord, le colvert, la sarcelle d'hiver (*Anas crecca*) et le canard pilet sont les espèces chez lesquelles la prévalence observée est la plus élevée.

Olsen *et al.* ont analysé l'ensemble des données existantes concernant la prévalence des VIA chez les oiseaux sauvages [63]. Sur 84 espèces étudiées, 36 sont des canards (34 503 prélèvements). Les espèces les plus étudiées sont le canard colvert, le canard pilet, la bernache du Canada, les foulques et les sarcelles. Les prévalences moyennes les plus élevées sont celles observées sur des canards colverts (13 %), canards pilets (11 %) et la sarcelle d'hiver (11,5 %). Les canards de surface (le canard colvert, le canard pilet et les sarcelles) sont beaucoup plus souvent trouvés infectés que les canards plongeurs et les tadornes (*Tadorna tadorna*) : la prévalence moyenne est respectivement de 10% pour les premiers et inférieure à 2% pour les seconds. Chez les autres ansériformes, la prévalence moyenne est de 2 % pour les cygnes (trois espèces étudiées, 5 000 prélèvements environ) et de 1 % pour les oies (huit espèces étudiées, 4800 prélèvements). La prévalence chez les Charadriiformes varie de 0,4 à 1,4 % selon les espèces (28 espèces étudiées, près de 20 000 prélèvements).

La prévalence des VIA chez d'autres ansériformes, c'est-à-dire les oies (genre *Anser*) et les cygnes (genre *Cygnus*) est beaucoup plus faible. Elle est également faible chez les foulques (Gruiformes). D'autres oiseaux aquatiques, comme les

tadornes (Ansériiformes), présentent une prévalence intermédiaire. Les limicoles (Charadriiformes) représentent la meilleur illustration de la différence entre les prévalences trouvées en Europe et en Amérique du nord. En effet, ils sont trouvés porteurs de VIA sur ce dernier continent mais rarement en Europe du Nord. Leur rôle dans l'écologie des VIA serait donc différent entre ces deux continents.

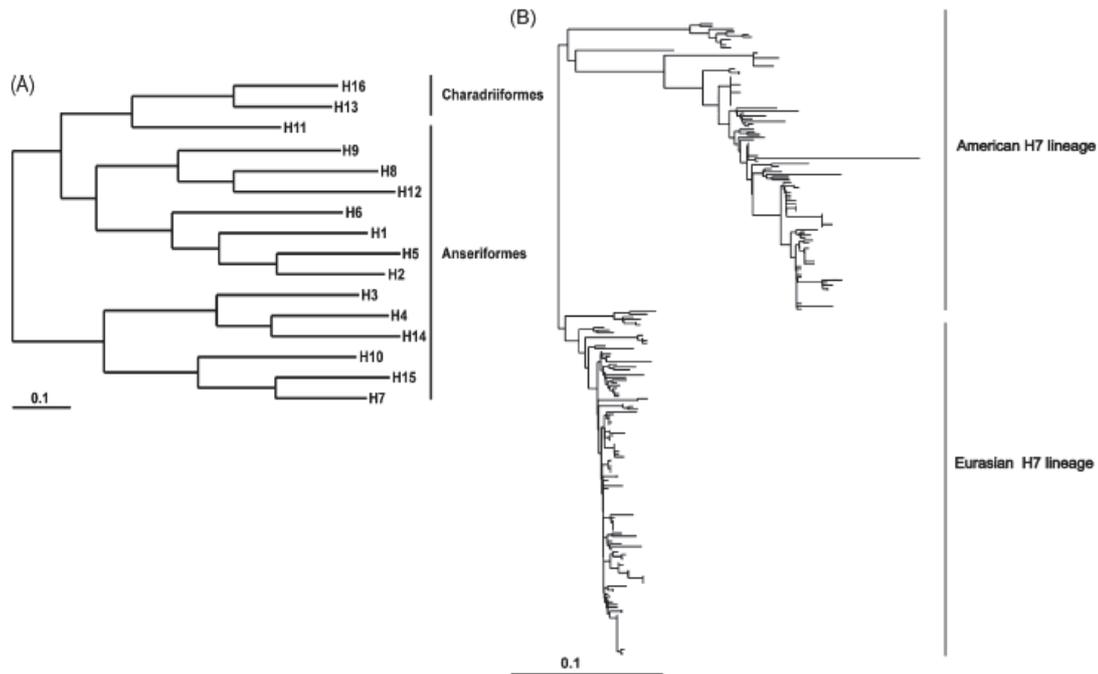
Bien que les VIA FP aient été isolés à partir de 105 espèces hôtes, appartenant à 26 familles différentes, la contribution respective de la plupart de ces espèces à l'écologie des VIA FP reste à établir. De grandes différences de prévalence de ces virus existent entre les différentes espèces d'oiseaux sauvages. Ces différences pourraient être dues à des spécificités liées à l'écologie des hôtes, ou à des différences intrinsèques dans la relation avec le virus. Par exemple, les différences dans la permissivité à l'infection par des virus IAFP entre les espèces pourraient être liées à des différences dans la distribution tissulaire des récepteurs d'un côté et la reconnaissance de ces récepteurs par différents VIA sur l'autre [64, 65]. Ainsi, le sous type d'hémagglutinine H<sub>13</sub> du goéland ne peut pas se répliquer efficacement dans le tractus intestinal et respiratoire des canards [66]. Les analyses des protéines membranaires de l'hémagglutinine de VIA isolés d'Anatidés et de Laridés ont révélé des différences au niveau de la capacité de ces virus à se lier aux récepteurs de différents tissus [65]. En effet, la composition des récepteurs cellulaires présents sur l'épithélium du tractus intestinal des différentes espèces d'oiseaux, étudiée par histochimie, révèle des différences dans la distribution de l'acide sialique, qui pourrait rendre compte des différences dans la prévalence des VIA FP [36]. Les infections expérimentales par des virus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> HP de différentes espèces d'oiseaux sauvages comme les canards, les oies, les cygnes et les mouettes ont révélé de grandes différences de sensibilité, de tropisme tissulaire, de mortalité et d'excrétion virale [56-58, 67, 68]. Considérant qu'il est difficile d'extrapoler les données obtenues sur les virus HPAI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> à la situation des virus IAFP chez des oiseaux sauvages, une variabilité analogue de la réceptivité aux virus IAFP devrait être mieux étudiée sur les tissus d'oiseaux sauvages.

### **3.4 Variation spatio-temporelle de la prévalence des virus**

La prévalence des virus influenza aviaires A dépend de la localisation géographique et de la saisonnalité du comportement des espèces hôtes. La prévalence des virus aviaires A chez les canards plongeurs, en Amérique du Nord et en Europe, varie de moins de 1%, au cours de leur migration de printemps, jusqu'à un maximum de 30%, avant et pendant la migration d'automne [24, 32]. La surveillance des Colverts, en deux points situés le long d'une même voie de migration, a montré que la prévalence du VIA variait durant la migration automnale (migration nord-sud). La prévalence chez les canards colverts, localisés sur le site d'échantillonnage du Nord, est trois fois plus élevée que celle mesurée chez ces oiseaux localisés sur le site de nidification [32]. Cela suggère que le calendrier de la migration détermine la prévalence du VIA : prévalence élevée du virus au début de la migration automnale ; puis vraisemblablement diminution progressive durant la migration, formant ainsi un gradient Nord-Sud de prévalence du VIA. Ceci explique les différences géographiques de prévalence de ces virus, entre les latitudes nord et sud, observées dans les différents études épidémiologiques [32, 69]. Le pic de prévalence au cours de la migration d'automne est censé être lié au grand nombre de jeunes oiseaux immunologiquement naïfs issus de la saison de reproduction, et à leur agrégation avant et pendant leur migration vers le sud.

La complexité de l'écologie des virus de l'influenza aviaire se traduit par une variation spatio-temporelle de leur circulation. Par exemple, chez les espèces d'échassiers, appartenant à la famille des Charadriidés et de Scolopacidés, comprenant des espèces telles que le tournepierre, bécasseau, chevalier gambette, barge, sont adaptés à des habitats marins ou d'eau douce. Leur cycle annuel se divise en une période de nidification dans les régions arctiques, des migrations à longue distance à la fin de l'été-début de l'automne pour rejoindre leurs aires d'hivernage, et le retour vers leurs lieux de reproduction au printemps-début d'été [70, 71].

L'écologie de l'hôte a non seulement un impact sur la transmission mais aussi sur l'évolution des virus influenza. La séparation des populations d'accueil a ainsi permis de distinguer clairement les populations de virus. Un bon exemple de cette évolution est donné par la séparation génétique des virus des sous-types H13 et H16 isolés principalement des goélands et des sternes, qui ont évolué dans une lignée génétique séparée des autres virus influenza A (Fig. 4A) [30, 36, 72]. Les segments de gènes de virus de goélands sont génétiquement distincts de ceux qui circulent chez d'autres oiseaux sauvages, ce qui suggère qu'ils ont été isolés pendant une durée suffisante pour permettre une différenciation génétique. Ceci est en accord avec l'observation que les goélands ne sont pas facilement infectés par les VIA des canards quand ils sont inoculés expérimentalement. Aux différences induites par la séparation des différentes espèces hôtes, s'ajoute, par ailleurs, l'effet de la distance géographique entre populations d'une même espèce hôte (comme les populations de canards plongeurs des Amériques et de l'Eurasie). Cette séparation allopatrique a donné lieu à deux lignées génétiques de virus influenza, eurasienne et américaine (Fig. 4B) [8, 40, 72-74]. Cela semble être le résultat d'une longue séparation écologique et géographique de ces populations d'oiseaux et donc des virus circulant au sein de leurs populations respectives.

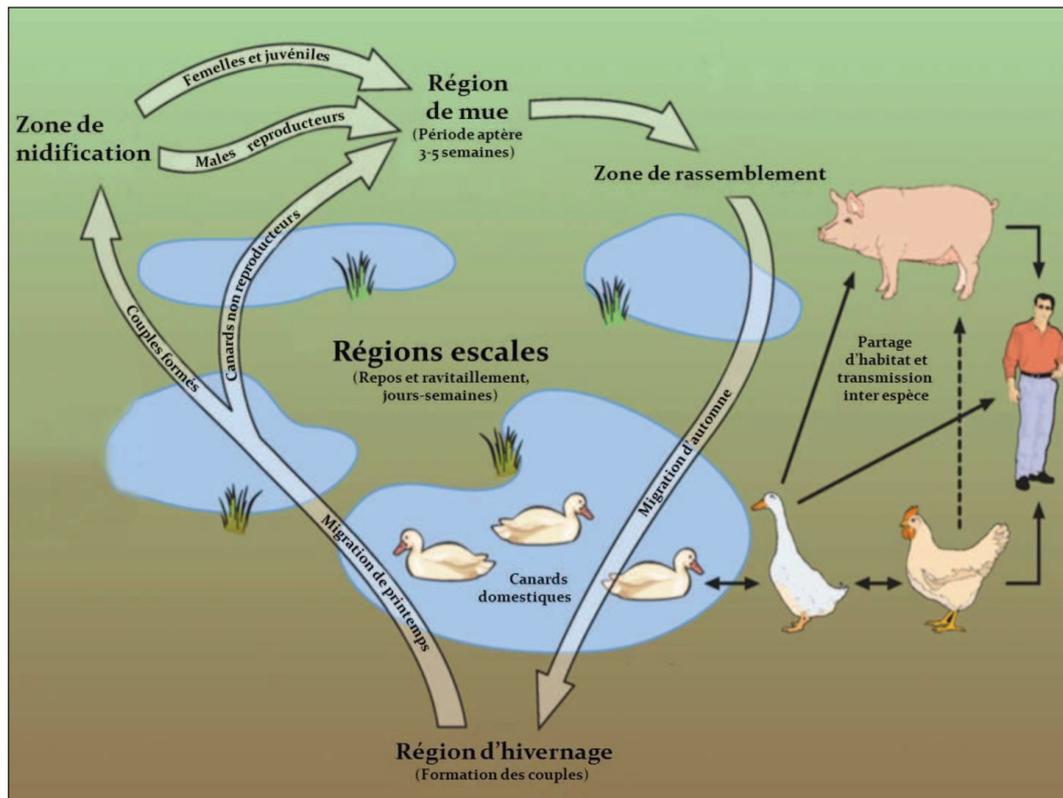


**Figure 5. Arbre phylogénétique du gène HA des virus influenza A. (A) Arbre affichant les différentes lignées génétiques isolées chez le canard (Anseriformes) et celles isolées du goéland (Charadriiformes). (B) Arbre affichant l'évolution des virus H7 allopatriques.**

### **3.5 Rôle spécifique des canards dans la transmission**

Des études ont identifié un rôle prédominant des canards de surface dans la perpétuation de la plupart des sous-types viraux [24, 32, 34, 40, 75, 76]. Les facteurs contribuant au rôle de ces canards dans l'écologie des VIA comprennent l'effectif des populations et le mode de transmission. Les grandes populations sont probablement mieux capables de soutenir une grande variété de sous-types différents. Les populations de canards sont estimées à 10.000.000 d'oiseaux en Europe, les canard colvert (*Anas platyrhynchos*) étant l'espèce la plus abondante (5.000.000 en Europe et 27.000.000 dans le monde entier) [77]. Le taux de remplacement annuel estimé de Canards colverts en Europe du Nord est d'environ  $1/3$  [78]. Une grande partie de la population est donc rajeunie chaque année, permettant potentiellement une co-circulation simultanée de plusieurs lignées génétiques et sous-types au sein d'une méta-population d'hôtes potentiels pour les virus influenza A.

Les canards appartiennent à la sous-famille des *Anatinae*, qui rassemble la plupart des membres de la famille des *Anserinae*. La répartition des espèces appartenant à cette sous-famille est cosmopolite, ils habitent quasiment toutes les zones humides de la planète. L'écologie de ces oiseaux, schématisée en Figure 6, est à l'origine de la persistance et la propagation des virus influenza. Bien que le virus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> HP ainsi que les virus influenza isolés chez les humains infectent, de façon générale, les voies respiratoires, le site de la multiplication des virus influenza chez le canard reste l'intestin [79]. Les virus sont ainsi excrétés exceptionnellement par voie bucco-nasale ou plus fréquemment par les fientes dans l'environnement. Ils contaminent surface et fond des eaux, permettant l'infection d'autres oiseaux sensibles qui viennent boire ou se nourrir. La multiplication des virus influenza HP a bien été observée au niveau des voies respiratoires [79], cependant la contribution de ce site dans la pérennité de l'infection au sein des populations d'oiseaux reste inconnue. En particulier, l'excrétion fécale des virus de sous-types H<sub>4</sub>N<sub>7</sub>, H<sub>7</sub>N<sub>3</sub> et H<sub>11</sub>N<sub>9</sub> inoculés à des canards colverts lors d'infections expérimentales, se caractérise par une durée et un titre viral plus importants que ceux mesurés dans les excrétions oro-pharyngés [79]. Il a été estimé que lorsqu'un grand nombre d'oiseaux viennent séjourner sur un petit étang (région escale), le titre viral peut atteindre 10<sup>10</sup> EID<sub>50</sub> particules virales par gramme des fientes excrétées [79]. De plus les virus IA sont stables dans l'eau [24, 80]. Ils ont été isolés à la surface d'étangs peuplés par un grand nombre d'oiseaux d'eau [81, 82]. Sans négliger leur transmission par aérosols, la présence plus importante des virus IA dans les écouvillons cloacaux ainsi que leur stabilité dans l'eau, suggèrent une pérennité de la transmission des VIA FP chez les canards par voie oro-fécale [24]. Ce mode peut expliquer en partie la prévalence plus élevée observée chez les canards de surface, qui se nourrissent essentiellement à la surface des eaux, par rapport à celle des canards plongeurs qui plongent dans des eaux plus profondes afin de trouver leur nourriture [8].



**Figure 6 : Mécanismes de migration saisonnière des oiseaux d'eau et voies de transmission de virus influenza à l'homme et aux animaux domestiques (Modifiée d'après Kim *et al.*, 2009 [83])**

Les données épidémiologiques suggèrent une transmission des virus influenza aviaires tout au long de l'année au sein des populations de canards. La prévalence ainsi mesurée montre une évolution cyclique de l'infection en Amérique du nord [24, 25] et en Europe [32] chez ces oiseaux, avec un pic qui se déclare avant et pendant la migration de l'automne à l'occasion des regroupements et des déplacements des juvéniles, n'ayant pas encore acquis de défense immunitaire [8, 24, 25, 82].

Des canards domestiques (Pékin), infectés expérimentalement ont excrété le virus influenza pendant plus de 3 semaines [54, 84]. Les oiseaux infectés seraient en mesure d'excréter le virus influenza durant les trois premières semaines de leur migration d'automne, sur une route empruntant divers couloirs de migration. Cette excrétion serait notamment facilitée par la faible morbidité liée à l'infection, ainsi qu'à la faible réponse immunitaire humorale des animaux infectés. Cependant cette prévalence est beaucoup moins importante dans les

zones de nidification que le long des couloirs de migration et dans les zones d'hivernage [28, 32, 34, 82].

De manière générale la prévalence observée au niveau des sites d'hivernage et de nidification est plus importante en Europe qu'en Amérique du nord. L'explication la plus probable à cette différence est une variation aléatoire, étant donné que les différentes études réalisées dans chacune de ces régions révèlent également des variations de prévalence dans les populations de canards. Plusieurs facteurs peuvent influencer la prévalence, dont la taille de la population, la région et le moment de collecte des prélèvements. Ainsi, si d'autres sites de collecte étaient inclus dans les études réalisées sur plusieurs années, ils contribueraient d'avantage à amplifier cette variation, et non pas la localisation géographique [34]. La prévalence la plus faible est mesurée au printemps juste avant la saison de nidification, elle augmente ensuite quand les oiseaux rejoignent les régions de mue, en passant par les différentes régions où ils font escale durant leur migration [25, 34, 85] (Figure 6). L'épisode de contamination des canards durant le printemps n'est pas encore totalement élucidé. Des particules virales pourraient persister dans les eaux gelées de l'hiver et ainsi rester infectantes jusqu'à la saison de nidification pour réinfecter les canards qui y retournent au printemps pour pondre [24, 79]. Les populations de canards pourraient également avoir gardé le virus tout au long de la saison de migration. L'isolement du virus sur toute l'année chez des oiseaux est en faveur de cette dernière hypothèse, cependant sa persistance dans les eaux gelées jouerait un rôle important dans la perpétuation de l'infection [8].

Certains sous-types viraux sont plus fréquemment isolés que d'autres [8, 25]. Les sous-types H3, H4 et H6 sont les plus communs sur les canards en Europe et en Amérique du nord [25, 32]. Les combinaisons les plus rencontrées dans ces deux régions sont H4N6 et H6N2 [34]. Ces fréquences plus importantes de certains sous-types s'expliqueraient par une affinité plus importante pour les tissus des canards, caractérisée par une réplication importante pour garantir une probabilité de transmission significative à la prochaine population sensible

rencontrée. Il a été rapporté que ceci impliquerait un équilibre entre l'aptitude de fixation des HA aux cellules cibles et l'activité enzymatique des NA [86].

Bien que les sous-types H6 soient d'origine européenne et soient également largement répandus en Amérique du nord, les analyses phylogénétiques des virus supposent un faible échange des souches entre les deux continents [75]. Par conséquent, de nouveaux génotypes devraient apparaître par mutation et réassortiment génétique dans les deux régions. Les zones d'escale offrent cette possibilité en attirant des populations de canards arrivant de plusieurs zones de nidification, empruntant plusieurs couloirs migratoires et hébergeant différentes combinaisons de sous-types [34]. L'infection de ces oiseaux par deux sous-types ou plus a été observée [31], ainsi que le réassortiment de ces derniers [84]. De cet événement émergerait de nouvelles souches faiblement pathogènes pour leurs hôtes anatidés [68], mais qui pourraient être virulentes pour les volailles domestiques. Le rôle des canards dans le maintien, la propagation et l'émergence de nouveaux génotypes viraux semble dépendre de leur comportement migratoire. En effet, les canards migrateurs semblent plus à même de diffuser le virus influenza le long de leur route migratoire, en contaminant les populations de canards sédentaires et domestiques des régions où ils s'arrêtent pour se nourrir et se reposer [8, 34, 87]. En même temps les canards sédentaires et domestiques maintiendraient le virus à proximité de populations d'oiseaux sensibles et seraient impliqués dans la transmission de virus FP et HP aux volailles domestiques et aux autres espèces d'oiseaux [68, 88, 89].

Le canard colvert est, dans ce contexte, un acteur décisif de l'épidémiologie du virus Influenza. Sa familiarité avec l'homme et ses installations avicoles, notamment en raison des comportements acquis en élevage par les canards lâchés pour la chasse, constitue un risque majeur de transport de l'infection dans les élevages. Sans préjuger du rôle joué par d'autres oiseaux d'eau, cette espèce est à placer en priorité parmi celles sur lesquelles doivent se focaliser les études épidémiologiques. Le canard colvert constitue un facteur de risque majeur dans l'apparition et la persistance des foyers domestiques d'IA HP de sous-type H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>(FAO). L'étude du foyer hollandais d'IA HP H<sub>7</sub>N<sub>3</sub> de 2003, ainsi que

l'analyse des souches circulant en Europe révèle que cette espèce est le creuset d'évolution des souches qui peuvent être introduites dans les filières avicoles et y acquérir une haute virulence. Ces caractéristiques s'expliquent par une adaptation du virus Influenza au canard se traduisant par une résistance à la maladie, une importante infectiosité des individus atteints, une longue période d'excrétion virale (OMS), ainsi qu'une capacité pour les individus exposés de se réinfecter et d'excréter le virus.

### ***3.6 Propagation des virus à la volaille domestique***

L'étude des virus influenza A a montré que des virus faiblement pathogènes sont excrétés à forte concentration dans les fientes des oiseaux. Toutefois, il a été noté à la suite de plusieurs infections expérimentales et observations, que le virus H5N1 HP est fréquemment excrété par voie respiratoire. Les foyers d'influenza aviaire déclarés officiellement restent relativement exceptionnels, bien qu'une tendance à l'augmentation du nombre de ces déclarations soit notable au cours de la dernière décennie. Par son ampleur, l'extension panzootique du virus H5N1 reste sans précédent dans l'histoire. Chez les oiseaux sauvages les épizooties dues à un virus hautement pathogène, restent des exceptions.

Dans de précédentes études, des chercheurs ont tenté d'évaluer la transmission des VIA FP et HP aux volailles domestiques [90]. Les résultats obtenus suggéraient que cette transmission est très complexe, faisant intervenir beaucoup de paramètres comme la souche virale, l'espèce animale, ainsi que des facteurs environnementaux.

Les oiseaux ne semblent pas être des hôtes naturels des VIA hautement pathogène. C'est la modification par l'homme des conditions dans lesquels vivent ces oiseaux (captivité, domestication, élevage de type industriel, commerce national et international, pratiques d'élevage) qui a créé de nouvelles niches écologiques favorables à la sélection de souches virulentes et contagieuses pour les VIA et a modifié l'incidence et la circulation de ces virus. Les mesures d'hygiène et les soucis d'augmenter la productivité ont progressivement réduit le risque de propagation de virus influenza dans les élevages rationnels, dans les pays

industrialisés, rendant les populations de volailles extrêmement sensible à la dissémination d'un virus HP qui entrerait dans les filières d'élevage.

L'introduction des VIA à partir du réservoir sauvage dans ces « agrosystèmes » peut avoir lieu par contact direct ou indirect entre oiseaux sauvages et domestiques. Une fois introduits, des sous-types de VIA peuvent persister et continuer de circuler chez les espèces domestiques, à la faveur de liens épidémiologiques tels que les marchés d'oiseaux vivants.

Les souches de VIA (pour la plupart FP) présentes chez les oiseaux sauvages pourront être transmises aux volailles (ainsi qu'aux oiseaux d'ornement et de parcs zoologiques) par contamination fécale de l'environnement, de l'eau ou de la nourriture ou par des supports inertes contaminés (élevage en claustration). Chez ces hôtes, l'évolution virale serait favorisée par la forte densité qui pourrait permettre l'acquisition d'un pouvoir pathogène plus élevé que la souche d'origine. Ainsi, au Mexique en 1995, un sous-type H5N2 aurait émergé chez les oiseaux sauvages, aurait été transmis aux volailles et ne serait devenu pathogène pour les gallinacés qu'après plusieurs cycles de réplication [90].

#### **4. Conclusion**

Les progrès réalisés dans la connaissance de l'épidémiologie et de la virologie des virus influenza aviaires ont permis de mieux définir l'importance des facteurs d'évolution des virus influenza dans les populations naturelles et domestiques d'oiseaux. Les différentes contraintes écologiques : comportement alimentaire, comportement migratoire et phénologie des déplacements, la préférence d'habitat, agrégation, diversité spécifique des oiseaux, interagissent avec la réceptivité au virus et les défenses immunitaires des oiseaux pour expliquer la cinétique de la transmission dans les populations exposées, et la persistance du virus dans l'environnement. L'exposition des volailles domestiques, du bétail et de l'homme à ces virus, résulte des comportements et des procédés qui assureront un contact infectant, entre la source naturelle représentée par le réservoir aviaire et ces cibles diverses.

Le protocole de notre étude, permettra d'étudier l'excrétion de virus faiblement pathogène dans les fientes par des canards de surface et plongeurs, ainsi que sa transmission inter et intra espèce. Il permettra de documenter le mode de transmission oro-fécal, reconnu comme le mode de diffusion principal des VIA FP, pour assurer leur transmission à partir d'un individu infecté excréteur à des individus sensibles. Notre étude comportera deux volets complémentaires : une infection expérimentale et une enquête de terrain s'appuyant sur le dosage des particules excrétées dans les fientes prélevées au bord de plusieurs étangs d'une zone humide, la Dombes, ainsi que dans l'eau de ces mêmes étangs. Ces travaux s'inscrivent dans l'effort entrepris au niveau international pour enrichir les méthodes d'étude et de surveillance à grande échelle des virus transportés par l'avifaune, notamment dans les zones humides, dont les populations hôtes constituent des réservoirs de virus potentiels.

**Partie II**

**MATERIELS ET**

**METHODES**



Cette étude des modalités d'excrétion, de persistance et de transmission des virus influenza au sein de populations naturelles de canards et de leur environnement s'est déroulée : d'une part en laboratoire - Caractéristiques de l'infection et de la transmission à travers une inoculation expérimentale de lots de canards par des virus influenza FP - ; d'autre part sur le terrain - Dépistage des virus Influenza dans l'environnement au voisinage des étangs et des mares d'une région naturelle (La Dombes, Ain). Nous en présentons, ci-dessous, les principales caractéristiques de notre programme d'étude.

## **1. Site de l'étude : la Dombes**

Située à 50 km au Nord-Est de la ville de Lyon, la Dombes est une zone humide importante, limitée à l'Ouest par la vallée de la Saône, au Sud par la Côte d'Or surplombant les plaines du Rhône, et à l'est par la vallée de l'Ain, qui sépare la Dombes du Bugey. La Dombes est un plateau de 1000 km<sup>2</sup>, située sur l'axe migratoire rhéno-rhodanien conduisant de la méditerranée à la mer baltique. Du point de vue ornithologique, cette région présente une richesse spécifique exceptionnelle.

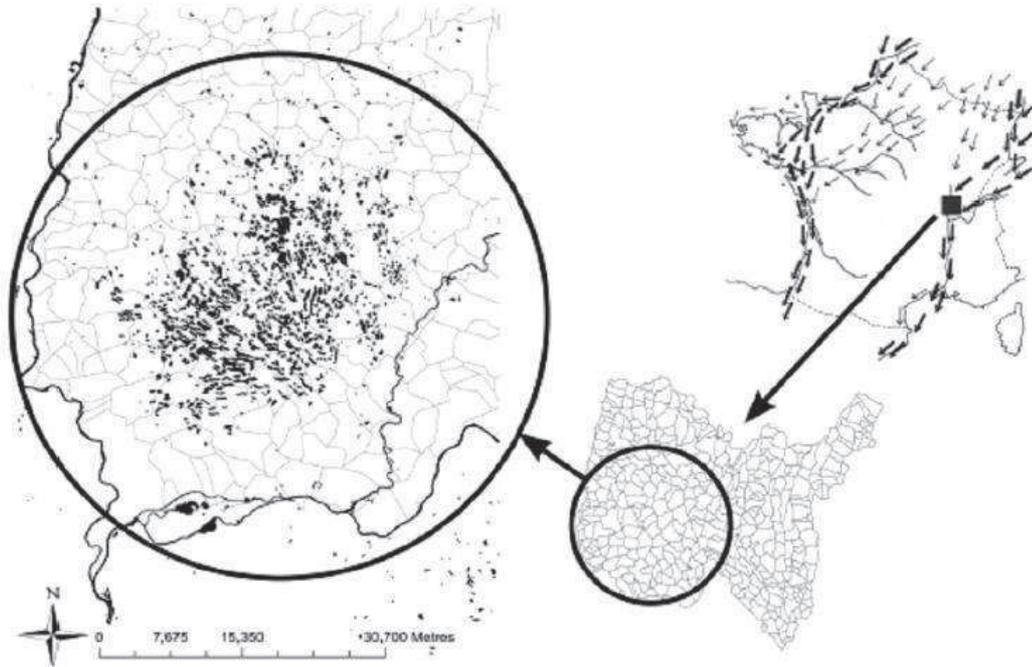
### **1.1 Avifaune**

La Dombes est inventoriée comme ZICO (Zone Importante pour la Conservation des Oiseaux), du fait de la diversité et de l'abondance des espèces d'oiseaux présentes, durant la migration, la reproduction et l'hivernage. La Dombes est également une zone d'élevage avicole, dont la population est passée de 450000 à 750000 bêtes entre 1970 et 2000. La Dombes abrite 277 espèces d'oiseaux, parmi lesquels 123 hivernants, 154 nicheurs et sédentaires (dont 110 réguliers et 44 occasionnels). Les étangs de la Dombes accueillent une cinquantaine d'oiseaux nidificateurs et autant de migrateurs : les grèbes, les anatidés, les ardéidés, les rallidés, les laridés et les passereaux. Compte tenu de la fréquence du gel des étangs, l'avifaune de la Dombes est moins sédentaire que celle d'autres régions qui sont : soit, localisées plus au sud, comme la Camargue ; soit caractérisées par des étangs plus profonds et donc, moins soumis

au gel, comme le lac Léman en Suisse. Les étangs de la Dombes hébergent donc une population hivernale plus riche notamment des canards plongeurs, comme le Fuligule morillon. Un peu plus d'un tiers des nicheurs passent l'hiver dans la région, et pendant les hivers les plus rudes seul le canard Colvert, la Foulque et la Sarcelle d'hiver persistent vraiment.

### ***1.2 Milieu naturel***

La Dombes est une zone rurale riche de quelques 1200 étangs de création artificielle répartis sur 67 communes. Ces étangs, dont le plus ancien remonte au XIII<sup>ème</sup> siècle, sont alimentés par les eaux de ruissellement et les précipitations. Pour compléter leur remplissage, il s'est établi au fil du temps un système de chaîne d'étangs dont le fonctionnement dépend de l'accord de tous les propriétaires. Une partie de l'originalité de la Dombes vient de l'exploitation traditionnelle des étangs qui fait alterner deux phases : l'évolage (phase de mise en eau des étangs) et l'assec (phase où l'étang est vidé, avec en général une mise en culture). L'ensemble des étangs est intégré au réseau Natura 2000 et classé ZNIEFF (Zone d'Intérêt Ecologique, Faunistique et Floristique). Longtemps vouée à une agriculture traditionnelle et la pratique de la chasse par à une clientèle essentiellement urbaine, la Dombes est restée peu peuplée malgré la proximité des villes de Lyon et de Bourg-en-Bresse. Mais à partir des années 70, la modernité agro-industrielle s'est imposée avec ses bienfaits et ses contraintes, imposant à la nature un choc dont les ornithologues ont été les premiers à constater et à dénoncer ses effets délétères [91].



**Figure 7 : Région de la Dombes où se concentrent près de 1000 étangs.  
En haut à droite, représentation des voies de migration traversant  
la France (axes Manche-Atlantique et Rhin-Rhône)**

### **1.3 Climat**

Le climat de la Dombes correspond à une forme atténuée du climat continental, qui est caractérisé par : (i) une saison hivernale, de novembre à mars inclus, dont le bilan hydrique est positif ; et (ii) une saison estivale, de juin à août, dont le bilan est négatif. Aux aléas près, il n'y a pas eu d'évolution de la pluviométrie sur les 43 dernières années. Par contre l'analyse de l'évolution des températures, montre une hausse significative. Le réchauffement porte sur tous les mois de l'année (1,8°C en moyenne), mais les écarts varient selon les saisons : l'été connaît une hausse mensuelle moyenne de +2,5° C, contre +1°C pour l'hiver. Les variations de température du printemps, avec +2°C, et de l'automne, avec +1,7°C, sont intermédiaires.

L'accroissement de la température estivale correspond à un déplacement nord-sud de 400 km (latitude). Ce réchauffement semble avoir des effets directs sur les cycles biogéochimiques aquatiques, sur la qualité de l'eau et sur l'équilibre

nutritif des étangs dont dépendent la démographie des poissons et des oiseaux. Il pourrait, par exemple, impacter l'écologie des deux principales espèces de canards hivernant en Dombes : le canard colvert et le fuligule milouin. En affectant la rigueur des températures de la mi-janvier, traditionnellement marquées par un gel des étangs de la Dombes, le changement climatique pourrait se traduire par un déplacement de 5 % de la balance colvert/milouin à l'horizon 2030. Le colvert perdrait 13 % de ses effectifs absolus à la mi-janvier tandis que le milouin en gagnerait 11 % [92].

## **2. Matériel de l'étude**

### **2.1 Animaux**

Nous avons utilisé deux espèces de canard: le *Canard pekin* modèle de canards de surface ; le *Fuligule morillon* modèle de canards plongeurs.

#### **2.1.1 Le Canard pekin (*Anas platyrhynchos domestica*)**

C'est un canard domestique très répandu en élevage, issu de la domestication du canard colvert. Originaire de Chine, il a été amélioré aux Etats- Unis vers les années 70 du 19<sup>ème</sup> siècle en croisant des Aylesbury (d'où son autre nom de Pékin américain) afin de produire des canards à rendement élevé en chair. Il a été introduit en Europe au début du 20<sup>ème</sup> siècle. Ce canard est très présent en élevage industriel et familial en France comme en Europe. Les mâles arrivent à peser 4,5 kg et les femelles 3,5 kg. Le Pékin, caractérisé par un comportement migratoire et une répartition mondiale, est vigoureux, résistant, prolifique et surtout très précoce. Il a un gros appétit, et s'alimente la nuit si la lumière et l'eau sont disponibles. Du fait de son appétit, sa croissance est très rapide il peut atteindre en 7-8 semaines un poids de 2 à 2,5 kg dans de bonnes conditions d'environnement, dont une nourriture adéquate et de l'eau. Au-delà d'un certain âge (14-20 jours), les cannetons deviennent des animaux très rustiques, ils peuvent alors survivre, même dans de très mauvaises conditions. Toutefois, élevés dans un environnement inadéquat, la production (croissance, utilisation

de la nourriture, production d'œufs, nombre d'œufs fécondés, taux d'éclosion des œufs, etc.) sera très médiocre.

### 2.1.2 Le Fuligule morillon (*Aythya fuligula*)

*Le Fuligule morillon* est une espèce essentiellement nidificatrice en Dombes, mais dont un nombre important d'individus à affinité plus "nordique" viennent aussi y hiverner à partir du mois de novembre pour atteindre une présence maximale en janvier. C'est un canard de taille moyenne dont la population mondiale compterait un million d'oiseaux environ. L'espèce est grégaire et forme de larges bandes en hiver. Elle vit avec d'autres canards plongeurs, notamment les fuligules milouins ainsi que les foulques. Comme la totalité des anatidés, ce canard fréquente les étangs, les lacs, les rivières lentes et les fleuves. En hiver, il pousse des incursions jusque dans les villes où on le retrouve principalement sur les grandes pièces d'eau des parcs ou à proximité des ponts qui enjambent les cours d'eau. Canard d'eau douce, le fuligule morillon est rarement observé en mer, sauf pendant les migrations ou pendant les grands froids. Présent dans les régions tempérées d'Eurasie, il est sédentaire en Europe occidentale seulement. Ailleurs, il est migrateur, nichant jusqu'en Scandinavie et hivernant jusqu'au sud du Sahara.

*Le Fuligule morillon* est un canard plongeur qui cherche la plupart de sa nourriture sous la surface. Propulsé par ses larges pattes palmées, il peut descendre jusqu'à 7 mètres de profondeur. Son régime alimentaire est mixte : d'une part des mollusques bivalves (des moules d'eau douce) et des insectes aquatiques (principalement des libellules), d'autre part des graines qu'il broute dans la végétation proche de l'eau. Mais il consomme également des petits poissons et des crustacés. Il est sociable, même en période de reproduction : son nid est souvent proche de celui de mouettes et de sternes. Les couples de Fuligule morillon se forment à la fin de l'hiver ou au début du printemps. En mai-juin, la femelle pond de 6 à 11 œufs dont l'incubation dure entre 23 et 28 jours. On ne compte qu'une seule ponte par an. Le fuligule atteint sa maturité sexuelle au bout d'un ou deux ans. Pour les besoins de l'expérimentation, nous nous somme

procuré des canards élevés en captivité et destinés à la vente comme canards d'ornement.

## 2.2 Virus

L'ANSES et l'ONCFS ont initié depuis 2000 une surveillance virologique d'espèces sauvages aquatiques dans deux sites (l'un en Loire Atlantique, l'autre dans La Dombes) d'importance majeure en terme de nombre d'oiseaux sauvages présents, de situation par rapport aux trajets migratoires (Manche-Atlantique, Rhin-Rhône), et de localisation d'élevages de volailles en plein air. L'enquête réalisée en 2001 a montré la présence de virus Influenza faiblement pathogène chez plusieurs espèces d'oiseaux capturées dans l'estuaire de la Loire et en Dombes [93]. Les espèces concernées étaient essentiellement le colvert (*Anas platyrhynchos*), la sarcelle d'hiver (*Anas crecca*), la foulque (*Fulica atra*) et le cormoran (*Phalacrocorax carbo*). De plus, dès le début de ce programme, des canards domestiques sentinelles réceptifs partageant le même environnement ont été mis en place.

### 2.2.1 Virus circulants en Dombes

Les virus ainsi isolés ont fait l'objet d'une caractérisation approfondie aux plans génétique et antigénique en vue d'une étude en épidémiologie moléculaire des sous-types à intérêt vétérinaire [93]. Des tests sérologiques ELISA ont révélé un taux de positivité respectivement de 40,5 % chez les canards sentinelles, 9 % chez les foulques macroule, 62 % chez les canards colvert et 1,3 % chez les Grands Cormorans. Des analyses virologiques ont révélé une prévalence de 2,6% chez les canards colverts et 1,5% chez les sarcelles d'hiver. Des virus de sous-types H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> et H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> faiblement pathogènes ont été isolés en Dombes [93]. Le 17 février 2006, un premier cas de mortalité dans l'avifaune sauvage imputé au virus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> HP est déclaré en Dombes. Le bilan de la surveillance épidémiologique faite par l'ONCFS au 09 Juin 2006 fait état de 42 lots de cadavres analysés confirmés positifs au virus H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> par l'AFSSA Ploufragan (Laboratoire National de Référence des Pestes Aviaires).

La majorité (90%) des lots confirmés se situe dans 15 communes différentes de l'Ain dont 11 font partie de la Dombes. Les espèces concernées sont essentiellement le cygne tuberculé (*Cygnus olor*), le fuligule milouin (*Aythya ferina*). Quelques cas erratiques sont signalés sur un héron cendré (*Ardea cinerea*), une buse variable (*Buteo buteo*), une oie cendrée (*Anser anser*), un grèbe huppé (*Podiceps cristatus*) et un fuligule morillon (*Aythya fuligula*). Dans l'avifaune domestique, un seul cas d'élevage contaminé par le virus H5N1 sera recensé. Il concerne un élevage de dindes sur la commune de Versailleux. L'analyse phylogénétique de 12 souches virales détectées a révélé la présence de deux groupes distincts appartenant au sous-clade 2.2.1 [94].

### 2.2.2 Virus utilisé en expérimentation

Une souche virale sauvage A/Finch/England/2051/91 de sous-type H5N2 faiblement pathogène isolée chez des passereaux, nous a été fournie par le Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Ce virus a été passé sur cellules MDCK afin d'obtenir une concentration de  $1.2 \cdot 10^6$  DICT<sub>50</sub>/ml dans un milieu EMEM, et conditionné dans des tubes Eppendorf de 1ml, qui est le volume inoculé à chaque canard.

Le volet expérimental de notre étude s'est déroulé dans les locaux de l'institut Claude Bourgelat, plateforme technologique dédiée aux essais pré-cliniques sur l'animal à Vetagro-sup (Campus Vétérinaire de Lyon). Des animaleries en système confiné A3 ont été utilisées pour héberger les canards inoculés et témoins dans des conditions de bien-être animal approuvées par le comité d'éthique de l'institut. L'accès aux animaleries a été assuré par un double sas d'entrée, en prenant toute les précautions nécessaires afin de ne pas diffuser les agents pathogènes à l'extérieur de l'institut (Masque, combinaison, etc). Les conditions de l'hébergement des canards seront détaillées dans la partie suivante de ce mémoire.

### ***3. Programme de l'étude***

Notre projet de recherche est résumé en trois chapitres, chacun d'eux ayant donné lieu à un projet de publication.

La première étude a porté sur la caractérisation de l'excrétion et de la localisation tissulaire d'un virus influenza aviaire chez le canard dans la perspective de la modélisation épidémiologique de l'influenza aviaire. Des canards pekin ont été inoculés par un virus influenza aviaire faiblement pathogène de sous type H5N2. Nous avons quantifié par RT-PCR en temps réel les particules virales excrétées par ces canards dans les fientes. Un 2<sup>ème</sup> essai a permis la localisation tissulaire du virus par immuno-histochimie chez ces mêmes animaux.

Dans la seconde étude, une inoculation expérimentale par le même virus a été réalisée sur des canards plongeurs, des Fuligules morillons d'ornement. Durant cet essai, nous avons étudié l'excrétion du virus influenza chez ces canards ainsi que sa transmission à la même espèce d'oiseaux sauvages (plongeurs) et aux canards domestiques Pékin (de surface).

La 3<sup>ème</sup> étude rapporte les résultats d'une étude analytique de prévalence des virus influenza dans le milieu naturel formé par trois étangs voisins en Dombes, au bord desquels des prélèvements de fientes et d'eau ont été réalisés. Cette étude nous a donné l'occasion de tester une trousse de diagnostic rapide (kit) mise au point par la société Synbiotics comme premier "screening" de nos prélèvements. Les échantillons ayant répondu positivement à ce test ont ensuite été analysés par RT-PCR en temps réel pour quantification des particules virales présentes. Des cartes de prévalence ont été ensuite réalisées en se fondant sur les coordonnées géographiques des prélèvements. Les prélèvements d'eau ont été transférés à l'institut Pasteur de Lille pour analyse par RT-PCR après filtration.

#### 4. Publications

-Article 1: "Shedding and intestinal spread of avian influenza virus H5N2 in dabbling ducks (preliminary study)". A. Mamlouk, M. Artois, M. Ottmann, P. Belli, B. Lina, P. Sabatier. *Revue Méd. Vét.*, 2011, **162**, 10, 454-459

-Article 2: "Experimental transmission of a low pathogenic H5N2 avian influenza virus from diving ducks". A. Mamlouk, M. Ottmann, M. Artois, B. Lina, P. Sabatier. (Article soumis)

-Article 3: " Avian influenza viruses in aquatic habitats of waterfowl during fall migration in the Dombes, France". A. Mamlouk, M. Artois, M. Ottmann, B. Lina, L. Lines, P. Sabatier. (Article en préparation)

- Poster 1: " Immunité et excrétion virale du Canard Pékin (*Anas platyrhynchos*) inoculé par un virus influenza aviaire faiblement pathogène". Journée de L'Association pour l'Étude de l'Épidémiologie des Maladies Animales, Maison Alfort le 22/05/2007.

A. Mamlouk, M. Artois, T. Buronfosse, L. Cova, B. Lina, P. Belli, K. Lemberger, T. Roger, S. Vidal, D. Bicout, et P. Sabatier.

-Poster 2: " Excrétion d'un virus influenza aviaire faiblement pathogène, expérimentalement inoculé à une population d'*Anatidae*". Journée de l'Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement, Grenoble le 07/05/2009.

A. Mamlouk, M. Artois, T. Buronfosse, L. Cova, B. Lina, P. Belli, K. Lemberger, T. Roger, S. Vidal, D. Bicout, F. Firouzi, C. Jamard et P. Sabatier.



**PARTIE III**

**ESSAI CLINIQUES ET**

**ETUDE ENVIRONN-**

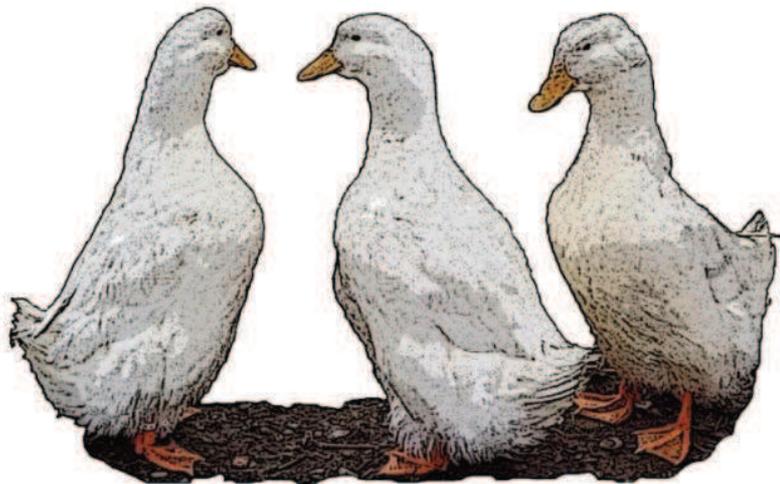
**EMENTALE**



## Chapitre I<sup>er</sup>

### Excrétion et diffusion intestinale du virus Influenza aviaire H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> chez les canards de surface (étude préliminaire)

*Shedding and intestinal spread of avian influenza virus H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> in dabbling ducks (preliminary study)*



*Canards pékin (Anas platyrhynchos)*

A. Mamlouk, M. Artois, M. Ottmann, P. Belli, B. Lina, P. Sabatier. *Shedding and intestinal spread of avian influenza virus H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> in dabbling ducks (preliminary study)*. *Revue Méd. Vét.*, 2011, **162**, 10, 454-459.



## **Shedding and intestinal spread of avian influenza virus H5N2 in dabbling ducks (preliminary study)**

### **Excrétion et diffusion intestinale du virus Influenza aviaire H5N2 chez les canards de surface (étude préliminaire)**

A. MAMLOUK<sup>1\*</sup>, M. ARTOIS<sup>1</sup>, M. OTTMANN<sup>2</sup>, P. BELL<sup>3</sup>, B. LINA<sup>2</sup>, P. SABATIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Equipe EPSP, TIMC IMAG, UMR5525, Vetagro-Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, FRANCE.

<sup>2</sup> Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, Faculté de Médecine Laennec, Université de Lyon 1, 7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, FRANCE.

<sup>3</sup> Unité Pathologie Morphologique et Clinique, VetAgro-Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, FRANCE.

\* Correspondence: A. MAMLOUK, Email: aymenmamlouk@gmail.com

#### **Summary**

Faecal excretion and tissue localisation of a low pathogenic avian influenza virus of subtype H5N2 were determined in 4 week old Pekin ducks experimentally inoculated. After inoculation of ducks (n = 4), the virus shedding in faeces quantified by real-time RT-PCR and the humoral immune response using a haemagglutination inhibition assay were monitored for 24 days. In a second experiment, the virus localisation in infected ducks (n = 4) was explored by immunohistochemistry for the 4 first days after inoculation. Although no marked clinical signs and no death case was recorded in infected ducks, the virus excretion in faeces was intense since the 3rd day then gradually declined until the 17th day and the serum antiviral antibodies appeared since the 10th day and persisted in all ducks until the end of the experiment. The virus immunolabelling was observed predominantly in the first third of intestines on day 1 and in the

caeco-colic junction on days 2, 3 and 4 at a lesser extend but at this time, virus particles were again detected in the intestines. No immunolabelling was found in the other organs. These results indicate that the low pathogenic avian influenza virus focus in the intestinal tract in which the intestines (first third) and the caeco-colic junction were the main sites of several replication cycles, leading to a delayed humoral response and to a persistent faecal shedding in ducks.

**Key-words:** Low pathogenic avian influenza virus, duck, excretion, faeces, real-time RT-PCR, immunohistochemistry, humoral immune response.

**Running title:** Shedding and intestinal spread of a low pathogenic avian influenza virus in ducks.

## Résumé

L'excrétion fécale et la localisation tissulaire d'un virus influenza aviaire faiblement pathogène de sous-type H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> ont été étudiées chez des Canards Pékin âgés de quatre semaines inoculés. Après infection expérimentale des canards (n = 4), l'excrétion du virus dans les fèces quantifiée par RT-PCR en temps réel ainsi que la réponse immune humorale mise en évidence par un test d'inhibition de l'hémagglutination, ont été mesurées sur une période de 24 jours. Au cours d'une seconde expérience, la localisation du virus a été entreprise par immunohistochimie au sein de différents organes issus des canards infectés (n = 4) durant les 4 premiers jours suivant l'inoculation. Bien qu'aucun signe clinique notable et qu'aucun cas de mortalité n'ait été observé chez les oiseaux infectés, l'excrétion du virus dans les fèces a été intense dès le 3ème jour puis a progressivement diminué jusqu'au 17ème jour, et les anticorps anti-virus circulants sont apparus dès le 10ème jour et ont persisté chez tous les canards jusqu'à la fin de l'expérience. L'immunomarquage du virus a été prédominant dans le premier tiers des intestins le 1er jour et dans la jonction caeco-colique le 2ème, 3ème et 4ème jour (à un moindre degré) mais, à cette date, les particules virales ont de nouveau été détectées dans les intestins. Aucun virus n'a été détecté dans les autres organes. Ces résultats indiquent que ce virus influenza aviaire peu pathogène se localise essentiellement dans le tractus intestinal dont

les sites principaux de réplication virale sont l'intestin (1<sup>er</sup> tiers) et la jonction caeco-colique, conduisant à une réponse immune humorale retardée et à une excrétion fécale persistante chez les canards.

**Mots-clés :** Virus Influenza aviaire faiblement pathogène, canard, excrétion, fèces, RT-PCR en temps réel, immunohistochimie, réponse immune humorale.

**Titre courant :** Excrétion et diffusion intestinale d'un virus Influenza aviaire peu pathogène chez le canard.

## 1. Introduction

Avian influenza virus has been isolated from several species of wild birds around the world [15], and all of them might be infected. Water birds, predominantly Anseriforms (including ducks, geese and swans) and Charadriiforms (particularly gulls and terns) are, therefore, rated as a major reservoir of influenza A viruses in nature. They can be sources of spread of low pathogenic avian influenza viruses (LPAIV) of subtypes H5 or H7 to poultry breeding flocks where they could eventually become high pathogenic (HP) [2, 10]. Water birds are involved most of the time, particularly ducks which seem to have an important role in the epidemiology of influenza A viruses. This species could host a wide range of virus subtypes at a high level evaluated at 12.9 % [15]. The epidemiological role of this species has to be questioned especially if it is considered that duck is the most abundant water bird species [24] depending on the region, and consequently the most likely to transmit the infection to wild birds or domestic poultry living or reared in the same environment.

Avian influenza viruses replicate primarily in the respiratory and intestinal tracts of wild aquatic birds and are excreted in high concentrations in their faeces [24]. Thus the viruses can be directly or indirectly transmitted from wild birds to domestic birds and/or mammals [8, 20]. It happens through nasal and/or faecal excretion after contact between infected and susceptible animals [24]. Since the study of Webster et al. [23] and until recently, few studies were interested in faecal excretion of the virus in spite of the fact that it is the most important direct

and indirect way of transmission through the excretion and environment persistence of the virus in faeces, and also through passive transmission. Only since recently, researchers have given much attention to influenza virus in faeces through experimental [9, 21] or surveillance studies [16]. These studies show that prevalence rates obtained by surveillance of fresh faeces sampled from the environment (percentage of birds with infected faeces), are similar to those based on cloacal swab samples, obtained after catching birds. The interest of this method is to avoid animal manipulation in routine surveillance programs. However, valuable information about the duration and the intensity of this faeces excretion by the birds are not available.

The aim of the present study was to investigate the modalities of LPAIV (especially of the subtype H5N2) excretion after an experimental inoculation to Pekin ducks in order to easily identify the virus using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) which has been evaluated in several studies [1, 5, 18] and quantify in intensity and in time the faecal excretion. In parallel, the humoral immune response was also monitored and compared to the excretion kinetic because it was reported that an immune response occurred since the second week after inoculation [4]. As monitoring the evolution of the virus in the infected organism may also inform indirectly to the excretion modalities of the pathogen agent in the environment and in particular may confirm the preferential localization of viruses in intestines [24] and the inherent importance of the faecal excretion, the virus localization in tissues from infected ducks was explored by immunohistochemistry. How many virus units are excreted in faeces? How would the susceptible animal immunity system react to the infection? And where is the virus in the ducks organism? These are questions asked in the present study.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Virus strain**

An A/Finch/England/2051/91 strain of an avian influenza virus of subtype H5N2, was obtained from the Virology and Human Pathology laboratory, UCBL

CNRS FRE 3011 (France). It was isolated from finch, a passerine bird (order of Passeriformes, family of Fringillidae), and passed on MDCK cells (Madin-Darby Canine Kidney) to obtain a concentration of  $1.2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml in EME medium. (TCID means median Tissue Culture Infective Dose: that amount of a pathogenic agent that will produce pathological change in 50% of cell cultures inoculated). A LPAIV H5 virus was used in this study knowing that it is a common subtype among wild Anseriforms; In two wild bird monitoring studies conducted in several European countries, 8.5% to 14.5% of the identified AIV belonged to LP H5 viruses [7, 22].

### ***2.2 Animals and protocol design***

The Pekin duck (*Anas platyrhynchos domesticus*) is a robust prolific widespread domestic duck. It was however postulated in the current study that this species have the same sensitivity against a LPAIV than Mallard, from which it has been genetically selected. The Mallard is the most abundant duck species in Eurasia. It is capable of long-distance migration between breeding and wintering areas [6], and is also the species from which the highest number of birds infected with LPAIV has been detected in wild bird surveillance studies [13].

Infected and control ducks were housed in an indoor aviary and placed in individual metabolic cages. Negative control ducks were placed in a separated aviary under the same conditions. Temperature was kept at 25°C and humidity at 70%. Access to the animals was managed through a security door to negative control animal room and through a double security door to infected animal room. Food and water were available ad libitum.

A total of 12 (6 males and 6 females), 4 week old, Pekin ducks were used in the study. Experiments were conducted according to local ethical guidelines, and were approved by the Animal Ethics Committee of the Claude Bourgelat Institute, Vetagro-Sup (France).

In a first experiment, 4 ducks were not inoculated by the influenza virus, were isolated in a separate room and served as negative controls whereas 4 other ducks

were inoculated with H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> influenza virus by challenge with 1 mL of EMEM fluid containing at least 10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/mL: all of the inoculated ducks received the viral suspension both by intranasal (0.4 mL), intra-tracheal (0.4 mL) and by topical ocular (0.2 mL) routes. Ducks were monitored daily for 19 days to investigate symptoms and mortality and excreted faeces were collected over 24 hours on days 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21 and 24 after inoculation. At the same time points, blood samples were collected by puncture of the venous occipital sinus in sterile tubes without anticoagulant [26]. After clotting at room temperature for 2 hours and centrifugation (1500 g, 4°C, 15 minutes), sera were carefully harvested and stored at -20°C until analysis.

In a second experiment, 4 Pekin ducks were all challenged according to the same protocol as previously described and were successively euthanized by an intravenous injection of sodium pentobarbital at the rate of one duck per day during 4 days. Immediately after death, organs (first and second thirds of intestines, caecum, caeco-colic junction, cloacae, bursa of Fabricius, brain, muscle, spleen, lung and trachea) were removed and fixed in 10% neutral-buffered formalin.

### ***2.3 Molecular, immunohistochemical and serological analyses***

#### ***2.3.1 Real-time RT-PCR***

Viral RNA was extracted from 140 µL of cloacal swab devices or faeces with the QIAmp virus RNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The RT-PCRs were all performed as described previously [3]. Briefly, the Superscript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was used on ABI 7500 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) platform. Primers and probe were designed from the M gene for the most sensitive detection of influenza viruses. After a reverse transcription reaction at 50°C for 15 minutes and a denaturation step at 95°C for 2 minutes, a two-step amplification of 50 cycles was performed at 95°C for 15 seconds and 60°C for 40 seconds. A calibration range of diluted transcript (kindly provided by Vincent Enouf and Sylvie Van Der Werf) ranging from 10 to

105copies/5µL was used for the quantitative real-time RT-PCR targeting the M gene.

Results were considered positive if the Ct value was 39 or less (Ct value is defined as the PCR cycle number at which the signal, fluorescence, of the probe rises above background. The lower is the Ct value the better is the PCR performance).

### 2.3.2 Immunohistochemistry

Tissues sampled after necropsy were fixed at 10% neutral-buffered formalin, embedded in paraffin and then transferred to Anipath histology laboratory of the Claude Bernard Lyon I University (France), to be sectioned at 4 µm and stained with haematoxylin and eosin. Immunohistochemistry was performed to detect the viral antigen. A mouse monoclonal antibody specific for the influenza A matrix protein (diluted 1:500, clone GA2B, AbDSerotec, Kidlington, UK) was used as the primary antibody [25]. Optical microscopy revealed the virus antigen as a dark brown coloration above a blue background (tissues counterstained with haematoxylin).

### 2.3.3 Haemagglutination inhibition (HI)

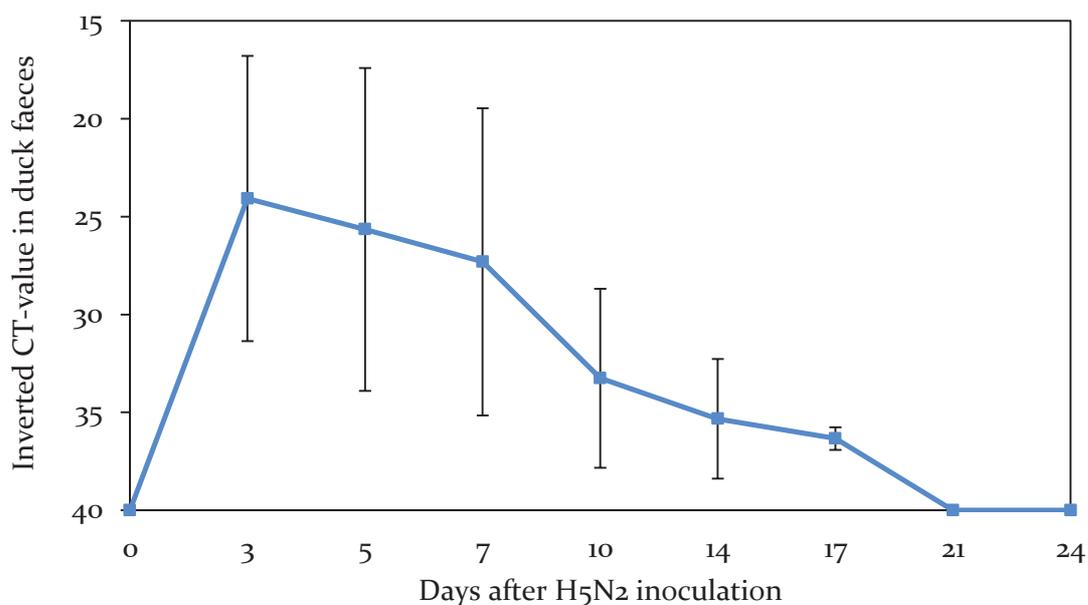
Anti-A Influenza virus (AIV) antibody titres in serum samples were determined by performing a haemagglutination inhibition (HI) test as described in the OIE manual [14]. The HI assay was performed with 4 haemagglutination units (HAU) of A/Finch/England/2051/91 as antigen. Samples were considered positive at a titre (log<sub>2</sub>) of 4 or more against 4 HUA of antigen.

## **3. Results**

Prior to challenge, negative control birds and birds prior to inoculation (day 0) have given negative influenza A virus detection in faeces samples. All birds were also serologically tested using the HI test and were all negative for antibodies against influenza virus H5N2.

During both experiments, only non-specific clinical signs, such as diarrhoea were observed in infected ducks. Some cases of diarrhoea were also pointed out in negative controls without a link with the targeted disease. No mortality case was recorded during the whole experimental period either in control birds or in infected ducks.

As shown in figure 1, a high rate of viral excretion in faeces was observed at the 3rd day after inoculation of the H5N2 subtype virus. From day 5 to day 17 post inoculation, the faeces viral titre gradually decreased until the end of the sampling period but remained elevated until the 7th day. On day 17, 3 out of 4 ducks had still detectable excretion and on day 21, no detectable viral RNA was noticed.



**Figure 1:** Mean shedding of influenza virus RNA evidenced by virus real-time RT-PCR detection in faeces from Pekin ducks ( $n = 4$ ) inoculated by intranasal, intra-tracheal and topical ocular injection of 1mL of EMEM fluid containing at least  $10^5$ TCID<sub>50</sub>/mL of LPAIV H5N2 (Ct values are inversely proportional to the amount of target nucleic acid in the sample). Bars represent the upper and lower limits of standard deviation values.

The variations of the anti-AIV antibody titres according to time were reported in Table I. Whereas serum specific antibody was never detected in the negative control ducks, a positive humoral immune response with HI antibody titres

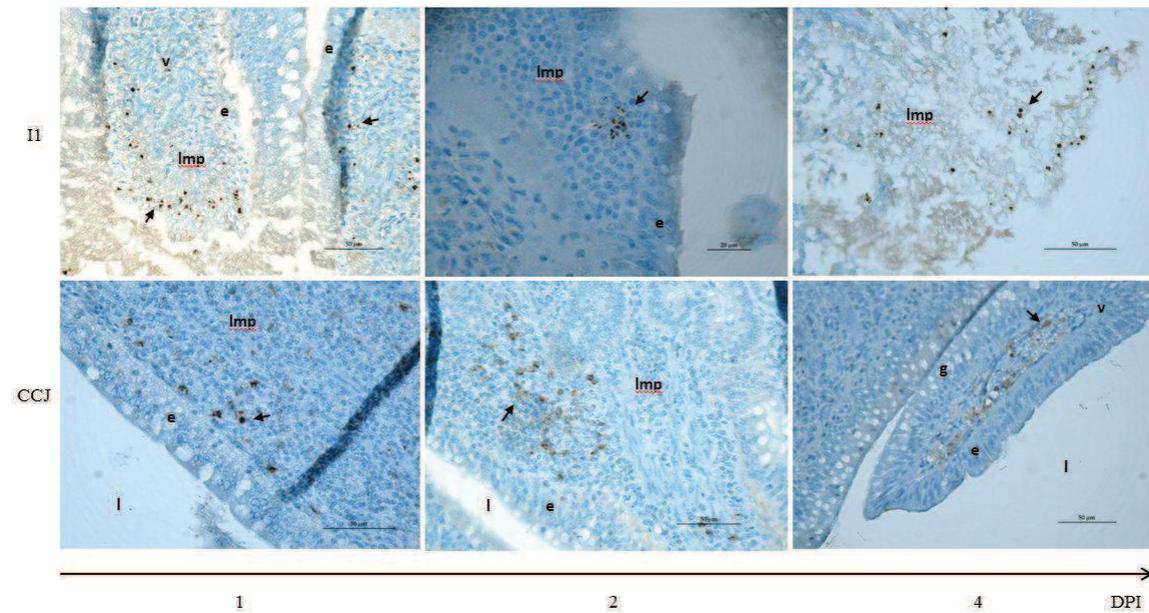
ranged from 4.0 to 5.3 was detected in 3/4 ducks since the 10th day after inoculation and in all infected ducks since the 14th day until the end of the experiment.

**Table I:** Serum anti-A influenza virus antibody titres detected by haemagglutination inhibition (HI) test in Pekin ducks not infected (negative controls) or inoculated by intranasal, intra-tracheal and topical ocular injection of 1mL of EMEM fluid containing at least 10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/mL of LPAIV H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>. Positive results are valid with a titre (log<sub>2</sub>) of 4 or more against 4 haemagglutination units (HAU).

	Days after LPAIV H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> virus inoculation								
	BI	3	5	7	10	14	17	21	24
Control ducks	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Infected ducks	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4

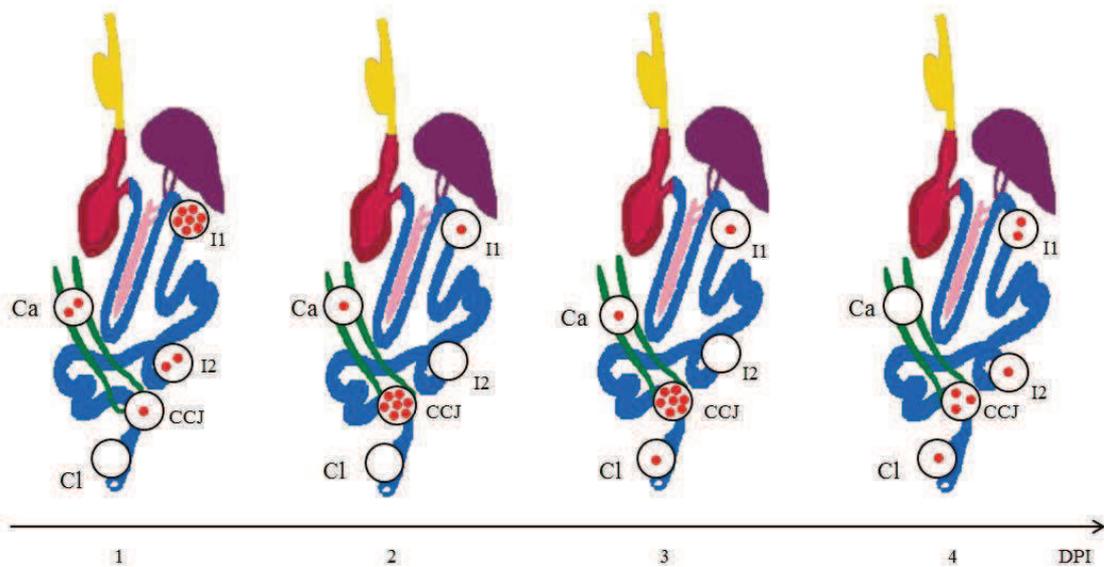
BI: before inoculation.

Using immunohistochemistry, abundant dark red to brown inclusions above a blue background of safe tissues not associated with necrosis, equivalent in size and corresponding to viral particles were seen in different parts of the intestines, with a delimited or diffused outline. They were localized at the top of the laminae propria just under the epithelium (figure 2). A strong immunolabelling was observed in the first third of intestines from infected ducks on day 1 post inoculation. At the same time, viral particles were also occasionally detected in the second third of intestines and in caecum (figure 3) and more rarely in the caeco-colic junction (figure 2).



**Figure 2:** LPAIV H5N2 viral particle (arrowheads) localisation in the first third of intestines (I1) and in the caeco-colic junction (CCJ) from infected Pekin ducks inoculated by intranasal, intra-tracheal and topical ocular injection of 1mL of EMEM fluid containing at least  $10^5$ TCID<sub>50</sub>/mL of LPAIV H5N2 on days 1, 2 and 4 post inoculation (DPI) (v: intestinal villus; lpm: laminae propria mucosae; e: epithelium; l: lumen; g: goblet cells).

Immunohistochemistry with mouse monoclonal antibody specific for the influenza A matrix protein as primary antibody, Bar: 50 µm.



**Figure 3:** Recapitulative schema showing the LPAIV H5N2 viral particle (red points) localisation within the gastro-intestinal tract according to the sampling areas (I1 and I2: first and second thirds of the intestines; Ca: caecum; CCJ: caeco-colic junction; Cl: cloacae) in the first third of intestines (I1) and in the caeco-colic junction (CCJ) from infected Pekin ducks inoculated by intranasal, intra-tracheal and topical ocular injection of 1mL of EMEM fluid containing at least  $10^5$ TCID<sub>50</sub>/mL of LPAIV H5N2 on days 1, 2, 3 and 4 post inoculation (DPI).

Thereafter, on day 2, the presence of the viral particles in the first and second thirds of intestines as well as in caecum declined whereas in parallel the immunolabelling was strengthened in the caeco-colic junction on days 2 and 3 (figures 2 and 3). At the 3rd and 4th days post inoculation, a cloacal labelling was evidenced which may correspond to the faecal excretion peak previously obtained. On day 4, the intensity of the immunolabelling weakly decreased in the caeco-colic junction and would be related to the decline of the virus excretion in faeces but appeared to be slightly increased in the intestines compared to the days 2 and 3 (figure 3). No immunolabelling was observed in the other sampled organs.

#### 4. Discussion

No severe clinical signs were observed in the groups of ducks inoculated with the LPAIV H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> virus. Although weaker symptoms such as conjunctivitis, sinusitis, and a transient egg drop can be reported [11], a low pathogen avian influenza virus infection is generally asymptomatic in wild birds as it was observed in both experimental [17] and surveillance studies [19]. Nevertheless, the absence of symptom doesn't mean absence of infection, as evidenced by the significant virus excretion rate measured in faeces in the present study. A peak of virus shedding was indeed noted at the 3rd day post inoculation, preceded by an intense immunolabelling in the intestines, mainly in the first third, on day 1 and progressive moving of the labelling spots to the caeco-colic junction on days 2 and 3. This early transmission of A influenza viruses would result from a high viral replication in the digestive tract, and from a rapid excretion in faeces, as it has been reported previously [23].

Although immunohistochemistry was performed on only one duck per day, the immunohistochemical findings were in accordance with the kinetic of the virus excretion in faeces from infected ducks. The early excretion would result mainly from an intensive multiplication at the caeco-colic junction, because of an important tropism to those tissues. The importance of the caeco-colic junction in the viral replication is noteworthy despite its short size (1 cm). This is the crossing point where intestine and caecum contents are poured and where the virus multiplies after being stayed in the upper part of the intestines for one day. Additionally, the immunohistochemical results also reveal the multiplicity and the change of localization of the viral reproduction sites inside the intestines.

After the intensive excretion stage which lasted roughly one week, a decrease in viral RNA level in faeces was observed until the end of the experiment (24 days). At the same time, a progressive humoral immune response was detected in all experimentally infected ducks. The serum anti-AIV antibodies appeared at the 10th day post inoculation and remained present until the end of the study. Furthermore, as the virus used in this study was isolated from finch, a wild

passerine bird, the immune response could be more intense or perhaps more precocious and durable with a duck adapted virus and a longer sampling period. Indeed, the persistence of the humoral response over at least 15 days would be related to the possible occurrence of secondary and moderate in intensity cycles of virus replication in intestines as suggested by immunohistochemical findings on the day 4, leading to a mild residual viral excretion in faeces

As a conclusion, the excretion of the H5N2 LPAI virus was quantified in faeces using real-time RT-PCR, was maximal at the 3rd day post inoculation and persisted at a detectable level until the 17th day. Using immunohistochemistry, it was highly suggested that the virus shedding in faeces was preceded by successive viral replication in intestines (mainly in the first third) and in the caeco-colic junction and that several replication cycles would occurred after a single experimental inoculation, leading to a delayed and persistent humoral immune response. Unlike the response encountered during infection of the host by a highly pathogenic virus [12], we found no immunolabelling in other organs (lungs, brain ...). This concentration of LPV in the intestinal tract enhances the transmission path through faeces and contaminated water over a transmission path through air. These results confirm that faeces would be practical markers to survey the epidemiological status of wild bird populations. Such sampling would avoid performing invasive cloacal and blood samples, i.e. to capture wild birds in their environment. Knowing the specific behaviour of diving ducks, it would be of interest to study the shedding of LPAIV in those duck species.

### **Acknowledgments**

This study was funded by the « Agence Inter-établissement de recherche pour le développement » within the framework of the project « Ecologie évolutive et modélisation de la circulation des virus influenza aviaire dans l'environnement ». Thanks are due to Vanessa Escuret, Olivier Ferraris, Fereshteh Firouzi and Anipath histology laboratory of the Claude Bernard Lyon I University (France) for the setting up of the experimental protocol. We would also like to thank

anonymous reviewers for their many helpful comments and suggestions on an earlier version of this article.

## References

1. Cattoli G., Terregino C., Guberti V., De Nardi R., Drago A., Salviato A., FASSINA S., CAPUA I.: Influenza virus surveillance in wild birds in Italy: results of laboratory investigations in 2003-2005. *Avian Dis*, 2007, 51, 414-416.
2. De Wit J.J., Koch G., Fabri T.H., Elbers A.R.: A cross-sectional serological survey of the Dutch commercial poultry population for the presence of low pathogenic avian influenza virus infections. *Avian Pathol*, 2004, 33, 565-570.
3. Duchamp M.B., Casalegno J.S., Gillet Y., Frobert E., Bernard E., Escuret V., Billaud G., Valette M., Javouhey E., Lina B., Floret D., Morfin F.: Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16, 317-321.
4. Fereidouni S.R., Grund C., Hauslaigner R., Lange E., Wilking H., Harder T.C., Beer M., Starick E.: Dynamics of specific antibody responses induced in mallards after infection by or immunization with low pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Dis*, 2010, 54, 79-85.
5. Ferro P.J., Peterson M.J., Merendino T., Nelson M., Lupiani B.: Comparison of real-time reverse transcription-PCR and virus isolation for estimating prevalence of avian influenza virus in hunter-harvested wild birds at waterfowl wintering grounds along the Texas mid-Gulf Coast (2005-2006 through 2008-2009). *Avian Dis*, 2010, 54, 655-659.
6. Gilbert M., Xiao X., Domenech J., Lubroth J., Martin V., Slingenbergh J.: Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5NI virus. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12, 1650-1656.
7. Hesterberg U., Harris K., Stroud D., Guberti V., Busani L., Pittman M., Piazza V., Cook A., Brown I.: Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. *Influenza Other Respi Viruses*, 2009, 3, 1-14.

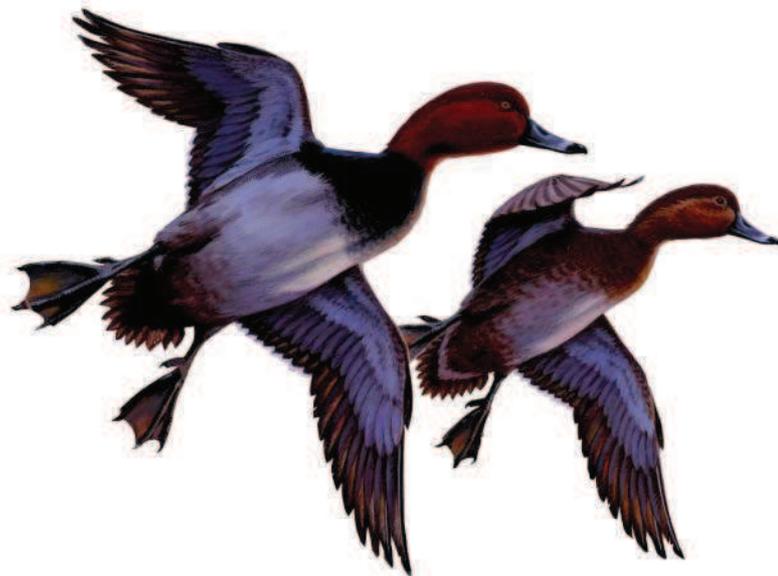
8. Horimoto T., Kawaoka Y.: Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3, 591-600.
9. Jourdain E., Gunnarsson G., Wahlgren J., Latorre-Margalef N., Brojer C., Sahlin S., Svensson L., Waldenstrom J., Lundkvist A., Olsen B.: Influenza virus in a natural host, the mallard: experimental infection data. *PLoS One*, 2010, 5, e8935.
10. Kawaoka Y., Naeve C.W., Webster R.G.: Is virulence of H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology*, 1984, 139, 303-316.
11. Laudert E., Sivanandan V., Halvorson D., Shaw D., Webster R.G.: Biological and molecular characterization of H<sub>13</sub>N<sub>2</sub> influenza type A viruses isolated from turkeys and surface water. *Avian Dis*, 1993, 37, 793-799.
12. Londt B.Z., Nunez A., Banks J., Nili H., Johnson L.K., Alexander D.J.: Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A/turkey/Turkey/1/2005 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally. *Avian Pathol*, 2008, 37, 619-627.
13. Munster V.J., Baas C., Lexmond P., Waldenstrom J., Wallensten A., Fransson T., Rimmelzwaan G.F., Beyer W.E., Schutten M., Olsen B., Osterhaus A.D., Fouchier R.A.: Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog*, 2007, 3, e61.
14. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2005
15. Olsen B., Munster V.J., Wallensten A., Waldenstrom J., Osterhaus A.D., Fouchier R.A.: Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 2006, 312, 384-388.
16. Pannwitz G., Wolf C., Harder T.: Active surveillance for avian influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. *J Wildl Dis*, 2009, 45, 512-518.
17. Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E.: Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Rev Sci Tech*, 2009, 28, 113-136.

18. Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L.: Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*, 2002, 40, 3256-3260.
19. Stallknecht D.E., Shane S.M.: Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun*, 1988, 12, 125-141.
20. Vandalen K.K., Shriner S.A., Sullivan H.J., Root J.J., Franklin A.B.: Monitoring exposure to avian influenza viruses in wild mammals. *Mammal Rev*, 2009, 39, 167-177.
21. Vandalen K.K., Franklin A.B., Mooers N.L., Sullivan H.J., Shriner S.A.: Shedding Light on Avian Influenza H4N6 Infection in Mallards: Modes of Transmission and Implications for Surveillance. *PLoS One*, 2010, 5, e12851.
22. Wallensten A., Munster V.J., Latorre-Margalef N., Brytting M., Elmberg J., Fouchier R.A., Fransson T., Haemig P.D., Karlsson M., Lundkvist A., Osterhaus A.D., Stervander M., Waldenstrom J., Bjorn O.: Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13, 404-411.
23. Webster R.G., Yakhno M., Hinshaw V.S., Bean W.J., Murti K.C.: Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*, 1978, 84, 268-278.
24. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., KAWAOKA Y.: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 1992, 56, 152-179.
25. Yamamoto Y., Nakamura K., Kitagawa K., Ikenaga N., Yamada M., Mase M., Narita M.: Severe nonpurulent encephalitis with mortality and feather lesions in call ducks (*Anas platyrhynchos* var. *domestica*) inoculated intravenously with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. *Avian Dis*, 2007, 51, 52-57.
26. Zimmermann N.G., Dhillon A.S.: Blood sampling from the venous occipital sinus of birds. *Poult Sci*, 1985, 64, 1859-1862.

## Chapitre II

### Transmission d'un virus influenza faiblement pathogène H5N2 chez des canards plongeurs inoculés

*Experimental transmission of a low pathogenic H5N2  
avian influenza virus in diving ducks*



*Fuligules à tête rouge (Aythya americana) © Charlie Allen*

*A. Mamlouk, M. Ottmann, M. Artois, B. Lina, P.Sabatier. Experimental transmission of a low pathogenic H5N2 avian influenza virus from diving ducks. (Article soumis au journal "Avian Pathology")*



**Experimental transmission of a low pathogenic H5N2  
avian influenza virus in diving ducks**

**Transmission d'un virus influenza faiblement pathogène  
H5N2 chez des canards plongeurs inoculés**

A. MAMLOUK<sup>1\*</sup>, M. OTTMANN<sup>2</sup>, M. ARTOIS<sup>1</sup>, P. BELL<sup>3</sup>, B. LINA<sup>2</sup>,  
P.SABATIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Equipe EPSP, TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS VetAgro-Sup, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France

<sup>2</sup> Université de Lyon, F-69000 Lyon, France; Université Lyon 1, Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine Faculté de médecine RTH Laennec 7-11 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon Cedex 08, France

<sup>3</sup> Unité Pathologie Morphologique et Clinique, VetAgro-Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, France

\* Corresponding author: Email: aymenmammlouk@gmail.com

**Abstract**

A group of diving ducks was challenged with a low pathogenic avian influenza virus of subtype H5N2. They were kept with two groups of contact ducks: the first one from the same species, Tufted ducks (*Aythya fuligula*); and the second one from dabbling Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). Cloacal swabs, viral shedding in faeces and humoral immune response were monitored. Significant excretion of viruses was observed in inoculated Tufted ducks 3 days after inoculation. These viruses were immediately transmitted to contact birds, thus become excretory. All birds continued to shed the virus substantially at the same level until 24 days after inoculation, end of the experiment. The hemagglutination inhibition commonly used was able to detect antibodies two weeks after inoculation. The serum antibody response does not affect excretion. Viral shedding in diving and

dabbling ducks – which were also respectively wild and domestic birds - showed no difference. The birds have excreted a large amount of viruses for the duration of experiment.

## 1. Introduction

Avian influenza viruses (AIVs) infect a wide variety of bird species in nature. AIVs have been isolated from at least 105 wild bird species [1], with only occasional disease [2-4]. AIVs are most commonly detected in those bird species that inhabit wetland and aquatic environments, namely Anseriformes (ducks, geese and swans) and Charadriiformes (shorebirds, gulls, terns and auks), which are considered as natural host species and reservoir for AIV [1, 5, 6]. All of the viral subtypes (hemagglutinin H1-16; neuraminidase N1-9) and at least 84 serotypes (HA-NA combinations) were found in these species [7-9]. Among waterbirds, the Mallard (*Anas platyrhynchos*) has a key place because virtually all the subtypes were isolated from it [10]. A study conducted in Italy isolated 22 AIV subtypes, the subtype H1N1 being the most frequent [11, 12]. Fifty per cent of ducks carried antibodies against AIV, which means they had been in contact with the viruses at some time during the previous months or years. In most cases, AIV carried by waterbirds are low pathogenic (LPAIV), but are actively evolving, and becoming highly pathogenic (HPAI) if introduced into poultry [13] [14] [15-17], and pandemic if these viruses reassort with human viruses in pigs generating zoonotic strains [18]. Antigenic drift is a result of genetic point mutations accumulated by the viral genome over an extended period of time. This drift produces small antigenic changes in the viruses while antigenic drift causes pandemics. Antigenic shift occur by reassortment of segments between two influenza strains resulting in an extensive change in genetic information [19].

The AIVs' surveillance put in place since 2006 show that diving ducks are important hosts of influenza viruses. The samples of birds sent by the EU reference laboratories between February and May 2006 showed a prevalence of 19.8% of H5N1 viruses in Tufted ducks, although a small number of samples were treated compared to other species [20]. The prevalence of AIVs in these species

has been estimated at 22.6% in Italy between 1993 and 1996 [11], 10.6% in Canada in 2005 [21], to 4.1% in Norway from 2006 to 2007 [22] and from 3.2 to 5.4% in Sweden and the Netherlands from 1998 to 2006 [9]. It is likely that the relatively high prevalence of AIV, about 9.5% in ducks [1, 7], is related to efficient transmission through contaminated water [4, 23]. Sharing a common water resource may therefore facilitate the ingestion of viral particles by tipping into the water to graze, on aquatic vegetation or on small aquatic preys, and the dissemination of AIVs among diverse bird species. Dabbling ducks are more frequently infected than other ducks, respectively 10.1 % and 1.6% in dabbling and diving ducks, and 7.7% for Anseriformes [1]. This distinction is probably related to bird behavior rather than population sizes.

The feeding behavior of waterbirds is likely an important risk factor. AIVs excreted in waters (and sediments) may efficiently be transmitted to other ducks that feed on the same waters (or sediments). It has also been reported recently that influenza viruses have been detected in lake ice and water in Siberia [24]. Waterbirds are therefore more or less in contact with -surface or deep- waters (and sediments) which is considered as a significant way of oral-fecal transmission of AIV in addition to bird-to-bird's. When the dabbling ducks feed by filtration of surface waters, diving ducks will look for seeds, mussels and other crustaceans into deep waters or sediments [25]. Abiotic sources such as -surface or deep- waters (and sediments) could be acting as reservoirs of active viruses that can infect further dabbling or diving birds [26, 27]. Viral particles in waters are able to be infective for months to years depending on its temperature, pH, and salinity [23, 28-31], suggesting that contaminated aquatic environments could prolong viral stability and serve as a source of infection. Therefore, as has been suggested for lake water [4], viruses could also be persisting in sediments and be a source of infection for new birds in subsequent years. This resistance characteristic leads wintering and breeding birds to be infected over years. The role of abiotic reservoirs in perpetuation and transmission of influenza viruses is unclear but viruses have previously been isolated from and detected in water samples [4].

The behavior of the virus outside the host could therefore play a major role in interspecies infection and viral ecology and evolution [32]. Unfortunately, the role of the physical and biogeochemical environment as an integral part of this transmission is poorly understood. In order to better understand the transmission of LPAIV in waterfowl, we study the evolution of a LPAIV infection in wild diving ducks (Tufted ducks, *Aythya fuligula*) and its transmission to diving ducks of the same species, and to dabbling ducks (Pekin duck, *Anas platyrhynchos domesticus*) from environment. A group of tufted ducks was inoculated with a LPAIV of subtype H5N2, and two control groups of birds were reared in the same aviary. Clinical, viral excretion and immune reaction were monitored for all animals as it was done in a previous study where only pekin ducks were inoculated [33].

## **2. Materials and methods**

The experiment was carried out to obtain information about excretion and immune response of inoculated surface and diving ducks by a LP AIV. Experiments were conducted according to local ethical guidelines, and were approved by the Animal Ethics Committee of the Claude Bourgelat Institute, Veterinary School of Lyon, France.

### ***2.1 Animals***

Three-week old captive-bred Tufted ducks and four-week old Pekin ducks were used in the experiment. Tufted ducks were acquired from a private breeder (Les Canards de Mormal, Jolimetz, France) whereas Pekin ducks were reared at the veterinary campus of Lyon (Vetagro-sup, Lyon, France). We selected this species of duck on the basis of historical monitoring studies that demonstrate its abundance [34], and a high prevalence among birds in wetlands of Europe and North America [1]. According to a previous study, birds at this age are most productive in virus shedding [35]. Ducks were distributed randomly into 3 groups. A first group of five Tufted ducks were inoculated with a LPAIV, and a second group was formed by 5 Tufted ducks and 5 Pekin ducks and placed in

direct contact with them. A third group was formed by two Tufted ducks and one Pekin duck as a negative control group.

## ***2.2 Facilities***

Access to birds was managed through a security double door. Inoculated and contact duck groups were placed in a laboratory room, and were separated from negative control group placed in another room. All of them were reared under the same conditions: feed and water were available *ad libitum*; temperature was fixed at 25 °C and humidity at 70%. A 470 liters pool was at the disposal of Tufted ducks in each room. Moreover, five individuals and identified metabolic cages were available in the laboratory room where inoculated and contact birds were kept (cf. Experimental design).

## ***2.3 Virus and inoculation method***

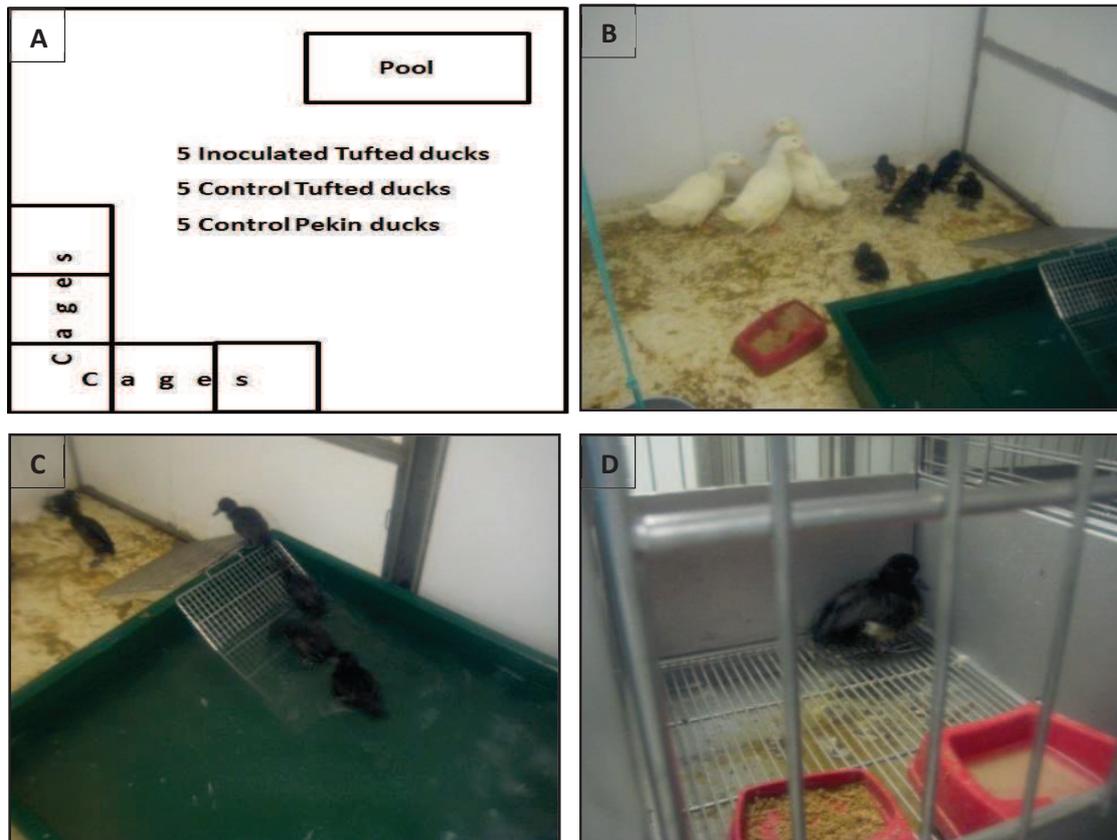
An A/Finch/England/2051/1991 strain of an avian influenza virus of subtype H5N2 was obtained from the Virology and Human Pathology laboratory, Claude Bernard University, Lyon, France. It was passed on MDCK cells to obtain a concentration of  $6,1 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$  in EMEM medium.

## ***2.4 Experimental design***

Prior to challenge, all birds were serologically tested using hemagglutination inhibition test (HI) [36], and faeces and cloacal swabs were sampled. All birds used for this study were negatives for antibodies and virus detection of type A influenza viruses. Five Tufted ducks were placed in the same room with five contact Tufted ducks and five contact Pekin ducks. The former were inoculated with 1ml of EMEM fluid containing at least  $5 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$  (0.4ml intra nasally, 0.4ml intra tracheal and 0.2ml upper retina to each of inoculated birds). The contact birds were not inoculated with the virus.

Cloacal swabs were sampled at days 3, 5, 10, and 24 days post inoculation (dpi) in inoculated and contact ducks. Virocult<sup>®</sup> swabs were used and kept at 4°C in a conservative medium to be put in culture in the 48h, and then stored at -80°C. They were analyzed by real time reverse transcriptase polymerase chain reaction

targeting M influenza segment. Besides, droppings excreted during the last 24 hours were collected in inoculated Tufted ducks, which were isolated at days 2, 4, 9, 23 dpi in metabolic cages. Faeces were weighed and sampled the day after. The following days, inoculated ducks were in contact with contacts birds, and not isolated. At the same dates of faeces collection (3, 5, 10 and 24 dpi), 1 ml of blood sample was taken to titer antibodies against H5N2. Sera were stored at 4 °C, and antibodies titer was measured by HI. Pool water was changed every 3 days and 10ml sample were collected at days 3, 6, 9 and 24 days PI after mixing the water. These samples were stored at -80 C° until real time RT-PCR analysis. The temperature of the air and the water was also measured each sampling day.



**Figure 1:** Experimental aviary (A: Infected room plan; B: Pekin ducks and Tufted ducks in infected room; C: Pool available for Tufted ducks; D: Metabolic cages where inoculated Tufted ducks were isolated to collect faeces)

### **2.5 Real time RT-PCR**

Viral RNA was extracted from 140 µL of cloacal swab devices, water samples or liquid from faeces obtained by centrifugation after adding 0.2 ml of PBS (Phosphate Buffer Saline) with the QIAmp virus RNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The RT-PCRs were performed as described previously [37]. Briefly, RT-PCRs were performed on pure or tenfold diluted samples in a Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf, LePecq, France) apparatus, using SuperScript™III Platinum®One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RT-PCRs were optimized for the M gene sensitive detection with 0.8 µM each primer, 0.2 µM probe and 0.5 µL enzyme mix. After a reverse transcription reaction at 50°C for 15 min and a denaturation step at 95°C for 2 min, a two-step amplification of 50 cycles was performed at 95°C for 15 s and 60°C for 40 s. A calibration range of diluted transcript (kindly provided by Vincent Enouf and Sylvie Van Der Werf) ranging from 10<sup>5</sup> to 10 copies/5 µL was used for the quantitative real-time RT-PCR targeting the M gene.

### **2.6 Hemagglutination inhibition**

Sera were treated with RDE to improve the HI test as described elsewhere [38]. A HI test was performed according to the SOP VI 002 MOP IHA 02\_ January 2nd 2007 version. The test consists in putting into contact equal volume twice dilution of tested blood serum with the virus to finally obtain 4 hemagglutination units into 50µl. After one hour at room temperature, the mix is put in contact with chicken red cells. Positive results were validated at a dilution of 1/16 at least (Titer = 24 or 4 log<sub>2</sub>) towards 4 HAU of antigen [39].

## **3. Results**

### **3.1 Infection**

During the experiment, daily monitored inoculated and control birds showed no specific clinical signs of avian influenza disease except a fleeting diarrhea observed in two inoculated ducks at 3 and 5 dpi. The temperature was daily

measured and was always standard to birds' norms. Besides, antibodies titer was investigated in sera of all ducks on days 14 and 24 pi. Immune response detected on day 14 dpi increased significantly on day 24 dpi in all birds that confirm their viral infection (Table I). No particular statistical significance between birds groups was worked out.

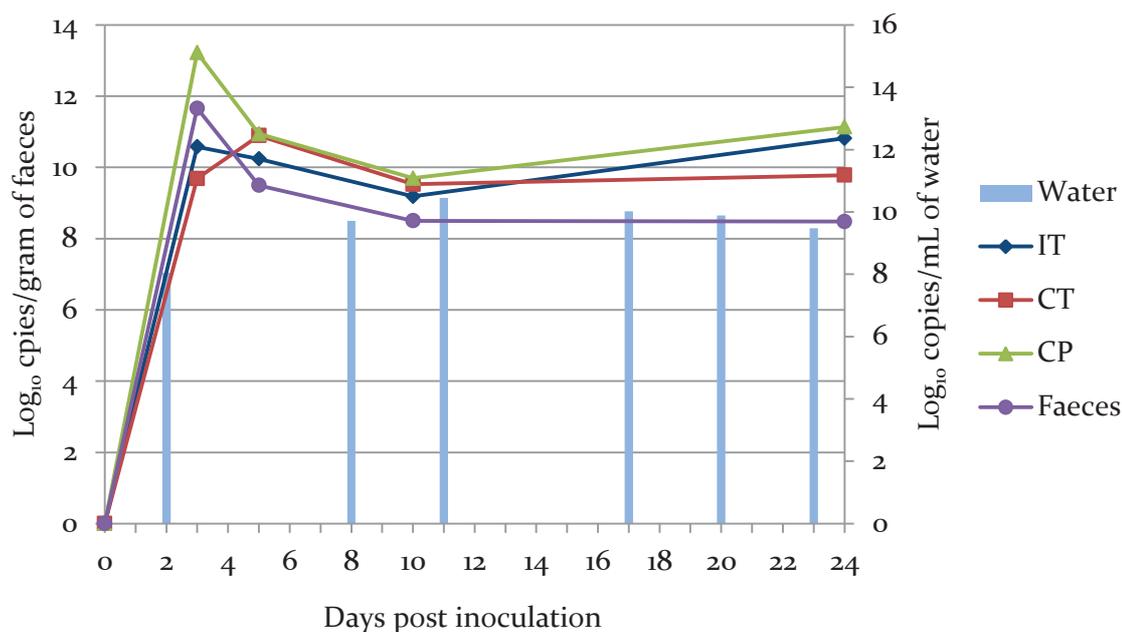
**Table I:** Haemagglutination inhibition (HI) test in sera of a group (n=5) of Tufted ducks after infection with a LPAIV H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>

	Days after LPAIV H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> virus inoculation		
	BI*	14	24
Inoculated Tufted ducks (IT)	0/5	4/5	5/5
Contact Tufted ducks (CT)	0/5	2/5	5/5
Contact Pekin ducks (CP)	0/5	3/5	5/5

\*BI: before inoculation.

### 3.2 Viral shedding

The virus inoculated by intra-tracheal, intranasal and topical ocular routes to each of five Tufted ducks was detected in all inoculated ducks, starting from day 3 dpi (figure 2). It's noteworthy as well that all birds continued to shed the virus at a high rate until the end of the experiment whatever they were inoculated or contact animals. The 3rd dpi showed the highest variation between animals inside each group. Viral titers, expressed in copies of virus/grams of faeces (grf), reached a mean titer of 10.95 log<sub>10</sub> copies/grf ( $\sigma = 1.80$ ) in inoculated Tufted ducks (n=5). The viruses was still detectable 24 dpi at a mean titer of 11.18 log<sub>10</sub> copies/grf ( $\sigma = 0.66$ ). Viral shedding was also measured in the faeces of these birds while they were isolated in metabolic cages. As it was observed in cloacal swabs, a peak was reached the 3rd dpi in 3 out of 5 ducks. The two other birds showed a peak 5 dpi. The mean titer in faeces at 3 dpi was 12.03 log<sub>10</sub> copies/grf ( $\sigma = 2.9$ ). The excretion decreased since then, nevertheless it still detectable at higher rates until the day 24 pi (8.48 log<sub>10</sub> copies/grf,  $\sigma = 0.45$ ).



**Figure 2 :** Mean shedding of AIV RNA in cloacal swabs, feces and water by inoculated and contact ducks measured by real time RT-PCR detection method on M segment. Infection was performed as described in materials and methods. (IT = Inoculated Tufted ducks, CT = Contact Tufted ducks, CP = Contact Pekin ducks)

Virus particles were also measured in water from pool. Bars in figure 2 represent the accumulation of influenza viruses for 3 days. The titer of 10.82 copies/ml reported at 11 dpi (accumulation of 9, 10 and 11 dpi) was the highest. Viruses were still being detected on day 23 pi, the last water sampling day.

### 3.3 Transmission

A rapid transmission of AIV to sensitive birds was observed little time after inoculation of a group of 5 Tufted ducks. They were 5 Tufted ducks and 5 Pekin ducks which were reared under the same conditions and exposed to the same risk of infection. Observing the kinetic of viral shedding revealed that 4 out of 5 inoculated Tufted ducks, as it was in the group of control Pekin ducks, reached a peak of excretion on day 3 pi. Whereas this peak was delayed by 2 days and observed at 5 dpi in 3 out of 5 control Tufted ducks. (Figure 2)

Control Tufted ducks and Pekin ducks began shedding the virus since the 3rd dpi respectively at a rate of 10.6 log<sub>10</sub> copies/grf ( $\sigma = 2.07$ ) and 13.59 log<sub>10</sub> ( $\sigma =$

2.89) until the end of the experiment where excretion was up to 10.15 log<sub>10</sub> copies/grf ( $\sigma = 0.95$ ) and 11.5 log<sub>10</sub> copies/grf ( $\sigma = 0.15$ ). Pekin ducks seemed to excreted at an eigher rate than Tufted ducks even 24 dpi. A Mann-Whitney statistic test was used to compare the excretion between birds groups. The results obtained showed no statistically significant difference between animals except on day 5 pi where control Tufted ducks excreted significantly more viruses than inoculated Tufted ducks ( $p < 0,05$ ). The shedding kinetic in faeces was substantially similar to cloacal swabs'. It was characterized by a slight peak at the 3rd day pi and continues at a high level until the end of the experiment on day 24 pi. Significant variation between individuals was observed in each group of ducks particularly on day 3 pi in Pekin ducks. Although no significant statistical difference was worked out between groups of birds (except between inoculated and control Tufted ducks on 5 dpi aforementioned).

#### **4. Discussion**

The recent introductions of HPAI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virus in wild birds and the subsequent spread of the virus throughout Asia, the Middle East, Africa and Europe has put a focus on the role of wild birds in the geographical spread of LPAI viruses [40]. Because HPAI outbreaks in poultry find their origin in LPAI viruses present in waterfowl, the epidemiology of AI is inseparable from the ecology of their respective hosts. The transmission of influenza A viruses is closely related to behavior of the potential host species, such as diet and foraging behavior; habitat use; migratory patterns and behavior; population size; group size and frequency of aggregation. To increase our understanding of the epidemiology of influenza A viruses in relation to the ecology of their host species, which remains limited, we have studied the experimental transmission of a low pathogenic H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> avian influenza virus in diving ducks.

##### ***4.1 Role of diving versus drabbling ducks in viral transmission***

Viral shedding by inoculated Tufted ducks and transmission to contact ducks (Pekin and Tufted ducks) started immediately after inoculation and lasted beyond the duration of the experiment, 24 days after inoculation. The viral titers

in faeces and in pond's water have reached high and sustainable levels describe in the literature: 8.7 log<sub>10</sub> egg infectious dose per gram of faeces [23]. These results confirm the fecal transmission of LPAI virus [41] [42], versus oropharyngeal transmission of HPAI virus [43, 44]. However, the measures of the viral title of faeces are probably underestimated for two reasons. Firstly, part of viral particles agglutinate in the organic elements of faeces, and make difficult the extraction of the virus by the diagnostic kits used routinely. Secondly, part of the viral particles is released in the water thanks to a dilution of faeces, which reduces the viral title in faeces and increase, in return, the viral titer in the pond's water. The ducks' habitat, which is supplied with viral particles by excrements of animals, insures at once transmission and storage of LPAI viruses, if any, over long periods during cold seasons [45].

No clinical or pathological signs were observed after the inoculation: neither from the 5 Tufted ducks inoculated with LPAI H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> virus; nor from the 5 Tufted ducks in direct contact with them. The activity of diving ducks has not been modified during the experiment, and the immune response conferred by the antibodies in diving ducks has been very low. Neither clinical response, nor immune response, affected viral shedding, which remained almost constant until the end of the experiment. The overall response of diving ducks to infection was the same that the response of the 5 drabbling Pekin ducks. These results are consistent with those acquired in other experiments [46]. It seems that the diving ducks are less sensitive than other species to AI viral infection [47], although one author reported that *Aythya* ducks, could present clinical signs and die from infection [48]. These findings strengthen the idea of the ability of diving ducks to hold the virus for long periods, shedding it continually at higher rates without showing clinical signs, due to efficient oral-fecal transmission route [4, 23]. In all sampled materials we observed a permanent excretion of AI virus until the trial was stopped. This allows them to infect other wild birds sharing the same environment, in breeding or wintering areas, or domestic birds they may meet.

#### ***4.2 Role of LP versus HP viruses in AI epidemiology***

Based on our current knowledge of reservoir role of wild birds in AI epidemiology, three main factors are important for viral persistence in waterfowl populations: 1) the highly concentrated and prolonged viral shedding by birds; 2) the ability of birds to remain infective for long durations in aquatic habitats; and 3) the resistance of the virus that can remain infectious for prolonged periods in water. LPAI H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> virus as other “wild-type AI virus”, that have evolved over time into perfect host-parasite relationship, fulfill all of these prerequisites for maintenance in a wild bird population [23]. As most LPAI virus, H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> replicates preferentially in the epithelial cells of the gastrointestinal tract of ducks producing an asymptomatic enteric infection, and are excreted at high levels from the cloaca into water [4, 23]. LPAI viruses are particularly abundant in the final part of the digestive tract, which explains why they are found mainly in the faeces [4]. The main transmission route in waterfowl is oro-fecal [23, 26], but indirect contamination by ingestion of contaminated water may also play a role in yearly infection dynamics. Previous studies showed experimentally infected ducks shed high concentrations of virus for a prolonged duration via the fecal route [23]. Faeces spread in the water and viruses can be transmitted to other waterbirds (Webster et al. 1992). LPAI virus can remain infectious for prolonged periods in surface water, depending on temperature, salinity, and pH [45]: from few days in water at 35° C to a month at 4°C [30, 43]. These environmental factors explain the high prevalence of LPAI viral infections occurring annually during the fall when juvenile ducks congregate at marshalling sites before fall migration [49].

H5N1 virus, meanwhile, do not appear to be as well-adapted to naturally circulating in wild bird population. In 2004, experimental inoculation of HPAI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virus show that ducks of the genus *Anas*, domestic Mallards, could be healthy carriers of the virus, playing a central role in the production and the preservation of HPAI H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> virus, but that the digestive tract of the ducks was not the main site of replication for this subtype. Viruses replicated rapidly in the trachea, suggesting an oral transmission path [44]. Duck species experimentally

infected with HPAI H5N1 virus excreted low viral titers for short durations, and shedding was primarily associated with oropharyngeal, rather than a cloacal, route (Brown et al., 2006). In addition, HPAI H5N1 viruses remain, experimentally, infective in water for a shorter duration than LPAI virus, suggesting the HPAI H5N1 virus may not be as environmentally fit as the LPAI virus (Brown et al., 2007). Potential losses in environmental fitness in aquatic habitats and the decreased viral shedding associated with HPAI H5N1 viral infections in most species of ducks may greatly reduce the viral burden in the aquatic environment. This implies that transmission must be very efficient in at least some aquatic bird species for HPAI H5N1 virus to be transmitted and potentially to persist in waterfowl populations. This increased transmission efficiency may be provided by the ability of these HPAI H5N1 virus to infect a susceptible bird at a very low dose. Currently, there is no available information on infective dose for any HPAI H5N1 virus in any wild duck species.

## **5. Conclusion**

Although LPAI viruses have been isolated from at least 105 different host species of 26 different families, the respective contribution of most of these species to the ecology of avian influenza viruses is unclear [50]. Large differences of LPAI virus prevalence exist between different wild bird species. Whereas these differences could be accounted for on the level of host ecology, another accompanying explanation could be intrinsic differences between these wild bird species in their ability to function as host for influenza A viruses. Many authors have identified a predominant role for dabbling ducks, i.e., ducks which feed mainly on vegetable matter by upending on the water surface, in the perpetuation of most IA viruses [4, 9, 10]. Our study shows that diving ducks could also play an important role in the epidemiology of AI. These ducks are, indeed, able to amplify efficiently, quickly and sustainably LP virus after experimental inoculation. They excrete, moreover, extensively and asymptotically LPAI viruses that could survive for long time in the wild birds' habitats, and especially in the ponds.

We suggest incorporating environmental data - such as faeces or water sampling - in influenza virus surveillance networks. Environmental data and jointly GPS-monitoring of wild birds in real time, will allow detailed investigations into virus prevalence in birds, in relation to their social status, migration pattern, condition, habitat choice and aggregation intensity [3, 51]. The satellite telemetry has proven its value revealing non-lethal HPAI H5N2 infection of white-faced whistling ducks (*Dendrocygna viduata*), and large-distance dispersal of viruses by wild migratory ducks, which are able to migrate for at least 655 km in Africa (These results, from environment, improve our understanding of the complex relationship of influenza A viruses with their hosts, and suggest that it will be crucial to integrate more deeply virus and host ecology within the currently performed long-term surveillance studies. In addition, high-throughput sequencing technologies will increase our understanding of the genetic variability and evolution of influenza A viruses in wild birds and allows integration of this information with epidemiology and virus-host ecology. The currently increased interest in avian influenza therefore provides unique opportunities to not only increase our knowledge of LPAI viruses in wild birds and the relationship between host and pathogen.

## References

1. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 2006;312(5772):384-8.
2. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*. 2005;79(5):2814-22.
3. Van Gils JA, Munster VJ, Radersma R, Liefhebber D, Fouchier RA, Klaassen M. Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. *PLoS One*. 2007;2(1):e184.

4. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):152-79.
5. Stallknecht DE, Shane SM. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun.* 1988;12(2-3):125-41.
6. Swayne DE, King DJ. Avian influenza and Newcastle disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2003;222(11):1534-40.
7. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 2000;74(1-2):3-13.
8. Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, Ghedin E, et al. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog.* 2008;4(5):e1000076.
9. Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):e61.
10. Munster VJ, Wallensten A, Baas C, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Olsen B, et al. Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(10):1545-51.
11. De Marco MA, Foni GE, Campitelli L, Raffini E, Di Trani L, Delogu M, et al. Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Dis.* 2003;47(3 Suppl):861-6.
12. De Marco MA, Campitelli L, Foni E, Raffini E, Barigazzi G, Delogu M, et al. Influenza surveillance in birds in Italian wetlands (1992-1998): is there a host restricted circulation of influenza viruses in sympatric ducks and coots? *Vet Microbiol.* 2004;98(3-4):197-208.
13. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine.* 2007;25(30):5637-44.

14. Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG. Is virulence of H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology*. 1984;139(2):303-16.
15. Bean WJ, Kawaoka Y, Wood JM, Pearson JE, Webster RG. Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: potential role of defective interfering RNAs in nature. *J Virol*. 1985;54(1):151-60.
16. Capua I, Marangon S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian Pathol*. 2000;29(4):289-94.
17. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol*. 1996;77 ( Pt 7):1493-504.
18. Webster RG. Influenza: an emerging disease. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(3):436-41.
19. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep*. 2010;125 Suppl 3:16-26.
20. Hesterberg U, Harris K, Stroud D, Guberti V, Busani L, Pittman M, et al. Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. *Influenza Other Respi Viruses*. 2009;3(1):1-14.
21. Parmley EJ, Bastien N, Booth TF, Bowes V, Buck PA, Breault A, et al. Wild bird influenza survey, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(1):84-7.
22. Germundsson A, Madslie KI, Hjortaas MJ, Handeland K, Jonassen CM. Prevalence and subtypes of influenza A viruses in wild waterfowl in Norway 2006-2007. *Acta Vet Scand*. 2010;52(1):28.
23. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KC. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*. 1978;84(2):268-78.

24. Zhang G, Shoham D, Gilichinsky D, Davydov S, Castello JD, Rogers SO. Evidence of influenza A virus RNA in Siberian lake ice. *J Virol.* 2006;80(24):12229-35.
25. Encyclopédie de la vie des bêtes: Stauffacher; 1972.
26. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol.* 1980;26(5):622-9.
27. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. Water-Borne Transmission of Influenza A Viruses? *Intervirology.* 1979;11(1):66-9.
28. Brown JD, Goekjian G, Poulson R, Valeika S, Stallknecht DE. Avian influenza virus in water: infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Vet Microbiol.* 2009;136(1-2):20-6.
29. Brown JD, Swayne DE, Cooper RJ, Burns RE, Stallknecht DE. Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 2007;51(1 Suppl):285-9.
30. Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 1990;34(2):412-8.
31. Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 1990;34(2):406-11.
32. Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. Host species barriers to influenza virus infections. *Science.* 2006;312(5772):394-7.
33. Mamlouk A, Artois M, Ottmann M, Belli P, Lina B, Sabatier P. Shedding and intestinal spread of avian influenza virus H5N2 in dabbling ducks (preliminary study). *Revue de Médecine Vétérinaire.* 2011;162(10):454-9.
34. Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J. Handbook of the birds of the world. Vol. 1 Ostrich to ducks. 1992.

35. Costa TP, Brown JD, Howerth EW, Stallknecht DE. The effect of age on avian influenza viral shedding in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Avian Dis.* 2010;54(1 Suppl):581-5.
36. Burleson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology : A Laboratory Manual*: Academic Press. San Diego, California; 1992.
37. Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, et al. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(4):317-21.
38. Jordan WS, Jr., Oseasohn RO. The use of RDE to improve the sensitivity of the hemagglutination-inhibition test for the serologic diagnosis of influenza. *J Immunol.* 1954;72(3):229-35.
39. OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* 2005.
40. Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature.* 2005;436(7048):191-2.
41. Brojer C, Agren EO, Uhlhorn H, Bernodt K, Morner T, Jansson DS, et al. Pathology of natural highly pathogenic avian influenza H5N1 infection in wild tufted ducks (*Aythya fuligula*). *J Vet Diagn Invest.* 2009;21(5):579-87.
42. Fouchier RA, Munster VJ. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Rev Sci Tech.* 2009;28(1):49-58.
43. Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(11):1663-70.
44. Sturm-Ramirez KM, Hulse-Post DJ, Govorkova EA, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, et al. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *J Virol.* 2005;79(17):11269-79.

45. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol.* 1995;140(7):1163-72.
46. Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect Immun.* 1980;30(2):547-53.
47. Jeong OM, Kim MC, Kim MJ, Kang HM, Kim HR, Kim YJ, et al. Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. *J Vet Sci.* 2009;10(1):53-60.
48. Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, van Lavieren R, et al. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis.* 2008;14(4):600-7.
49. Halvorson DA, Kelleher CJ, Senne DA. Epizootiology of avian influenza: effect of season on incidence in sentinel ducks and domestic turkeys in Minnesota. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49(4):914-9.
50. Munster VJ, Fouchier RA. Avian influenza virus: of virus and bird ecology. *Vaccine.* 2009;27(45):6340-4.
51. Jourdain E, Gauthier-Clerc M, Kayser Y, Lafaye M, Sabatier P. Satellite-tracking migrating juvenile Purple Herons *Ardea purpurea* from the Camargue area, France. *Ardea.* 2008;96(1):121-4.



## Chapitre III

### Les virus influenza aviaires dans l'environnement aquatique des oiseaux d'eau durant la migration d'automne en Dombes, France

*Avian influenza viruses in aquatic habitats of waterfowl during  
fall migration in the Dombes, France*



*Canard pilet (Anas acuta) © Charlie Allen*

*A. Mamlouk, M. Artois, M. Ottmann, B. Lina, L. Lines, P.Sabatier. Avian  
influenza viruses in aquatic habitats of waterfowl during fall migration in the  
Dombes, France. (Article en cours de preparation)*



**Avian influenza viruses in aquatic habitats of waterfowl  
during fall migration in the Dombes, France**

**Les virus influenza aviaires dans l'environnement aquatique  
des oiseaux d'eau durant la migration d'automne  
en Dombes, France**

A. MAMLOUK<sup>1\*</sup>, M. ARTOIS<sup>1</sup>, M. OTTMANN<sup>2</sup>, B. LINA<sup>2</sup>, L. LINES<sup>2</sup>,  
P.SABATIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Equipe EPSP, TIMC IMAG, UMR5525, Vetagro-Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'étoile, FRANCE.

<sup>2</sup> Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, Faculté de Médecine Laennec, Université de Lyon 1, 7-11 rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, FRANCE.

\* Corresponding author: Email: aymenmamlouk@gmail.com

**Résumé**

Un total de 700 prélèvements de fientes et urine d'oiseaux sauvages a été prélevé aux environs de trois étangs de la Dombes pendant les mois d'octobre à décembre 2009, correspondant au début de la période d'hivernage des oiseaux dans la région. Un test rapide de diagnostic de virus influenza A basé sur la détection du gène M a été utilisé en analyse de première intention donnant 22% de fréquence de fientes positives. Une RT-PCR en temps réel sur les prélèvements dépistés infectés a permis de détecter 90 fientes infectées, soit à une fréquence de 12,8% parmi les 700 fientes prélevées. A la même période, trois prélèvements d'eau de surface ont été également réalisés sur les trois étangs étudiés. Le virus influenza a été détecté dans un unique étang au mois d'octobre, et dans les trois étangs au mois de novembre.

## 1. Introduction

Les oiseaux d'eau, en particulier les Ansériformes et les Charadriiformes sont considérés comme le réservoir naturel des virus influenza A, où tous leurs sous-types ont été isolés (1). Ils sont mondialement répartis à l'exception des régions les plus arides. Ils sont connus pour leur capacité de parcourir de longues distances à l'occasion de leur migration. Ils peuvent ainsi, constituer une source d'infection pour les élevages industriels de volailles, aux conséquences sanitaires et économiques considérables (2, 3). Ces oiseaux peuvent héberger des virus faiblement pathogènes, en particulier de sous-types H5 ou H7, qui peuvent acquérir une haute pathogénicité lors d'une transmission aux volailles domestiques (4), se traduisant par une infection septicémique, des symptômes nerveux et une mortalité importante (5). Des changements dans le pouvoir pathogène des virus sont associés à l'acquisition au niveau du site de clivage de l'hémagglutinine de multiples acides aminés basiques (6).

Jusqu'à 2002, les oiseaux sauvages n'étaient pas connus pour être à l'origine de transmission de virus hautement pathogènes. Celle-ci était jusqu'à cette date observée exclusivement dans les élevages domestiques (7). Quelques cas sporadiques ont été décrits mais une seule épizootie à H5N3 HP a été rapportée en 1961 chez la Sterne pierregarin (*Sterna hirundo*) (8). En 2002, le virus H5N1 HP est apparu à Hong Kong chez des oiseaux sauvages élevés en captivité (9), conduisant à des cas cliniques ainsi qu'à de la mortalité. A cette épizootie suivront d'autres où les oiseaux sauvages, en particulier les canards, étaient impliqués, et où l'infection qui a démarré en Asie du sud-est est arrivée en Europe en début de 2006 au gré de leur migration.

La région de Dombes a été, en février 2006, le lieu du premier cas d'infection par un virus hautement pathogène H5N1 en France (10). Cette région constitue une zone humide classée d'importance internationale (11) grâce notamment à un patrimoine ornithologique considérable, riche de quelques 20000 anatidés au plus fort de la saison d'hivernage. De plus cette région est connue pour sa densité d'élevages, particulièrement celui réalisé en plein air, et qui représente un facteur

de risque d'introduction de virus influenza aviaire par les oiseaux sauvages par contact direct ou indirect (12).

A la fin de l'année 2009, cette étude a été conduite dans le but d'évaluer la prévalence des virus influenza A circulant dans la région de la Dombes (46.004 °N ; 5.029 °E) au cours de la migration d'automne, qui constitue le début de la saison d'hivernage. Nous avons utilisé un kit de diagnostic rapide sur le terrain suivi d'une détection par RT-PCR en temps réel, sur des prélèvements de fientes collectées sur le bord des étangs. Cette méthode en effet, pourrait être appliquée lors d'un protocole de surveillance de routine des zones humides.

## **2. Matériels et méthodes**

### ***2.1 Collecte des fientes***

Trois étangs de la région humide de la Dombes ont été choisis pour l'étude. Deux sont situés dans le domaine de la Fondation Vérot, l'étang Praillebard (45,9534 N ; 4,9222 E) et l'étang Boufflers (45,9458 N ; 4,9191 E), et un étang appartient à la Fédération des chasseurs de l'Ain, le Petit Vernange (45,9453N ; 4,9278 E). Ces étangs où la chasse est interdite, constituent une réserve pour les oiseaux sauvages, d'où le nombre important d'oiseaux qui y séjournent.

Au bord de ces 4 étangs, 700 fientes ont été prélevées au cours d'une période de collecte qui s'est étendue du mois d'octobre à décembre 2009. Cette période correspond à la période d'arrivée des oiseaux hivernant en Dombes, qui sont pour la plupart des nicheurs du nord de l'Europe (Scandinavie, Nord-ouest de la Russie), en plus de la présence des oiseaux sédentaires de la région de la Dombes.

Toutes les fientes présentes sur un parcours pédestre qui longe le bord des étangs, ont été collectées dans des tubes Eppendorf de 1,5ml, à condition qu'elles soient fraîches, donc encore humides. C'est pour cette raison aussi que les fientes ont été prélevées préférentiellement le matin. Pour chaque prélèvement la date ainsi que les coordonnées GPS ont été notées dans le but de réaliser des cartes de prévalence par étang.

### **2.2 Détection du virus influenza dans l'eau**

De l'eau de surface a été prélevée au niveau des 3 étangs étudiés afin de détecter le gène M des virus influenza A ainsi que les sous-types H5. Dix litres d'eau ont été prélevés dans chaque étang à 2 mètres du bord, au rythme d'un prélèvement par mois pendant les 3 mois de l'étude. La détection des virus a été faite par adsorption sur filtres, suivie d'une élution en présence de solution protéique et de leur concentration avec du polyéthylène glycol (PEG), puis leur analyse par RT-PCR. Ces analyses ont été réalisées par le laboratoire de l'Unité de Sécurité Microbiologique de l'Institut Pasteur de Lille, et ont fait partie d'une étude publiée (13).

### **2.3 Diagnostic de laboratoire**

Les fientes collectées ont été acheminées au laboratoire et stockées à +4°C pour être analysées dans les 24h. Un premier criblage a été fait par un kit de diagnostic rapide sur terrain basé sur le gène M, FluDetect® Test Strip (Synbiotics, Lyon, France) de sensibilité et de spécificité évaluées respectivement à 92% et 90% par le fabricant, et de détectabilité minimale de 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> EID<sub>50</sub>/ml.

Ce kit permet de révéler les virus influenza A dans différentes excréctions biologiques, dont les fientes. Un écouvillon de chaque tube a été prélevé et utilisé avec ce test selon les indications du fabricant. Les résultats sont révélés sur bandelette, et les fientes positives stockés à -80°C pour être analysées par RT-PCR en temps réel à la fin de la période de prélèvement.

### **2.3 Analyse RT-PCR en temps réel**

L'ARN viral a été extrait de 140µL de prélèvement de fientes, obtenus après centrifugation par un kit d'extraction QIAmp (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les indications du fabricant. Une analyse par RT-PCR a été réalisée selon des méthodes précédemment décrites (14). La réaction a été conduite sur des prélèvements purs ou dilués au dixième (prélèvements ne présentant pas de surnageant liquide supérieur ou égale à 140µL après centrifugation) dans un thermocycleur Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf, LePecq, France) en utilisant

le kit SuperScriptTMIII Platinum®One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cette analyse ciblait le gène M de la matrice virale en utilisant 0,8 µM pour chaque amorce, 0,2 µM de sonde et 0,5 µL du mélange enzymatique. Après une réaction de transcriptase inverse à 50°C pendant 15 minutes et une étape de dénaturation à 95°C pendant deux minutes, une amplification en deux étapes est réalisée à 95°C pendant 15 secondes puis à 60°C pendant 40 secondes. Une gamme d'étalonnage (aimablement fournie par Vincent Enouf et Sylvie van der Werf) variant de 10 à 10<sup>5</sup> copies/5 µL a été utilisée.

#### ***2.4 Dénombrement des oiseaux***

Les dénombrements d'oiseaux sont réalisés par les techniciens de la Fondation Vérot ainsi que ceux de la Fédération des chasseurs. Les dénombrements relevés pendant notre période d'étude nous ont été gracieusement communiqués par leurs services.

### **3. Résultats**

#### ***3.1 Criblage par le kit FluDetect® et RT-PCR en temps réel***

Au total, 700 fientes ont été analysées par le kit FluDetect® dont 154 se sont révélées positives. Ces fientes infectées, testées par RT-PCR en temps réel, donnent 90 fientes positives. Les prévalences sont estimées par le rapport des fientes positives testées par RRT-PCR par le nombre total des fientes collectées sur tous les étangs. Ainsi, la prévalence totale notée était de 12,8%, la plus élevée par étang (6,3%) a été relevée au niveau de l'étang Boufflers. Le tableau I décrit les données d'analyse réparties selon les étangs étudiés.

**Tableau I** : Répartition des fientes collectées au bord des étangs étudiés de la Dombes, et les résultats de leur analyse successive par le kit de diagnostic rapide sur terrain FluDetect® et par RRT-PCR. (Entre parenthèses : fréquences en % par rapport aux 700 fientes)

Etangs	Praillebard	Boufflers	Petit Vernange	Total
Fientes	322 (46)	236 (33,7)	142 (20,3)	700 (100)
FluDetect (+)	78 (11,1)	56 (8)	20 (2,9)	154 (22)
RT-PCR temps réel (+)	32 (4,6)	44 (6,3)	14 (2)	90 (12,9)

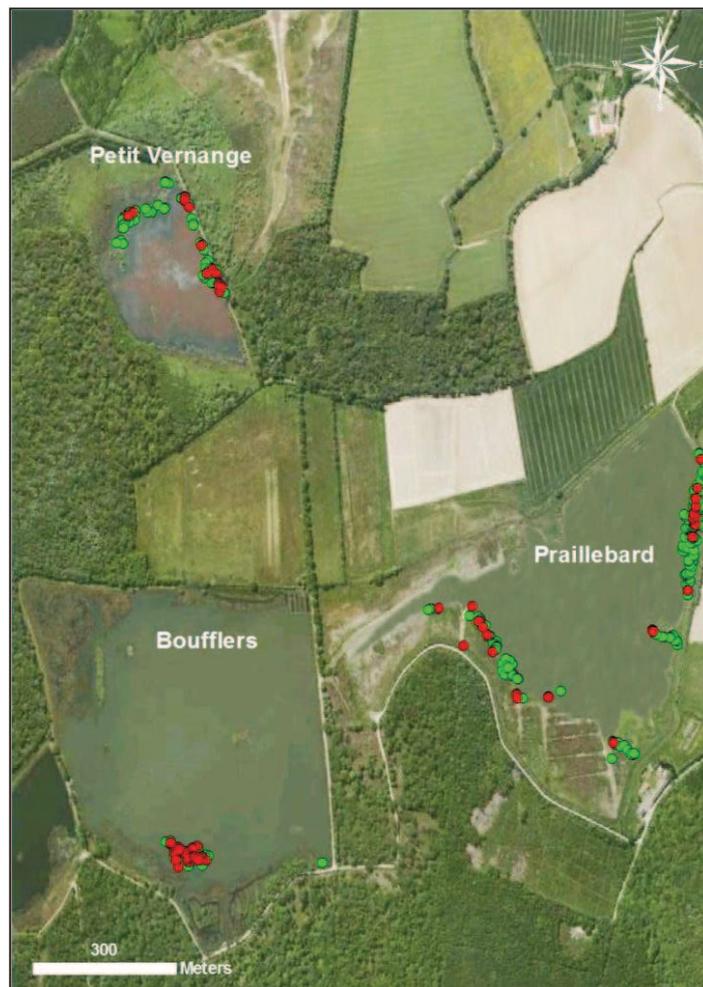
Les prélèvements de fientes se sont étalés entre octobre et décembre 2009, de manière non égale qui dépendait de la possibilité d'accès aux étangs en rapport avec la météo ou bien à des limitations de dérangement des oiseaux fixées par les gestionnaires des étangs. Les prélèvements étaient les plus nombreux pendant le mois de novembre, où 295 fientes sur 700 ont été prélevées dont 46 confirmées positives par RT-PCR. Soit 6,6% des fientes infectées (Tableau II).

**Tableau II** : Répartition des fientes collectées selon le mois d'étude, et les résultats de leur analyse successive par le kit de diagnostic rapide sur terrain FluDetect® et par RRT-PCR. (Entre parenthèses : fréquences en % par rapport aux 700 fientes)

Mois	October	November	December	Total
Fientes	157 (22,4)	295 (42,1)	248 (35,4)	700 (100)
FluDetect (+)	52 (7,4)	58 (8,3)	44 (6,3)	154 (22)
RT-PCR en temps réel (+)	20 (2,9)	46 (6,6)	24 (3,4)	90 (12,9)

Les données GPS ont montré que les 700 fientes prélevées n'ont pas été équitablement réparties selon les étangs (Figure 1). Ceci en raison du nombre variable d'oiseaux d'une part, et des possibilités d'accès d'autre part qui se

complicquent souvent par la météo hivernale et la montée du niveau des eaux. Praillebard a été l'étang le plus prélevé (46% des fientes) (Tableau I).



**Figure 1 :** Coordonnées GPS des fientes positives et négatives au virus influenza A révélées par RT-PCR en temps réel. Photos satellites obtenues par Google Earth (ver. 5.2.1.1588), géo-référencées et carte réalisée par ESRI ArcView 9.2.

L'étang Boufflers duquel 236 fientes ont été prélevées, et qui présentait la prévalence la plus élevée, se caractérise par une zone de prélèvement concentrée au niveau de 5000m<sup>2</sup> seulement de sa surface (Figure 2c). C'est une zone préférée par les oiseaux d'eau, proche du bord de l'étang et éloignée de la route principale. Elle se caractérise par des plantations de tiges de jonc groupées (Figure 2a), dont une grande partie est coupée près de leur base (Figure 2b). Elle sert à ces oiseaux

de lieu de repos et d'alimentation. Ils y ramènent leurs proies, essentiellement des mollusques bivalves.



**Figure 2 :** (a) Zone de prélèvement majeure au niveau de l'étang Boufflers. (b) Groupe de tiges de jonc coupées à leur base. (c) Carte de répartition des prélèvements positifs (rouges) et négatifs (verts) révélés par RRT-PCR au niveau de cette zone (Barre=20m).

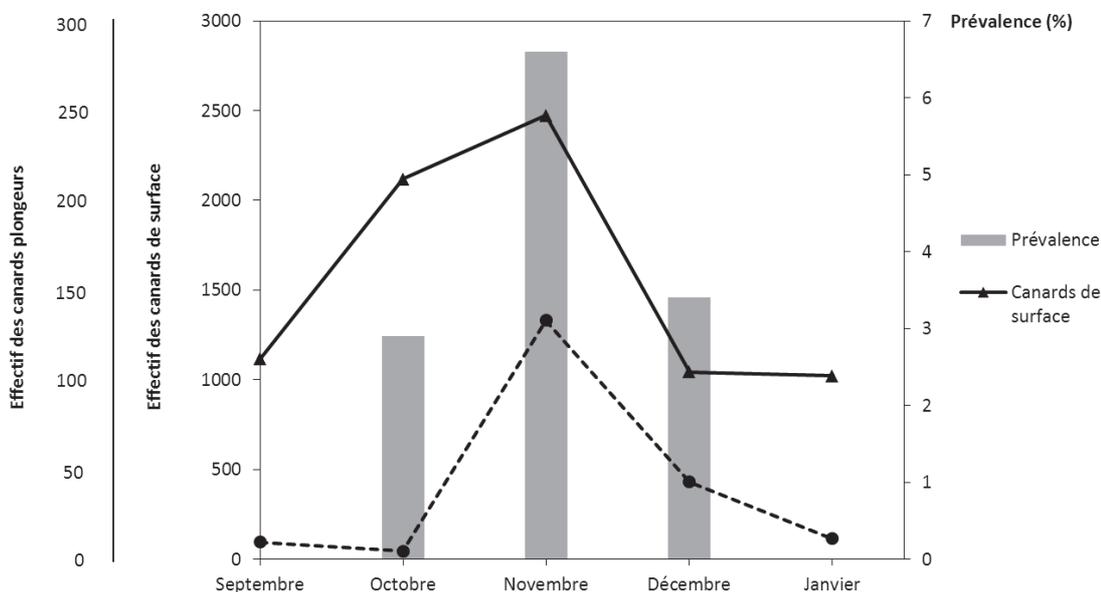
Le titre des fientes analysées par RRT-PCR a été comparé selon les étangs où elles ont été collectées. Ce titre a été exprimé en copies de particules virales par gramme de fientes (c/grf). Il a varié de  $3,7 \cdot 10^5$  à  $2,2 \cdot 10^{11}$  en tenant compte de tous les étangs, avec une moyenne totale de  $1,6 \cdot 10^{10}$  c/grf. La moyenne des titres viraux par étang a été sensiblement équivalente, atteignant  $1,7 \cdot 10^{10}$  c/grf au niveau de l'étang Boufflers,  $5,9 \cdot 10^9$  c/grf au Petit Vernange et  $1,8 \cdot 10^{10}$  c/grf à Praillebard.

### 3.2 Dénombrement des oiseaux

L'hiver 2009/2010 s'est avéré peu propice à l'hivernage des canards sur les étangs dombistes. La région de la Dombes subit en moyenne 60 à 80 jours de gel par an. Les incidences d'un tel régime thermique sont nettement ressenties par l'avifaune, en particulier les oiseaux plongeurs (foulques, fuligules, ...) qui désertent la région. En effet, pendant l'hiver 2009/2010, 54 jours de gel étalés sur plusieurs périodes de gel complet (hormis trou d'eau entretenu par les oiseaux d'eau) ont caractérisé la saison, comme en témoigne l'alerte vague de froid déclenchée par la Préfecture de l'Ain (avec arrêt de la chasse aux oiseaux d'eau). Par ailleurs, après les hivers 2005/2006 et 2006/2007, cette saison d'hivernage correspond à la surface en eau la plus réduite, depuis l'année 2000.

En conséquence, les dénombrements des canards de surface enregistrent leur valeur la plus basse depuis l'hiver 2005/2006. Quant aux canards plongeurs, leur

nombre est le plus bas depuis l'hiver 1998/1999. Ces dénombrements obtenus sur les 5 mois encadrant nos 3 mois de prélèvement sont positivement corrélés à la prévalence des virus influenza dans les fientes testées par RRT-PCR (Figure 3).



**Figure 3 :** Variation de la fréquence des fientes infectées par le virus influenza A en fonction du nombre de canards de surface et plongeurs présent pendant la migration d'automne

### 3.3 Détection du virus influenza dans l'eau

Il a été possible de détecter le virus influenza A dans les étangs analysés. Le titre viral mesuré par RT-PCR ciblant le gène M variait de  $2,1 \cdot 10^3$  à  $9,8 \cdot 10^3$  copies/L dans 4 prélèvements sur 9, correspondant à 10L d'eau prélevées dans un étang (Petit Vernange) en octobre et dans les 3 étangs étudiés en novembre.

## 4. Discussion

L'objectif de cette étude était d'estimer une « prévalence dans l'environnement » de virus influenza A pendant le début de la saison hivernale au moyen de l'analyse des fientes fraîches collectés sur le bord des étangs où ces oiseaux trouvent refuge. En effet, la surveillance active reste indispensable afin de détecter précocement l'évolution de virus influenza aviaire faiblement pathogènes (15) pouvant menacer la santé des volailles voire de l'homme.

Mis à part la relative facilité avec laquelle les prélèvements des fientes sont collectés, il est à noter que cette méthode crée une faible perturbation de l'environnement des oiseaux, par rapport à la méthode de capture pour réaliser des écouvillonnage cloacaux ou trachéaux. Certaines espèces en effet, requièrent une attention particulière compte tenu de leur statut d'espèce protégée. Il serait intéressant qu'une méthode de prélèvement permette de limiter à la fois les risques de blessure directe pendant leur manipulation et les conséquences indirectes du dérangement.

Toutefois, certains virus influenza à tropisme respiratoire, risquent de ne pas être détectés dans ce genre de prélèvements. Mais le principal inconvénient de cette méthode reste la perte d'information concernant les espèces excrétrices. En effet, nous avons pu distinguer les fientes d'origine aviaire sans pouvoir affecter une espèce précise à chaque fiente collectée. La méthode de choix serait de réaliser ce travail en partenariat avec une équipe d'ornithologistes dont le travail consisterait soit à la reconnaissance spécifique des fientes, soit à observer les oiseaux, à les identifier avant de se déplacer pour collecter leurs fientes. Cette méthode a été testée dans une précédente étude de surveillance (16), mais des manques de précision de l'information du même ordre y ont été notés par les auteurs.

Pour limiter l'influence de ce manque de précision dans l'analyse du risque présenté par la circulation des virus influenza aviaires, nous avons étudié en parallèle la prévalence de ces virus dans les fientes, et les résultats de dénombrement des canards de surface et plongeur réalisé par les ornithologues. La comparaison suggère une corrélation positive entre le nombre de canards présent sur les étangs et la fréquence des fientes infectées, ce qui était attendu sachant le rôle de ces espèces dans l'épidémiologie des virus influenza aviaire et leur transmission.

Nos résultats montrent une augmentation du nombre de chaque groupe de canards et l'évolution de la prévalence d'octobre à novembre puis décembre.

En effet, on note une augmentation de 127% de la fréquence des fientes infectées faisant suite à une arrivée massive de canards plongeurs au mois de novembre, cette fréquence chute ensuite de moitié à leur départ associé à une vague de froid (Tableau III).

**Tableau III** : Dénombrement des canards de surface et plongeurs, la prévalence des fientes ainsi que la fréquence des étangs infectés pendant la migration d'automne par rapport au mois d'octobre (100%) (Données de la fondation Vérots et la Fédération des chasseurs)

	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Canards de surface	1115(-45%)	2017(100%)	2472(+17%)	1044(-51%)
Canards plongeurs	95(+52%)	45(100%)	1330(+2855%)	430(+9%)
Prevalence	ND	2,9% (100%)	6,6%(+127%)	3,4%(+17%)
Eau des étangs	0/3	1/3	3/3	ND

\*ND : Donnée non disponible

L'eau de surface analysée a été infectée à une concentration suffisante pour permettre sa détection par les moyens que nous avons employés : Toutefois à l'arrivée des oiseaux lors de la migration d'automne (Novembre), tous les étangs étudiés étaient déjà infectés. Enfin, nous avons observé que la surface d'environ 5000m<sup>2</sup> de l'étang Boufflers concentre un très grand nombre d'oiseaux sauvages qui y trouvent un refuge contre le dérangement. La forte densité d'oiseaux qui en résulte aurait pu permettre de détecter une plus forte fréquence de fientes infectées au niveau de cet étang (observation de 6,3% de fientes infectées). Cependant le taux d'excrétion de particules virales par gramme de fientes au niveau des trois étangs étudiés reste sensiblement équivalent, indépendamment de la densité des oiseaux présents.

## 5. Conclusion

Notre étude a permis de tester une trousse de diagnostic de terrain pour faire une analyse de première intention des fientes collectées au bord d'étangs de la Dombes. Etant donné que la sensibilité de cette trousse semble faible (moins de 13% de réponse positive au test en RT-PCR parmi les échantillons ayant répondu positivement au test de criblage), nos résultats de prévalence sont sous-estimés par rapport à la prévalence réelle. Cela donne en revanche une indication de la circulation des virus influenza qui pourrait être complétée par la détermination des sous-types circulant et leur évolution selon les saisons. Cette méthode pourrait être utilisée lors d'étude de surveillance active particulièrement au moment des grandes vagues de migration. Son caractère non invasif a rend plus utilisable en pratique que la capture d'oiseaux.

L'eau de surface fait rarement partie des programmes de surveillance des virus influenza aviaires. Compte tenu de son rôle dans la transmission de l'infection aux oiseaux, elle peut être périodiquement analysée dans le cadre de programmes de détection précoce de la contamination environnementale. Il serait alors bénéfique d'étudier la circulation des virus influenza aviaires, afin de préciser les risques de dissémination à chaque saison, simplement à l'aide de prélèvement d'eau et de fientes d'oiseaux, récoltés dans l'environnement des zones humides proches des élevages de volailles ou des centres urbains.

## Références

1. Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 2007 May 11;3(5):e61.
2. Guan Y, Chen H, Li K, Riley S, Leung G, Webster R, et al. A model to control the epidemic of H5N1 influenza at the source. *BMC Infect Dis.* 2007;7:132.
3. Kilpatrick AM, Chmura AA, Gibbons DW, Fleischer RC, Marra PP, Daszak P. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 19;103(51):19368-73.

4. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. 2007 Jul 26;25(30):5637-44.
5. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech*. 2000 Aug;19(2):463-82.
6. Webster RG, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell*. 1987 Aug 28;50(5):665-6.
7. Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT. *Infectious diseases of wild birds*: Wiley-Blackwell; 2007.
8. Becker WB. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa--1961. *J Hyg (Lond)*. 1966 Sep;64(3):309-20.
9. Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim ST, et al. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol*. 2004 Oct;33(5):492-505.
10. Hars J, Ruetten S, Benmergui M, Fouque C, Fournier JY, Legouge A, et al. The epidemiology of the highly pathogenic H5N1 avian influenza in Mute Swan (*Cygnus olor*) and other Anatidae in the Dombes region (France), 2006. *J Wildl Dis*. 2008 Oct;44(4):811-23.
11. Fouque C, Couvillers J. Enquête sur les dénombrements hivernaux des anatidés et de la foulque macroule: 12 hivers en région Rhône-Alpes. Réseau national: Oiseaux d'Eau et Zones Humides ON d I C edl F Sauvage Birieux (01). 2001.
12. Webster RG. Influenza: an emerging disease. *Emerg Infect Dis*. 1998 Jul-Sep;4(3):436-41.
13. Deboosere N, Horm SV, Pinon A, Gachet J, Coldefy C, Buchy P, et al. Development and Validation of a Concentration Method for the Detection of Influenza A Viruses from Large Volumes of Surface Water. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Apr 15.

14. Duchamp MB, Casalegno JS, Gillet Y, Frobert E, Bernard E, Escuret V, et al. Pandemic A(H1N1)2009 influenza virus detection by real time RT-PCR: is viral quantification useful? *Clin Microbiol Infect.* 2010 Apr;16(4):317-21.
15. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science.* 2006 Apr 21;312(5772):384-8.
16. Pannwitz G, Wolf C, Harder T. Active surveillance for avian influenza virus infection in wild birds by analysis of avian fecal samples from the environment. *J Wildl Dis.* 2009 Apr;45(2):512-8.
17. Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 1990 Apr-Jun;34(2):412-8.
18. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KC. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology.* 1978;84(2):268-78.

# Partie IV

# DISCUSSION



Cette étude de l'excrétion, de la persistance et de la transmission des virus influenza aviaires (VIA) au sein de populations de canards (surface *versus* plongeurs), nous a permis de mettre en évidence l'importance de la transmission environnementale des VIA FP. Les résultats que nous avons acquis nous permettent de proposer des recommandations pratiques relatives à la surveillance des virus influenza dans les régions à haut risque de propagation aux populations domestiques, particulièrement à partir de l'avifaune des zones humides.

### **1. Rôle de l'excrétion des VIA FP par les canards (de surface *versus* plongeurs)**

Face aux enjeux sanitaires et économiques de l'IA HP au sein des productions avicoles, l'intérêt de la communauté scientifique s'est focalisé dans un premier temps sur l'excrétion des VIA par les volailles domestiques [95], puis sur les oiseaux sauvages et le gibier, ainsi que sur les mammifères domestiques [96]. Des infections expérimentales avec le virus H5N1 HP ont été conduites sur de nombreuses espèces comme les Canards Pékins [97-99] ainsi que chez les gallinacés domestiques [95], les cygnes [58], les oies [100], les passereaux [101], d'autres oiseaux sauvages [56]. Chez les espèces domestiques, il a été rapporté que le virus H5N1 de Hong Kong qui a émergé en 1997 provoquait la mort de 75 à 100% des volailles en 10 jours ; avec des signes cliniques neurologiques (dépression) et digestives (diarrhée mucoïde) et des manifestations histologiques de septicémie (hémorragie, exsudation, nécrose) [95]. Mais des canards adultes infectés par le virus H5N1 de Hong Kong n'ont pas présenté de signes cliniques particuliers [102], alors qu'un virus isolé de canards au Vietnam en 2005 a entraîné une mortalité de 100% trois à sept jours après inoculation [97].

Parmi les oiseaux sauvages les plus étudiés figure le canard colvert, oiseau migrateur mais pouvant aussi être sédentaire dans certaines régions (notamment la Dombes). Il est présent sur les principaux continents et constitue par endroit, l'espèce d'avifaune aquatique la plus abondante [103]. C'est un hôte des virus influenza à partir duquel la plupart des sous-types ont été isolés. D'autres canards

de surface ont fait l'objet d'infections expérimentales, essentiellement par des virus HP comme le canard musqué (*Cairina moschata*) [104], plus rarement par des virus FP. Les oies sont apparues plus sensibles que les canards ou les pigeons, développant des dysfonctionnements neurologiques et des lésions pancréatiques et cardiaques [102]. D'autres espèces sont apparues plus résistantes, les infections expérimentales n'entraînant pas de mortalité avec une morbidité variable, mais uniquement une variation inter et intra spécifique [56, 57].

Dans un contexte marqué par une certaine rareté des travaux relatifs aux VIA FP, notre étude a porté : dans un premier temps sur l'excrétion des VIA FP, notamment par les fientes, ainsi que sur la localisation tissulaire des virus excrétés chez les canards domestiques (Canards Pékin); puis sur l'excrétion de ces virus chez des canards plongeurs, ainsi qu'à leur transmission aux canards domestiques. Nous avons estimé la concentration des virus influenza excrétés par les fientes dans l'environnement, et l'évolution de leur réplication dans l'organisme de ces oiseaux.

### ***1.1 Excrétion des VIA FP par les canards de surface***

En moyenne l'excrétion des VIA a atteint  $2 \times 10^6$  copies/grf à son pic chez des Canards Pékin, trois jours après inoculation. La cinétique d'excrétion a baissé après la réponse immunitaire humorale que nous avons observée au 10<sup>ème</sup> jour ; cette réponse immunitaire a été détectable chez tous les canards infectés à partir de deux semaines post infection (PI). Parallèlement, l'analyse immunohistochimique des différents tissus prélevés, a révélé que le pic d'excrétion était précédé par un marquage histologique intense au niveau du premier tiers de l'intestin, dès le premier jour PI. Ce marquage s'est déplacé dans l'épithélium intestinal au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour pour se localiser au niveau de la jonction cœco-colique, pour laquelle les VIA semblent avoir un tropisme particulièrement élevé [105] (Cf. Chapitre I). La transmission rapide des virus influenza après infection serait en relation avec une multiplication intense dans le tractus intestinal suivie d'une libération des particules virales dans les fientes

puis vers l'environnement, entretenant ainsi le cycle de transmission oro-fécale de ces virus [96] [79].

A la différence des VIA HP, les virus FP n'ont pas été retrouvés dans les organes respiratoires, ce qui confirme la prédilection de la voie oro-fécale pour la transmission de ces virus au dépens de la voie aérienne. Ceci est cohérent avec le fait que la trypsine ainsi que les enzymes du même type, responsables du clivage de l'hémagglutinine des VIA FP, aient une distribution tissulaire limitée aux cellules épithéliales de l'intestin et des organes respiratoires. La répartition de ces virus dans l'organisme de leur hôte serait influencée par cette distribution [106]. Par opposition, les VIA HP ont une HA qui est, non seulement clivée par ces enzymes trypsine-like, mais aussi par les enzymes de la famille des furines, présentes de manière ubiquitaire dans différents tissus. Ce clivage par différentes classes d'enzymes est également responsable de la variation des sites de réplication des virus et la nature des lésions qu'ils provoquent.

### ***1.2 Excrétion des VIA FP par les canards plongeurs***

L'épidémiologie des virus influenza chez les canards plongeurs, qui comprennent des espèces migratrices ou sédentaires, a été moins décrite que celle des canards de surface. Dans leur milieu naturel, les canards plongeurs partagent un même écosystème avec d'autres canards sauvages et domestiques. Ce milieu est caractérisé par la présence d'étendues d'eau plus ou moins importantes. Le comportement de ces oiseaux ainsi que leurs habitudes alimentaires en font des acteurs importants de l'écologie des virus influenza. Les canards plongeurs plongent au fond des étendues d'eau pour trouver leur nourriture [103, 107]. Leur contact avec l'eau, en termes de durée et de surface relative immergée du corps, ainsi que leur régime alimentaire à base de mollusques les exposent plus au risque que les canards de surface. Cependant, Faust *et al.* ont montré que les palourdes (*Corbicula fluminea*) sont capables de concentrer les particules du virus influenza présentes dans l'eau, et de les séquestrer ou les inactiver les rendant non infectantes et même non détectables par RT-PCR en temps réel [108]. Nous avons sélectionné le canard Fuligule

morillon (*Aythya fuligula*) sur la base de son abondance [70], ainsi que sur celle de l'historique des études de surveillance qui témoignent d'une prévalence élevée chez ces oiseaux dans plusieurs régions humides en Europe et en Amérique du nord [8].

Cette étude, à la différence de l'essai sur les canards de surface, a permis de noter une persistance de l'excrétion de VIA FP jusqu'à la fin de l'expérimentation (24 jours). La transmission spontanée de virus aux canards contact, s'est faite de façon immédiate. Les résultats montrent une variation individuelle de l'excrétion à l'intérieur de chaque groupe qui a été la plus importante chez les Canards Pékin contacts ( $\sigma=2,89$  à J3). La variation entre les groupes d'animaux, calculée à J3, J5, J10 et J24, est restée statistiquement non significative en comparant les moyennes d'excrétion de chaque groupe d'oiseaux, à l'exception de la moyenne calculée à J5 chez les morillons inoculés et contact, qui s'est avérée statistiquement significative ( $p<0,05$ ).

Les virus influenza ont également été détectés dans l'eau du bassin mis à disposition des morillons inoculés et contacts. Une présence virale qui est à l'image des concentrations détectées dans les étangs de fermes où sont élevés des canards en plein air [109]. Pour assurer le bien-être des animaux, nous devons changer l'eau du bassin tous les trois jours. Les résultats obtenus représentaient alors la quantité de particules virales excrétée par ces animaux et accumulée dans le bassin pendant trois jours. Le niveau de concentration de cette eau était comparable à celui des excréments dans les fientes. Ceci confirme l'importance de l'eau dans la transmission des virus influenza. D'une part les animaux excréteurs pourraient l'approvisionner en particules virales, et d'autre part, elle assurerait la conservation du virus, particulièrement dans les régions à hiver froid [110].

Notre mesure de l'excrétion de virus influenza dans les fientes des canards inoculés a donné des résultats semblables à ceux observés dans les écouvillons cloacaux de ce groupe d'oiseaux (prévalence fiente = prévalence écouvillon). Toutefois, nous pensons que l'évaluation de titres de virus dans les fientes est sous-estimée. En effet, les particules virales s'agglutinent aux éléments

organiques des fientes, rendant difficile l'extraction du virus par les trousse de diagnostic habituellement utilisées, celles-ci filtrent ces particules au cours des premières étapes du processus de détection. Cette sous-estimation des titres est confirmée par le fait que la concentration dans les fientes paraît équivalente à celle de l'eau malgré l'effet de dilution (Cf. Chapitre II). Ceci serait rendu possible grâce à la désintégration des fientes dans l'eau, ce qui libérerait le virus qui deviendrait plus facilement détectable. Ainsi, le virus influenza aviaire FP inoculé à des populations de canards de surface et plongeurs, domestiques et sauvages, s'est multiplié rapidement chez ces oiseaux, et a été transmis quasi instantanément aux canards contacts (de surface versus plongeurs). La détection du virus à J3 dans les fientes a montré une concentration élevée en particules virales qui s'est poursuivie à un niveau constant jusqu'à 24 jours après inoculation. La littérature rapporte que dans le cas d'un contact strictement aérien entre Canards Pékin inoculés et contacts, aucune transmission n'a pu être observée [105].

### ***1.3 Rôle de réservoir épidémiologique***

Les niveaux d'excrétion entre les différents groupes d'individus, ou entre canards de surface et plongeurs sont semblables. La transmission des virus influenza entre différentes espèces de canards est facilitée par l'affinité de ces virus aux récepteurs de type  $\alpha$  2-3, présents en forte proportion dans les tissus respiratoires supérieurs et intestinaux des canards. Ceci à la différence des volailles domestiques qui possèdent les deux types de récepteurs  $\alpha$  2-3 et  $\alpha$  2-6 en proportions équivalentes [111]. D'où la rareté d'émergence de nouvelles souches dans l'avifaune sauvage où le virus a acquis une certaine stabilité. Ce frein à son évolution est favorisé par une immunité de masse chez ces oiseaux, mise évidence dans plusieurs enquêtes sérologiques en Europe et en Amérique du Sud qui, aussi faible soit-elle, permet néanmoins de limiter son expansion. Cependant, l'adaptation des virus influenza aux canards sauvages garantissent une pérennité d'infection constante chez ces espèces dont la population sensible se renouvelle continuellement.

Les canards plongeurs sont théoriquement plus sensibles que les canards de surface aux VIA. Dans l'étude de Keawcharoen *et al.*, les canards plongeurs du genre *Aythya* étaient les seuls, à présenter des signes cliniques spécifiques et à mourir de l'infection [56]. Cependant dans notre étude, aucun canard, qu'il soit plongeur ou de surface, n'a présenté de signes cliniques spécifiques de maladie, confirmant un portage asymptomatique de ce type de virus sur des oiseaux âgés de plus de quatre semaines. Ils semblent moins sensibles à la maladie que les autres espèces de volailles [112], et la réaction immunitaire des canards excréteurs conférée par les anticorps, ainsi que la réaction immunitaire humorale est généralement faible [54]. Les canards plongeurs peuvent donc jouer un rôle de réservoir épidémiologique des virus influenza ; celui-ci reste encore sous-estimé compte tenu du peu de résultats scientifiques obtenus sur ces espèces. Leurs particularités comportementales et alimentaires facilitent l'infection et la transmission des virus influenza dans l'environnement. Ce rôle est complémentaire de celui des canards de surface. Ces canards constitueront un modèle intéressant à étudier, sachant leur répartition non négligeable en effectifs autour des étendues d'eau.

## **2. Rôle de l'environnement dans la transmission des VIA : cas de la Dombes**

Après avoir étudié les mécanismes qui conduisent à la contamination et la persistance du virus dans l'environnement, le deuxième volet de cette étude a porté sur l'évaluation de la prévalence des VIA aux abords d'étangs à forte densité d'oiseaux d'eau. Des prélèvements de fientes et d'eau ont été réalisés au bord de trois étangs de réserve naturelle (chasse interdite) à forte densité d'oiseaux sauvages, durant trois mois entre octobre et décembre 2009 correspondant à l'arrivée des oiseaux du nord de l'Europe pour l'hibernation.

### ***2.1 Présence des VIA dans les fientes des bords des étangs***

La prévalence a été estimée par l'analyse de fientes fraîches collectées sur le bord des étangs fréquentés par l'avifaune sauvage. La prévalence d'infection des

fientes a augmentée de 127%, entre les mois d'octobre et novembre avant de chuter de 50% en décembre. L'augmentation rapide de la prévalence des fientes infectées a pu être corrélée à l'arrivée massive des canards plongeurs en Dombes au mois de novembre, et la chute brutale de la prévalence, en janvier 2009, a pu être associée au départ, en raison d'une vague de froid constatée.

Tout s'est passé comme si les virus influenza avaient été introduits par des migrateurs arrivant dans un environnement peuplé d'oiseaux d'eau sensibles. Les VIA, le plus souvent faiblement pathogènes, sont excrétés par les individus infectés sur plusieurs semaines de manière asymptomatique. Selon cette hypothèse, les mouvements d'arrivée et de départ d'oiseaux assurent la pérennité de l'infection, en recrutant de nouveaux animaux sensibles à chaque nouveau cycle de transmission d'un sous-type viral. Les nouveaux infectés excréteront à leur tour le virus dans l'environnement. Les oiseaux d'eau (notamment les colverts) peuvent entrer en contact avec des congénères ainsi qu'avec des oiseaux d'autres espèces, à l'intérieur d'une surface s'étendant sur près de 20000 ha. Les distances parcourues par ces oiseaux durant quelques jours en hiver atteignent un peu moins de 500m et exceptionnellement 27km selon des observations récentes [113] [Artois *et al.*, *communication personnelle*]. Les possibilités de dispersion des VIA par des oiseaux infectés sont amplifiées lorsque les conditions climatiques forcent les oiseaux à se déplacer (parfois massivement) d'une zone à une autre.

Les oiseaux d'eau sont attirés par la nourriture disponible sur les parcours des volailles élevées en plein air. Ils peuvent rencontrer ce type d'élevages sur leur parcours migratoire, ou bien à l'occasion de la recherche de nourriture quand celle-ci devient plus rare dans les zones d'hivernage. Cette attraction pourrait être la cause d'une transmission de virus influenza aux volailles domestiques, soit de manière directe, soit à travers les excréments des oiseaux d'eau qui vont souiller la nourriture et l'eau. Des espèces résidentes dites « relais » pourraient également transmettre l'infection aux volailles domestiques, étant donné la faible fréquentation des espèces migratrices aux endroits à forte activité humaine [114].

## ***2.2 Présence des VIA dans l'eau des étangs***

L'eau joue également un rôle important dans la persistance du virus, ainsi que dans sa transmission oro-fécale. En effet, des étendues d'eaux situées dans des endroits à hiver froid assureraient la survie des particules virales jusqu'à la saison du retour des oiseaux, permettant ainsi d'infecter les juvéniles non immunisés [8, 24]. La concentration de ces eaux en virus influenza serait particulièrement importante aux faibles profondeurs, où les canards de surface ont l'habitude de rechercher leur nourriture. L'eau pourrait notamment prendre le relais de la persistance virale lorsque les animaux infectés cessent d'excréter.

L'eau de surface des étangs de la Dombes a été trouvée infectée à forte concentration. Ce qui confirmerait que les suspensions virales seraient en concentration importante à faible profondeur. Au pic d'arrivée des migrateurs d'automne (Novembre), tous les étangs étudiés étaient déjà infectés. Par conséquent l'hypothèse d'une persistance de virus influenza d'une saison à l'autre ne peut être écartée. La transmission virale serait assurée par les canards de surface, qui se nourrissent à partir des eaux de surface infectées par les déjections de leurs congénères. Leur mode de recherche de nourriture caractérisé par le barbotage au niveau des eaux de surface les exposerait à un risque d'infection [32]. Plusieurs enquêtes montrent que les canards de surface sont les espèces dans lesquelles les VIA a été le plus fréquemment isolé [8].

Les canards plongeurs sont moins en contact avec les eaux de surface, donc avec les suspensions virales décrites précédemment. Ceci pourrait expliquer le plus faible nombre de canards plongeurs trouvés porteurs de virus lors des investigations épidémiologiques [8]. Toutefois, nos infections expérimentales de canards plongeurs par des virus faiblement pathogènes, ont montré que ces canards avaient une réceptivité comparable à celle des canards de surface (résultats de l'essai N°2, Cf. Chapitre II). La transmission pourrait par conséquent, se faire également à partir des canards plongeurs, qui entrent en contact avec des sédiments contaminés. En effet, les VIA peuvent également être conservés durant

de longues périodes dans les sédiments, selon les conditions de pH, de salinité, de charge en matière organique et de température [79, 115].

En Dombes, la persistance du virus influenza dans l'eau ainsi que la présence d'une espèce réservoir toute l'année, seraient des conditions optimales pour permettre au virus de passer la saison printanière et de persister jusqu'à la vague migratrice automnale. Notre méthode d'échantillonnage pourrait être utilisée dans le but de mieux décrire la variabilité phénotypique, ou génétique des souches virales circulantes, au moment des grandes vagues de migration.

### ***2.3 Persistance des VIA dans l'environnement des étangs***

Guberti *et al.* ont estimé que le nombre critique d'individus nécessaires à la persistance du VIA est de 380 individus/jour. La taille critique de la population pouvant assurer la persistance du virus durant l'hiver, a été estimée à 1200 individus [116]. En Dombes, l'étang Praillebard de la Fondation Vérot a accueilli 1494 canards colverts pendant la dernière semaine du mois d'octobre 2009. Une semaine auparavant, le dénombrement révélait seulement 229 individus, soit une entrée de 1265 canards en une semaine (180/jour en moyenne). A titre de comparaison, les comptages réalisés localement sur la Dombes recensent 18000 canards Colvert en janvier 2010 (Wetlands International). Cette espèce représente environ 65% des anatidés (27000 individus). Près de 30% de la population hivernale est composée de canards résidants, donc près de 6000 canards Colvert restent sur les étangs toute l'année. Il faut cependant considérer dans ces dénombrements les canards Colvert élevés et lâchés dans un but cynégétique dont le nombre reste mal connu, mais estimé à quelques dizaines de milliers. (Il serait de 1.400000 à l'échelle nationale).

## **3. Apport de la surveillance environnementale des VIA**

D'après la littérature, les oiseaux d'eau en général sont trouvés porteurs de ces virus à des prévalences variables selon les saisons et leur fréquentation des oiseaux sur les zones humides [117]. Dans le cas de la Dombes, les virus les plus retrouvés sont faiblement, voire non pathogènes [93]. C'est ce pathotype qui

circule au sein de la population sauvage d'oiseaux aux saisons que nous avons étudié. Nos résultats, tant expérimentaux qu'environnementaux, permettent de caractériser l'intensité de l'excrétion virale ainsi que sa durée chez des espèces hôtes. Ces résultats ouvrent la voie à une amélioration de la démarche de la surveillance, qui est selon Artois *et al.* « Un système pour collecter et analyser de façon continue une information sur la santé des espèces animales sauvages, ainsi que les facteurs de risques associés, dans le but d'atteindre des objectifs de contrôle, voire d'éradication d'une maladie dans une population ou un peuplement d'animaux sauvages » [118].

### **3.1 Etat des lieux de la surveillance des VIA en Dombes**

Depuis l'épisode d'influenza aviaire de septembre 2005, associé à l'introduction d'une souche asiatique du virus (H5N1 hautement pathogène) par des oiseaux migrateurs venant de Sibérie occidentale, la surveillance des VIA chez les oiseaux sauvages est désormais fondée, en France, sur la recherche de virus dans des cadavres (surveillance dite passive) et chez des oiseaux apparemment sains capturés ou tués à la chasse, ainsi que chez des canards sentinelles (surveillance dite active). Les études de surveillance réalisées dans la Dombes révèlent exclusivement des virus faiblement pathogènes, avec des indices de pathogénicité intraveineuse (IPIV) nulles ou très faibles [93, 119], y compris parmi les sous-types H5 et H7. En 2006, année où la Dombes avait connu sa première épizootie à virus HP, le virus H5N1 (ayant infecté un élevage de dinde) avait été, en toute hypothèse, introduit par les oiseaux sauvages migrateurs et non à la suite d'une évolution d'un virus FP qui aurait circulé dans la population d'oiseaux sauvages [120].

Etant donné le faible nombre de contacts qui se produisent entre canards sauvages et volailles domestiques [121], un virus ayant circulé dans les populations naturelles d'oiseaux d'eau aurait plus de chances d'être transmis à des espèces d'oiseaux « relais » qui pourraient assurer le transport vers les élevages domestiques [101, 114]. L'étude de Bicout *et al.* suggère que le risque de contact entre oiseaux sauvages et volailles domestiques serait variable selon les saisons

[114]. La probabilité relative maximale de ce contact serait de 0.32, 0.52, 1 et 0.6 respectivement en hiver, printemps, été et automne. A ces probabilités correspondent des espèces, toutes anthropophiles ; les plus à risque de contact avec les volailles étant envisagés pour les espèces suivantes : le Moineau domestique (*Passer domesticus*) en hiver, le Pigeon biset domestique (*Columbalivia domesticus*) au printemps et en été, et le Pinson du Nord (*Fringilla montifringilla*) en automne. Il est à noter que le risque le plus élevé de contact correspond à la saison d'été avec un plus grand nombre d'espèces observées, entrant en contact avec les volailles domestiques. Parmi ces espèces on note également un plus grand nombre qui fréquente les zones humides : Héron cendré (*Ardea cinerea*), Bruant des roseaux (*Emberiza schoeniclus*), Hirondelle rustique (*Hirundo rustica*), Hirondelle de fenêtre (*Delichon urbicae*), Mésange bleue (*Parus caeruleus*) et Mésange à longue queue (*Aegithalos caudatus*). Ces espèces viennent construire sur les fermes leurs gîtes de reproduction, et exploitent les ressources alimentaires présentes.

Comme dans de nombreux autres sites naturels d'intérêt ornithologique, il faut noter qu'avant et depuis l'épizootie H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> de 2006, aucun VIA HP n'a été découvert dans cette région, aussi bien chez l'avifaune sauvage que chez les volailles domestiques. Nous pouvons considérer que l'introduction de VIA dans les élevages de volailles domestiques est efficacement contrôlée jusqu'à aujourd'hui dans la Dombes, ainsi que dans les pays industrialisés en général. Les mesures de prévention sanitaires pratiquées limitent en effet les chances de contacts avec un VIA des volailles ; que ce soit par un contact direct avec des oiseaux sauvages, ou indirect avec l'eau, le sol des parcours, ou les matériaux d'élevage. Nous pouvons formuler l'hypothèse que les conditions d'émergence d'un VIA HP dans les élevages de volailles exposées aux oiseaux sauvages de la Dombes, ne sont pas optimales dans cette région.

A ce jour, la vigilance épidémiologique reste élevée concernant l'introduction de sous-types H<sub>5</sub> et H<sub>7</sub>, voire d'autres sous types menaçants la santé ou la productivité des volailles domestiques en Europe. Même si le risque d'apparition d'une souche HP est faible, l'événement reste possible (par exemple si l'évolution

naturelle du H5N1 aboutit à des souches pouvant plus facilement persister dans des populations sauvages : Ce qui semble être le cas du « clade » 2.3.2.B du virus H5N1, qui a évolué à partir du clade 2.3.2 qui caractérisait les virus isolés en Asie depuis 2005). Un clade ancien circulait jusqu'à récemment au Viet Nam, Inde, Chine, Bangladesh, et au Myanmar. Un nouveau clade, appelé 2.3.2B a récemment évolué à partir du clade 2.3.2.1. Il a été isolé en 2011 au Vietnam et en Chine, source : (FAO-OIE-WHO, 7 Sept. 2011).

### ***3.2 Recommandations relatives à la surveillance des zones humides***

La surveillance active reste la méthode de choix afin de suivre l'évolution des virus influenza aviaire faiblement pathogènes dans l'environnement [8]. Des plans de surveillance active doivent donc être établis, principalement en fin d'été et en automne, à l'arrivée des oiseaux hivernants, et une carte des sites infectés et des souches circulantes réalisée. En effet le risque d'introduction du virus en cette période paraît plus important qu'en hiver [122]. Les étangs qui présentent une densité d'oiseaux importante, présentent également un risque de contamination élevé particulièrement pendant les hivers froids, où les animaux se regroupent dans les zones non gelées des grandes étendues d'eau [120].

La surveillance devrait aussi concerner les oiseaux sédentaires et nicheurs à l'année ainsi que leur environnement, en particulier l'eau et les sédiments des étangs et marais. Nous considérons que des prélèvements de fientes et d'eau peuvent constituer un matériel d'étude suffisant pour surveiller la circulation des souches virales dans les zones humides. D'un point de vue technique, nos mesures, réalisées sur les fientes des canards inoculés ainsi que l'eau utilisée par les canards plongeurs montrent des niveaux équivalents, et semblables à celle faites sur les écouvillons (Cf. Chapitre II). De plus, mis à part la facilité avec laquelle les prélèvements des fientes sont collectés, cette méthode crée une faible perturbation de l'environnement des oiseaux, par rapport à la méthode de capture (prélèvements cloacaux). Certaines espèces en effet, requièrent une attention particulière compte tenu de leur risque d'extinction. Ce qui amène à fournir un effort supplémentaire quant à leur préservation ainsi que leur

habitat. Il serait intéressant qu'une méthode de prélèvement vienne limiter leur manipulation. Il serait plus efficace en temps et en coût d'introduire ces types de prélèvement lors des enquêtes de surveillance de routine. Les prélèvements de fientes auront en revanche pour inconvénient de ne pas fournir des données sur l'animal dont elles sont issues.

Pour réaliser une surveillance basée sur ce type de prélèvement, il faut considérer la phénologie des déplacements d'oiseaux sauvages en Dombes qui reste très complexe [113] ; ainsi les mouvements d'arrivées d'oiseaux en provenance du nord, s'étalent de la fin de l'été jusqu'au début de l'hiver ; les mouvements inverses viennent quasiment succéder, voire même se superposer aux précédents. En outre, les sous populations migratrices coexistent avec des congénères résidents, assurant un brassage quasi permanent des souches, augmenté par les « mouvements de fuite », difficilement prévisibles. La surveillance ornithologique pose donc de sérieux problèmes techniques pour déterminer le statut des oiseaux capturés et échantillonnés. Un programme de surveillance qui reposerait sur des prélèvements de fientes au bord d'étangs sélectionnés pour leur capacité d'accueil de différentes espèces d'oiseaux d'eau, ainsi que pour leur proximité à un nombre important d'élevages serait plus opérationnel pour suivre quasiment en temps réel la circulation virale. La collecte des fientes se fera de manière exhaustive au cours de la tournée sur le terrain ; toutes les fientes rencontrées en longeant le bord de l'étang seront prélevées sur un parcours de 600 m (Un parcours de 600 m nous a permis de récolter 123 fientes dont 16 (13%) étaient infectées). Un tel plan de surveillance peut se baser sur la collecte d'un très grand nombre d'échantillons, (un prélèvement de 1522 fientes permettrait de détecter une prévalence de l'ordre de 1% avec une précision relative de 50%, par exemple [123], (700 fientes nous ont permis de détecter une prévalence de 7% avec un IC de 95% : au niveau de notre zone d'étude au mois de novembre).

### 3.3 Organisation de la surveillance en Dombes

Dans une zone humide comme la Dombes, nous proposons de déployer un programme de surveillance à deux vitesses en tenant compte du cycle écologique des oiseaux:

- présence d'espèces d'oiseaux d'eau qui peuvent rester sédentaires durant toute l'année (près de 30% des oiseaux recensés pendant la saison d'hivernage).
- présence plus importante d'oiseaux à l'occasion des flux migratoire qui s'étalent de la fin de l'été au début du printemps.
- persistance du virus dans l'environnement et dans l'eau.

Une **première période** d'intense d'échantillonnage prendrait donc principalement place pendant la période d'afflux migratoire du mois d'août au mois de mars (Durant le mois d'août les oiseaux migrateurs commencent à arriver en Dombes pour finir de la quitter au mois de mars). Des prélèvements de fientes en nombre proportionnel au nombre moyen d'oiseaux observés suite à des dénombrements réalisés à la même période, seront réalisés ainsi que des prélèvements d'eau. Pendant cette campagne, l'objectif serait de détecter les virus circulants et de les comparer aux virus ayant sévi l'année précédente ainsi qu'à ceux ayant atteint d'autres pays avant d'arriver en Dombes. Ces prélèvements seront récoltés au niveau de trois étangs sélectionnés pour leur plus grande affluence d'oiseaux, et appartenant à des réserves naturelles (Exemple : Grand Birieux de l'ONCFS, étang du Parc des oiseaux, étang Praillebard de la Fondation Vérot). Les trois étangs étudiés en Dombes, nous ont permis de détecter une prévalence globale de VIA de 13% en trois mois d'étude.

Une **deuxième période** sera considérée par la suite, allant du mois d'avril au mois de juillet, où des prélèvements moins fréquents seront récoltés. Son objectif serait essentiellement à s'assurer de la persistance (ou non) des virus ayant circulés pendant la saison d'hivernage.

Il faut veiller à ce que les fientes soient fraîches et humides (prélever de préférence en début de matinée). Les prélèvements sont analysés par RT-PCR en temps réel sur prélèvement individuel ciblant le gène M de la matrice. Les

prélèvements positifs sont analysés afin de rechercher des sous-types H5 ou H7, leur identification conduirait à une déclaration aux services vétérinaires et au déclenchement d'une alerte sanitaire dont le premier objectif serait d'isoler et séquencer le génome du virus le plus rapidement possible. Si un virus est fortement soupçonné d'être hautement pathogène (site de clivage de l'hémagglutinine multi-basique), un périmètre de sécurité devrait être établi au niveau de la zone infectée, il viserait à protéger les élevages de volailles domestiques à risque d'entrer en contact avec les oiseaux sauvages de la zone contaminée.



# CONCLUSION GENERALE

Au cours de notre étude, nous avons conduit des essais expérimentaux qui nous ont permis de suivre l'infection de groupes de canards par un VIA FP et de mettre en évidence un déplacement des lieux de réplication virale dans leur système digestif. Nous avons pu parallèlement, quantifier la présence de particules virales dans les fientes de canards de surface et plongeurs. Des fientes ainsi que de l'eau ont par la suite été prélevées dans l'environnement d'une zone humide sélectionnée, afin d'évaluer la quantité des VIA présents durant la migration d'automne et au début de la saison d'hivernage, où un grand nombre d'oiseaux affluent dans la région de la Dombes.

Nos résultats ont confirmé l'existence d'une réplication du VIA au niveau de l'épithélium du premier tiers de l'intestin des oiseaux pour se poursuivre, deux jours après l'infection, dans les cellules épithéliales de la jonction cœco-colique, avant d'être éliminé dans les fientes. Cette excrétion se fait à des taux élevés ( $2 \times 10^6$  copies/grf chez les Canards Pékin,  $4 \times 10^4$  copies/grf chez les fuligules morillons), ainsi le virus se transmet quasi instantanément aux individus exposés. Cette excrétion a été observée sur une période de 17 jours chez les Canards Pékins et sur plus de 24 jours chez les Fuligules Morillons. Ces résultats soulignent la grande contagiosité du virus dans des conditions de forte promiscuité. Dans l'environnement naturel de la Dombes, les fientes prélevées étaient infectées à 13% en moyennes avec des titres viraux à hauteur de  $1,6 \times 10^{10}$  copies/grf en moyenne. La concentration en virus de l'eau des étangs étudiés variait quant à elle, de  $2 \times 10^3$  à  $10^4$  copies/L, avec un pic atteint en novembre, au moment de la plus forte présence d'oiseaux en migration hivernale.

L'intérêt de ces résultats nous a amené à considérer la problématique de la surveillance des virus influenza dans l'avifaune sauvage. Ainsi, nous recommandons de pratiquer, en complément, voire en remplacement d'une surveillance clinique de détection d'oiseaux malades, une surveillance active de la prévalence des VIA dans des fientes récoltées dans les zones humides proches d'élevages d'oiseaux en plein air. Cette surveillance se fonderait sur des prélèvements environnementaux réalisés entre la fin de l'été et le début

d'automne. Des fientes et de l'eau d'étangs ou de marres seraient prélevées à partir du mois d'août tout en surveillant l'arrivée des oiseaux hivernants par des dénombrements hebdomadaires réalisés par les ornithologues. Les prélèvements testés positifs pour le gène M de la matrice, pourront être sous-typés afin de révéler d'éventuels virus H5 ou H7, seuls pour le moment connus pour engendrer des épizooties à virus HP, voire d'autres sous-types d'intérêt pour la santé humaine (sous-types rencontrés dans les gripes humaines ou porcines) ou pour la santé animale (sous-types réputés FP mais capables d'engendrer des maladies d'importance économique en élevage avicole).

On peut imaginer avec le développement des méthodes rapides de dépistage (Micro-puces) ou de séquençage en temps réel, l'automatisation des procédés permettant une réponse rapide après les prélèvements. La logistique de collecte d'échantillon, que nous proposons, n'est pas traumatisante pour les oiseaux, ne nécessite pas de moyens matériels de piégeage et peut se programmer avec peu de contraintes environnementales ou administratives. Nos données expérimentales et environnementales viennent enrichir les paramètres des modèles prédictifs de transmission des VIA de l'avifaune sauvage aux volailles domestiques, particulièrement celles élevées en plein air, dans la région de la Dombes. Ces modèles continuent d'être étudiés par l'équipe EPSP du laboratoire TIMC-IMAG.



# REFERENCES

1. Murphy FA. Emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(3):429-35.
2. Doherr MG, Audige L. Monitoring and surveillance for rare health-related events: a review from the veterinary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1411):1097-106.
3. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356(1411):991-9.
4. Moutou F. Agents infectieux et migrations aviaires. *Annales de l'Institut Pasteur Actualités.* 2001;8:p. 77-90.
5. Waldenstrom J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottosson U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol Ecol.* 2002;11(8):1545-54.
6. Hubalek Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis.* 2004;40(4):639-59.
7. Comstedt P, Bergstrom S, Olsen B, Garpmo U, Marjavaara L, Mejlou H, et al. Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(7):1087-95.
8. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier RA. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science.* 2006;312(5772):384-8.
9. Alerstam T, Lindström Å. Optimal bird migration: the relative importance of time, energy and safety. In: Gwinner E, editor. *Bird migration: physiology and ecophysiology*: Springer-Verlag; 1990. p. 331-51.
10. Blancou J. Histoire de la surveillance et du contrôle des maladies animales transmissibles: Office international des épizooties; 2000.
11. Fleming G. *Animal plagues: Their history, nature and prevention*: London, Chapman and Hall; 1871.
12. Perroncito E. Epizootia tifoide nei gallinacei. *Ann Acad Agric.* 1878;21:87.
13. Short T. A general chronological history of the air, weather, seasons, meteors, etc. 1749. 497 p.
14. Von Heusinger KF. *Recherches de pathologie comparée: Cassel, chez Henri Hotop*; 1853. 549 p.

15. Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.* 2004;33(4):393-404.
16. Webster RG, Govorkova EA. H5N1 influenza - continuing evolution and spread. *N Engl J Med.* 2006;355(21):2174-7.
17. Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8950-5.
18. Capua I, Alexander DJ. *Avian Influenza and Newcastle Disease*: Springer; 2009. 190 p.
19. Webster RG, Guan Y, Poon L, Krauss S, Webby R, Govorkovai E, et al. The spread of the H5N1 bird flu epidemic in Asia in 2004. *Arch Virol Suppl.* 2005(19):117-29.
20. Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J, et al. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *Vet Rec.* 2005;157(6):159-64.
21. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, Fouchier R, et al. Avian H5N1 influenza in cats. *Science.* 2004;306(5694):241.
22. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 2004;430(6996):209-13.
23. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature.* 2005;437(7060):889-93.
24. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992;56(1):152-79.
25. Krauss S, Walker D, Pryor SP, Niles L, Chenghong L, Hinshaw VS, et al. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2004;4(3):177-89.
26. Stallknecht DE, Shane SM, Zwank PJ, Senne DA, Kearney MT. Avian influenza viruses from migratory and resident ducks of coastal Louisiana. *Avian Dis.* 1990;34(2):398-405.

27. Webster RG, Morita M, Pridgen C, Tumova B. Ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks: characterization of a new group of influenza A viruses. *J Gen Virol.* 1976;32(2):217-25.
28. Okazaki K, Takada A, Ito T, Imai M, Takakuwa H, Hatta M, et al. Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch Virol.* 2000;145(5):885-93.
29. Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology.* 1996;217(2):508-16.
30. Kawaoka Y, Chambers TM, Sladen WL, Webster RG. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology.* 1988;163(1):247-50.
31. Sharp GB, Kawaoka Y, Jones DJ, Bean WJ, Pryor SP, Hinshaw V, et al. Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *J Virol.* 1997;71(8):6128-35.
32. Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenstrom J, Wallensten A, Fransson T, et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):e61.
33. Parmley EJ, Bastien N, Booth TF, Bowes V, Buck PA, Breault A, et al. Wild bird influenza survey, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(1):84-7.
34. Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmberg J, Fouchier RA, et al. Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(3):404-11.
35. Ip HS, Flint PL, Franson JC, Dusek RJ, Derksen DV, Gill RE, Jr., et al. Prevalence of Influenza A viruses in wild migratory birds in Alaska: patterns of variation in detection at a crossroads of intercontinental flyways. *Virol J.* 2008;5:71.
36. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 2005;79(5):2814-22.

37. Wright PF, Webster GR. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1533-79.
38. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol*. 2000;74(1-2):3-13.
39. Webster RG, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell*. 1987;50(5):665-6.
40. Munster VJ, Wallensten A, Baas C, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Olsen B, et al. Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(10):1545-51.
41. Capua I, Alexander DJ. The challenge of avian influenza to the veterinary community. *Avian Pathol*. 2006;35(3):189-205.
42. Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, et al. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature*. 2005;436(7048):191-2.
43. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 2001;7(12):1306-12.
44. Birch-Machin I, Rowan A, Pick J, Mumford J, Binns M. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera. *J Virol Methods*. 1997;65(2):255-63.
45. O'Neill RE, Talon J, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*. 1998;17(1):288-96.
46. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2007. p. 1647-89.
47. Tumpey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):676-83.
48. De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. Influenza virus: a master of metamorphosis. *The Journal of infection*. 2000;40(3):218-28.

49. Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*. 2005;309(5738):1206.
50. Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim ST, et al. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol*. 2004;33(5):492-505.
51. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2189-91.
52. De Jong MD, Bach VC, Phan TQ, Vo MH, Tran TT, Nguyen BH, et al. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med*. 2005;352(7):686-91.
53. Ducatez MF, Olinger CM, Owoade AA, De Landtsheer S, Ammerlaan W, Niesters HG, et al. Avian flu: multiple introductions of H5N1 in Nigeria. *Nature*. 2006;442(7098):37.
54. Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect Immun*. 1980;30(2):547-53.
55. Van Gils JA, Munster VJ, Radersma R, Liefhebber D, Fouchier RA, Klaassen M. Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. *PLoS One*. 2007;2(1):e184.
56. Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, van Lavieren R, et al. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis*. 2008;14(4):600-7.
57. Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(11):1663-70.
58. Brown JD, Stallknecht DE, Swayne DE. Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(1):136-42.
59. Latorre-Margalef N, Gunnarsson G, Munster VJ, Fouchier RA, Osterhaus AD, Elmberg J, et al. Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks. *Proc Biol Sci*. 2009;276(1659):1029-36.

60. Stallknecht DE, Shane SM. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun.* 1988;12(2-3):125-41.
61. Wallensten A. Influenza A virus in wild birds. Linköping University Medical Dissertations. 2006;955.
62. Bean WJ, Schell M, Katz J, Kawaoka Y, Naeve C, Gorman O, et al. Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. *J Virol.* 1992;66(2):1129-38.
63. Artois M, Bicoût D, Doctrinal D, Fouchier R, Gavier-Widen D, Globig A, et al. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe: the risks associated with wild birds. *Rev Sci Tech.* 2009;28(1):69-92.
64. Gambaryan A, Webster R, Matrosovich M. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken. *Archives of Virology.* 2002;147(6):1197-208.
65. Yamnikova SS, Gambaryan AS, Tuzikov AB, Bovin NV, Matrosovich MN, Fedyakina IT, et al. Differences between HA receptor-binding sites of avian influenza viruses isolated from Laridae and Anatidae. *Avian Dis.* 2003;47(3 Suppl):1164-8.
66. Hinshaw VS, Air GM, Gibbs AJ, Graves L, Prescott B, Karunakaran D. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. *J Virol.* 1982;42(3):865-72.
67. Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol.* 2004;78(9):4892-901.
68. Sturm-Ramirez KM, Hulse-Post DJ, Govorkova EA, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, et al. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *J Virol.* 2005;79(17):11269-79.
69. Hanson BA, Stallknecht DE, Swayne DE, Lewis LA, Senne DA. Avian influenza viruses in Minnesota ducks during 1998-2000. *Avian Dis.* 2003;47(3 Suppl):867-71.
70. Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J. Handbook of the birds of the world. Vol. 1 Ostrich to ducks. 1992.

71. Van de Kam J, Ens B, Piersma T, Zwarts L, de Goeij P, Moore S, et al. *Shorebirds: an illustrated behavioural ecology*: Utrecht : KNMV; 2004.

72. Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses. *J Virol*. 2004;78(16):8771-9.

73. Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, Ghedin E, et al. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathog*. 2008;4(5):e1000076.

74. Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. 2006;311(5767):1576-80.

75. Krauss S, Obert CA, Franks J, Walker D, Jones K, Seiler P, et al. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. *PLoS Pathog*. 2007;3(11):e167.

76. Wallensten A, Munster V, Fouchier R, Olsen B, editors. *Avian influenza A virus in ducks migrating through Sweden*. 2004: Elsevier.

77. Scott DA, Rose PM. *Atlas of Anatidae populations in Africa and Western Eurasia*: Wageningen, Netherlands:Wetlands International; 1996.

78. Bentz PG. Studies on some urban Mallard *Anas platyrhynchos* populations in Scandinavia. Part I: Causes of death, mortality and longevity among Malmö Mallards as shown by ringing recoveries. *Fauna Norv Ser C Cinclus*. 1985;8:44-56.

79. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KC. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*. 1978;84(2):268-78.

80. Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis*. 1990;34(2):406-11.

81. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. Water-Borne Transmission of Influenza A Viruses?

. *Intervirology*. 1979;11(1):66-9.

82. Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. The perpetuation of orthomyxoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Can J Microbiol*. 1980;26(5):622-9.

83. Kim JK, Negovetich NJ, Forrest HL, Webster RG. Ducks: the "Trojan horses" of H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> influenza. *Influenza Other Respi Viruses*. 2009;3(4):121-8.
84. Hinshaw VS, Bean WJ, Webster RG, Sriram G. Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. *Virology*. 1980;102(2):412-9.
85. Hinshaw VS, Wood JM, Webster RG, Deibel R, Turner B. Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America. *Bull World Health Organ*. 1985;63(4):711-9.
86. Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Reviews in medical virology*. 2002;12(3):159-66.
87. Arzel C, Elmberg J, Guillemain M. Ecology of spring-migrating Anatidae: a review. *Journal of Ornithology*. 2006;147(2):167-84.
88. Gilbert M, Chaitaweesub P, Parakamawongsa T, Premashthira S, Tiensin T, Kalpravidh W, et al. Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):227-34.
89. Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, Seiler P, Govorkova EA, Krauss S, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10682-7.
90. Villarreal C. Avian influenza in Mexico. *Rev Sci Tech*. 2009;28(1):261-5.
91. Bernard A, Lebreton P. Les oiseaux de la Dombes : Une mise à jour. In: Dombes Adl, editor. *Dombes2007*. p. 5-10.
92. Lebreton P, Richoux P. L'évolution climatique et son impact en Dombes. *Zones humides infos*. 2008(59-60):9-10.
93. Hars J, Louboutin K, Le Potier V, Rousset J, Fournier J, Leray G, et al. Evaluation de l'état sanitaire de l'avifaune sauvage de deux réserves de chasse et de faune sauvage vis à vis de deux maladies partagées par les oiseaux sauvages et domestiques : l'Influenza aviaire (peste aviaire) et la maladie de Newcastle (pseudo-peste aviaire). 2003.
94. Le Gall-Reculé G, Briand FX, Schmitz A, Guionie O, Massin P, Jestin V. Double introduction of highly pathogenic H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> avian influenza virus into France in early 2006. *Avian Pathol*. 2008;37(1):15-23.

95. Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol.* 2001;38(2):149-64.
96. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine.* 2007;25(30):5637-44.
97. Vascellari M, Granato A, Trevisan L, Basilicata L, Toffan A, Milani A, 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. *Vet Pathol.* 2007;44(5):635-42.
98. Londt BZ, Nunez A, Banks J, Nili H, Johnson LK, Alexander DJ. Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A/turkey/Turkey/1/2005 H5N1 in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally. *Avian Pathol.* 2008;37(6):619-27.
99. Bingham J, Green DJ, Lowther S, Klippel J, Burggraaf S, Anderson DE, et al. Infection studies with two highly pathogenic avian influenza strains (Vietnamese and Indonesian) in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*), with particular reference to clinical disease, tissue tropism and viral shedding. *Avian Pathol.* 2009;38(4):267-78.
100. Pasick J, Berhane Y, Embury-Hyatt C, Coppins J, Kehler H, Handel K, et al. Susceptibility of Canada Geese (*Branta canadensis*) to highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis.* 2007;13(12):1821-7.
101. Perkins LE, Swayne DE. Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Vet Pathol.* 2003;40(1):14-24.
102. Perkins LE, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis.* 2002;46(1):53-63.
103. Kear J. Ducks, geese and swans: Oxford University Press; 2005.
104. Guionie O, Guillou-Cloarec C, Courtois D, Bougeard BS, Amelot M, Jestin V. Experimental infection of Muscovy ducks with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) belonging to clade 2.2. *Avian Dis.* 2010;54(1 Suppl):538-47.

105. Mamlouk A, Artois M, Ottmann M, Belli P, Lina B, Sabatier P. Shedding and intestinal spread of avian influenza virus H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> in dabbling ducks (preliminary study). *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2011;162(10):454-9.
106. Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*. 1975;68(2):426-39.
107. Olney P. The food and feeding habits of tufted duck *Aythya fuligula*. *Ibis*. 1963;105(1):55-62.
108. Faust C, Stallknecht D, Swayne D, Brown J. Filter-feeding bivalves can remove avian influenza viruses from water and reduce infectivity. *Proc Biol Sci*. 2009;276(1673):3727-35.
109. Markwell DD, Shortridge KF. Possible waterborne transmission and maintenance of influenza viruses in domestic ducks. *Appl Environ Microbiol*. 1982;43(1):110-5.
110. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol*. 1995;140(7):1163-72.
111. Pillai SP, Lee CW. Species and age related differences in the type and distribution of influenza virus receptors in different tissues of chickens, ducks and turkeys. *Virol J*. 2010;7:5.
112. Jeong OM, Kim MC, Kim MJ, Kang HM, Kim HR, Kim YJ, et al. Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> avian influenza virus. *J Vet Sci*. 2009;10(1):53-60.
113. Zayackowski S, Laval B. Stratégies d'occupations spatiales en période hivernale d'une espèce réservoir d'Influenzas Aviaires : le Canard colvert (*Anas platyrhynchos*): Université Jean Monnet - Saint Etienne; 2010.
114. Bicout JD, Artois M, Musseau R, Caparros O, Lubac S. Quels Oiseaux Sauvages A Risque Pour Les Contacts Entre Avifaune Sauvage Et Volailles Domestiques ? Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole; 29 et 30 mars 2011; Tours2011.
115. Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis*. 1990;34(2):412-8.

116. Guberti V, Scremin M, Busani L, Bonfanti L, Terregino C. A simulation model for low-pathogenicity avian influenza viruses in dabbling ducks in Europe. *Avian Dis.* 2007;51(1 Suppl):275-8.
117. Hars J, Ruelle S, Benmergui M, Fouque C, Fournier JY, Legouge A, et al. The epidemiology of the highly pathogenic H5N1 avian influenza in Mute Swan (*Cygnus olor*) and other Anatidae in the Dombes region (France), 2006. *J Wildl Dis.* 2008;44(4):811-23.
118. Artois M, Bengis R, Delahay RJ, Duchêne M, Duff P, Ferroglio E, et al. Wildlife disease surveillance and monitoring. In: Delahay RJ, Smith GC, Hutchings M, editors. *Management of Disease in Wild Mammals* 2009. p. 187-213.
119. Doctrinal D. Contribution à l'analyse du risque de survenue d'une épizootie d'Influenza Aviaire en Dombes: Université Joseph Fourier Grenoble I; 2009.
120. Doctrinal D, Ruelle S. Spatial and temporal analysis of the highly pathogenic avian influenza H5N1 outbreak in the Dombes Area, France, in 2006. *Wildfowl.* 2009(2):202-14.
121. Simon A, Delphine D, Bicout D. Risque de contact entre oiseaux sauvages et domestiques dans la région de la Dombes, France. *Epidémiologie et santé animale.* 2006;50:27-39.
122. René M, Bicout D. Influenza aviaire : Modélisation du risque d'infection des oiseaux à partir d'étangs contaminés. *Epidémiologie et santé animale.* 2007;51:95-109.
123. Toma B, Dufour B, Sanaa M, Benet J, Shaw A, Moutou F, et al. *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures: Association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies animales*; 1995. 640 p.

## Résumé

Les virus influenza A ont suscité à partir de l'année 1997 un intérêt sanitaire et économique mondial considérable après l'émergence d'une forme hautement pathogène d'un virus influenza aviaire H5N1. Cette épizootie a mis en évidence le danger majeur que constitue la proximité entre espèces sensibles sauvages et domestiques. En effet, pouvant présenter les caractéristiques de réservoirs de ces virus, les canards étaient les plus soupçonnés de transmettre l'infection, grâce à une pratique migratoire importante et d'un portage asymptomatique fréquent.

Ce portage associe dans la plupart des cas des virus faiblement pathogènes de sous-types multiples. Ces virus peuvent se transmettre aux volailles domestiques et émerger en épizootie à virus hautement pathogène dans le cas particulier des sous-types H5 et H7. Ces épizooties peuvent avoir des conséquences économiques considérables, avec une mortalité avoisinant les 100%, et sanitaire avec un possible passage à l'homme.

Notre projet vise à caractériser l'infection et la transmission des virus influenza faiblement pathogènes, après inoculation expérimentale à une population de canards de surface et plongeurs. Il répond également à la nécessité d'établir des méthodes de surveillance des virus influenza aviaires à l'arrivée des oiseaux migrateurs dans des zones humides à riche patrimoine ornithologique, et situées à proximité de régions à fort potentiel en matière de production avicole (La Dombes comme exemple).

**Mots clés :** Canards, Influenza aviaire faiblement pathogène, Epidémiologie, Epidémiosurveillance, excrétion, émergence, inoculation

## Abstract

Since 1997, influenza A viruses has given rise to great sanitary and economic interest after the emergence of a highly pathogenic subtype of avian influenza virus H5N1. This epizooty underlined the threat that could be the closeness of wild and domestic birds. Ducks which were actually showing reservoirs characteristics were suspected to pass on the virus thanks to their migratory habits and asymptomatic portorage.

This portorage mostly involves low pathogenic viruses of numerous subtypes. Those viruses could be transmitted to domestic poultries and emerge, in the case of H5 and H7 subtypes, in a viral highly pathogenic epizooty. Those epizooties may have major economic (average 100% mortality) and sanitary (possible transmission to humans) consequences.

Our study aims to characterize the infection and the transmission of low pathogenic avian influenza viruses, after experimental inoculation to surface and diving ducks. It suggests setting up epidemiologic surveillance methods of avian influenza viruses after the arrival of migratory birds in most important wetlands, which are close to major poultry breeding regions (The Dombes for instance).

**Key words:** Ducks, Low pathogenic Avian influenza virus, epidemiology, epidemiological surveillance, excretion, emergence, inoculation.