

ETUDE CLINIQUE ET PATHOLOGIQUE COMPAREE DE CAS D'INFLUENZA AVIAIRE HAUTEMENT PATHOGENE H5 CHEZ LES GALLIFORMES ET PALMIPÈDES DANS LE SUD-OUEST DE LA FRANCE, 2015-2016

Marie-Noëlle LUCAS¹, Guillaume CROVILLE¹, Romain VOLMER¹, Angélique TEILLAUD¹, Mattias DELPONT¹, Léni CORRAND², Xavier BANSE², Laurent MICHEL³, François LANDAIS², Pierre-Olivier COSTEDOAT², Bruno NEVERS³, Alice MACHET³, Laurent DEFFREIX⁴, Maxence DELVERDIER¹ et Jean-Luc GUERIN¹

¹UNIVERSITE DE TOULOUSE, ENVT, INRA, 31076 Toulouse

²ABIOPOLE, 64410 Arzacq

³SANTE ANIMALE SUD OUEST, 31240 L'Union

⁴BIO'VET Santé Animale, 40330 Amou

jl.guerin@envt.fr

RÉSUMÉ

Dans le cadre de l'épisode majeur d'influenza aviaire hautement pathogène H5 initié en 2015 dans le Sud-Ouest de la France, 10 foyers déclarés (i.e. H5N1, H5N2 or H5N9) de Décembre 2015 à Février 2016 ont été inclus dans une étude pathologique : 4 lots de poulets labels, 3 lots de pintade, 2 lots de canards en gavage, 1 lot d'oies en élevage.

Pour chaque cas inclus, 5 sujets morbides étaient sélectionnés et autopsiés : un relevé des lésions a été effectué ainsi qu'un prélèvement systématique de tissus, en parallèle en formol tamponné à 10% et en fixateur d'acides nucléiques. Un immunomarquage a également été réalisé sur une sélection de coupes histologiques à l'aide d'un anticorps spécifique de la nucléoprotéine. Par ailleurs, pour une sélection de tissus, l'ARN a été extrait et soumis à une analyse RT-PCR quantitative en temps réel ciblant le gène M des virus influenza A.

Chez les galliformes, la mortalité quotidienne était faible à modérée, les lots ne présentant pas d'abattement significatif. Les lésions macroscopiques consistaient essentiellement en un œdème sous-cutané et pulmonaire aigu, ainsi qu'une splénomégalie modérée mais systématique. Les principales lésions microscopiques étaient une pneumonie interstitielle aiguë marquée et des lésions de vasculite. Ces lésions étaient plus sévères chez les pintades que chez les poulets. L'immunomarquage a confirmé un marquage intense des noyaux des leucocytes circulants et des cellules endothéliales.

Chez les palmipèdes, les signes cliniques étaient absents à l'exception d'un lot d'oisons en élevage présentant des œdèmes très sévères. De même, le tableau lésionnel macroscopique était le plus souvent limité à une splénomégalie modérée. Les lésions microscopiques étaient également absentes à minimales.

L'analyse des charges virales tissulaires par RT-PCR quantitative a montré des charges virales significativement plus élevées chez les galliformes que chez les palmipèdes, quels que soient les tissus.

Cette analyse de cas spontanés d'IAHP H5 illustre les différences majeures observées entre les galliformes et les palmipèdes dans l'intensité de l'expression clinique et lésionnelle, dont les déterminants virologiques restent à préciser.

ABSTRACT

Clinical and pathological investigation of H5 highly pathogenic avian influenza in galliforms and waterfowl in south West France, 2015-2016

Ten field cases of H5 (i.e. H5N1, H5N2 or H5N9) Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) (i.e. 3 Guinea fowl flocks, 4 label chicken flocks, 2 mule ducks flocks and one geese flocks) were investigated during outbreaks in the south-west of France from November 2015 to January 2016, using histopathology, immunochemistry and molecular-based viral titration.

On each case, a complete clinical analysis was performed on farm. 5 dying birds were selected and necropsied. On each bird, gross lesions were recorded and tissues were sampled for histopathology, immunohistochemistry and viral load titration in tissues.

In gallinaceous species: the clinical picture was characterized by a mild to moderate increase in mortality, and almost no overall prostration of affected flocks. Cephalic subcutaneous edema, necrosis of comb or wattles, were observed in a small proportion of affected flocks. In waterfowl, clinical signs were mostly absent.

During necropsic examination, lesions of subcutaneous and pulmonary oedema with congestion, and splenomegaly, were inconsistently observed in chickens and Guinea pouls. The main microscopic lesions consisted in systemic cutaneous and visceral tissue hyperaemia, marked acute interstitial pneumonia with capillary thrombosis and heterophilic leukostasis, mild lymphocytic portal hepatitis, and non-specific reactive splenitis. Lesions were more severe in Guinea fowl than in chickens.

In ducks and geese in contrast, gross and microscopic lesions were mild or absent, suggesting a completely distinct pathological picture. Tissular viral RNA loads were globally much higher in galliforms than in waterfowl.

This investigation of spontaneous IAHP cases suggests major differences in clinical and lesional patterns in chickens vs waterfowl, which virological drivers are still to be investigated.

INTRODUCTION

Les virus influenza de type A sont les agents des gripes humaine et animales. De nombreux sous-types sont définis par deux glycoprotéines de surface : chaque virus influenza est ainsi caractérisé par la combinaison d'une des 16 hémagglutinines (H) et une des 9 neuraminidases (N) (Rott, 1992). Les virus susceptibles d'être hautement pathogènes pour la volaille appartiennent tous aux sous-types H5 ou H7, d'où l'intérêt particulier porté à ces derniers. Le génome de ces virus est constitué de 8 brins d'ARN qui peuvent se réassortir, en cas de co-infections. Ces échanges de gènes sont sans doute à l'origine de l'émergence de virus « pandémiques », redoutés chez l'homme et d'une manière générale, expliquent en grande partie le potentiel évolutif de ces virus. Les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP) présentent un tableau pathologique particulièrement sévère (Swayne et Halvorson, 2008). Dans ce contexte, l'émergence de virus hautement pathogènes (VIAHP) H5 en 2015 dans le Sud-Ouest de la France représente un épisode sanitaire d'une ampleur majeure, associé à des virus réassortants de sous-type H5N1, H5N2 et H5N9 (Briand et al, 2017). Une analyse clinique et pathologique comparée a été réalisée sur une sélection de 10 cas spontanés concernant des galliformes ou des palmipèdes. Ce travail s'est focalisé sur l'analyse des signes cliniques et du tableau pathologique, sans intégrer la composante épidémiologique.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Recrutement des cas et visites

Les lots inclus correspondaient à des foyers concernant des poulets labels (n=4), pintades (n=3), oies (n=1) ou canards mulards (n=2) ayant fait l'objet d'une suspicion clinique (galliformes et oies) ou analytique (canards) d'IAHP confirmée par le Laboratoire National de Référence pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle (Ploufragan - Plouzané). Les virus ont été typés en tant que H5N1, H5N2 ou H5N9 : l'effet du type de neuraminidase n'a pas été pris en compte à ce stade de l'étude pathologique. L'intervention sur le site était réalisée après autorisation des services compétents, en relation avec le(la) vétérinaire sanitaire ayant réalisé la suspicion et dans le respect des procédures de biosécurité, notamment le port d'équipements de protection individuelle et la mise en œuvre de procédures renforcées de nettoyage-désinfection à la sortie du foyer.

1.2. Etude clinique et lésionnelle et prélèvements

En première intention, l'ensemble du lot visité faisait l'objet d'un examen clinique complet. Pour les poulets, pintades et oies, 5 sujets présentant des signes cliniques très sévères étaient sélectionnés. Pour les canards, les animaux étaient sélectionnés aléatoirement. Dans tous les cas, les oiseaux prélevés ont été sacrifiés en vue d'une autopsie systématique et de prélèvements de tissus : sur chaque oiseau, les tissus suivants étaient prélevés et fixés immédiatement en solution de formol 10% tamponné ou dans un microtube contenant du Trizol®, permettant de fixer les acides nucléiques tout en inactivant l'agent infectieux : cœur, foie, rein, rate, trachée, poumon, pancréas, proventricule, gésier, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon, bourse de Fabricius, thymus, encéphale. Toutes ces opérations ont été réalisées sur le site, dans le respect des procédures de biosécurité prescrites sur les foyers IAHP.

1.3. Histopathologie et immunohistochimie

Pour l'analyse histologique, les prélèvements listés ci-dessus ont été fixés en formol tamponné à 10%, inclus en paraffine et soumis à une recoupe à 3µm. Après coloration à l'hémalum-éosine-safran, les lames étaient observées en microscopie optique.

Une sélection de lames a été soumise à une analyse par immunohistochimie, par marquage à l'aide d'un anticorps et révélation par immunoperoxydase, selon un protocole pratiqué en routine au Laboratoire d'histopathologie de l'ENVT (Corrand et al, 2012) : pré-incubation avec de la pronase 0,05%, incubation sur la nuit à 48°C avec l'anticorps primaire dirigé contre la nucléoprotéine des virus influenza A (anti-NP Argène 11-030, Biomérieux) dilué au 1/50^{ème}, rinçages et incubation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, puis application du chromogène, rinçages et lecture. Les lectures des lésions élémentaires et des immunomarquages ont été effectuées par 2 pathologistes vétérinaires diplômés du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire (ECVP).

1.4. Extraction des acides nucléiques et RT-PCR quantitative en temps réel

L'extraction des ARN a été réalisée à partir d'une masse de 10 mg de tissus à l'aide d'un kit commercial (Total RNA isolation, NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel), les acides nucléiques ont été élués dans 50µL d'eau nanopure puis conservés à -80°C.

Les réactions de RT-PCR temps réel ont été réalisées à l'aide d'amorces ciblant de gène M commun aux virus influenza A, selon un protocole de routine au laboratoire (Corrand et al, 2012). La charge virale

tissulaire a été ainsi exprimée en nombre de copies de gène M par mg de tissu.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Tableaux cliniques et lésions macroscopiques

Chez les galliformes, les oiseaux présentaient des signes cliniques très frustes, sans spécificité, de prostration agonique, avec une incidence faible à modérée : moins de 5% des sujets présentant des signes cliniques et moins de 1% de mortalité journalière au jour de la visite. Les lésions macroscopiques majeures et systématiquement observées (4/4 lots de poulets et 3/3 lots de pintade) étaient un œdème sous-cutané, notamment au niveau céphalique (Figure 1A), un œdème pulmonaire sévère associé à une congestion (Figure 1B), une splénomégalie quasiment systématique mais non spécifique (Figure 1C) et, sur quelques sujet d'un seul foyer, des hémorragies des glandes du proventricule (Figure 1D).

Chez les palmipèdes, les 2/2 lots inclus ne présentaient aucun signe clinique, ni augmentation de la mortalité, ni de lésion macroscopique d'intérêt diagnostique. Par contre, les 5 oies analysées présentaient des signes cliniques de prostration agonique et des lésions très sévères d'œdème sous-cutané et de splénomégalie.

2.2. Analyse des lésions microscopiques

Les principales lésions microscopiques étaient une pneumonie interstitielle aiguë marquée, des lésions de vasculite, avec thrombi, leucostase hétérophilique, hyperhémie cutanée (Figure 2D) et viscérale ; œdème et infiltration pulmonaire (Figure 2A et 2B), une hépatite portale modérée et une splénite non spécifique. Ces lésions semblaient plus sévères chez les pintades que chez les poulets, sans que l'on puisse en tirer un enseignement de portée générale. L'immuno-marquage par IHC des tissus à l'aide d'un anticorps anti-influenza A a révélé un marquage nucléaire et cytoplasmique intense, essentiellement dans les cellules endothéliales et les leucocytes circulants et ce, dans tous les tissus examinés, y compris en l'absence de lésion microscopique, comme cela est illustré dans le colon (Figure 2C).

2.3. Analyse des charges virales tissulaires

Pour comparer les charges virales tissulaires chez le poulet et le canard, une étude *préliminaire* a été réalisée sur 2 lots de poulets et 2 lots de canards, tous infectés par un VIAHP de sous-type H5N9. La figure 3 montre que les charges virales (exprimées en copies-équivalent génome/mg de tissus) observées dans le poumon, la rate, le tube digestif et l'encéphale chez le poulet sont globalement de l'ordre de 10^4 à

10^8 copies/mg de tissu, soit des charges supérieures d'un facteur 10^2 à 10^4 à celles observées chez les canards. Cette observation confirme les faibles charges tissulaires, associées à des lésions microscopiques minimales à modérées, observées chez les palmipèdes infectés par les virus H5Nx ayant circulé en France en 2015-2016.

CONCLUSION

L'analyse pathologique comparée des cas spontanés d'IAHP confirme les différences majeures entre les tableaux observés chez le poulet et le canard : les épanchements sous-cutanés et pulmonaires dominent chez les galliformes. L'analyse des lésions microscopiques confirme l'extension et l'intensité des lésions vasculaires. Les marquages illustrent l'ampleur remarquable de la réplication virale, quel que soit le tissu prélevé.

Chez les galliformes, la sévérité du tableau pathologique et les niveaux de charges virales très élevés contrastent avec la faible incidence relative des cas observés par comparaison avec la diffusion extrêmement forte dans les élevages de canards, ainsi que les niveaux de morbidité et mortalité très variables observés au sein d'un lot infecté (données non montrées).

Chez le canard mulard, à l'opposé, le tableau pathologique était, sauf exception, extrêmement fruste. Ces observations sont corroborées par les faibles charges virales détectées dans les tissus, aussi bien par immunomarquage que par les essais de PCR quantitative en temps réel dans les tissus.

L'émergence de VIAHP de sous-type H5N8 intervenu fin 2016 sur le territoire français suggère des différences drastiques du profil clinique et pathologique chez les palmipèdes : les signes cliniques à expression essentiellement nerveuse, associés à des charges virales extrêmement élevées sont caractéristiques de ce dernier sous-type.

Les déterminants du tropisme d'hôte et de la virulence de ces différents sous-types de VIAHP H5 seront des sujets d'étude particulièrement intéressants pour mieux comprendre les mécanismes d'adaptation de ces virus et ainsi, de mieux évaluer le risque d'évolution et d'émergence que représente la circulation des VIAHP ou de leurs précurseurs VIA faiblement pathogènes dans les élevages de palmipèdes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Briand FX. et al. Euro Surveill. 2017 Mar 2;22(9).
- Corrand L. et al. Avian Pathol. 2012 Dec;41(6):569-77.
- Rott, 1992. Vet. Microbiol. 33 : 303-310.

Swayne, D.E. et Halvorson, D.A. 2008. Influenza. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, & D.E. Swayne (Eds.). Diseases of

Poultry 12th edn (pp. 153-184). Ames: Blackwell Publishing.

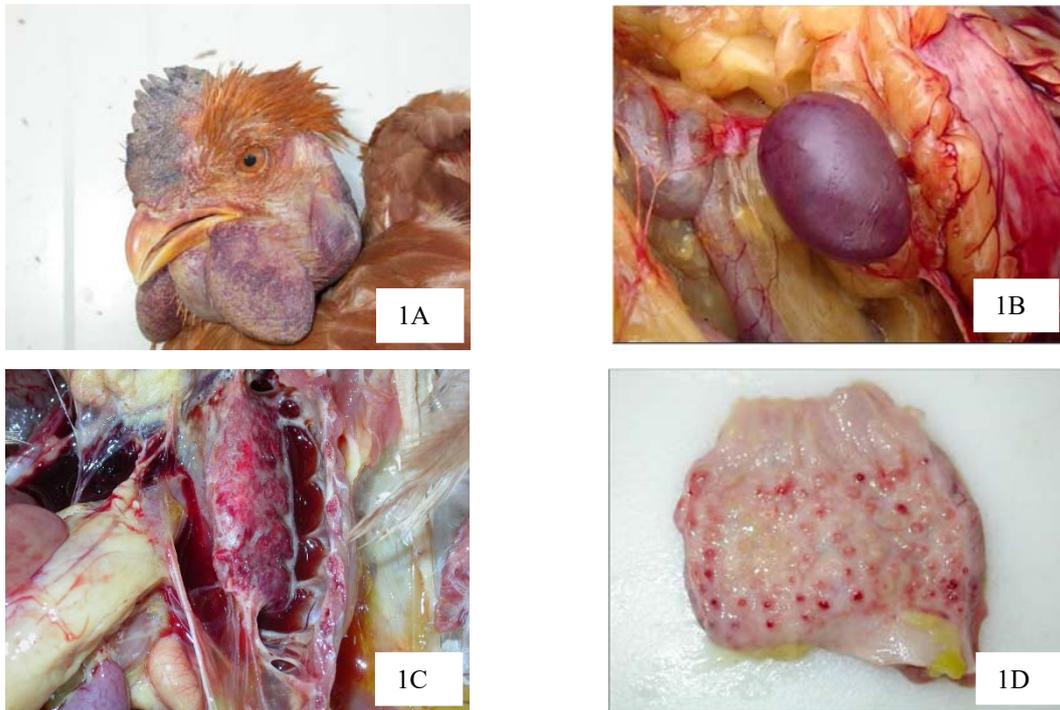


Figure 1 : Lésions macroscopiques majeures observées chez les galliformes infectés par les VIAHP H5Nx. (1A) lésions de nécrose et cyanose de la crête et des barbillons sur un coq ; (1B) Splénomégalie, systématique mais peu spécifique ; (1C) œdème et congestion pulmonaire très sévères ; (1D) nécrose hémorragique des glandes du proventricule.

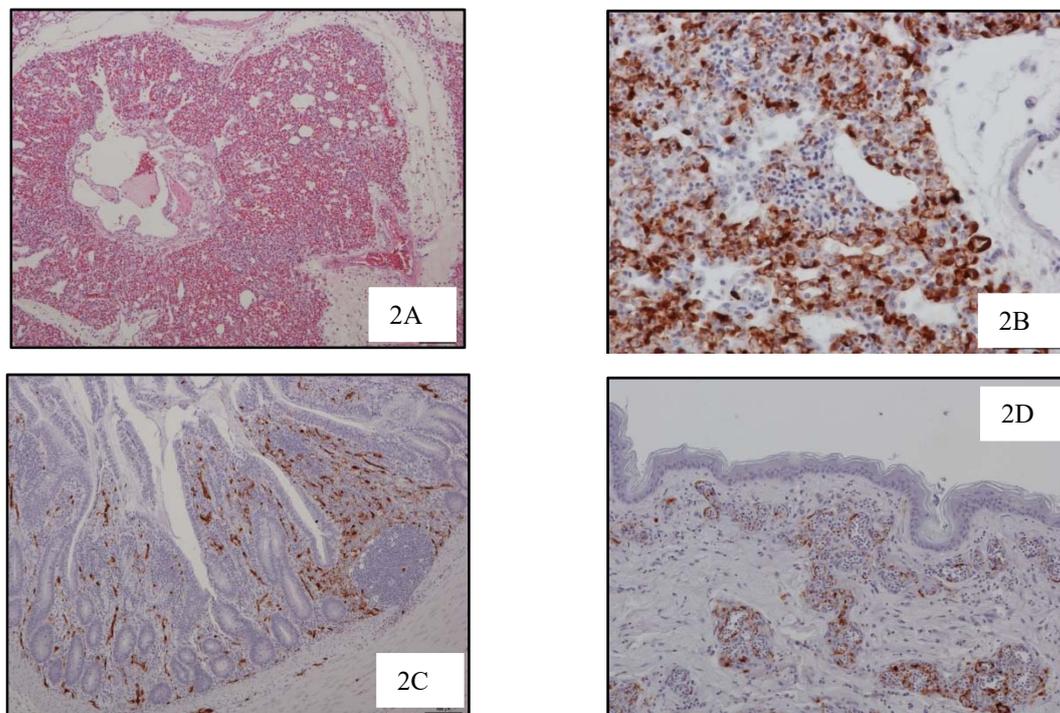


Figure 2 : Lésions microscopiques observées chez les poulets spontanément infectés : poumon (2A) : noter l'infiltration massive par des hétérophiles et des thrombocytes ; 2B : présence massive du virus (marron) dans le parenchyme pulmonaire ; 2C : le colon ne présente pas de lésion microscopique élémentaire mais on note cependant une intense répllication virale (antigènes viraux en marron) ; 2D : marquage viral des capillaires et de leucocytes dans la peau.

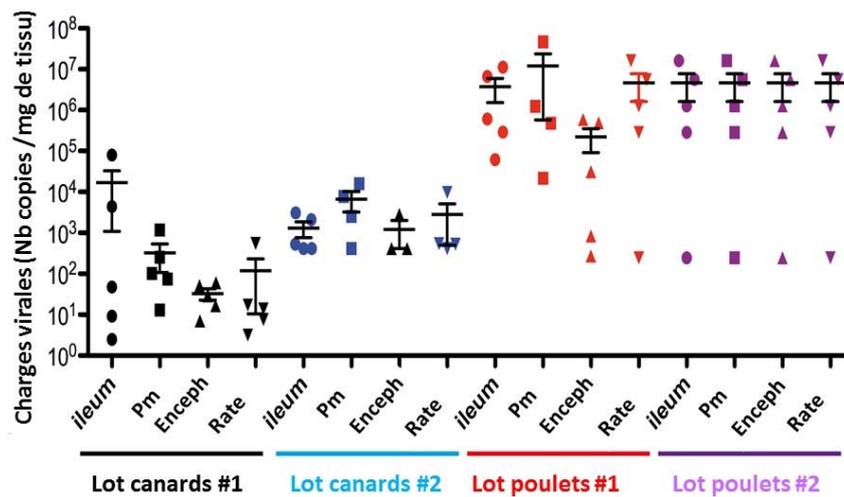


Figure 3 : charges virales (exprimées en équivalents copies génomes/mg de tissu) déterminées dans l'iléon, le poumon (Pm), l'encéphale (Enceph) et la rate de 2 lots de canards et 2 lots de poulets spontanément infectées par des VIAHP de sous-type H5N9. Pour chaque tissu et chacun des 5 sujets analysés, les charges individuelles sont exprimées, ainsi que la moyenne et l'écart à la moyenne.