

IMMUNITÉ NATURELLE VIS À VIS DES INFLUENZAVIRUS DE SOUS-TYPES H5 ET N1 DANS L'AVIFAUNE SAUVAGE FRANÇAISE EN 2006 ET 2007

Eric Niqueux¹, Olivier Guionie¹, Audrey Schmitz¹, Jean Hars² et Véronique Jestin¹

¹AFSSA, LERAPP, UVIPAC - BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN, ²ONCFS, Unité Sanitaire de la Faune - 5, allée de Bethléem - 38610 GIERES

RÉSUMÉ

Parallèlement et/ou consécutivement aux cas d'influenza aviaire H5N1 hautement pathogène (IAHP) survenus l'hiver 2006 dans la Dombes et l'été 2007 dans les étangs de Moselle, des prélèvements de sang ont été effectués chez des oiseaux sauvages apparemment sains afin d'évaluer le niveau d'immunité naturelle dirigée contre les sous-types H5 et N1. Ont été ainsi concernés 100 cygnes tuberculés de la Dombes en 2006, 46 canards colverts, 69 fuligules milouins et 59 cygnes tuberculés présents sur le domaine de Lindre en zone contaminée en 2007, ainsi que 60 cygnes tuberculés du lac du Der dans la Marne, zone distante d'environ 200 km plus à l'ouest, apparemment non contaminée en 2007. Les sérums ont été analysés par inhibition de l'hémagglutination (IHA) avec plusieurs antigènes H5 français et par ELISA N1.

En 2006 et 2007, le pourcentage de sérums positifs en IHA H5 était significativement plus élevé chez les cygnes (49% à 69%) que chez les deux autres espèces (27% à 28%). La prévalence globale des anticorps anti-N1 restait quant à elle moyenne (33% à 49%) et sans différence significative d'une espèce à l'autre. On pouvait néanmoins noter une association significative entre les réponses sérologiques dirigées contre H5 et contre N1, chez les populations de cygnes étudiées, quelles que soient l'année ou l'origine du prélèvement avec toutefois une différence dans le profil de réponse en IHA H5 selon l'origine. Ainsi les titres IHA moyens vis-à-vis d'un antigène H5N1 faiblement pathogène étaient significativement plus élevés que vis-à-vis d'un antigène H5N1 HP de 2006 pour les cygnes prélevés en zone non contaminée. Cette différence n'a pas été retrouvée pour les cygnes issus des zones contaminées en 2006 ou 2007. Tous ces résultats suggèrent l'existence, chez ces oiseaux sauvages aquatiques, d'une éventuelle immunité naturelle contre les virus influenza de sous-types H5 et N1 dont l'origine (infection inapparente, guérison, protection croisée à l'intérieur d'un même sous-type H5) reste à définir.

ABSTRACT

Highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) belonging to H5N1 subtype was detected in France for the first time in winter 2006 essentially in la Dombes wetlands, and in summer 2007 in Moselle wetlands. In these areas, apparently healthy wild birds were blood sampled during and/or following these outbreaks to assess the level of natural immunity against H5 and N1 subtypes. 100 mute swans were thus concerned in la Dombes in 2006. 46 mallards, 69 pochards and 59 mute swans were taken from the contaminated area of le Lindre domain in 2007, and 60 mute swans from the "lac du Der" (department of Marne), a westward area about 200 km away, apparently uncontaminated in 2007. For the present study, sera were analysed with hemagglutination inhibition (HI) tests using several French H5 antigens and with N1-specific ELISA technique.

In 2006 and 2007, mute swans showed the highest prevalence of positive sera in H5 HI tests (49% to 69%) compared to the other two species (27% to 28%). Whereas N1-specific antibodies were also present in all species tested, to a moderate overall frequency ranging from 33% to 49% of positive sera without statistically significant variation according to species, positive H5- and N1-specific antibody responses were significantly associated in each of the three populations of mute swans, irrespective of sampling year or of infection status in the area studied. However, a difference in mean HI titres was observed for H5 positive sera of mute swans, depending on the antigen used and the origin of the samples: HPAI-contaminated areas (either in 2006 or 2007) versus uncontaminated area. In the latter, mean HI titre against an H5N1 low pathogenic AIV was significantly higher than HI titre against an H5N1 2006 HPAIV antigen, whereas no difference could be shown for swans from contaminated areas. All of these serological results would suggest a possible acquired natural immunity against infection by AIV of subtypes H5 and N1 in these wild aquatic birds: several hypotheses (asymptomatic infections of wild birds, recovery, or cross-homosubtypic protection) might explain these observations.

INTRODUCTION

Depuis la première introduction en Europe de souches d'influenzavirus hautement pathogènes (HP) H5N1 durant l'été 2005, de nombreux épisodes de mortalité ont été décrits tant en élevage que dans l'avifaune sauvage les années suivantes (ADNS, ec.europa.eu/food/animal/diseases/adns/index.html). Du 16 février au 18 avril 2006, la France a connu 43 épisodes de mortalité due au virus H5N1 HP dont la quasi-totalité a concerné plus d'une soixantaine d'oiseaux sauvages (en majorité des cygnes tuberculés) dans la région de la Dombes. L'analyse phylogénique des souches isolées sur ces cas a révélé deux sous-groupes distincts (Le Gall-Reculé et al., 2008). En 2007, trois épisodes de mortalité survenus entre fin juin et début août ont également permis de mettre en évidence des infections à virus influenza H5N1 HP chez 7 oiseaux sauvages. Ces découvertes ont concerné deux zones voisines en Moselle : le domaine de Lindre près d'Assenoncourt pour le premier cas (sur 3 cygnes tuberculés immatures), et la commune de Diane-Capelle pour les suivants (sur 2 cygnes tuberculés, puis sur 2 canards colverts). La caractérisation moléculaire des souches isolées en 2007 a révélé leur étroite parenté entre elles et leur appartenance à un sous-clade également présent en Allemagne au même moment, distinct des virus présents en 2006, ce qui démontrait qu'une nouvelle introduction du virus s'était produite lors de ces événements (données non publiées).

Afin de préciser le mode d'introduction et de circulation des influenza virus H5 hautement et faiblement pathogènes dans la zone touchée, et de caractériser le statut immunitaire humoral des oiseaux sauvages présents, une étude sérologique s'intéressant aux réponses en anticorps spécifiques des antigènes de surface H5 et N1 des influenza virus a été conduite. Cette étude a porté sur un échantillon de trois espèces de Palmipèdes : cygnes tuberculés, fuligules milouins et canards colverts (ci-après désignés respectivement cygnes, milouins et colverts dans le texte), espèces infectées en 2006 et/ou 2007, considérées comme soit sentinelles soit vectrices potentielles (Keawcharoen et al., 2008). Les résultats sérologiques obtenus en 2007 en Moselle ont été comparés à des prélèvements effectués sur des cygnes provenant d'un site distant de 200 km et situé plus à l'ouest dans la Marne (hors de la zone de surveillance), et sur des cygnes prélevés dans la Dombes après les épisodes de 2006.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage et prélèvements

Du 29 mai au 16 juin 2006, soit 1,5 à 2 mois après le dernier cas de mortalité, 100 cygnes ont été prélevés sur plusieurs communes de la région de la Dombes. En 2007 sur le domaine de Lindre, commune

d'Assenoncourt en Moselle, contaminée par le virus H5N1 HP : 59 cygnes, 46 colverts et 69 milouins ont été prélevés entre le 8 août et le 21 septembre 2007. Cette période couvre les derniers cas de mortalité observés en 2007, et les trois semaines suivantes. En zone non contaminée en 2007, sur le lac du Der, commune d'Arrigny dans la Marne, 60 cygnes ont été prélevés entre le 10 et le 25 septembre 2007.

1.2. Analyses sérologiques

Chaque sérum exploitable (cf. figure 1 pour le nombre final n) a été soumis à deux types d'essais : des réactions d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) dirigées contre plusieurs antigènes H5 et un test ELISA spécifique de l'antigène N1.

Les tests IHA ont été réalisés d'après une transposition de la méthode normalisée AFNOR (2000). Les antigènes utilisés ont été ajustés à 4 unités hémagglutinantes, et le seuil de positivité fixé au titre de 4 \log_2 . Cinq antigènes inactivés dérivés de souches françaises de sous-type H5 ont été utilisés. Trois souches faiblement pathogènes (FP) possédant chacune un sous-type différent de neuraminidase ont été retenues : H5N1 A/duck/France/05066b/2005, H5N2 A/duck/France/05057b/2005 et H5N3 A/duck/France/02166/2002. Deux souches H5N1 HP isolées en 2006 A/common pochard/France/06167/2006, et en 2007 A/mute swan/France/070203tr/2007 ont été également testées. Les relations phylogéniques et les réactivités sérologiques croisées entre les trois souches FP ont été décrites par Cherbonnel et al. (2007). Les deux souches HP utilisées appartiennent à deux sous-clades distincts : le sous-clade 2.2.1 pour H5N1 HP 06167, et le sous-clade 2.2.3 pour H5N1 HP 070203tr (Hars et al., 2008 ; Le Gall-Reculé et al., 2008, et données non publiées).

Pour chaque sérum testé, l'interprétation conjointe des tests IHA H5 individuels permet de distinguer trois classes de réponses désignées par convention avec les abréviations suivantes dans le texte et les figures : négatif/H5 -, douteux/H5 ?, et positif/H5 + (cf. légende de la figure 1).

Les anticorps spécifiques anti-N1 ont été détectés par technique ELISA de compétition, en utilisant un kit commercial (ID-Vet, Montpellier, France) selon les recommandations du fabricant.

1.3. Analyses statistiques

Les comparaisons de fréquences observées (séroprévalence H5 et N1) ont été faites en appliquant des tests du χ^2 . χ^2_n désigne la valeur observée de la statistique à n degrés de liberté.

Les comparaisons de titres en IHA H5 entre les différents antigènes testés ont été étudiées par des tests de Student pour séries appariées. Dans ce cas, une correction de Bonferroni a été appliquée au risque de première espèce consenti ($\alpha=0,05$ sans correction ; $\alpha=0,05/10$ après correction) pour tenir compte des comparaisons multiples effectuées.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Fréquence de la séropositivité H5 dans les différentes populations d'oiseaux

La comparaison globale des fréquences observées des trois classes de résultats en IHA H5, a révélé une distribution différente entre les cinq populations d'oiseaux sauvages étudiées : $\chi^2=48,23$; $p<0,001$ (figure 1). Des comparaisons individuelles ont permis des réunions de populations d'oiseaux homogènes entre elles du point de vue de la distribution en résultats positifs, douteux ou négatifs. Ainsi, les deux populations de cygnes prélevés en 2007 dans l'Est de la France apparaissaient homogènes quant à leurs distributions de résultats en IHA H5, que les animaux proviennent de la région contaminée par H5N1 HP ou non. La troisième population de cygnes, provenant de la Dombes (région contaminée en 2006), présentait des résultats différents du groupe des cygnes prélevés en 2007 ($\chi^2=15,69$; $p<0,001$). Enfin, les deux autres espèces prélevées en 2007 en zone contaminée (colverts et milouins) constituaient également, du point de vue de la distribution en positifs, douteux, négatifs, un groupe homogène distinct des précédents ($\chi^2=37,03$; $p<0,001$ vs. cygnes prélevés en 2007, et $\chi^2=16,28$; $p<0,001$ vs. cygnes prélevés en 2006).

C'est ce regroupement des données obtenues en IHA H5 en trois groupes d'oiseaux (cygnes prélevés en 2006 en région contaminée, cygnes prélevés en 2007 en région indemne et contaminée, colverts et milouins prélevés en 2007 en région contaminée), visualisé par des accolades, qui a été conservé pour la comparaison des données dans la figure 1. Ainsi, chez les cygnes prélevés en 2007 quelle que soit leur origine, le pourcentage de séropositifs H5 est statistiquement significativement supérieur à celui observé chez les cygnes de la Dombes en 2006, lui-même significativement supérieur à celui observé chez les colverts et milouins en 2007. Chez ces derniers, la fréquence des individus dont la séropositivité H5 est douteuse est significativement supérieure par rapport aux autres populations précitées (figure 1).

Cette variabilité de la réponse en anticorps anti-H5 observée peut correspondre à une différence réelle du taux d'infection à influenza virus H5 chez ces différentes espèces, à une variabilité de virulence du virus ou de sensibilité de l'hôte ou à une différence quantitative ou qualitative du niveau de réponse immunitaire induite chez l'animal, ou bien à un délai d'investigation plus ou moins long après la fin de l'épisode de mortalité.

2.2. Titres en anticorps anti-H5 selon l'antigène utilisé dans les différentes populations

Cette séroprévalence forte chez les cygnes (de 49% à 69% selon l'année de prélèvement) ou modérée chez les milouins (27%) était associée à des profils communs de titres en IHA H5 pour chaque antigène (tableau 1). Ainsi, au sein de chacune des populations

d'oiseaux, la comparaison par paire des titres moyens a toujours permis d'identifier un ensemble de valeurs maximales de titres en IHA H5 comprenant systématiquement deux des antigènes H5N1 testés : la souche H5N1 HP 06167 isolée en 2006, et la souche H5N1 FP 05066b. Pour les cygnes prélevés en 2006, cet ensemble incluait également un troisième antigène H5 FP appartenant à un autre sous-type, H5N2 05057b. Contre toute attente, le troisième antigène H5N1, plus récent et dérivé d'une souche HP isolée en 2007, appartenait systématiquement au groupe de titres moyens les moins élevés.

Cependant, la comparaison des titres IHA élevés obtenus avec l'antigène H5N1 HP 06167 et l'antigène H5N1 FP 05066b a également permis de distinguer les populations d'oiseaux selon leur origine : pour les cygnes prélevés en 2007 sur le lac du Der en zone indemne, le titre IHA moyen obtenu avec l'antigène H5N1 FP était significativement plus élevé que celui obtenu avec l'antigène H5N1 HP de 2006. Pour les cygnes et milouins prélevés en zone contaminée par le virus H5N1 HP quelle que soit l'année, la même différence n'était pas statistiquement significative.

2.3. Fréquence de la séropositivité N1 dans les différentes populations

L'analyse des mêmes sérums par ELISA N1 a mis en évidence une séroprévalence modérée, de 33-36% (chez les colverts et les cygnes prélevés en 2007) à 49% (chez les milouins en 2007 et les cygnes en 2006). Cette variation observée n'était cependant pas significative ($\chi^2=7,81$; $p=0,099$), révélant une situation apparemment différente de celle observée pour la séroprévalence H5.

2.4. Réponse associée H5 et N1 dans les différentes populations

L'étude de l'association entre les réponses sérologiques vis-à-vis de l'antigène H5 et de N1 (figure 2) a permis de préciser et nuancer la conclusion précédente. Quels que soient l'année de prélèvement ou le statut épidémiologique de la région, la fréquence des sérums positifs en ELISA N1 dans les trois populations de cygnes étudiées était significativement plus élevée parmi les sérums H5 +. Aucune association des deux réponses sérologiques n'a pu être mise en évidence pour les milouins et colverts, populations prélevées toutes deux en 2007 en zone contaminée par l'influenza HP.

CONCLUSION

Cette étude a permis de comparer la réponse immunitaire humorale chez trois espèces d'oiseaux sauvages présentes en milieu contaminé ou non par les influenza virus H5N1 HP. La forte prévalence de la réponse dirigée contre l'antigène H5 et son association à la présence concomitante d'anticorps anti-N1 relevées chez les cygnes pourraient signaler l'existence d'une immunité naturelle acquise quels

que soient les sous-types (H5N1, H5Nx ou H5N1) ou le pathotype des virus en cause. Ainsi, bien qu'aucun influenza virus H5N1 HP n'ait été mis en évidence en 2006 et 2007 dans le cadre de la surveillance virologique des mêmes populations d'oiseaux sauvages, ce suivi a permis de caractériser en 2007 quatre virus H5 FP non-N1 et quatre virus non-H5 non-N1, montrant l'existence d'une circulation effective des influenza virus FP. La différence des profils de titres en IHA H5 entre zone contaminée ou non par un virus HP vient renforcer l'hypothèse que cette immunité puisse résulter d'une infection à H5N1 HP, après guérison ou infection inapparente. Une telle éventualité pourrait expliquer que l'évolution des infections en 2006 et 2007 a été différente tant en

France que dans les autres pays européens : à des épisodes de grande ampleur accompagnés de forte mortalité observés en 2006, a fait place en 2007 l'apparition de cas plus ponctuels. Ce constat de terrain mérite d'être rapproché de l'observation expérimentale d'une modulation de l'infection expérimentale chez le cygne par la présence préalable d'anticorps (Kalthoff et al., 2008). Dans ce contexte, une meilleure connaissance du niveau de la réponse immunitaire naturelle pré-existant au sein de l'avifaune sauvage serait précieuse pour modéliser la transmission du virus lors de son introduction dans un nouveau territoire et pour prévoir ses caractéristiques épidémiologiques.

Remerciements :

Pour le travail de capture des oiseaux et une partie des prélèvements sanguins, nous sommes redevables au personnel des services départementaux de l'ONCFS (01, 51 et 57) et du CNERA avifaune migratrice (dirigé par J.M. Boutin). Les laboratoires départementaux d'analyses de l'Ain, de l'Aube et de la Moselle ont réalisé les prélèvements sur les cygnes, le traitement et l'expédition des sérums. Nous remercions également C. Allée, C. Guillemoto, J. Lamandé, M.O. Le Bras et I. Pierre pour la réalisation technique des analyses sérologiques, ainsi que S. Bougeard, qui a contribué à l'analyse statistique des données.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 2000. NF U47-011 Juin 2000 (en cours de révision).
- Cherbonnel M., Lamandé J., Allée C., Schmitz A., Ogor K., Le Gall-Reculé G., Le Bras M.O., Guillemoto C., Pierre I., Picault J.P., Jestin V., 2007. Avian Dis., 50, 408-413.
- Hars J., Ruetz S., Benmergui M., Fouque C., Fournier J.Y., Legouge A., Cherbonnel M., Baroux D., Dupuy C., Jestin V., 2008. J. Wildlife Dis., 44, 811-823.
- Kalthoff D., Breithaupt A., Teifke J.P., Globig A., Harder T., Mettenleiter T.C., Beer M., 2008. Emerging Infect. Dis., 14, 1267-1270.
- Keawcharoen J., van Riel D., van Amerongen G., Bestebroer T., Beyer W.E., van Lavieren R., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Kuiken T., 2008. Emerging Infect. Dis., 14, 600-607.
- Le Gall-Reculé G., Briand F.X., Schmitz A., Guionie O., Massin P., Jestin V., 2008. Avian Pathol., 37, 15-23.

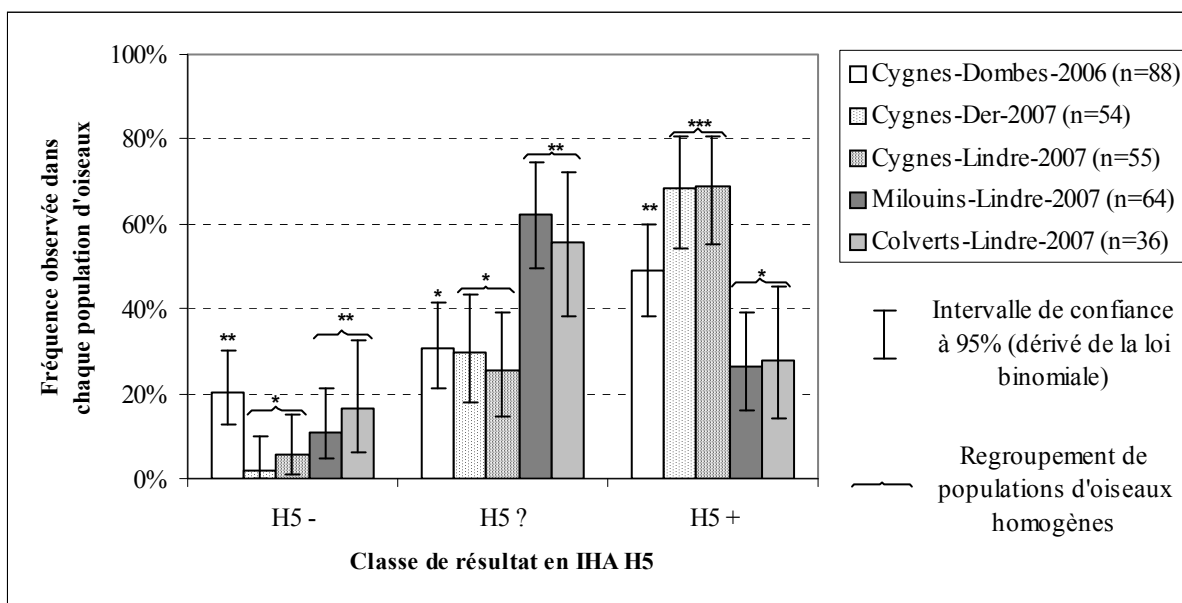
Tableau 1. Variation des titres en IHA H5 des sérums positifs en anticorps anti-H5 (H5 +) en fonction de l'espèce, de l'origine des sérums et de l'antigène utilisé.

	Nombre de sérums H5 + ^b	Titre IHA moyen +/- écart-type (exprimé en log ₂) ^a				
		H5N1 HP 06167	H5N1 FP 05066b	H5N2 FP 05057b	H5N3 FP 02166	H5N1 HP 070203tr
Cygnes Dombes-2006	36	5,6 +/- 2,3 ^{1 2}	5,6 +/- 1,3 ¹	5,4 +/- 2,6 ^{1 2}	4,8 +/- 1,6 ^{2 3}	4,2 +/- 2,2 ³
Cygnes Der-2007	34	6,2 +/- 0,9 ²	6,9 +/- 1,1 ¹	4,3 +/- 1,8 ⁴	5,2 +/- 0,9 ³	3,0 +/- 1,6 ⁵
Cygnes Lindre-2007	34	6,1 +/- 1,4 ¹	5,7 +/- 2,2 ^{1 2}	5,0 +/- 1,2 ^{2 3}	4,6 +/- 1,9 ³	2,9 +/- 2,5 ⁴
Milouins Lindre-2007	16	5,8 +/- 1,2 ¹	6,3 +/- 1,3 ¹	4,4 +/- 0,7 ^{2 3}	4,6 +/- 1,5 ²	2,8 +/- 1,9 ³
Colverts Lindre-2007 ^c	9	3,9 +/- 1,3	3,3 +/- 2,1	3,7 +/- 1,9	2,7 +/- 1,7	1,3 +/- 1,0

^a : au sein d'une même population d'oiseaux, les titres IHA moyens significativement différents l'un de l'autre sont notés par des exposants chiffrés différents. Pour chaque population, sont identifiés les ensembles de titres homogènes présentant les valeurs maximales (en trait plein) et minimales (en trait pointillé).

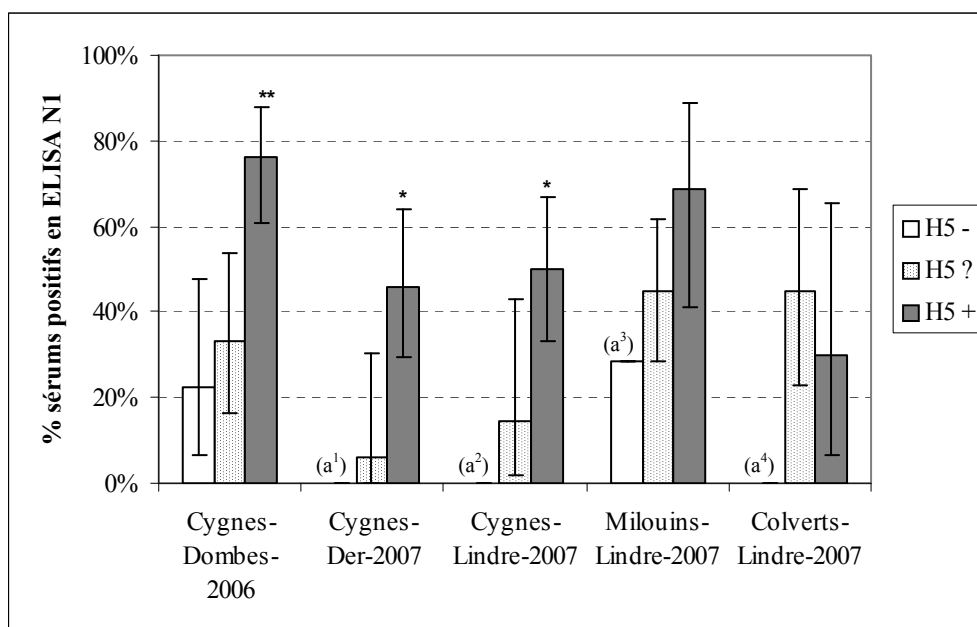
^b : seuls les sérums H5 + présentant des résultats en IHA interprétables pour l'ensemble des cinq antigènes testés ont été conservés dans ce tableau afin d'assurer la comparabilité des titres entre eux.

^c : compte tenu du faible nombre de sérums H5 + chez les colverts, aucune analyse statistique des données de titre moyen en IHA n'a été effectuée.

Figure 1. Comparaison des fréquences relatives des classes de résultats en IHA H5.

H5 -, H5 ?, H5 + : sérums respectivement négatifs vis-à-vis des cinq antigènes H5 utilisés, positifs ($\geq 4 \log_2$) vis-à-vis d'un seul sous-type N d'antigène H5 (ou H5 douteux), et positifs ($\geq 4 \log_2$) vis-à-vis d'au moins deux antigènes H5 de sous-types N différents.

Dans chaque classe de résultat, les histogrammes affectés du même nombre d'astérisques ne présentent pas de différence statistiquement significative entre eux.

Figure 2. Comparaison des séroprévalences en anticorps anti-N1 (détectés par ELISA N1) entre les différentes classes de résultats en IHA H5, pour chacune des cinq populations d'oiseaux étudiées.

H5 -, H5 ?, H5 + : cf. légende de la figure 1.

* : séroprévalence en anticorps anti-N1 des sérums H5 + significativement plus élevée que pour la classe H5 ?.

** : séroprévalence en anticorps anti-N1 des sérums H5 + significativement plus élevée que pour les classes H5 ? et H5 -.

(a^x) : pour la classe de résultat H5 - en IHA dans les populations d'oiseaux prélevées en 2007, les prévalences sont estimées sur de faibles effectifs (a¹, n=1 ; a², n=3 ; a³, n=7 ; a⁴, n=6). Pour cette raison, ces classes n'ont pas fait l'objet d'exploitation statistique (intervalle de confiance et tests de comparaison de fréquences).