

# MISE EN EVIDENCE DE REASSORTIMENTS MULTIPLES CHEZ LES INFLUENZAVIRUS DE SOUS TYPE H5 FAIBLEMENT PATHOGENES FRANÇAIS ENTRE 2002 ET 2008

**F-X. Briand, G. Le Gall-Reculé, A. Bluteau, C. Guillou-Cloarec, K. Ogor, C. Macé, S. Ferré, A. Schmitz, O. Guionie, P. Massin, J. Lamandé, C. Allée, M. Cherbonnel, J-P. Picault, V. Jestin**

*AFSSA Site de Ploufragan-Plouzané, BP53, 22440, Ploufragan, Unité de Virologie  
Immunologie Parasitologie, Aviaires et Cunicoles*

## RESUME :

Les virus d'influenza aviaire (AIV) de sous-type H5 faiblement pathogènes (FP) ont la capacité de devenir hautement pathogènes pour les oiseaux, ce qui peut entraîner de sérieuses pertes économiques pour la filière avicole, menacer certaines espèces ou lignées rares d'oiseaux, outre le risque de transmission à l'homme et à d'autres mammifères. La surveillance permanente de l'évolution des AIV détectés chez les volailles et les oiseaux sauvages est donc nécessaire. Pour cela, nous avons séquencé puis analysé le génome entier (constitué de 8 gènes codant 11 protéines (PB2, PB1/PB1-F2, PA, HA, NP, NA, M1/M2 et NS1/NS2) de 10 AIV FP (2 H5N1, 3 H5N2 et 5 H5N3) isolés en France entre 2002 et 2008 sur des canards appelants, des canards d'élevage ainsi que sur des poulets. Les séquences de chacun des 8 gènes ont été comparées avec celles disponibles dans les bases de données. L'analyse phylogénique a été réalisée en utilisant les méthodes de Neighbor Joining et de Maximum de Vraisemblance pour l'identification de groupes monophylétiques sur chacun des gènes. Tous les gènes appartiennent bien à la lignée eurasiennne des AIV et ont une origine commune avec des AIV italiens, néerlandais, danois ainsi que quelques virus asiatiques. Pour chacun des gènes étudiés (excepté M) au moins 2 groupes phylogéniques ont été identifiés. Plusieurs caractéristiques spécifiques ont été trouvées au niveau protéique, comme l'insertion d'un acide aminé en position C-terminale du PB1 de 3 H5 isolés de canards mulards, la présence de PB1-F2 tronquée chez un virus H5N2 isolé de poulet, ou encore l'insertion de 8 acides aminés en position C-terminale du NS1 chez un virus H5N1 isolé de canard mulard. Il est prévu d'étudier l'impact de ces particularités génétiques sur la pathogénicité et la contagiosité de ces souches virales. De plus, les nombreux réassortiments identifiés entre les virus isolés confirment la fréquence élevée des réassortiments déjà décrite pour les influenza virus. Ce résultat révèle aussi la présence de multiples co-circulations d'AIV, augmentant ainsi la probabilité d'apparition d'AIV potentiellement pathogènes pour les volailles.

## ABSTRACT :

H5 low pathogenic avian influenza (LPAI) virus has the potential to become highly pathogenic for birds which poses serious problems in both animal and public health. Surveillance and characterisation of AIV in wild and domestic species is a necessity. So, we sequenced and analysed the entire genomes (constituted of 8 genes coding to 11 proteins PB2, PB1/PB1-F2, PA, HA, NP, NA, M1/M2 and NS1/NS2) of 10 LP AIV (2 H5N1, 3 H5N2 and 5 H5N3) isolated in France between 2002 and 2008 from decoy ducks, domestic ducks and chicken. Sequences of each gene segment were compared with those available in databases. The phylogenetic trees were inferred using MEGA3.1 for the Neighbor-Joining analysis and PhyML for the Maximum Likelihood analyses to identified monophyletic groups for each gene. All genes studied belonged to avian Eurasian lineage and had a common ancestor with Italian, Dutch, Danish, and few Asiatic AIV. Inside avian Eurasian lineage, at least 2 groups were identified for each 8 genes except to M. Several characteristics were identified at protein level, like the insertion of 1 amino acid in C-terminal of PB1 of 3 H5 mule duck isolates. The PB1-F2 protein of a H5N2 chicken isolate was truncated, and for a H5N1 mule duck isolate, we showed the insertion of 8 amino acids in the NS1 gene. We plan to study the impact of these genetic characteristics on the viral pathogenicity and contagiousness. In addition, the many reassortants identified between the isolated viruses confirm the high frequency of the phenomenon already described for influenza viruses. This result reveals the presence of multiple cocirculations of AIV, increasing consequently the probability of appearance of potentially pathogenic AIV for poultry.

## 1. INTRODUCTION

Les oiseaux aquatiques sont le réservoir des Influenzavirus aviaires (AIV). Ces virus peuvent posséder 16 hemagglutinines ainsi que 9 neuraminidases différentes (Fouchier et al., 2005). Leur génome est segmenté en 8 brins d'ARN négatifs codant pour 11 protéines. L'évolution génétique de ces virus peut avoir différentes causes incluant des mutations, des insertions, des délétions, et des réassortiments (Webster et al., 2007). Les mutations sont dues aux erreurs engendrées par le complexe polymérase au cours de la réplication. Ces mutations peuvent résulter d'une pression de sélection exercée par la présence d'une réponse immunitaire vaccinale (Escoria et al., 2008). Des insertions peuvent également être observées. C'est le cas lors de l'addition, dans le site de clivage de la protéine HA, d'acides aminés polybasiques permettant notamment aux virus de sous-types H5 ou H7 faiblement pathogènes (FP) de devenir hautement pathogènes. Par ailleurs, des délétions sont observées sur la neuraminidase lors de l'adaptation du virus aux volailles domestiques (Matrosovich et al., 1999). Enfin, le dernier phénomène pouvant faire évoluer les Influenzavirus provient de leur capacité à se réassortir entre eux. En effet, lorsque plusieurs Influenzavirus infectent un même hôte, les virus résultants de ces co-infections peuvent partager des gènes des différents virus parents, phénomène ayant par exemple généré les virus pandémiques (Kawoka et al., 1989).

L'infection par des virus H5 ou H7 peut être asymptomatique mais elle peut également entraîner des symptômes non négligeables en cas de co-infections avec d'autres agents pathogènes. De plus, du fait de leur capacité à devenir hautement pathogènes, la présence des virus H5 ou H7 FP chez les volailles est indésirable et fait l'objet d'une réglementation internationale (Code sanitaire pour les animaux terrestres OIE, Directive du conseil européen 2005/94/CE). La surveillance et la caractérisation des AIV FP des sous-types H5 et H7 chez les oiseaux sauvages ainsi que chez les oiseaux captifs à vocation commerciale ou non, est donc essentielle pour mieux appréhender leur évolution génétique. Dans ce contexte nous avons analysé les génomes entiers de 10 Influenzavirus aviaires FP de sous-types H5 isolés chez des canards appelants (surveillance active), des canards ainsi que chez des poulets d'élevage, pendant une période de 6 années entre 2002 et 2008.

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1 Virus et multiplication

Cette étude a été réalisée sur 10 AIV FP H5 isolés entre 2002 et 2008 en France : 1 provenant de poulets d'élevage, 2 de canards appelants, 5 de canards mulards « prêt à gaver » et 1 de canards de barbarie reproducteur. Ces 10 AIV se répartissent en 3 sous-

types différents H5N1(2), H5N2(3) et H5N3(5). Les virus ont été multipliés sur des œufs embryonnés exempts d'organismes pathogènes spécifiés de 9 jours à partir de surnageant d'écouvillons cloacaux ou trachéaux inoculés par voie allantoïdienne et identifiés par inhibition de leur activité hémagglutinante (référence NF U 47-011) et neuraminidase à l'aide d'antisérums de référence selon les recommandations internationales.

### 2.2 RT-PCR et séquençage

L'ARN génomique des AIV a été extrait à partir de 200µL de liquide allantoïdien en utilisant le Kit « Rneasy mini Kit » (QIAGEN, Hilden, Germany). L'ADN complémentaire (ADNc) a été obtenu grâce à la Superscript II (Invitrogen) en utilisant soit des hexamères soit des amorces spécifiques des segments d'Influenzavirus. Les différentes PCR ont été réalisées à l'aide d'une polymérase haute fidélité (Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen). Pour les gènes PB2, PB1 et PA, les amplicons ont été réalisés grâce à deux PCR chevauchantes (Li et al., 2007). Les autres segments d'ADNc ont été amplifiés en une seule PCR à l'aide d'amorces PCR définies au laboratoire. Le séquençage a été réalisé en utilisant le kit du « Big dye terminator v3.1 » (Applied Biosystem) en suivant les instructions du fabricant. Les alignements des séquences obtenues ont été effectués avec ClustalW 1.83 (Higgins et Sharp, 1988).

### 2.3 Phylogénie et génotypage

Une première analyse phylogénique regroupant des séquences porcines, humaines, équine et aviaires des lignées américaine et eurasienne, a été réalisée pour déterminer la lignée d'appartenance de tous les gènes. Une fois cette étape effectuée, les arbres phylogéniques basés uniquement sur des virus de la lignée aviaire ont été réalisés avec MEGA3.1 en utilisant la méthode de Neighbor-Joining et confirmés par la méthode de Maximum de vraisemblance (PhyML). Environ 250 séquences de gènes entiers de souches eurasiennes ont été sélectionnées. Parmi les souches H5N1 HP et H9N2 asiatiques très largement représentées seules quelques souches ont été sélectionnées. L'étape suivante a été de déterminer à quel groupe génétique s'apparentait chacun des gènes étudiés. Pour cela 12 souches eurasiennes entièrement séquencées partageant avec les souches H5 FP françaises étudiées au moins deux gènes appartenant aux groupes génétiques identifiés ont été choisies comme souches de « référence ». L'identification des groupes a été validée par des valeurs de bootstrap >75% et confirmée par l'analyse statistique P-value avec  $p > 0.01$  (ML). Pour mieux visualiser les réassortiments et la filiation des virus étudiés, chacun

des gènes de chaque groupe génétique a été identifié par la symbole du virus de référence le plus ancien du groupe. Par exemple pour le gène PB2 (Figure 1), tous les virus possédant un gène appartenant au groupe de la souche de référence A/chicken/Italy/5093/99 seront représentés en gris clair sur la représentation schématique par des génotypes (Figure 2).

### 3. RESULTATS

#### 3.1 Phylogénie

Tous les gènes étudiés appartiennent à la lignée aviaire eurasiennne des influenza virus. Le résultat de l'étude phylogénique a montré que pour chacun des gènes autres que M d'AIV FP de sous-type H5 isolés en France, au moins 2 groupes génétiques étaient identifiés. A titre d'exemple, la Figure 1 représente l'arbre phylogénique obtenu avec les gènes PB2 dans lequel les souches françaises se répartissent dans 2 groupes distincts. Concernant les gènes NS, les 2 types d'allèles A et B ont été mis en évidence. Nous avons également montré que les AIV FP français avaient une origine commune avec des AIV italiens, néerlandais, danois ainsi que quelques virus asiatiques. Cependant, la répartition des séquences dans les différents groupes génétiques composant les arbres réalisés pour chacun des 8 gènes était très différente. Ainsi, la représentation schématique des différents virus selon leur génotype montre que sur les 10 virus français et les 12 virus eurasiens de « référence », seuls 3 possèdent le même génotype (Figure 2). Ces 3 virus sont de sous-type H5N3 et ont été isolés en France, à 3 mois d'intervalle. 2 ont été isolés à partir d'écouvillons issus de canards appelants dans le nord et l'ouest de la France et 1 sur des canards de barbarie reproducteurs dans l'ouest de la France.

#### 3.2 Caractérisation moléculaire

Des caractéristiques plus ou moins originales ont été trouvées sur les gènes PB1, NA, M2 et NS au niveau nucléotidique comme au niveau protéique (Tableau 1). Ainsi, l'ajout d'une glutamine en position C-terminale a été identifié chez 3 des 10 PB1 étudiés. Il a également été constaté que la protéine PB1-F2 de la souche A/chicken/France/03426/03 était tronquée et au lieu d'avoir une taille supérieure à 78 acides aminés (aa), elle ne possédait que 11 aa. Le gène de la neuraminidase de la souche poulet H5N2 03426 présentait une délétion de 19 aa dans sa partie N-terminale en cohérence avec son adaptation au poulet. Concernant le gène M2 très conservé, une mutation (I28V) a été observée pour la souche H5N1 05066b. Une autre caractéristique a également été mise en évidence sur cette souche : la protéine NS1 déduite de la séquence nucléotidique était en effet plus longue de 8 aa en position C-terminale. Par

ailleurs, la mutation A42S a été observée au niveau du gène NS1 des 6 souches du allèle A.

### 4. DISCUSSION / CONCLUSIONS

Le séquençage des 10 génomes complets de 10 influenza virus aviaires faiblement pathogènes de sous-types H5 isolés en France entre 2002 et 2008 a permis de caractériser génétiquement ces virus et de mettre en évidence des événements de réassortiments. Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence de réassortiments avec les virus HP H5N1 des sous-clades 2.2.1 et 2.2.3 de la lignée asiatique « Qinghai » qui étaient présents respectivement en France lors des deux introductions en 2006 et en 2007.

Cette étude a montré l'existence de nombreux génotypes chez les souches européennes et notamment chez les virus de sous-types H5 FP. Cependant, aucun des 8 génotypes (combinaison de 8 gènes chacun appartenant à un groupe bien identifié) français caractérisés n'a été mis en évidence chez les souches étrangères prises comme « référence ». L'analyse d'un plus grand nombre de souches eurasiennes pourrait nous permettre de confirmer l'éventuelle spécificité des différents génotypes français. Malgré la diversité des génotypes identifiés, beaucoup d'AIV possédaient des gènes partagés par plusieurs autres virus montrant ainsi le nombre important de réassortiment génétique qui ont eu lieu et confirmant la fréquence élevée de ce phénomène chez les influenza virus (Campitelli et al., 2008, Macken et al., 2006). Par ailleurs, les 8 virus H5 FP français provenant d'oiseaux en contact avec l'avifaune sauvage (canards appelants ou d'élevage plein-air) ainsi que le virus isolé de poulets d'un élevage revendeur multi-espèces, possédaient des gènes d'origine commune avec ceux caractérisés chez des espèces sauvages. Ces résultats confirment l'existence de multiples co-circulations et co-infections virales au sein des populations d'oiseaux, augmentant ainsi la probabilité d'apparition d'AIV potentiellement pathogènes pour les volailles d'élevage. Il serait important d'étudier l'implication des particularités moléculaires décrites dans cette étude sur certains AIV français, notamment en termes de pathogénicité et de contagiosité. Ces travaux vont être menés à l'AFSSA Site de Ploufragan en recourant à la technique de génétique inverse et à la possibilité de procéder à des tests *in vivo* en animalerie protégée. Ainsi, en l'absence de données et alors que d'autres souches eurasiennes possèdent cette caractéristique, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'ajout d'une glutamine en position C-terminale de PB1. Par ailleurs, le rôle chez un AIV isolé de poulet d'une PB1-F2 de 11 aa, caractéristique plutôt spécifique de certains virus porcins (Zell et al., 2007), de même que la présence d'une NS1 plus longue de 8 aa compte tenu du rôle de la taille de cette protéine dans le pouvoir pathogène (Dundon et al., 2006), méritent d'être étudiés. Il en est de même pour les

mutations ponctuelles d'aa relevées dans certaines protéines.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Campitelli, L., Di martino, A., Spagnolo, D., Smith, J.D., Trani, L.D., Fachini, M., De marco, M.A., Foni, E., Chiapponi, C., Martin, A.M., Chen, H., Guan, Y., Delogu, M., Donatelli, I. 2008. J Gen Virol, 89, 48-59
- Dundon, W.G., Milani, A., Cattoli, G., Capua, I. 2006. Virus Res, 119(2), 171-176
- Escoria, M., Vasquez, L., Mendez, S., Rodriguez-Ropon, A., Nava, G. 2008. Virology Journal, 5, 15
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus A.D. 2005. J Virol, 79, 2814-2822.
- Higgins, D.G. and Sharp, P. M. 1988. Gene 73, 237-244.
- Kawoka, Y., Krauss, S., Webster, R.G. 1989. J Virol, 63, 2189-2191.
- Macken, C.A., Webby, R.J., Bruno, W.J. 2006. J Gen Virol. 87, 2803-2815.
- Matrosovich, M., Zhou, N., Kawoka, Y., Webster, R.G. 1999. J Virol. 73(2), 1146-1155
- Li, O.T., Barr, I., Leung, C.Y., Chen, H., Guan, Y., Peiris, J.S., Poon, L.L. 2007. J Virol Methods, 142, 218-222
- Webster, R.G., Krauss, S., Hulse-Post, D., Sturn-Ramirez, K. 2007. J Wildlife Diseases, 43(3)
- Zell, R., Krumbholz, A., Eitner, A., Krieg, R., Halhuber, K.J., Wutzler P. 2007. J Gen Virol, 88, 536-546.

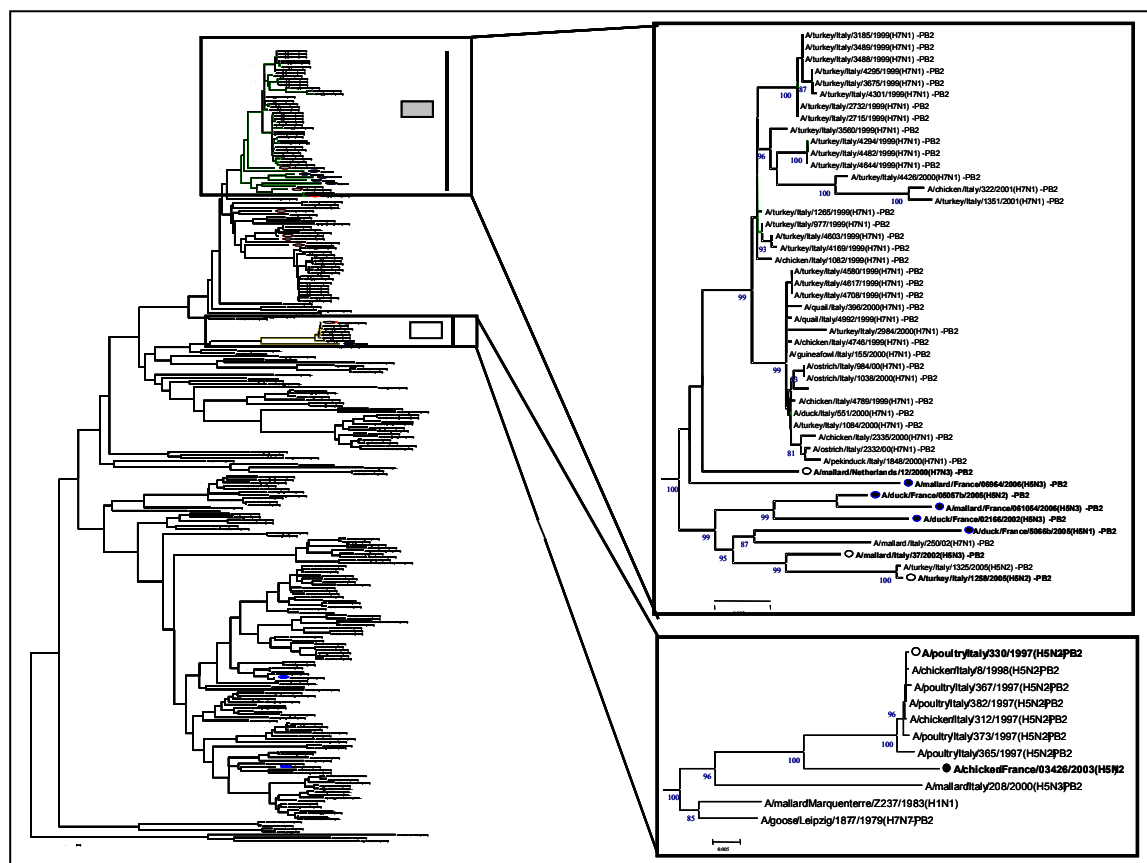


Figure 1: Représentation phylogénique basée sur les nucléotides 1 à 2266 du gène PB2 permettant de déterminer les différents groupes génétiques. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 75% sont indiquées. Les séquences des virus français sont marquées par un rond noir et les séquences eurasiennes de références sont marquées d'un rond blanc. Les branches d'un même groupe sont identifiées par un même symbole.

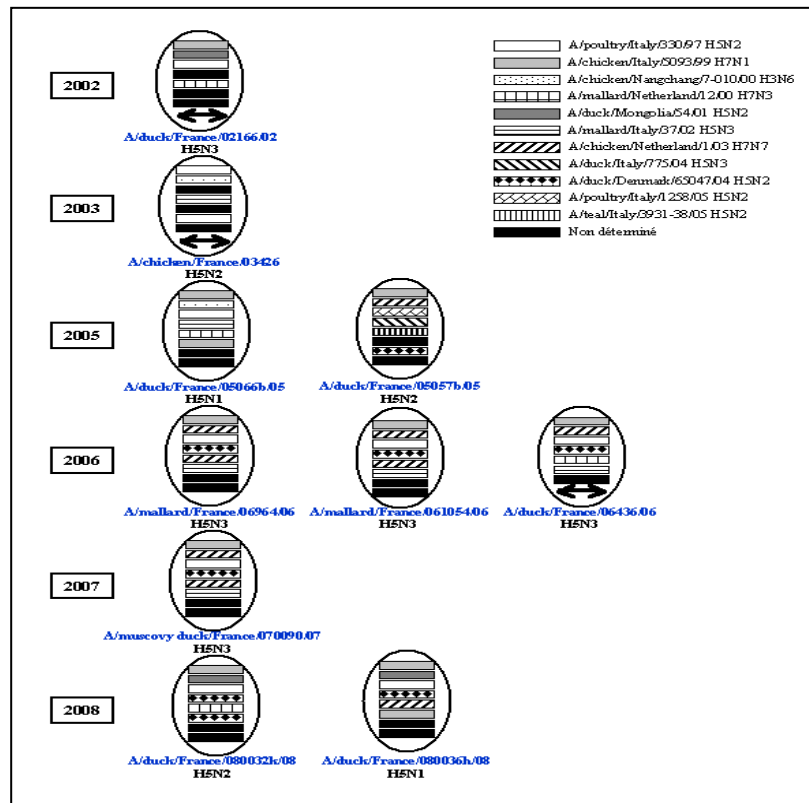


Figure 2 : Représentation schématique des différents génotypes identifiés en se basant sur les regroupements phylogéniques des H5 FP français et des souches eurasiennes de références. Les 8 gènes (représentés par des barres horizontales et de bas en haut) sont PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M et NS (quand NS appartient au type d'allèle B, la barre horizontale est remplacée par une flèche). Chaque symbole correspond à une lignée de virus. Les segments noirs représentent des gènes appartenant à des clades non déterminés.

Tableau 1 : Caractéristiques moléculaires des Influenzavirus de sous-type H5 faiblement pathogènes français isolés entre 2002 et 2008.

Références virus	Hôtes	Année d'isolement	Localisation	Sous-type	Taille PB1 (aa)	Taille PB1-F2 (aa)	Deletion NA	M2	Allèle NS	Taille NS1 (aa)	NS1
<b>02166</b>	Canards Mulard	2002	Ouest	H5N3	<b>758*</b>	90	-		B	230	
<b>03426</b>	Poulets	2003	Ouest	H5N2	757	<b>11</b>	<b>63-81</b>		B	230	
<b>05057b</b>	Canards Mulard	2005	Ouest	H5N2	757	90	-		A	230	<b>A42S</b>
<b>05066b</b>	Canards Mulard	2005	Ouest	<b>H5N1</b>	757	90	-	<b>I28V</b>	B	<b>238</b>	
<b>06436</b>	Canards Mulard	2006	Ouest	H5N3	757	90	-		B	230	
<b>06964</b>	Colvert appelant	2006	Ouest	H5N3	757	90	-		A	230	<b>A42S</b>
<b>061054</b>	Colvert appelant	2006	Nord	H5N3	757	90	-		A	230	<b>A42S</b>
<b>070090b</b>	Canards Barbarie	2007	Ouest	H5N3	757	90	-		A	230	<b>A42S</b>
<b>080032</b>	Canards Mulard	2008	Ouest	H5N2	<b>758*</b>	90	-		A	230	<b>A42S</b>
<b>080036</b>	Canards Mulard	2008	Ouest	<b>H5N1</b>	<b>758*</b>	90	-		A	230	<b>A42S</b>

\* Addition d'une glutamine en C-Terminal.