



**HAL**  
open science

## **Expérimentation de vaccination des canards mulards en élevage contre un virus influenza aviaire hautement pathogène A(H5N1) clade 2.3.4.4b**

Béatrice Grasland, Audrey Schmitz, Éric Niqueux, Rachel Busson, Nadège Morin, Carole Guillemoto, Angéline Orosco, Florent Souchaud, Stéphanie Bougeard, François-xavier Briand, et al.

### **► To cite this version:**

Béatrice Grasland, Audrey Schmitz, Éric Niqueux, Rachel Busson, Nadège Morin, et al.. Expérimentation de vaccination des canards mulards en élevage contre un virus influenza aviaire hautement pathogène A(H5N1) clade 2.3.4.4b. Anses; ENVT. 2023, 30 p. <hal-04158032>

**HAL Id: hal-04158032**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04158032v1>**

Submitted on 10 Jul 2023

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.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0 - Attribution - Non-commercial use - No Derivative Works - International License

Expérimentation de vaccination des  
canards mulards en élevage contre un  
virus influenza aviaire hautement  
pathogène A(H5N1) clade 2.3.4.4b

Rapport intermédiaire :

« *Evaluation expérimentale de la protection  
clinique et de l'excrétion virale* »

**B. Grasland, A. Schmitz, E. Niqueux, R. Busson, N. Morin,  
C. Guillemoto, A. Orosco, F. Souchaud, , S. Bougeard, FX.  
Briand, C. Martenot, M. Cherbonnel, P. Massin, N. Rose,  
K. Louboutin, I. Pierre, M. Amelot, M. Delpont, L.  
Pouvelle, S. Soubies, A. Keita, J-L. Guérin, N. Eterradosi**

07 avril 2023

Table des matières

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCTION .....   | 4  |
| 2. MATERIELS ET METHODES .....  | 6  |
| 2.1. Règlementation et éthique .....                                  | 6  |
| 2.2. Protocole des essais de vaccination en condition terrain .....   | 6  |
| 2.2.1. Organisation générale des essais .....                         | 6  |
| 2.2.2. Vaccins .....  | 7  |
| 2.2.3. Mise en œuvre de la vaccination .....                          | 7  |
| 2.2.4. Suivi technique et sanitaire .....                             | 7  |
| 2.2.5. Suivi vétérinaire -analyses sérologiques et moléculaires ..... | 8  |
| 2.3. Protocole expérimental en animalerie .....                       | 8  |
| 2.3.1. Transfert et hébergement des animaux .....                     | 8  |
| 2.3.2. Virus d'épreuve .....  | 9  |
| 2.3.3. Répartition des animaux .....                                  | 9  |
| 2.3.4. Evaluation de la clinique .....                                | 10 |
| 2.3.5. Sérologie .....  | 10 |
| 2.3.6. Quantification des charges génomiques virales .....            | 11 |
| 2.3.7. Analyses statistiques .....                                    | 11 |
| 3. RESULTATS .....  | 12 |
| 3.1. Essais terrain : résultats techniques et sanitaires .....        | 12 |
| 3.1.1. Données techniques – innocuité .....                           | 12 |
| 3.1.2. Surveillance moléculaire .....                                 | 13 |
| 3.2. Essais terrain : cinétique sérologique .....                     | 13 |
| 3.3. Infections expérimentales : clinique .....                       | 15 |
| 3.4. SEROCONVERSION .....   | 15 |
| 3.4.1. Séroconversion après épreuve à 7 semaines d'âge .....          | 16 |
| 3.4.2. Séroconversion après épreuve à 11 semaines d'âge .....         | 21 |
| 3.4.3. Excrétion après épreuve à 7 semaines d'âge .....               | 24 |
| 3.4.4. Excrétion après épreuve à 11 semaines d'âge .....              | 26 |
| 4. CONCLUSION .....   | 28 |
| 5. REMERCIEMENTS .....  | 29 |
| 6. REFERENCES .....   | 30 |



## 1. INTRODUCTION

La France a connu cinq épizooties d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) depuis la saison hivernale 2015-2016. En 2016-2017, l'épizootie a été provoquée par un virus de sous-type A (H5N8) du clade 2.3.4.4 b de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996 (Briand et al., 2018). Des virus appartenant à ce clade provoquent depuis la fin 2020 de nouvelles vagues d'épizooties d'IAHP successives chaque hiver en Europe, et la France est particulièrement touchée (Briand et al., 2022). Ces crises sanitaires ont généré des coûts considérables pour l'Etat et les professionnels. Par exemple, pour l'hiver 2021-2022, au 10 juin 2022, la France a déclaré 1378 foyers d'IAHP en élevage, 51 cas en faune sauvage et 35 cas en basse-cour suite à des infections par des virus IAHP A (H5N1), et plus particulièrement dans l'ouest (sud-ouest et grand-ouest) de la France, avec une majorité des élevages qui hébergeaient des palmipèdes. Les coûts de cette épizootie 2021-2022 ont été estimés à plus d'un milliard d'euros (Le Boulch and Bouzidi, 2022) avec l'abattage de 21 millions de volailles en France représentant 37% du total au niveau européen.

Le caractère épizootique de l'influenza aviaire, notamment liée aux virus du clade 2.3.4.4.b, s'est manifesté dans plusieurs pays d'Europe, conduisant le Conseil de l'Union Européenne, au cours de la Présidence française, à envisager des nouveaux leviers d'action pour prévenir et contrôler l'IAHP en élevage. La publication du règlement délégué 2023/361 (annexe XIII) en février 2023 rend possible le recours à la vaccination contre l'IAHP au sein de l'Union Européenne. La vaccination contre l'IAHP est donc envisagée comme un moyen supplémentaire pour contrôler la diffusion de cette maladie.

L'ampleur des épisodes d'IAHP (H5) survenus jusqu'à présent en France a souvent trouvé son origine dans une transmission inter-élevages s'étant développée après une introduction virale dans un élevage de palmipèdes (gras ou maigre). L'étude des dernières épizooties d'IAHP en France suggère que les élevages de canards ont joué un rôle particulier dans la dynamique épizootique à l'échelle territoriale, notamment dans les zones où ils sont les plus densément implantés (Guinat et al, 2019).

Par ailleurs, au niveau international, les palmipèdes ont nettement moins bénéficié de développements de solutions vaccinales spécifiques vis à vis de l'IAHP par comparaison avec le poulet. Néanmoins, après l'épizootie de 2016-2017, une étude expérimentale, de preuve de concept, avait été conduite pour évaluer la protection clinique et virologique induite par trois vaccins basés sur une hémagglutinine H5 chez des canards mulards conventionnels naïfs, vis-à-vis d'une épreuve par un virus IAHP A (H5N8) de clade 2.3.4.4b (Niqueux et al., 2023). Les résultats de ces travaux, menés en animaleries protégées de biosécurité de niveau 3, avaient permis de démontrer que les vaccins et les différents protocoles de vaccination testés étaient efficaces pour réduire l'excrétion virale. La preuve de concept que la vaccination contre l'IAHP peut être utilisée pour contrôler l'IAHP a donc été apportée par cette étude. Toutefois, en dehors de l'étude précédente où les vaccins n'avaient pas d'autorisation de mise sur le marché pour les médicaments vétérinaires en Europe, peu d'essais concluants d'évaluation de vaccins chez les canards ont été réalisés.

Afin de pallier cette insuffisance et d'évaluer si le déploiement de la vaccination de masse en élevage de palmipèdes est réalisable, une étude expérimentale avec un volet « expérimentation terrain » et un volet « expérimentations en animaleries de biosécurité de niveau 3 » a été élaborée sous la

gouvernance du ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, en partenariat avec l'Anses, l'ENVT, le CIFOG, des collectivités territoriales et des laboratoires pharmaceutiques.

L'expérimentation terrain est nécessaire afin de disposer d'informations chez le canard sur :

- La faisabilité d'une vaccination contre l'IAHP en conditions réelles en élevage avec des vaccins encore en phase de développement ;
- L'innocuité de cette vaccination en condition proches du terrain ;
- La réponse immunitaire induite par la vaccination, sa durée et l'évaluation de différents tests sérologiques pour suivre cette réponse immunitaire. ;
- La capacité des outils de surveillance à détecter une éventuelle circulation de virus influenza aviaires, pour valider une stratégie de surveillance « DIVA ».

Pour étude, deux candidats vaccins ont été retenus sur la base de leur composition antigénique correspondant à une hémagglutinine H5 de la lignée A/goose/Guangdong/1/1996 et de résultats expérimentaux antérieurs suggérant une efficacité chez le canard dans des conditions expérimentales.

L'étude s'est déroulée en 2 phases :

1. Une série d'essais en conditions terrain, organisée par l'équipe ENVT-INRAE (Chaire de Biosécurité et Santé aviaires) en collaboration avec les professionnels de la filière (Interprofession, organisations de production, vétérinaires), portant sur 6 lots de canetons mulards conventionnels mis en place sur des sites d'expérimentation en conditions d'élevage commercial. Pour chaque site, un lot d'animaux a été vacciné (selon les protocoles recommandés par les fabricants) à l'aide d'un des deux vaccins retenus et un autre a été élevé en tant que lot témoin non vacciné.

2. Pour chacun des deux vaccins retenus, un lot de canards mulards a été sélectionné pour transférer des canards (vaccinés ou témoins non vaccinés) vers les installations expérimentales de niveau de confinement A3 du LNR influenza aviaire du laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané-Niort afin d'y conduire à 7 et 11 semaines d'âge des épreuves expérimentales réalisées avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1).

Une étude en conditions expérimentales en animaleries de biosécurité de niveau 3 réalisée par l'ANSES-Ploufragan avec pour objectifs de produire des informations chez le canard mulard portant :

- Dans un premier temps, sur la capacité des vaccins étudiés à protéger cliniquement et à réduire l'excrétion virale ;
- Dans un second temps, sur la capacité des vaccins étudiés à ralentir la transmission du virus IAHP de clade 2.3.4.4b au sein d'une population de canards vaccinés.

L'ensemble des résultats produits dans le cadre de la convention sont présentés dans un premier temps dans le présent document qui rapporte, de manière synthétique, le volet terrain et, de manière plus détaillée, les essais consacrés à l'étude de la réduction de l'excrétion. Dans un deuxième temps, un rapport final agrégera l'ensemble des données terrain et des essais d'infections expérimentales, notamment celle relative à la réduction de la transmission virale dans les populations vaccinées.

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. Règlementation et éthique

Le volet de l'expérimentation terrain pour la mise en place de la vaccination sur des canards mulards en élevage a été approuvé par le ComEtH n°115 Science et Santé Animales (Référence SSA-2022-005) sur un dossier de saisine hors champs en application du Décret N°2013-118.

L'un des vaccins utilisés, non disponible en Europe, a été importé après autorisation de l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (autorisation n° 22-310981).

Les procédures expérimentales réalisées en animaleries de biosécurité de niveau 3 sur les animaux pour évaluer la clinique et l'excrétion virale suite à une épreuve virale ont été approuvées par le comité d'éthique ComEtH Anses/ENVA/UPEC (référence n°16-038) et le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (autorisation 2019111809264278#22817 avec des modifications de protocoles mineures approuvées le 04/04/2022).

### 2.2. Protocole des essais de vaccination en condition terrain

#### 2.2.1. Organisation générale des essais

Pour les deux solutions vaccinales, trois séries d'essais ont été mis en œuvre. Pour chaque série d'essai, un lot de canetons mulards, issus des mêmes parentaux, était réparti entre les deux sites pour assurer des conditions comparables pour les deux solutions vaccinales. Pour chaque site, un lot essai et un lot témoin étaient répartis entre deux bâtiments ou salles d'élevage totalement séparés.

Le tableau ci-dessous présente la répartition des lots d'animaux et les dates de mises en place :

| Série d'essai                           | Site d'essai   | Département | Vaccin | Effectifs canetons     |
|---|----------------|-------------|--------|------------------------|
| Série 1 : mise en place le 10 Mai 2022  | INRAE          | 40          | A      | 1200 : 800 V / 400 T   |
|   | Site élevage 1 | 32          | B      | 3200 : 1200V / 2000 T  |
| Série 2 : mise en place le 30 juin 2022 | INRAE          | 40          | B      | 1200 : 800 V / 400 T   |
|   | Site élevage 2 | 81          | A      | 3800 : 1800 V / 2000 T |
| Série 3 : mise en place le 09 aout 2022 | Site élevage 3 | 24          | B      | 1000 : 500 V / 500T    |
|   | Site élevage 4 | 24          | A      | 1000 : 700 V / 300T    |

**Tableau 1** : Plan général des essais en condition de terrain. Pour chaque série, sont détaillés, le site d'essai (le département), le vaccin testé et les effectifs correspondants de canetons vaccinés (V) et témoins (T). Les lots conduits à la station expérimentale INRAE d'Artiguères sont ceux pour lesquels des canards ont été transférés à Ploufragan pour la phase d'infection expérimentale.

## 2.2.2. Vaccins

Deux candidats vaccins ont été testés :

- Vaccin A : Duck H5-SRV vaccine® de Ceva Santé Animale : vaccin à ARN permettant l'expression de la protéine H5 modifiée du virus IAHP A/duck/France/161108h/2016 (H5N8) de clade 2.3.4.4b. Les animaux ont été vaccinés à 1 et 28 jours d'âge par voie intramusculaire dans la cuisse selon les recommandations du fabricant de vaccin.
- Vaccin B : Volvac B.E.S.T. AI+ND® de Boehringer Ingelheim animal health (BI) : vaccin bivalent adjuvé sous-unitaire incluant une H5 modifiée provenant du virus IAHP A/duck/China/E319-2/2003 (H5N1) de clade 2.3.2 exprimée en baculovirus recombinant dans des cellules d'insecte et incluant la souche inactivée LaSota d'orthoavulavirus aviaire de type 1 (OAvV-1). Chaque dose de vaccin contient 250 unités hémagglutinantes de H5. Les animaux ont été vaccinés par voie sous-cutanée à 10 et 28 jours d'âge selon les recommandations du fabricant de vaccin.

## 2.2.3. Mise en œuvre de la vaccination

L'administration de chaque vaccin a été réalisée selon le protocole défini par le laboratoire pharmaceutique, qui a effectué une visite préalable de chaque site et a supervisé les bonnes pratiques d'administration de son vaccin. Les vaccinations ont été pratiquées avec un écart maximal de 2 jours par rapport aux âges cibles définis par chacun des laboratoires :

- Vaccin A : vaccination à 1 jour et 28 jours
- Vaccin B : vaccination à 10 jours et 28 jours

L'administration par injection a été effectuée par un opérateur expérimenté et spécifiquement formé et encadré par chacun des 2 laboratoires producteurs de vaccins. Sur l'ensemble des essais, 2 opérateurs ont pratiqué ces vaccinations : 1 pour les séries 1 et 2, un autre pour la série 3.

## 2.2.4. Suivi technique et sanitaire

Chaque lot de canards mulards inclus a fait l'objet d'un suivi technique renforcé, avec relevé quotidien des paramètres techniques des bâtiments d'élevage et d'éventuelles mortalités, et relevé hebdomadaire du poids d'un échantillon d'animaux. Les lots vacciné et témoin ont été conduits, séparément mais à l'identique, par le responsable du site d'élevage selon ses pratiques techniques et son programme alimentaire habituels.

Les animaux n'ont pas eu accès à un parcours extérieur, conformément au cadre réglementaire en vigueur au moment de la réalisation des essais.

De même, le plan de vaccination habituel des sites d'élevage a été mis en œuvre contre la maladie de Derzsy ou la pasteurellose, avec quelques ajustements mineurs éventuels définis avec le laboratoire producteur du vaccin A ou B testé.

Pour chaque lot inclus dans les essais et en application de la réglementation, les animaux vaccinés ont été euthanasiés à l'issue du protocole et les carcasses traitées en équarrissage sous contrôle des services de la DD(ec)PP compétente. Ils n'ont ainsi pas été introduits dans la chaîne alimentaire.

## 2.2.5. Suivi vétérinaire -analyses sérologiques et moléculaires

Chaque lot inclus dans le projet a été suivi par le vétérinaire sanitaire de l'élevage, spécialisé en médecine avicole.

Une visite vétérinaire a été effectuée à l'âge de 2, 4, 6, 8 et 11 semaines pour chaque élevage inclus. Certaines dates de visite ont fait l'objet d'un ajustement à la marge (écart de 2 jours au maximum) selon le schéma vaccinal et en accord avec le laboratoire producteur.

NB : pour chaque vaccin A et B, un des 3 lots vaccinés a été suivi en sérologie jusqu'à la fin de la phase d'engraissement pour évaluer la persistance de la réponse sérologique.

A chaque visite effectuée par le vétérinaire sanitaire, un examen clinique du lot a été effectué et des prélèvements ont été réalisés par le vétérinaire sur 60 sujets du lot vacciné et 20 sujets du lot témoin (prise de sang, écouvillon trachéal et écouvillon cloacal).

Les échantillons biologiques ont été soumis aux analyses suivantes en première intention (Laboratoire d'Analyse et de Recherche de Dordogne) :

- Suivi sérologique : ELISA H5 pour la détection et cinétique de la réponse sérologique post-vaccinale et ELISA NP (nucléoprotéine, commune aux virus influenza A) pour la détection d'une circulation éventuelle de virus influenza. Pour ces tests, ont été utilisés les kits ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect ELISA et ID Screen® Influenza H5 Indirect ELISA (ID Vet), selon les recommandations du fournisseur.
- Suivi moléculaire : rRT-PCR gène M en 1ère intention et rRT-PCR H5-H7 en cas de positivité, à l'aide de kits commerciaux agréés par le LNR.

## 2.3. Protocole expérimental en animalerie

### 2.3.1. Transfert et hébergement des animaux

A l'âge de 5 semaines et de 9 semaines, 15 animaux non-vaccinés et 15 animaux vaccinés ont été transférés en camion bâché vers les animaleries A3 de l'Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort pour chaque modalité testée (âge et vaccin).

Les animaux ont été hébergés dans des parcs, sur caillebotis, en conditions confinées (atmosphère filtrée et contrôlée, sous pression négative). Les animaux ont été identifiés par une bague alaire numérotée lors de la mise en place des lots dans les animaleries permettant d'identifier les animaux vaccinés et non-vaccinés. Les animaux ont reçu une alimentation et un abreuvement à volonté.

### 2.3.2. Virus d'épreuve

La souche d'épreuve A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) a été isolée à partir d'écouvillons prélevés sur poulet lors de l'épizootie de 2021-2022 et appartient au clade 2.3.4.4b, génotype AC, génotype majoritaire circulant en Europe et en France dans les élevages depuis 2022 (European Food Safety Authority et al., 2023).

La souche a été multipliée dans des œufs embryonnés de poule exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) et le liquide allantoïque a été récolté. La pureté du stock de virus a été vérifiée conformément aux modes opératoires internes, en utilisant des méthodes de contrôle directes et indirectes, et le stock de virus a été titré sur des œufs embryonnés EOPS. L'inoculum utilisé dans cette étude a été préparé en diluant le stock viral dans du PBS jusqu'à une concentration finale attendue de  $10^7$  doses infectieuses dans l'œuf (EID<sub>50</sub>)/ml.

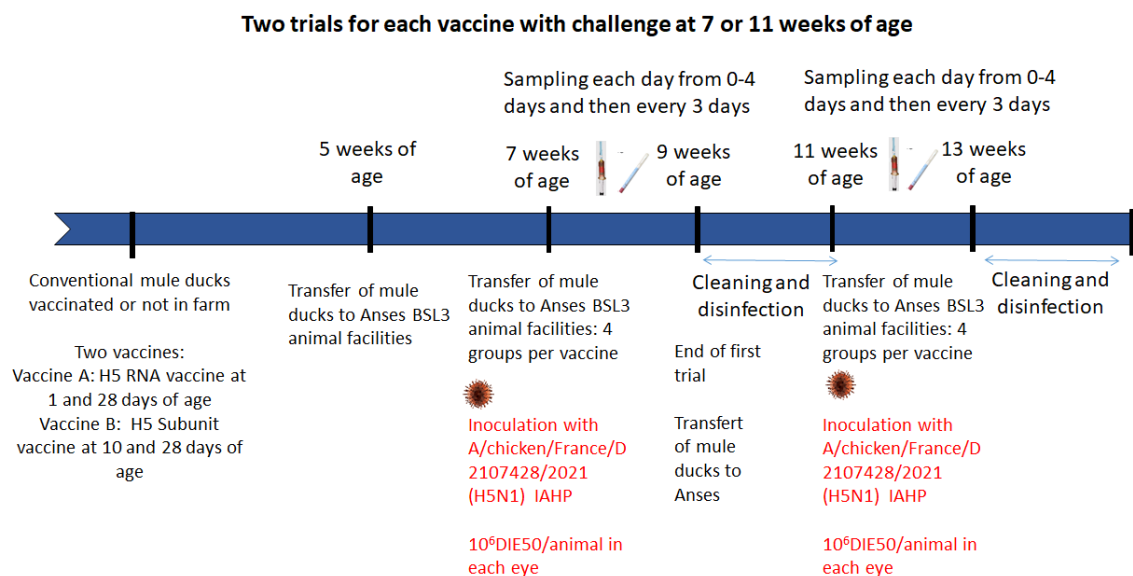
### 2.3.3. Répartition des animaux

Pour chaque vaccin testé, deux essais d'épreuve ont été réalisés à 7 et 11 semaines d'âge, comme indiqué dans la figure 1 du schéma du protocole expérimental.

Pour chaque vaccin et chaque âge, les animaux ont été répartis en quatre groupes, comme suit, en animalerie juste avant l'inoculation d'épreuve:

- Groupe NV-NE : 5 canards mulards naïfs non-vaccinés non-évalués ;
- Groupe V-NE : 5 canards vaccinés non-évalués ;
- Groupe NV-E : 10 ou 8 canards non-vaccinés puis évalués (diminution du nombre d'animaux par parc pour respecter la densité veillant au bien-être animal à 11 semaines d'âge) ;
- Groupe V-E : 10 ou 8 canards vaccinés puis évalués (diminution du nombre d'animaux par parc pour respecter la densité veillant au bien-être animal à 11 semaines d'âge).

Les animaux évalués ont reçu par voie oculaire  $10^6$ EID<sub>50</sub> (50µL dans chaque œil).



**Figure 1** : Schéma représentation du protocole expérimental avec 4 groupes de canards mulards conventionnels par vaccin et par âge.

### 2.3.4. Evaluation de la clinique

Pour chacun des quatre essais réalisés, les canards témoins non-vaccinés éprouvés et les canards vaccinés éprouvés ont été inspectés individuellement chaque jour pour détecter les signes cliniques. Les symptômes habituellement associés à l'IAHP ont été classés selon différentes catégories : signes généraux (apathie/somnolence, prostration...), signes respiratoires (toux, râles, dyspnée, écoulement nasal...), signes nerveux (démarche ou posture anormale, torticolis...) et signes cutanés (cyanose, œdème...). Chaque jour de prélèvement, un score clinique individuel a été établi selon cette méthode de notation : 0 : aucun signe clinique ; 1 : signes cliniques d'une seule catégorie ; 2 : plusieurs signes cliniques associés décrits précédemment; 3 : canards morts ou euthanasiés pour le bien-être des animaux.

### 2.3.5. Sérologie

Des prises de sang individuelles ont été effectuées sur tous les animaux 4 jours avant l'épreuve puis 4, 7, 10 et 14 jours après épreuve.

Les réponses en anticorps dirigées contre la nucléoprotéine des virus influenza (anticorps anti-NP) ont été étudiées en ce qu'elle reflète seulement l'infection par les virus influenza (aucun des deux vaccins étudiés ne contient la protéine NP des virus influenza), alors que les réponses en anticorps dirigés contre la protéine H5 ont été étudiées comme reflétant à la fois la vaccination (les deux vaccins contiennent un antigène H5) et, le cas échéant, l'exposition à un virus influenza H5 circulant (phase terrain) ou inoculé (virus d'épreuve).

La présence d'anticorps contre la protéine NP et contre la protéine H5 de virus influenza aviaire a été recherchée à l'aide des kits ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect ELISA et ID Screen® Influenza H5 Indirect ELISA (ID Vet) selon les recommandations du fournisseur.

Des tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ont également été réalisés sur tous les sérums contre plusieurs antigènes : un antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8), permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par les virus du clade H5 2.3.4.4b, et un antigène inactivé du virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1), permettant également de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par la souche d'épreuve appartenant aussi au clade H5 2.3.4.4b (deux antigènes HA dérivés de virus influenza porteurs de neuraminidases différentes sont en effet utilisés pour garantir la spécificité des réactions sérologiques anti-H5 détectées). Les sérums collectés sur les animaux vaccinés avec le vaccin B ont également été testés par IHA contre un antigène inactivé IAHP A/duck/China/E319-2/2003 (H5N1) permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps dirigés contre la protéine H5 du vaccin B utilisé. Chaque antigène a été ajusté à quatre unités hémagglutinantes conformément aux normes internationales. Les résultats ont été transformés en log<sub>2</sub> et les titres IHA individuels supérieurs ou égaux à 4 log<sub>2</sub> ont été considérés comme positifs.

### 2.3.6. Quantification des charges génomiques virales

Des écouvillons oro-pharyngés et cloacaux ont été réalisés sur tous les animaux 4 jours avant l'épreuve, 6 heures après épreuve (J0 H+6) puis à 1, 2, 3, 4, 7, 10 et 14 jours après l'épreuve afin de déterminer la charge génomique virale excrétée. Chaque écouvillon a été repris dans 1mL de milieu MEM avec 0,1% d'une solution de pénicilline/streptomycine (Pénicilline, 100 000 unités; Streptomycine, 100 mg /mL) puis vortexé. Les ARN ont été extraits à partir de 100µL de surnageant sur un automate KingFisher Flex à l'aide du kit d'extraction NucleoMagVET (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fournisseur avec un volume final d'élution de 100µL. L'excrétion virale a été évaluée en détectant le gène M de virus influenza aviaire par RT-PCR temps réel en utilisant le kit commercial ADIAVET AIV REAL TIME (BIO-X) à l'aide du thermocycleur Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR. Le kit commercial utilisé est également fourni avec un contrôle interne, afin de confirmer l'absence d'inhibiteurs d'amplification. Afin d'avoir une estimation de la charge infectieuse virale présente dans chaque écouvillon, chaque série de RT-PCR en temps réel comprenait une gamme d'un ARN transcrit synthétique dilué de façon sériée de dixième en dixième. Cet ARN standard, permettant de quantifier le nombre de copies de génome viral dans les échantillons testés, a été étalonné par rapport au stock du virus d'épreuve, démontrant une équivalence linéaire directe entre la charge génomique virale et le titre infectieux estimé exprimé en log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>. Les résultats de chaque écouvillon ont ensuite été quantifiés et exprimés en log EID<sub>50</sub>/réaction PCR (Niqueux et al., 2023).

### 2.3.7. Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées indépendamment pour chaque vaccin (i.e., vaccin A et B), chaque âge de challenge (i.e., 7 et 11 semaines) et chaque type d'excrétion (i.e., cloacale, oro-pharyngée).

Pour étudier la différence d'excrétion entre animaux vaccinés et non-vaccinés, deux analyses de variance sont appliquées : la première (paragraphe (i) ci-dessous) étudie l'évolution temps par temps, la seconde (paragraphe (ii) ci-dessous) prend en compte l'ensemble des temps.

- (i) Après vérification des conditions d'application, une analyse de variance mixte est appliquée avec : l'excrétion en tant que variable à expliquer, le statut (vacciné, non-vaccinés) et le temps en tant que facteurs explicatifs (fixes) et l'animal en tant que facteur explicatif aléatoire. Une autocorrélation temporelle (ordre 1) est appliquée. Lorsque le facteur 'temps' a un effet significatif sur l'excrétion, un test de Tukey (ajusté) est appliqué pour estimer le degré de signification des différences entre temps. La fonction 'lme' du package R 'nlme' est utilisée.
- (ii) Après vérification des conditions d'application, une analyse de variance est appliquée avec : l'aire sous la courbe d'excrétion comme variable à expliquer et le statut (vacciné, non-vacciné) comme facteur explicatif. L'aire sous la courbe est calculée par la fonction 'auc' du package R 'flux'. La fonction 'lm' du package R 'MASS' est utilisée.

Pour étudier le lien entre réponses immunitaires post-vaccinales et excrétion virale (avant infection), des corrélations non-paramétriques de Spearman sont utilisées (seuls les animaux vaccinés sont pris en compte ; faibles effectifs de 8-10 animaux). Les réponses immunitaires sont les mesures d'ELISA H5, IHA.H5Boh et IHA.H5N1 aux temps J-4 et J+4. L'excrétion virale est caractérisée par le temps de début et de fin d'excrétion, ainsi que la valeur maximale de l'excrétion sur la période J+1 à J+14. La fonction 'rcorr' du package R 'Hmisc' est utilisée.

## 3. RESULTATS

### 3.1. Essais terrain : résultats techniques et sanitaires

**Les résultats de la phase terrain sont présentés dans ce rapport de manière très synthétique** : seules figurent les données sérologiques, pour éclairer et compléter les essais d'infection expérimentale. Les résultats zootechniques et les données d'innocuité seront détaillés dans une version consolidée du rapport d'essai.

#### 3.1.1. Données techniques – innocuité

A l'issue des vaccinations, une surveillance clinique et technique renforcée n'a pas permis de détecter de signe clinique (prostration, signes locomoteurs, ...), ni de baisse de consommation d'eau ou d'aliment.

Lors de la 1<sup>ère</sup> série d'essai, à l'occasion de l'euthanasie des animaux à l'issue du protocole, 15 canards ont été soumis à un examen nécropsique approfondi, notamment au niveau des membres pelviens, pour détecter d'éventuelles lésions cicatricielles associées à la vaccination : aucune lésion n'a pu être observée sur l'ensemble des sujets examinés.

### 3.1.2. Surveillance moléculaire

Pour l'ensemble des séries et des lots prélevés séquentiellement pendant leur phase d'élevage, tous les pools d'écouvillons trachéaux et cloacaux testés pour le gène M par rRT-PCR ont été testés négatifs.

## 3.2. Essais terrain : cinétique sérologique

Les tableaux ci-dessous présentent de manière synthétique les profils sérologiques observés pour chaque solution vaccinale A et B et pour chaque série 1 à 3. Pour les 3 séries et les 2 vaccins ont été observés :

- L'absence de séroconversion vis-à-vis de l'antigène NP, ce qui suggère l'absence de circulation de virus influenza A, faiblement ou hautement pathogène, indépendamment du sous-type
- Une séroconversion vis-à-vis de l'antigène H5 observée à l'issue du rappel effectué à 28 jours d'âge
- Une décroissance des titres observés à partir de l'âge de 10 semaines

**Avertissement :** les données sérologiques ELISA doivent être interprétées en tendance plus qu'en données absolues : les valeurs absolues peuvent différer selon la solution vaccinale, sans que l'on puisse en déduire une corrélation avec la protection conférée vis-à-vis d'une infection virale.

Fig. 1.1.a/ Vaccin A – Essai #1

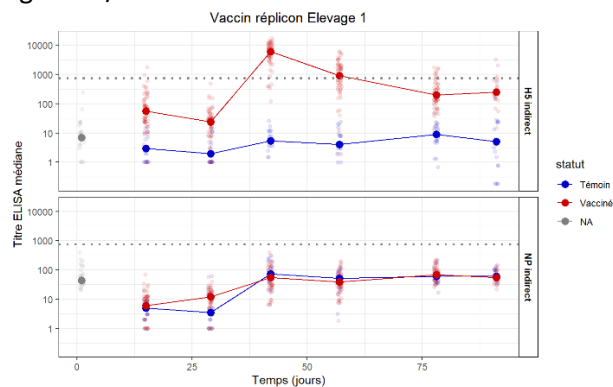


Fig. 1.1.b/ Vaccin A – Essai #2

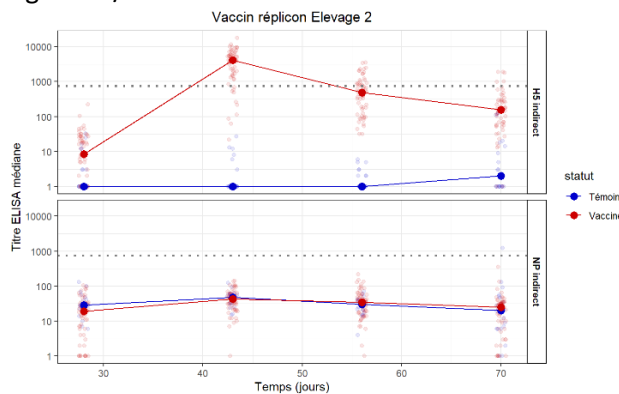
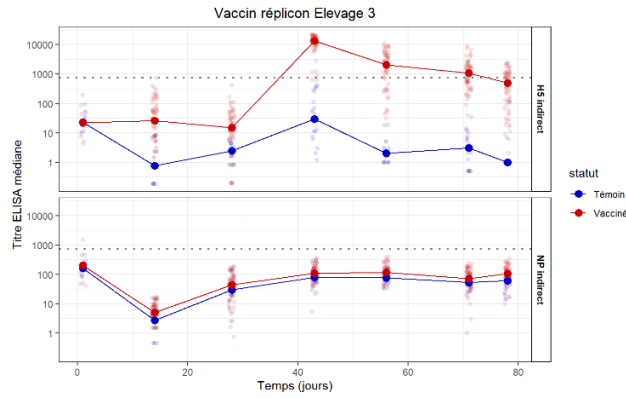


Fig. 1.1.c/ Vaccin A – Essai #3



**Figure 1.1.** Cinétique des titres sérologiques ELISA (ELISA indirect H5 et NP) au cours des 3 essais du vaccin A (SRV-H5 vaccine ; Ceva Santé Animale). Rappel : pour chaque temps de prélèvement, 60 canards vaccinés et 20 sujets non vaccinés ont été prélevés aléatoirement dans les lots respectifs.

Fig. 1.2.a/ Vaccin B – Essai #1

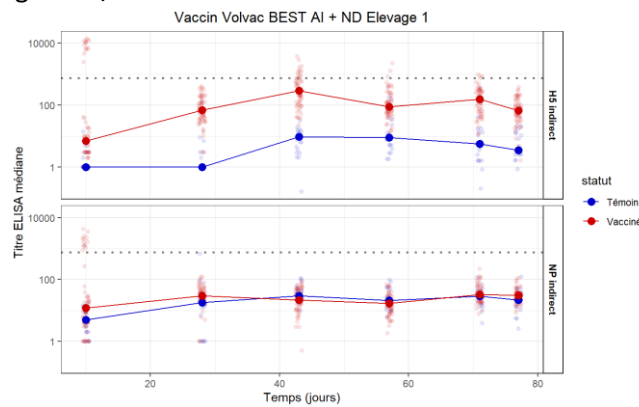


Fig. 1.2.b. Vaccin B – Essai #2

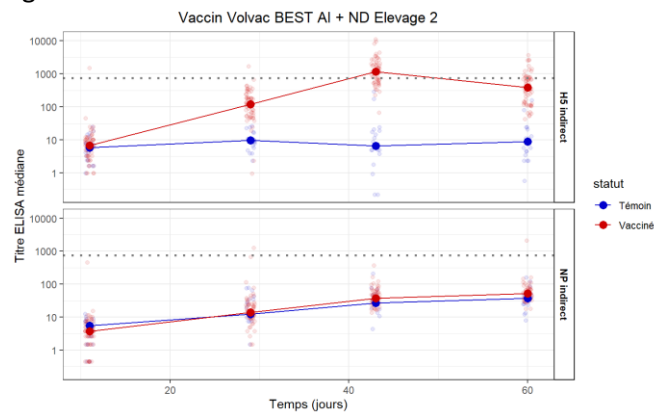
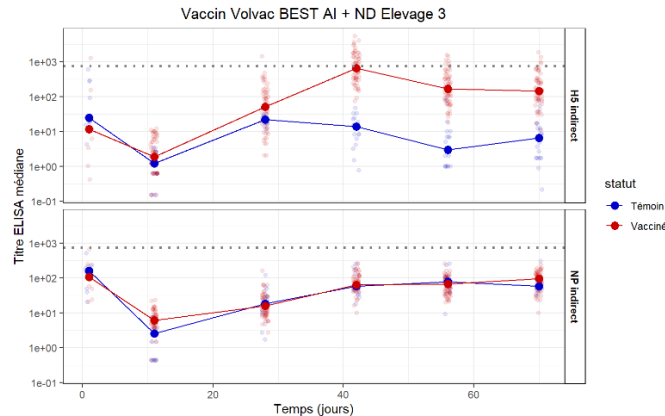


Fig. 1.2.c/ Vaccin B – Essai #3



**Figure 1.2.** Cinétique des titres sérologiques ELISA (ELISA indirect H5 et NP) au cours des 3 essais du vaccin B (VOLVAC B.E.S.T AI + ND ; Boehringer Ingelheim Animal Health). Rappel : pour chaque temps de prélèvement, 60 canards vaccinés et 20 sujets non vaccinés ont été prélevés aléatoirement dans les lots respectifs.

### 3.3. Infections expérimentales : clinique

L'ensemble des animaux des groupes témoins (vaccinés ou non vaccinés) et non-évalués (= lots NV-NE et V-NE) n'a montré aucun signe clinique tout au long des quatre essais réalisés.

Pour les groupes de canards non-vaccinés et évalués (lot NV-E) à 7 semaines d'âge, un seul animal a montré de la prostration et tremblements nerveux 4 jours après épreuve et est mort 6 jours après épreuve. Peu de signes cliniques ont été observés. Pour les épreuves à 11 semaines, aucun signe clinique n'a été observé chez les canards non-vaccinés et évalués.

Les animaux vaccinés n'ont montré aucun signe clinique après épreuve (lots V-E) à 7 ou 11 semaines d'âge.

### 3.4. SEROCONVERSION

Tous les animaux des groupes témoins non vaccinés et non inoculés (lots NV-NE, soit 2 groupes de 5 animaux suivis de 6 à 9 semaines d'âge et 2 groupes de 5 animaux suivis de 10 à 13 semaines d'âge) étaient séronégatifs vis-à-vis des protéines NP et H5 de virus influenza aviaire ainsi qu'avec les tests IHA avec les antigènes des virus de clade 2.3.4.4b tout au long des essais. De façon comparable, aucun anticorps anti-NP ou anti-H5 n'est détecté avant épreuve dans les lots vaccinés et destinés à être évalués (lots NV-E, 2 groupes de 10 sujets suivis de 6 à 9 semaines d'âge et deux lots de 8 sujets suivis de 10 à 13 semaines d'âge). Ces résultats indiquent l'absence d'infection par des virus influenza aviaries sauvages dans les élevages, où la vaccination des canards mulards conventionnels a été effectuée, ou lors du transport de ces animaux jusqu'au laboratoire Anses de Ploufragan.

Les réponses immunitaires observées au cours de l'étude expérimentale peuvent donc bien être attribuées aux effets, seuls ou combinés, des vaccins reçus au cours de la phase d'élevage et des virus d'épreuve administrés au cours de l'expérimentation.

### 3.4.1. Séroconversion après épreuve à 7 semaines d'âge

#### 3.4.1.1. Vaccin A

Dans le lot ayant reçu le vaccin A mais non éprouvés (lot V-NE), le nombre d'animaux positifs en ELISA H5 a diminué au cours du temps, passant de 4/5 animaux positifs à 6,5 semaines d'âge, à 2/5 à 9 semaines, 1/5 à 10,5 semaines et 1/5 à 13 semaines d'âge. Les mêmes animaux étaient tous négatifs en IHA avec des antigènes H5 de clade 2.3.4.4b aux mêmes âges. Ces résultats démontrent que les animaux ont bien été vaccinés avec un niveau de réponse sérologique contre la H5 hétérogène, que celle-ci a diminué au cours du temps et que l'ELISA H5 présente une meilleure sensibilité que l'IHA réalisée avec un antigène 2.3.4.4b pour la détection de la réponse immunitaire anti-H5 post vaccinale.

Les animaux du groupe témoin non vacciné et éprouvé à 7 semaines d'âge étaient indemnes d'anticorps contre des virus influenza aviaries (négatifs en ELISA NP et H5) avant épreuve, contrairement aux animaux vaccinés qui étaient positifs en ELISA H5 attestant de la vaccination H5 de ces animaux (Fig2.1 et 2.2, J-4). Après épreuve, l'ensemble de ces animaux étaient positifs 7 jours vis-à-vis des protéines NP et H5 (Figure 2), ce qui indique une infection et multiplication virales dans les deux groupes d'animaux. Toutefois, les deux groupes présentaient des titres ELISA différents, avec une séroconversion vis-à-vis de la protéine NP plus rapide et plus élevée après épreuve chez les animaux non-vaccinés que chez les animaux vaccinés (Fig. 2.1), ce qui est cohérent avec une réplication virale plus élevée chez ces animaux non-vaccinés (cf paragraphe 3.3.1.1). La séroconversion vis-à-vis de la protéine H5 était, quant à elle, plus rapide et plus élevée chez les animaux vaccinés éprouvés par rapport aux animaux non-vaccinés éprouvés, ce qui est cohérent avec un effet rappel de l'infection chez les animaux vaccinés qui étaient déjà positifs contre H5 avant l'épreuve (Fig2.2).

Fig. 2.1/

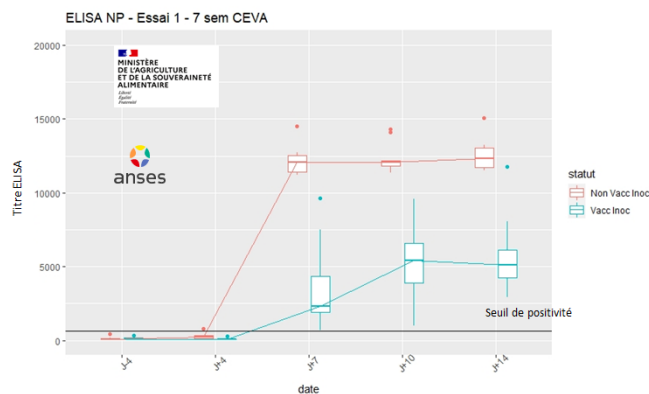
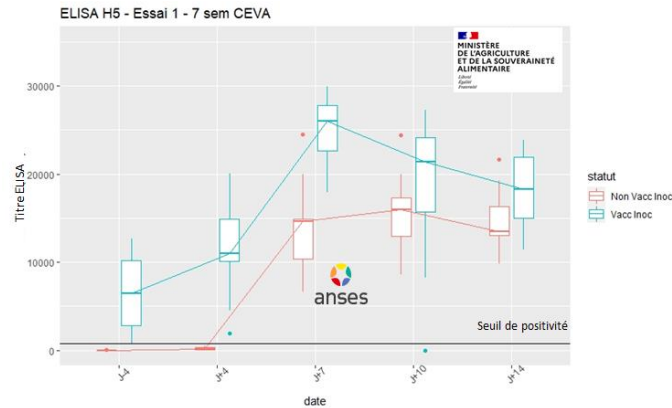


Fig.2.2/



**Figure 2** : Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve virulente chez les canards mulards de 7 semaines d'âge vaccinés ou non avec le vaccin A. Titres en anticorps mesurés par des tests ELISA indirects dirigés contre les protéines NP (Fig 2.1) et H5 (Fig. 2.2). Epreuve virulente réalisée avec un virus IAHP de clade 2.3.4.4b à J0 dans l'échelle de temps du graphique

Les canards des deux groupes éprouvés étaient négatifs en IHA contre des virus de clade 2.3.4.4b avant l'épreuve à 7 semaines d'âge attestant, en cohérence avec les résultats obtenus en ELISA-H5, de l'absence d'infection dans l'élevage de départ par des virus IAHP H5 de clade 2.3.4.4b (Figure 3).

De manière similaire aux résultats obtenus en ELISA-H5, la séroconversion observée 7 jours après épreuve en IHA vis-à-vis des antigènes H5 de clade 2.3.4.4b a été plus rapide et plus élevée chez les animaux vaccinés éprouvés que chez les non-vaccinés éprouvés. Ce résultat est à nouveau en cohérence avec un effet rappel de l'épreuve sur une immunité anti-H5 pré-existante, même si celle-ci apparaît essentiellement mesurable par ELISA-H5, et non par IHA, avant épreuve (Figure 3).

Fig. 3.1/

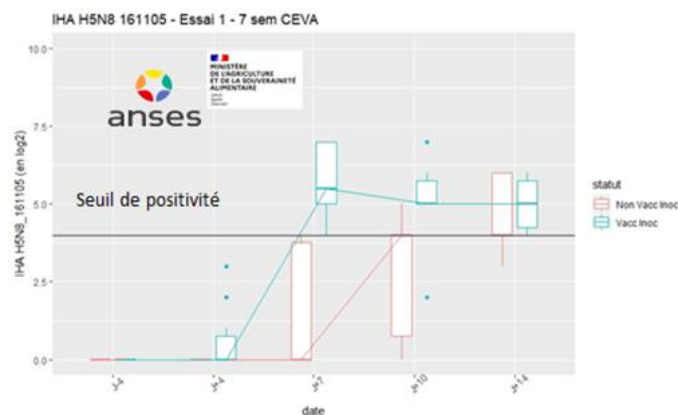
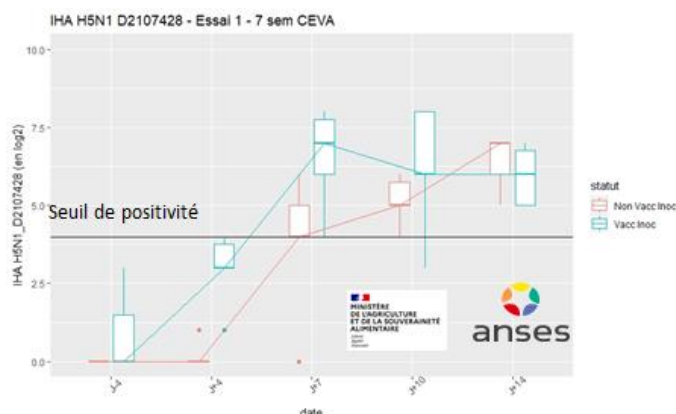


Fig. 3.2/



**Figure 3:** Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve virulente chez les canards mulards de 7 semaines d'âge non-vaccinés et vaccinés avec le vaccin A. Titres en anticorps mesurés par un test IHA avec l'antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps dirigés contre les virus de clade H5 2.3.4.4b (Fig 3.1) et l'antigène inactivé dérivé du virus d'épreuve IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par la souche d'épreuve appartenant aussi au clade H5 2.3.4.4b. Les titres sont exprimés en log2 du titre IHA. L'épreuve virulente est réalisée à J0 dans l'échelle de temps du graphique.

### 3.4.1.2. Vaccin B

Dans le lot témoin ayant reçu le vaccin B mais non éprouvé (lot V-NE), le nombre d'animaux positifs en ELISA H5 a diminué au cours du temps passant 1/5 animal positif à 6,5 et 9 semaines d'âge à 0/5 à partir de 10,5 semaines d'âge. Les mêmes animaux étaient tous négatifs en IHA avec des antigènes H5 de clade 2.3.4.4b aux mêmes âges mais, par contre, étaient tous positifs en IHA avec l'antigène vaccinal et ce jusqu'à 13 semaines d'âge. Ces résultats démontrent que les animaux ont bien été vaccinés, qu'ils ont présenté un niveau de réponse sérologique contre la H5 hétérogène et que les réponses sérologiques post-vaccinales étaient détectées de façon optimale seulement en utilisant un antigène IHA homologue de l'hémagglutinine contenue dans le vaccin (Clade 2.3.2).

Avant épreuve, comme précédemment, les animaux du groupe non vacciné et éprouvé à 7 semaines d'âge étaient indemnes d'anticorps contre des virus influenza aviaire (négatifs en ELISA NP et H5, cf Fig. 4.1 et 4.2, J-4) contrairement aux animaux vaccinés dont 4/10 étaient positifs en ELISA H5 (Figure 4.2). Ces résultats attestent de la vaccination H5 de ces animaux avec une réponse sérologique hétérogène en ELISA. L'ensemble de ces animaux étaient positifs 7 jours après l'épreuve contre les protéines NP et H5 (Figure 4), ce qui indique une infection et une multiplication virales chez les animaux mais avec des titres ELISA différents entre les deux groupes. Comme précédemment observé avec le vaccin A, la séroconversion vis-à-vis de la protéine NP était plus élevée chez les animaux non-vaccinés et éprouvés que chez les animaux vaccinés, ce qui est cohérent avec une réplication virale plus élevée chez ces animaux non-vaccinés (cf infra paragraphe 3.3.1.2). La séroconversion vis-à-vis de la protéine H5 était, quant à elle, en moyenne un peu plus rapide et plus élevée chez les animaux

vaccinés éprouvés par rapport aux animaux non-vaccinés éprouvés, résultat là aussi cohérent un effet rappel de l'infection chez les animaux vaccinés qui étaient déjà immunisés contre la protéine H5 avant l'épreuve. Il est à noter toutefois que cette immunité pré-existante induite par le vaccin B était moins facile à révéler sur le plan sérologique avec l'ELISA-H5 (Figure 4.2, J-4) qu'avec un test IHA mettant en œuvre à un antigène homologue à celui du vaccin (Cf Fig 5.3, J-4).

Fig. 4.1/

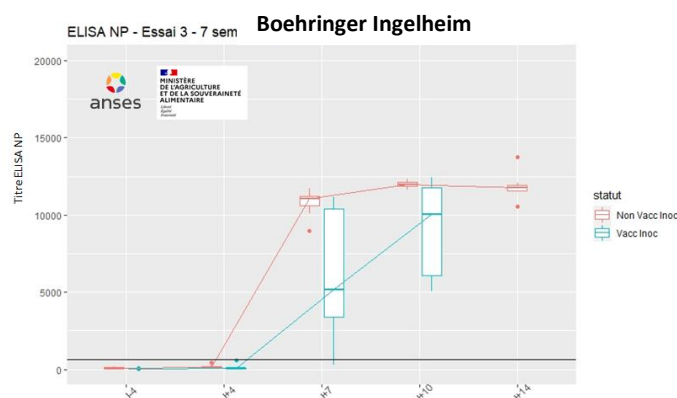
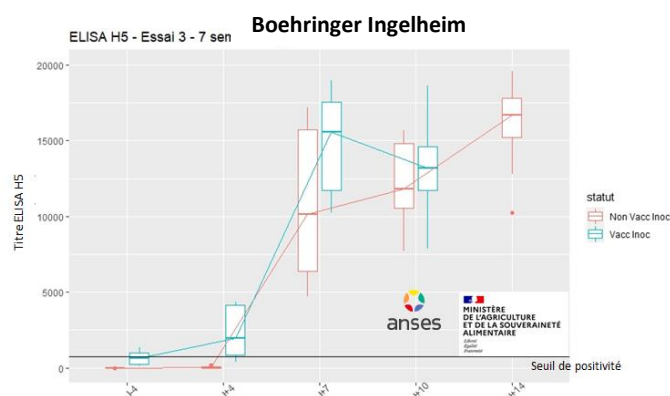


Fig 4.2/



**Figure 4** : Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve virulents chez les canards mulards de 7 semaines d'âge vaccinés ou non avec le vaccin B. Niveaux immunitaires mesurés par des tests ELISA indirects dirigés contre les protéines NP (Fig 4.1) et H5 (Fig. 4.2). Epreuve virulente réalisée avec un virus IAHP de clade 2.3.4.4b à J0 dans l'échelle de temps du graphique

Les canards des deux groupes éprouvés vaccinés ou non par le vaccin B étaient négatifs en IHA contre des virus de clade 2.3.4.4b avant l'épreuve à 7 semaines d'âge, attestant une nouvelle fois l'absence d'infection dans l'élevage de départ par des virus IAHP H5 sauvages de clade 2.3.4.4b (Figures 5.1 et 5.2). Cependant tous les animaux ayant reçu le vaccin B étaient positifs en IHA avec l'antigène vaccinal (Figure 5.3). Cette dernière méthode sérologique confirme donc que l'ensemble des animaux avaient bien séroconverti contre la valence vaccinale et donc avaient donc bien été vaccinés lors de la phase d'élevage.

De manière similaire aux résultats obtenus en ELISA contre la H5, la séroconversion vis-à-vis des antigènes H5 de clade 2.3.4.4b était légèrement plus élevée chez les animaux vaccinés éprouvés que chez les non-vaccinés éprouvés (Figure 5.1 et 5.2) mais cette différence était révélée de façon plus accentuée avec les résultats d'IHA avec l'antigène vaccinal (Figure 5.3).

Fig. 5.1/

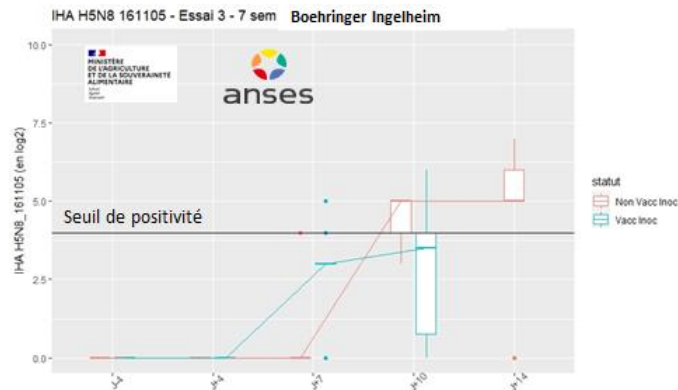


Fig 5.2/

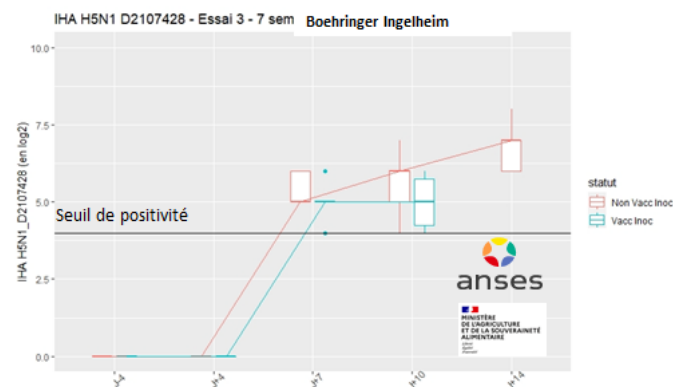
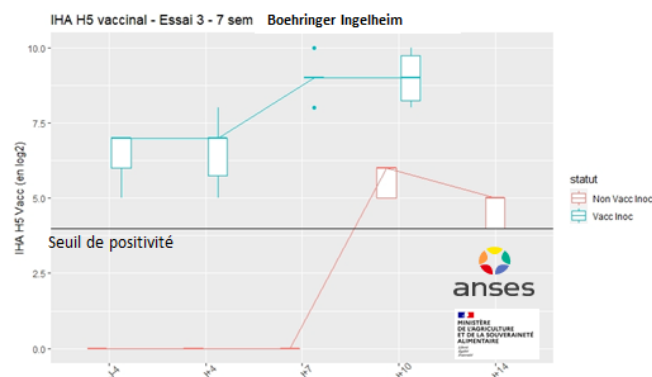


Fig 5.3/



**Figure 5:** Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve virulents chez les canards mulards de 7 semaines d'âge vaccinés ou non avec le vaccin B. Titres en anticorps mesurés soit par un test IHA avec l'antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par les virus de clade H5 2.3.4.4b (Fig. 5.1), soit par un tests IHA réalisé avec l'antigène inactivé du virus d'épreuve IAHP

A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) permettant de détecter les anticorps spécifiques de la souche d'épreuve appartenant aussi au clade H5 2.3.4.4b (Fig 5.2), soit avec un antigène HA homologue de l'antigène vaccinal, permettant de détecter plus spécifiquement la réponse sérologique vis-à-vis du vaccin B (Fig 5.3). Les titres sont exprimés en  $\log_2$  du titre IHA. L'épreuve virulente est réalisée à J0 dans l'échelle de temps du graphique.

## 3.4.2. Séroconversion après épreuve à 11 semaines d'âge

### 3.4.2.1. Vaccin A

Comme précédemment, avant épreuve, les animaux du groupe non vacciné et éprouvé à 11 semaines d'âge étaient séronégatifs en ELISA NP attestant de l'absence d'infection par un virus influenza aviaire au niveau de l'élevage ou lors du transfert des animaux à destination de l'Anses. A 10,5 semaines d'âge (J-4 avant épreuve), le nombre d'animaux séropositifs en ELISA H5 avait diminué à 4/8 animaux positifs (contre 10/10 à 6,5 semaines d'âge dans l'essai précédent), montrant – comme les animaux du groupe vacciné non éprouvé lors de l'essai précédent – que le niveau de réponse sérologique contre la H5 était hétérogène et que ce niveau diminue au cours du temps en s'éloignant de la dernière vaccination.

Contrairement à ce qui avait été observé lors de l'épreuve à 7 semaines d'âge, les animaux vaccinés ou non ont présenté des profils sérologiques vis-à-vis de la protéine NP similaires tout au long de l'essai, avec une séroconversion de tous les animaux signant une infection et multiplication virale chez l'ensemble des sujets inoculés (Figure 6.1), même si, 7 jours après épreuve, les niveaux en anticorps anti-NP détectés chez les sujets non vaccinés étaient légèrement supérieurs à ceux observés chez les sujets vaccinés (résultat cohérent avec celui de l'épreuve réalisée à 7 semaines). Comme observé lors de l'épreuve à 7 semaines, la séroconversion vis-à-vis de la protéine H5 après épreuve restait bien plus précoce et élevée chez les animaux vaccinés éprouvés que chez les animaux non-vaccinés éprouvés, montrant de nouveau l'effet rappel de l'infection chez les animaux préalablement vaccinés.

Fig. 6.1/

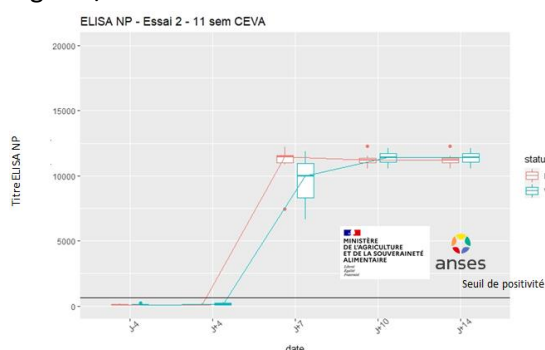
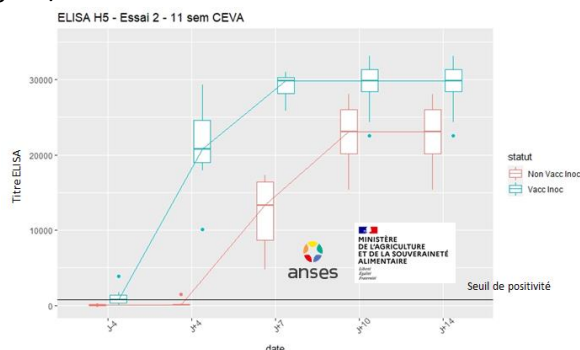


Fig 6.2/



**Figure 6 :** Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve chez les canards mulards de 11 semaines d'âge vaccinés ou non avec le vaccin A. Titres en anticorps mesurés par des tests ELISA indirects dirigés contre les protéines NP (Fig. 6.1) et H5 (Fig 6.2). Epreuve virulente réalisée avec un virus IAHP de clade 2.3.4.4b à J0 dans l'échelle de temps du graphique.

Les résultats en IHA avec des antigènes de clade 2.3.4.4b avant et après épreuve à 11 semaines d'âge sont semblables à ceux obtenus avant et après épreuve à 7 semaines d'âge. Ils montrent, comme les analyses sérologiques réalisées par ELISA-H5, un effet rappel de l'infection chez les animaux ayant reçu le vaccin A, par rapport aux animaux non-vaccinés (Figure 7).

Fig. 7.1/

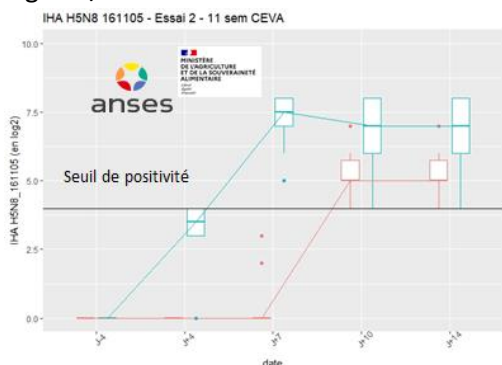
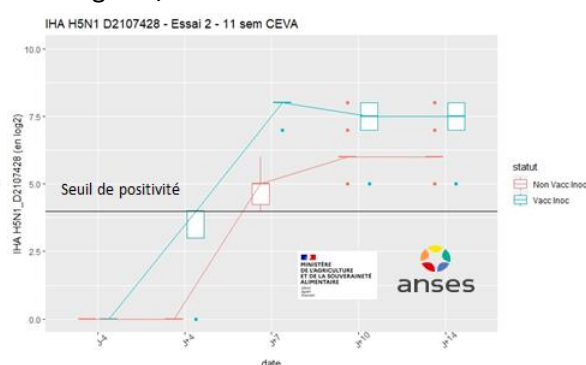


Fig. 7.2/



**Figure 7:** Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve chez les canards mulards de 11 semaines d'âge vaccinés ou non avec le vaccin A. Titres en anticorps mesurés par un test IHA mettant en œuvre soit l'antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) (Fig. 7.1), soit l'antigène inactivé dérivé du virus d'épreuve IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) (Fig. 7.2). Les titres sont exprimés en  $\log_2$  du titre IHA. Epreuve virulente réalisée à J0 dans l'échelle de temps du graphique.

### 3.4.2.2. Vaccin B

Vaccin B avant épreuve à 11 semaines d'âge, tous les animaux (vaccinés ou non) et destinés à être éprouvés étaient séronégatifs en ELISA NP, montrant l'absence d'infection par un virus influenza aviaire au niveau de l'élevage ou lors du transfert vers l'Anses (Figure 8.1). Comme pour le vaccin A avant épreuve, le nombre d'animaux vaccinés séropositifs en ELISA H5 avait diminué en passant de 4/10 animaux séropositifs avant l'épreuve à 7 semaines à 1/8 avant l'épreuve à 11 semaines (Figure 8.2) indiquant une diminution de la réponse sérologique induite par le vaccin B et détectable par ELISA-H5 au cours du temps.

Après épreuve à 11 semaines d'âge, les profils de séroconversion révélés par les tests ELISA contre la protéine NP et la protéine H5 sont proches de ceux observés après épreuve à 7 semaine d'âge, avec tout de même une baisse du titre en ELISA H5 chez les animaux (vaccinés ou non) à 13 semaines d'âge (Fig. 8.2, J+10 et J+14).

Fig. 8.1/

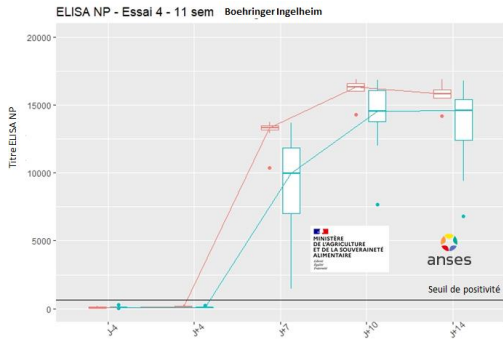
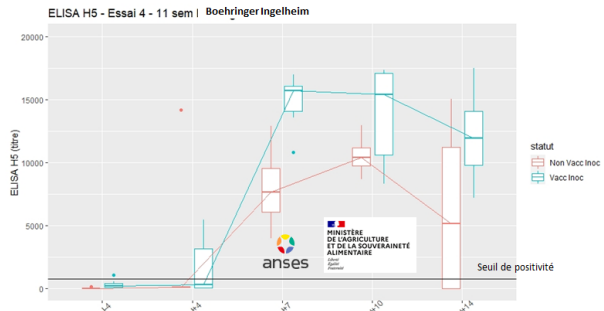


Fig. 8.2/



**Figure 8 :** Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve virulente chez les canards mulards de 11 semaines d'âge vaccinés ou non avec le vaccin B. Titres en anticorps mesurés par des tests ELISA indirects dirigés contre les protéines NP (Fig. 8.1.) et H5 (Fig. 8.2.). Epreuve virulente avec un virus IAHP de clade 2.3.4.4b à J0 dans l'échelle de temps du graphique

Fig 9.1/

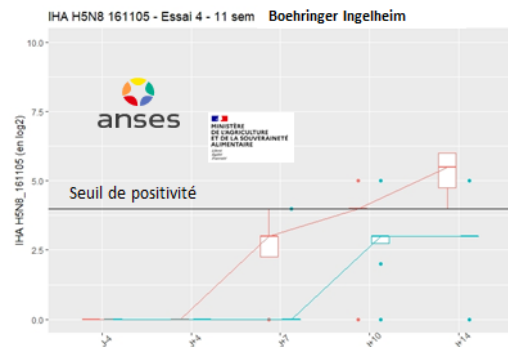


Fig. 9.2/

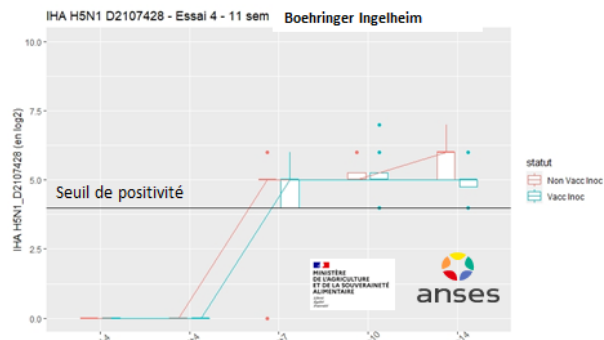
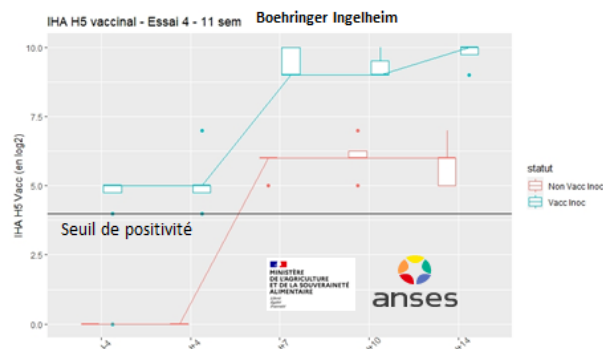


Fig 9.3/



**Figure 9 :** Titres en anticorps sériques déterminés après épreuve virulente chez les canards mulards de 11 semaines d'âge vaccinés ou non avec le vaccin B. Titres en anticorps mesurés par un test IHA réalisé soit avec l'antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) permettant de détecter les anticorps spécifiques du clade H5 2.3.4.4b (Fig. 9.1.), soit avec l'antigène inactivé du virus d'épreuve IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) permettant de détecter les anticorps spécifiques de la souche d'épreuve appartenant aussi au clade H5 2.3.4.4b (Fig. 9.2.) et avec l'antigène

IHA correspondant à l'antigène vaccinal (Fig. 9.3.) permettant de détecter la réponse sérologique spécifique vis-à-vis du vaccin B. Les titres sont exprimés en log<sub>2</sub> du titre IHA. Epreuve virulente réalisée à J0 dans l'échelle de temps du graphique

L'analyse par IHA des réponses sérologiques produit des résultats qui précisent et restent cohérents avec ceux obtenus par ELISA et qui sont également globalement cohérents avec ceux obtenus précédemment à 7 semaines. L'absence d'infection dans l'élevage de départ ou lors du transport vers l'Anses par des virus IAHP H5 avant épreuve est confirmée par les résultats négatifs en IHA avec les trois antigènes testés (Figure 9). Sept des 8 animaux ayant reçu le vaccin B étaient positifs avant épreuve en IHA avec l'antigène vaccinal (Fig. 9.3), montrant qu'avec cette méthode sérologique plus spécifique de l'antigène vaccinal, des réponses sérologiques anti-H5 post vaccinales peuvent être détectées chez la majorité des animaux avant l'épreuve à 11 semaines d'âge. L'effet rappel de l'infection chez les animaux vaccinés avec le vaccin B est – comme déjà observé après épreuve à 7 semaines – également plus visible avec les résultats d'IHA avec l'antigène vaccinal (Fig. 9.3).

## 3.5. EXCRETION VIRALE

Aucun génome viral n'a été détecté pour l'ensemble des animaux des groupes témoins non-évalués (vaccinés ou non) au cours des quatre essais réalisés.

### 3.5.1. Excrétion après épreuve à 7 semaines d'âge

#### 3.5.1.1. Vaccin A

Chez les animaux témoins non-vaccinés, l'excrétion oro-pharyngée est détectée chez les premiers sujets qui se positivent dès 6 heures après épreuve et chez tous les animaux non-vaccinés dès 1 jour après épreuve. L'excrétion se prolonge jusqu'à 14 jours, son maximum étant atteint à 4 jours post infection (Figure 10.1). L'excrétion cloacale suit un profil similaire à l'excrétion oro-pharyngée à l'exception du maximum d'excrétion qui plus est plus faible de 1,6 log<sub>10</sub> que l'excrétion oro-pharyngée (Figure 10.2).

Chez les animaux ayant reçu le vaccin A, l'excrétion oro-pharyngée du virus d'épreuve est réduite par rapport aux animaux non-vaccinés, dès 1 jour après épreuve, avec une diminution de 1,45 log<sub>10</sub> en moyenne et une extinction dès 7 jours après épreuve. Les différences observées étaient statistiquement significatives à 1, 2, 3, 4, 7, 10 et 14 jours après épreuve dans le modèle mixte (p-value < 2,20.10<sup>-16</sup>) ainsi que dans le modèle tenant compte de l'aire sous la courbe avec une diminution significative de 26,5 log<sub>10</sub> sur les 14 jours (p-value = 7,14.10<sup>-12</sup>). De même, l'excrétion cloacale est diminuée de 1,35 log<sub>10</sub> en moyenne et les différences étaient significatives à 1, 2, 3, 4, 7, 10 et 14 jours après épreuve (p-value = 2,03.10<sup>-14</sup>). Dans le modèle tenant compte de l'aire sous la courbe, la diminution est également significative avec un abattement de 23,5 log<sub>10</sub> sur les 14 jours (p-value = 4,15.10<sup>-10</sup>). L'excrétion cloacale n'est plus détectée chez aucun animal 10 jours après épreuve chez les animaux vaccinés A (Figure 10).

Fig 10.1/

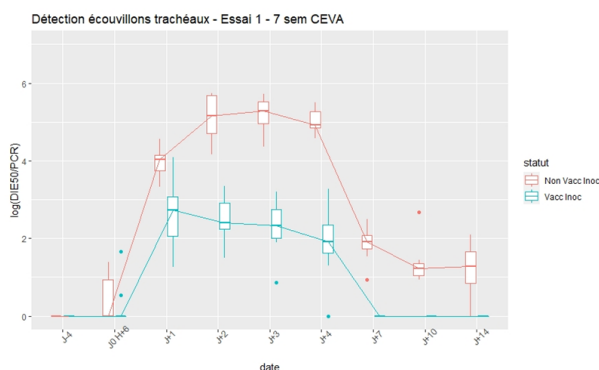
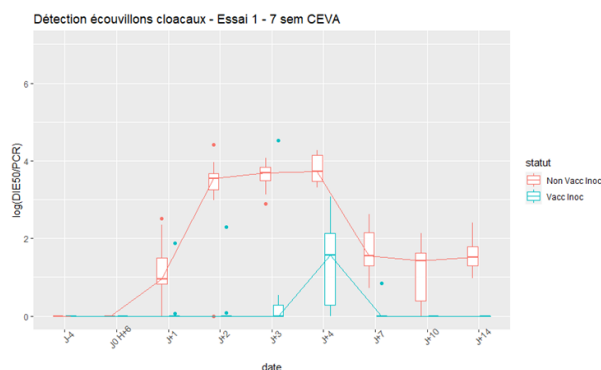


Fig 10.2/



**Figure 10:** Excrétion virale oro-pharyngée (A) et cloacale (B) chez les canards mulards vaccinés ou non avec le vaccin A et éprouvés à 7 semaines d'âge avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1). L'excrétion virale est exprimée en titre infectieux estimé ( $\log_{10}$  EID<sub>50</sub>/PCR).

Deux corrélations significatives entre les niveaux immunitaires et les niveaux d'excrétion sont observées. La première est une corrélation significative négative entre les titres IHA avec l'antigène de la souche d'épreuve 4 jours après épreuve, d'une part, et le début de l'excrétion cloacale, d'autre part, qui reflète la tendance à observer une multiplication virale et donc une excrétion cloacale moins élevée de la souche virale d'épreuve chez les animaux ayant les titres IHA les plus bas juste après l'épreuve. La seconde est une corrélation négative entre les titres IHA avec l'antigène de la souche d'épreuve avant épreuve, d'une part, et le maximum de l'excrétion trachéale, d'autre part, qui reflète la tendance à observer que les animaux étant sérologiquement naïfs (révélé par les titres IHA très faibles) avant épreuve ont eu une multiplication élevée de la souche virale d'épreuve.

### 3.5.1.2. Vaccin B

Dans cet essai, chez les animaux témoins non-vaccinés, les excrétions oro-pharyngée et cloacale sont détectées dès 1 jour après épreuve et jusqu'à 10 et 14 jours respectivement, les maximums d'excrétion étant atteints entre 3 et 4 jours (Figure 11).

Chez les animaux ayant reçu le vaccin B, l'excrétion oro-pharyngée est réduite par rapport aux animaux non-vaccinés (Fig. 11.1). Cette réduction est observable dès 1 jour après épreuve. Elle est en moyenne de  $1,10 \log_{10}$  et l'excrétion trachéale s'éteint chez tous les sujets vaccinés à J10 post infection. Les différences de niveau d'excrétion trachéale entre sujets vaccinés ou non apparaissent statistiquement significatives à 1, 2, 3, 4, et 7 jours après épreuve dans le modèle mixte ( $p$ -value =  $1,98 \cdot 10^{-13}$ ) ainsi que dans le modèle tenant compte de l'aire sous la courbe (avec une diminution significative de  $15,6 \log_{10}$  X jours,  $p$ -value =  $1,60 \cdot 10^{-08}$ ). De même, l'excrétion cloacale est diminuée de  $0,58 \log_{10}$  en moyenne et les différences entre sujets vaccinés ou non sont significatives à 2, 3, 4 et 7 jours après épreuve ( $p$ -value =  $1,53 \cdot 10^{-07}$ ). Dans le modèle tenant compte de l'aire sous la courbe, la diminution est également significative avec un abattement de  $6,9 \log_{10}$  x jours ( $p$ -value =  $6,84 \cdot 10^{-04}$ ). L'excrétion cloacale n'est plus détectée chez aucun sujet ayant reçu le vaccin B 14 jours après épreuve (Figure 11).

Fig. 11.1/

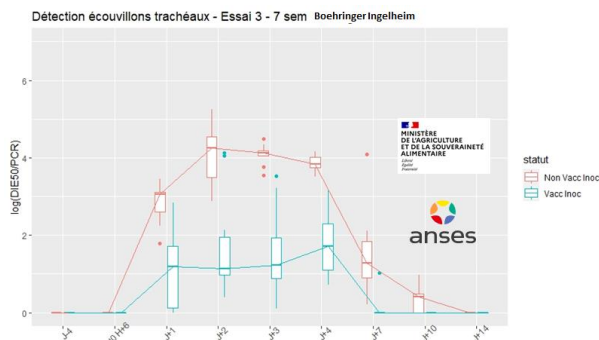
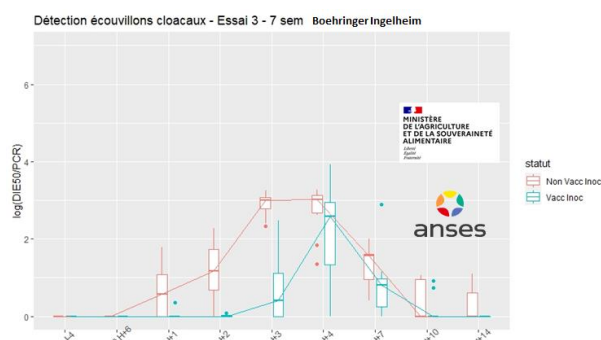


Fig. 11.2/



**Figure 11:** Excrétion virale oro-pharyngée (Fig. 11.1) et cloacale (11.2) chez les canards mulards vaccinés ou non avec le vaccin B et éprouvés à 7 semaines d'âge (J0 dans le graphique ci-dessus) avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1). Le niveau d'excrétion virale est exprimé en titre infectieux estimé ( $\log_{10} \text{EID}_{50}/\text{PCR}$ ).

Aucun lien significatif n'a été établi entre la réponse immunitaire avant épreuve à 7 semaines d'âge et l'excrétion virale pour les animaux vaccinés B.

### 3.5.2. Excrétion après épreuve à 11 semaines d'âge

#### 3.5.2.1. Vaccin A

Chez les animaux témoins non-vaccinés, l'excrétion oro-pharyngée est détectée chez les premiers sujets, qui se positivent dès 6 heures après épreuve, et chez tous les animaux non-vaccinés, dès 1 jour après épreuve. Les niveaux d'excrétion mesurés entre J+1 et J+4 sont relativement stables et le maximum est atteint à 4 jours post infection, date à laquelle l'excrétion décroît pour quasiment s'éteindre à 14 jours (Figure 12.1). L'excrétion cloacale augmente progressivement pour atteindre également son maximum – inférieur à celui atteint par voie respiratoire – à J4, puis décroître (Figure 12.2).

Chez les animaux ayant reçu le vaccin A et éprouvés à 11 semaines d'âge, les courbes d'excrétion suivent une évolution comparable : les excrétions virales oro-pharyngée (Fig 12.1) et cloacale (Fig 12.2) sont toujours réduites chez les animaux vaccinés par rapport aux non-vaccinés, mais de manière moindre que ce qui avait été observé qu'après épreuve à 7 semaines d'âge (Figure 10). Ainsi, les excrétions virales oro-pharyngée et cloacale sont encore détectées chez les animaux vaccinés avec le vaccin A et éprouvés à 11 semaine d'âge 14 jours après épreuve (Figure 12).

La réduction d'excrétion virale observée après épreuve à 11 semaines d'âge chez les animaux ayant reçu le vaccin A, bien que moindre que celle qui avait été observée après épreuve à 7 semaines, reste significative. Ainsi l'excrétion oro-pharyngée a diminué par rapport aux animaux non-vaccinés de 0,56  $\log_{10}$  en moyenne et les différences étaient significatives à 1, 3, 4, et 7 jours après épreuve dans le modèle mixte ( $p\text{-value} = 9,93.10^{-06}$ ). Dans le modèle tenant compte de l'aire sous la courbe la

diminution est significative et de  $9,6 \log_{10} \times \text{jours}$  ( $p\text{-value} = 2,72 \cdot 10^{-04}$ ). De même, l'excrétion cloacale est diminuée de  $0,54 \log_{10}$  en moyenne, ce qui est statistiquement significatif à 1, 3, 4, 7 et 10 jours après épreuve ( $p\text{-value} = 6,44 \cdot 10^{-04}$ ). Dans le modèle tenant compte de l'aire sous la courbe, la diminution est également significative avec un abattement de  $10,6 \log_{10} \times \text{jours}$  ( $p\text{-value} = 2,98 \cdot 10^{-03}$ ).

Fig. 12.1/

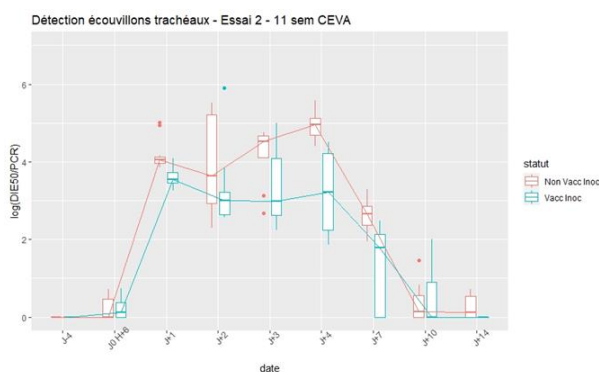
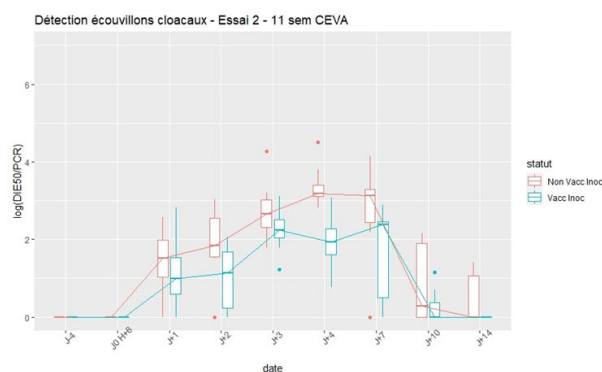


Fig. 12.2/



**Figure 12:** Excrétion virale oro-pharyngée (Fig. 12.1) et cloacale (Fig 12.2) chez les canards mulards vaccinés ou non avec le vaccin A et éprouvés à 11 semaines d'âge avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1). Le niveau d'excrétion virale est exprimé en titre infectieux estimé ( $\log_{10} \text{EID}_{50}/\text{PCR}$ ). Aucun lien significatif n'a été établi entre la réponse immunitaire avant épreuve à 11 semaines d'âge et l'excrétion virale pour les animaux vaccinés A.

### 3.5.2.2. Vaccin B

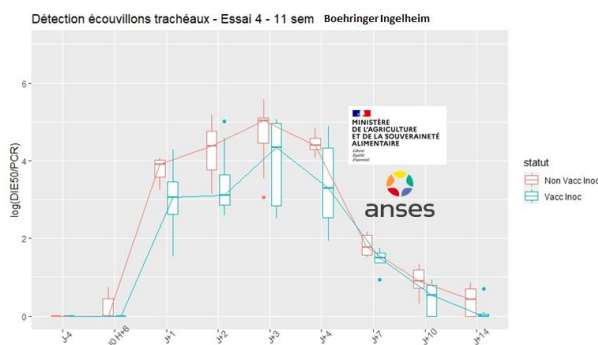
Chez les animaux témoins non-vaccinés, l'évolution des excrétions oro-pharyngée et cloacale est tout à fait comparable à celle observée au cours de l'essai précédent (Fig. 13.1 et 13.2).

Chez les sujets ayant reçu le vaccin B, puis été éprouvés à l'âge de 11 semaines, les mêmes tendances déjà observées avec le vaccin A se retrouvent, avec des excrétions virales oro-pharyngée (Fig 13.1) et cloacale (Fig 13.2) réduites chez les animaux vaccinés par rapport aux témoins non-vaccinés, cette réduction étant toutefois moindre que ce qui avait été observé après épreuve à 7 semaines d'âge (Figure 11), et une excrétion virale oro-pharyngée et cloacale encore détectée chez plus de la moitié des animaux vaccinés 14 jours après l'épreuve à 11 semaines (Figure 13).

Comme précédemment, la réduction d'excrétion observée après épreuve à 11 semaine d'âge reste statistiquement significative avec chez les animaux ayant reçu le vaccin B, une excrétion oro-pharyngée diminuée par rapport aux animaux non-vaccinés de  $0,50 \log_{10}$  en moyenne et des différences entre sujets vaccinés et témoins non-vaccinés qui étaient significatives à 1, 2, 3, 4, 7 et 10 jours après épreuve dans le modèle mixte ( $1,20 \cdot 10^{-04}$ ). Dans le modèle tenant compte de l'aire sous la courbe, la diminution est significative et de  $8,2 \log_{10} \times \text{jours}$  ( $p\text{-value} = 6,80 \cdot 10^{-04}$ ). De même, l'excrétion cloacale est diminuée chez les sujets vaccinés de  $0,43 \log_{10}$  en moyenne, ce qui est statistiquement significatif à 1, 3, 4, 7 et 10 jours après épreuve ( $p\text{-value} = 6,43 \cdot 10^{-04}$ ). Dans le modèle tenant compte de l'aire

sous la courbe, la diminution est également significative avec un abattement de 6,6  $\log_{10}$  x jours (p-value =  $1,76 \cdot 10^{-02}$ ).

Fig. 13.1/



Les résultats des tests sérologiques utilisés (ELISA contre les protéines NP et H5, ou l'IHA vis-à-vis de l'antigène vaccinal pour le vaccin B) ont montré que ces méthodes combinées pouvaient être utilisées au niveau du lot pour différencier les animaux vaccinés des animaux non-vaccinés. L'ELISA NP permet de détecter les infections par des virus influenza aviaire et l'ELISA H5 ou l'IHA, avec l'antigène homologue du virus vaccinal, permet de détecter les animaux vaccinés et/ou infectés par des virus influenza aviaire de sous-type H5.

Enfin, et de manière plus importante pour ce qui concerne les perspectives de contrôle d'une épizootie, les deux candidats vaccins testés ont fait la preuve, dans les conditions expérimentales utilisées, de leur capacité à réduire significativement les niveaux et durées d'excrétion du virus d'épreuve, par voie respiratoire et digestive, chez les sujets vaccinés. La réduction d'excrétion observée, plus importante après épreuve virulente à 7 semaines d'âge, reste significative à 11 semaines d'âge.

Suite à ces premiers résultats positifs, il importe maintenant d'évaluer la capacité des deux candidats vaccins à limiter la transmission directe et indirecte du virus d'épreuve chez des animaux vaccinés, dans le cadre d'essais de transmission réalisés à 7 et 11 semaines d'âge : il est en effet essentiel de vérifier que les niveaux de réduction de l'excrétion rapportés ici suffisent pour limiter la diffusion virale au sein des populations qui seraient vaccinées.

L'essai de transmission à 7 semaines d'âge, déjà réalisé et en fin d'exploitation, fera l'objet d'un rapport séparé avant l'été. L'essai de transmission à 11 semaines d'âge, ajouté au programme de travail de la convention d'étude du fait des premiers résultats obtenus et présentés ici, sera réalisé d'ici à l'automne 2023.

## 5. REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ensemble des personnels impliqués sur le terrain, les éleveurs et organisations de production, les vétérinaires sanitaires, le personnel en animalerie et au laboratoire ainsi que l'ensemble des partenaires ayant contribué à (et co-financé) ce projet d'expérimentation de la vaccination contre l'IAHP coordonné par le ministère français de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire - Direction générale de l'Alimentation (Convention N° CC-2022-002 et convention Anses 220095) : le comité interprofessionnel des palmipèdes à foie gras (CIFOG), les opérateurs ayant fourni et transféré des canetons dans le respect des contraintes sanitaires, les régions Bretagne, Nouvelle-Aquitaine, Occitanie, Pays-de-Loire, l'Unité Expérimentale d'Artiguères (Azélie HAZARD et ses équipes), le Laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche de Dordogne ainsi que les laboratoires Ceva santé animale et Boehringer Ingelheim.

## 6. REFERENCES

- Briand, F.X., Niqueux, E., Schmitz, A., Hirchaud, E., Quenault, H., Allee, C., Le Prioux, A., Guillou-Cloarec, C., Ogor, K., Le Bras, M.O., Gares, H., Daniel, P., Fediaevsky, A., Martenot, C., Massin, P., Le Bouquin, S., Blanchard, Y., Etteradossi, N., 2018. Emergence and multiple reassortments of French 2015-2016 highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *Infect Genet Evol* 61, 208-214. doi:10.1016/j.meegid.2018.04.007
- Briand, F.X., Niqueux, E., Schmitz, A., Martenot, C., Cherbonnel, M., Massin, P., Busson, R., Guillemoto, C., Pierre, I., Louboutin, K., Souchaud, F., Allee, C., Quenault, H., Lucas, P., de Wiele, A.V., Blanchard, Y., Etteradossi, N., Scoizec, A., Bouquin-Leneveu, S.L., Rautureau, S., Lambert, Y., Grasland, B., 2022. Multiple independent introductions of highly pathogenic avian influenza H5 viruses during the 2020-2021 epizootic in France. *Transbound Emerg Dis* 69, 4028-4033. doi:10.1111/tbed.14711
- European Food Safety Authority, E.C.f.D.P., Control, E.U.R.L.f.A.I., Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J.L., Kuiken, T., Marangon, S., Niqueux, E., Staubach, C., Terregino, C., Aznar, I., Guajardo, I.M., Baldinelli, F., 2023. Avian influenza overview September - December 2022. *EFSA J* 21, e07786. doi:10.2903/j.efsa.2023.7786
- Guinat C, Artois J, Bronner A, Guerin JL Gilbert M, Paul MC, 2019. Duck production systems and highly pathogenic avian influenza H5N8 in France, 2016-2017. *Sci Rep.* 16;9(1):6177.
- Le Boulch, M., Bouzidi, M., 2022. Impacts économiques des crises (| Ukraine inflation) sur les marchés avicoles. *SPACE Rennes*, 14 septembre 2022.
- Niqueux, E., Flodrops, M., Allee, C., Lebras, M.O., Pierre, I., Louboutin, K., Guillemoto, C., Le Prioux, A., Le Bouquin-Leneveu, S., Keita, A., Amelot, M., Martenot, C., Massin, P., Cherbonnel-Pansart, M., Briand, F.X., Schmitz, A., Cazaban, C., Dauphin, G., Delquigny, T., Lemiere, S., Watier, J.M., Mogler, M., Tarpey, I., Grasland, B., Etteradossi, N., 2023. Evaluation of three hemagglutinin-based vaccines for the experimental control of a panzootic clade 2.3.4.4b A(H5N8) high pathogenicity avian influenza virus in mule ducks. *Vaccine* 41, 145-158. doi:10.1016/j.vaccine.2022.11.012