



Focus sur un laboratoire

Le Laboratoire national de référence sur l'Influenza aviaire

V. Jestin, Afssa, Ploufragan (France)

Le Laboratoire d'études et de recherches avicoles, porcines et piscicoles de l'Afssa à Ploufragan est pour la France le LNR pour l'Influenza aviaire (IA) et la maladie de Newcastle (ND) depuis 1992, année de la parution des premières directives européennes relatives au contrôle de ces maladies. Cette activité de référence nationale jointe à une activité de référence OIE (Organisation mondiale de la santé animale) concernant la bursite infectieuse et metapneumovirose aviaires s'exerce aujourd'hui, en parallèle des travaux de recherche sur les viroses aviaires et cunicoles d'importance majeure ou émergentes, dans les locaux (1 100 m² en laboratoires L2 et 80 m² en laboratoires L3) dédiés à l'unité Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles. En outre, le LNR a recours aux installations expérimentales du Laboratoire d'études et de recherches avicoles, porcines et piscicoles sur le même site de Ploufragan pour les tests de pathogénicité sur poulet.



L'activité de référence nationale IA a réellement « décollé » à la fin des années 90 avec la volonté d'anticiper l'introduction de virus IA hautement pathogènes (HP) en France et de connaître le statut des productions avicoles françaises par rapport aux infections à virus IA faiblement pathogènes (FP) de sous-types H5/H7, en raison de leur risque potentiel en santé animale voire en santé publique. Ceci s'est traduit par le développement rapide des outils de diagnostic moléculaire, mais aussi par un rôle moteur du LNR IA dans la conception, la mise en place et le suivi de la surveillance de l'IA dans les productions avicoles et l'avifaune sauvage sur le territoire national.

Le LNR IA s'est également organisé de manière à apporter toute la réactivité nécessaire et à moduler les moyens humains déployés en fonction du risque épizootique. En période normale, à ce jour, 6 équivalents temps plein sont consacrés à l'activité de référence IA/ND, néanmoins 14 personnes (13 équivalents temps plein), affectées également à des fonctions de recherche, sont habilitées pour des compétences couvrant l'ensemble du champ d'accréditation IA/ND. Ces personnes sont mobilisées en alternance en fonction des besoins variables au cours de l'année et selon le risque épizootique. Des astreintes techniques de week-end et jours fériés peuvent être mises en place ponctuellement. En période de crise, comme lors de l'hiver 2006, l'ensemble du personnel virologue de l'unité a été redéployé et mobilisé en trois équipes assurant un relais 7/7 jours avec une large amplitude horaire. À ces effectifs, il convient d'ajouter le personnel du service d'élevage et d'expérimentation animale en pathologie aviaire du laboratoire, pour fournir l'appui nécessaire à la réalisation des tests de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV) chez les poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS).

Le présent article illustre de quelle façon le LNR IA remplit ses missions de LNR telles que définies dans le décret du 5 janvier 2006, à savoir le développement et la validation méthodologique incluant leur standardisation et leur normalisation, l'animation du réseau des laboratoires agréés, la réalisation des analyses officielles notamment de confirmation, la réalisation d'une veille scientifique et technique, la réponse à toute demande d'expertise scientifique ou technique du ministère de l'Agriculture et de la

Pêche et éventuellement d'autres ministères. De plus, cet article situe le positionnement du LNR IA dans le réseau mondial, communautaire en particulier, des laboratoires de référence IA et tente de montrer les apports respectifs liés à une activité de recherche et d'expertise parallèles sur le même sujet.

Développement méthodologique, validation, normalisation, accréditation

Le LNR IA/ND est accrédité depuis 1997 sur les programmes 109 (sérologie animale) et 112 (virologie animale) du COFRAC avec des extensions mineures en 2002 et 2003, ce qui couvre les techniques officielles d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ND et IA H5, H6, H7, d'immunodiffusion en gélose (IDG) IA, d'isolement par ovoculture et typage de l'hémagglutinine des virus hémagglutinants IA et ND, à l'aide de sérums de référence et d'anticorps monoclonaux (dont certains développés au LNR dans les années 1980), des virus hémagglutinants IA et ND. Un scientifique du LNR qui avait participé à leur standardisation au plan européen a écrit les textes français de référence puis les normes correspondantes du fait de sa participation continue aux groupes de travail AFNOR en immunosérologie et virologie animales. Les techniques de rétro transcription polymérisation en chaîne (RT-PCR)/séquençage développées 10 ans plus tôt au laboratoire pour ND/paramyxovirose du pigeon, ont été appliquées au diagnostic de l'IA à la fin des années 90. Elles ont été ensuite modernisées avec l'avènement du séquençage automatique et des techniques de RT-PCR en temps réel, puis validées en collaboration avec le LCR et quelques autres LNR pilotes européens. Ceci a abouti à l'élaboration du Manuel européen de diagnostic IA auquel se réfère la directive du Conseil 2005/94/EC et qui constitue le socle réglementaire des mesures communautaires de lutte contre l'IA.

Le LNR IA a approfondi les travaux précédents et obtenu en juillet 2008 la 1^{re} accréditation COFRAC en PCR Santé Animale pour 4 techniques de RT-PCR temps réel ; il poursuit encore leur amélioration en construisant un contrôle interne de type ARN encapsidé (« armored RNA ») permettant de valider l'ensemble des étapes du processus.



Focus sur un laboratoire

Cahier numéro 1

Le LNR IA a ainsi la capacité de détecter et de caractériser par des techniques RT-PCR temps réel et/ou RT-PCR/séquençage l'intégralité de chacun des huit gènes de tout sous-type d'influenzavirus. En continuum avec cette puissance analytique, la maîtrise des outils bioinformatiques au laboratoire permet d'identifier des mutations particulières et de suivre l'évolution génétique des virus, IA H5 faiblement pathogène (FP) en particulier, en parallèle de l'étude de leur évolution au plan antigénique, dans les limites d'accès aux échantillons pertinents.

Par ailleurs, le LNR a également développé et/ou validé des tests ELISA influenza NP, N1, NS, M2 et continue à travailler, notamment dans le cadre de programmes européens, à la mise au point de tests DIVA (stratégie permettant de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés, ou Discriminating infected from vaccinated animals) et à l'évaluation des kits de diagnostic sérologique.

Animation du réseau de laboratoires agréés français et appartenance au réseau mondial de laboratoires, communautaires en particulier



Le LNR a organisé de manière régulière des sessions de formation à l'intention des laboratoires de diagnostic spécialisés en aviculture, relatives essentiellement aux techniques de base IDG IA (et IHA Newcastle), et sur demande des ateliers plus spécialisés (ovoculture notamment). Un réseau de laboratoires publics et privés spécialisés en aviculture s'est ainsi constitué. Ces techniques étant bien maîtrisées par les laboratoires, les sessions de formation ne sont plus organisées que sur demande, en dehors des sessions de formation spécifiques mises en place à chaque transfert de nouvelles techniques (ELISA NP, IHA H5/H7 RT-PCR temps réel gènes M et H5).

Le LNR organise annuellement des essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) au titre du programme 109 (en alternance IHA (uniquement IHA Newcastle avant 2002, ensuite IHA Newcastle et H5/H7 de criblage) ou IDG Influenza) depuis 1993 et depuis 2005 sur les tests de RT-PCR temps réel IA M et H5. Une quinzaine de laboratoires y participent. Le LNR se prépare aussi en vue d'être accrédité en tant qu'organisateur d'EILA.

Le LNR participe à tous les EILA européens annuels organisés par le LCR (VLA Weybridge, RU) dans ses domaines d'activité couvrant donc la détection et l'identification des virus par des techniques de RT-PCR/séquençage et IHA ainsi que la détection, quantification et le typage des anticorps par des techniques IDG et IHA respectivement.

Le LNR fait part annuellement, comme il en a l'obligation, du bilan des virus identifiés et des positivités observées au plan sérologique et présente régulièrement des communications scientifiques. Outre la participation conjointe avec l'équipe du LCR à 4 programmes de recherche européens, le LNR transmet

également au LCR les souches présentant un intérêt particulier ou posant un problème d'identification. De plus, le LNR fait partie du réseau FLU.LAB.NET regroupant tous les LNR européens ainsi que les laboratoires de référence majeurs dans le monde, ce qui facilite les échanges d'information. Il participe aussi au sein du réseau d'excellence EPIZONE à des groupes de travail permettant de mutualiser des données, savoir faire et matériel biologique.

En outre le LNR IA contribue à la formation des cadres et techniciens de laboratoires de pays tiers.

Réalisation des analyses officielles, notamment de confirmation

Le LNR IA réalise toutes les analyses de confirmation demandées par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) que ce soit dans un contexte de suspicion clinique, de surveillance ou de contrôle d'exportation, en mettant en œuvre les techniques précitées. Il réalise également tous les autocontrôles nécessaires pour la surveillance des troupeaux EOPS et conventionnels du Laboratoire d'études et de recherches avicoles porcines et piscicoles. De plus au début des années 2000, lors de la mise en route des enquêtes de surveillance IA, le LNR IA a effectué les analyses de première intention dans les productions avicoles mineures pour lesquelles la validation des tests sérologiques était peu documentée; le LNR a ensuite progressivement transféré ces analyses aux laboratoires agréés.



Le LNR a traité un volume de près de 10000 tests en 2008 contre près de 18000 en 2006 (année de crise). Le LNR IA a ainsi identifié et caractérisé au plan de la virulence tous les virus H5N1 HP (hautement pathogène) détectés au cours de l'hiver 2006 et de l'été 2007 et démontré que lors du 2^e épisode, il s'agissait d'une nouvelle introduction, à côté d'un suivi systématique de l'évolution génétique et antigénique des virus IA identifiés (virus H5 FP notamment), ainsi que des sous-types qui émergent et d'une sollicitation régulière pour confirmer des sérologies H5 positives.

Un diagramme résumant les relations entre les laboratoires agréés et le LNR IA est présenté figure 1. Les laboratoires agréés réalisent les tests de RT-PCR temps réel de première intention consistant 1- à détecter la présence de virus influenza quel que soit le sous-type impliqué et 2- en cas de positivité à détecter la présence ou non de virus de sous-type d'hémagglutinine H5 (encadré vert en haut à gauche). En cas de positivité, le LNR prend le relais (tout le reste de la figure 1):

- soit, si un virus H5 a été détecté, pour immédiatement confirmer ou exclure la présence de virus H5N1 hautement pathogènes du clade 2.2 (présent en Europe en 2006-2008) et dans tous les cas pour confirmer ou déterminer les caractéristiques de virulence du virus H5 par séquençage du motif de clivage de l'hémagglutinine (encadré rouge en bas à gauche);
- soit, en l'absence de mise en évidence de virus H5, pour, sans délai, exclure ou non la présence de virus de sous-types



Focus sur un laboratoire

d'hémagglutinine H7 et en cas de positivité déterminer les caractéristiques de virulence du virus H7 par séquençage du motif de clivage de l'hémagglutinine (encadré au milieu à droite).

Le typage des virus H5/H7 identifiés précédemment est poursuivi par détermination du sous-type de neuraminidase par des méthodes RT-PCR; l'isolement de la souche est mis en œuvre pour, en cas de succès, approfondir les investigations: détermination des caractéristiques antigéniques et selon l'intérêt séquençage partiel ou complet du génome, éventuellement réalisation de tests *in vivo* dont le test de mesure de l'index de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV).

En l'absence de virus H5/H7, les sous-types les plus fréquents (H6, H1 H3) et/ou émergents (H9) sont recherchés par des méthodes RT-PCR et en cas de positivité, les investigations sont poursuivies comme précédemment.

En l'absence des sous-types précédents, l'isolement est tenté en vue d'une identification virale à l'aide d'antisérums de référence puis confirmation et caractérisation éventuelle par des méthodes de RT-PCR séquençage, le LNR étant en capacité d'identifier les sous-types H1-15 et N1-N9 d'influenzavirus aviaires.

Des études de phylogénie et de recherche des réassortiments sont ensuite mises en œuvre. Les souches les plus intéressantes viennent enrichir la collection et peuvent être utilisées dans les travaux de recherche en pathogénie, vaccinologie mais également en développement méthodologique pour la réactualisation des tests existants ou la validation des nouveaux etc.

surveillance IA puis de leur réactualisation et extension avec l'augmentation du risque d'introduction du virus H5N1 HP en France, lors de la conception d'un plan de vaccination et de surveillance associé, lors de la mise en évidence de la situation sanitaire dans les productions de palmipèdes domestiques. De plus, deux scientifiques seniors du LNR participent à l'expertise collective au sein de l'Afssa (présidence du groupe d'expertise collective en urgence, GECU Influenza aviaire), de l'Afset (Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail) et de l'AESA (Agence européenne de sécurité des aliments), l'un d'entre eux ayant aussi contribué à des missions d'expertise pour la FAO (Food and Agriculture Organization, ou Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) et l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale).

Conclusion

Grâce à sa maîtrise d'outils puissants et fiables, à son investissement permanent dans le développement méthodologique, à son organisation et sa réactivité, à l'implication parallèle de son personnel dans des activités de recherche et/ou d'expertise, le LNR IA remplit toutes ses obligations officielles. Il est ainsi en capacité d'apporter tout le soutien scientifique et technique nécessaire à la surveillance de l'Influenza aviaire en France et à faire partager son savoir faire auprès des laboratoires des pays tiers demandeurs.

Références

- Briand FX, Le Gall-Reculé G, Bluteau A, Guillou-Cloarec C, Ogor K, Macé C, Ferré S, Schmitz A, Guionie O, Massin P, Lamandé J, Allée C, Cherbonnel M, Picault JP, Jestin V. 2009. Mise en évidence de réassortiments multiples chez les influenza virus de sous-type H5 faiblement pathogènes français entre 2002 et 2008. Proceedings des 8^{es} Journées de la Recherche Avicole, St-Malo, 25 et 26 mars 2009 (sous presse).
- Cherbonnel M, Lamandé J, Allée A, Schmitz A, Ogor K, Le Gall-Reculé G, Le Bras MO, Guillemoto C, Pierre I, Picault JP, Jestin V. 2007. Virologic findings in selected free-range mule duck farms at high risk for avian influenza infection. Avian Disease, 51: 408-413. <http://avdi.allenpress.com/avdionline/?request=get-document&doi=10.1637%2F7595-040306R1.1>
- Le Gall-Reculé G, Briand FX, Schmitz A, Guionie O, Massin P, Jestin V. 2008. Double introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus into France in early 2006. Avian Pathology, 37(1): 15-23. <http://www.informaworld.com/smp/content-db=all?content=10.1080/03079450701774835>
- Niqueux E, Guionie O, Schmitz A, Hars J, Jestin V. 2009. Immunité naturelle vis-à-vis des influenza virus de sous-types H5 et N1 dans l'avifaune sauvage française. Proceedings des 8^{es} Journées de la Recherche Avicole, St-Malo, 25 et 26 mars 2009 (sous presse).
- Schmitz A, Guillemoto C, Pierre I, Le Bras MO, Allée C, Lamandé J, Picault JP, Jestin V. 2009. Influence de l'âge et de la saison de prélèvements sur la seropositivité vis-à-vis des influenza virus de sous-types H5 chez les palmipèdes reproducteurs pour la période 2005 à 2007. Proceedings des 8^{es} Journées de la Recherche Avicole, St-Malo, 25 et 26 mars 2009 (sous presse).
- Slomka M, Coward V, Banks J, Löndt B, Brown I, Voermans J, Koch G, Handberg K, Jorgensen P, Cherbonnel M, Jestin V, Cattoli G, Capua I, Ejdersund A, Thorén P, Czifra G. 2007. Identification of Sensitive and Specific Avian Influenza Polymerase Chain Reaction Methods Through Blind Ring Trials Organized in the European Union. Avian Diseases, 51: 227-234. <http://avdi.allenpress.com/avdionline/?request=get-document&doi=10.1637%2F7674-063006R1.1>

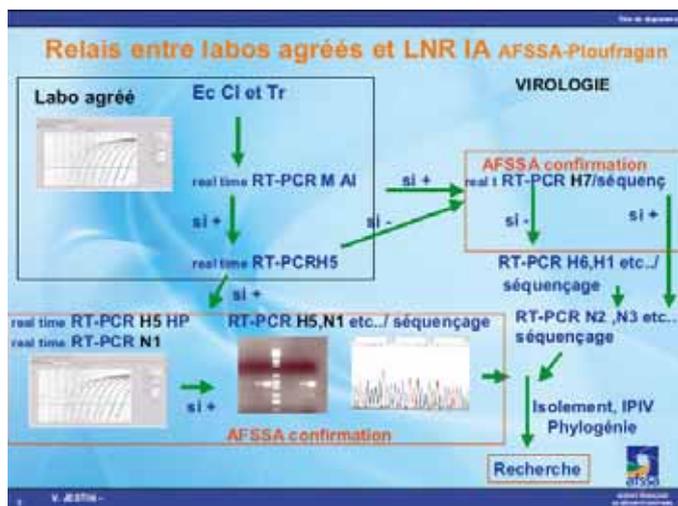


Figure 1. Processus de détection et d'identification des virus d'Influenza aviaire.

Activité de veille et d'appui scientifiques et techniques

De par la contribution des mêmes scientifiques à des activités de référence et de recherche de niveau international, le LNR remplit au quotidien sa mission de veille scientifique et technique. En ce qui concerne la réponse aux demandes d'expertise, le LNR, grâce à ses scientifiques seniors, a toujours répondu présent aux sollicitations de ses tutelles, du ministère de l'Agriculture et de la Pêche, en particulier. Ces sollicitations ont d'ailleurs été très fortes lors de la mise en place des premiers plans de