



Émergence de virus influenza aviaires hautement pathogènes : la triade hôte, microbiote et virus

Pierre Bessière

► To cite this version:

Pierre Bessière. Émergence de virus influenza aviaires hautement pathogènes : la triade hôte, microbiote et virus. Médecine vétérinaire et santé animale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30114 . tel-03590810

HAL Id: tel-03590810

<https://theses.hal.science/tel-03590810>

Submitted on 28 Feb 2022

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Pierre BESSIERE

Le 23 septembre 2021

**Émergence des virus influenza aviaires hautement pathogènes :
la triade hôte, virus et microbiote**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition**

Unité de recherche :

IHAP - Laboratoire Interactions Hôtes-Agents Pathogènes

Thèse dirigée par
Romain VOLMER

Jury

Mme Caroline GOUJON, Rapporteure
M. Christophe CHEVALIER, Rapporteur
M. Christophe PASQUIER, Examineur
Mme Sophie LE PODER, Examinatrice
M. Romain VOLMER, Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, le Docteur Romain Volmer, pour m'avoir confié ce sujet, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.

Je remercie les Docteurs Caroline Goujon et Christophe Chevalier, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et ont été bienveillants quand bien même ils l'ont reçu sous la forme de feuilles volantes.

Je remercie le Professeur Sophie Le Poder, qui a accepté d'être l'examinatrice de mon jury de thèse.

Enfin, je remercie le Professeur Christophe Pasquier, qui a accepté de présider le jury.

Table des matières

Table des matières	1
Listes des Figures.....	3
Listes des Tableaux.....	3
Liste des abréviations.....	4
I. Introduction.....	7
A. Découverte et classification des virus influenza	7
B. Morphologie des virus influenza A.....	7
C. Génome et protéines des virus influenza A	8
1. Structure	8
2. Segments du complexe polymérase et de la nucléoprotéine (NP)	9
3. Segment de l'hémagglutinine (HA)	11
4. Segment de la neuraminidase (NA)	11
5. Segment des protéines de matrice (M)	12
6. Segment des protéines non structurales (NS)	12
D. Cycle viral.....	15
1. Récepteurs cellulaires	15
2. Attachement	15
3. Réplication, transcription et traduction	16
4. Assemblage et bourgeonnement.....	17
E. Evolution virale.....	18
F. Spectre d'hôtes des virus influenza A	22
G. Phénotypes VIAFP et VIAHP	24
1. Critères de classification	24
2. VIAFP	25
3. VIAHP	25
4. Limites de la classification.....	27
5. Obtention d'un site de clivage polybasique	28
6. Prédispositions génétiques des VIAFP	32
7. Quasi-espèce virale et émergence de VIAHP.....	32
8. Analyse des phénomènes d'émergence	33
H. Epidémiologie des virus influenza aviaires de sous-type H5	35

I.	Mesures de prévention dans les élevages	37
J.	Immunité antivirale dirigée contre les virus influenza.....	39
1.	Senseurs de l'immunité antivirale innée	39
2.	Réponse interféron de type 1	40
3.	Réponse inflammatoire.....	42
4.	Réponse immunitaire adaptative	44
K.	Interactions avec le microbiote et d'autres virus influenza A	46
1.	Interactions avec le microbiote	47
2.	Interactions entre virus influenza	55
II.	Hypothèses et objectifs.....	58
III.	Résultats.....	61
A.	Le microbiote contribue au contrôle de la réplication virale d'un VIAHP H5N9 chez le canard.....	62
B.	Coinfections avec un couple VIAFP et VIAHP chez le poulet et le canard	80
IV.	Discussion.....	118
A.	Le microbiote : une barrière à l'émergence des VIAHP	119
B.	Les interactions entre variants à l'échelle de l'individu	122
C.	Modulation de la compétition entre les VIAHP et VIAFP H5N8 par la réponse immunitaire antivirale innée.....	124
D.	Interactions entre virus à l'échelle des populations	127
V.	Perspectives.....	129
VI.	Bibliographie	130
VII.	Annexes	159

Listes des Figures

Figure 1 : Structure schématique d'un virus influenza A	8
Figure 2 : Ribonucléoprotéine virale des virus influenza A.....	10
Figure 3 : Cycle viral des virus influenza A	18
Figure 4 : Dérive et cassure antigéniques, illustration par l'exemple de la grippe de Hong-Kong.....	21
Figure 5 : Ecologie des virus influenza A.	23
Figure 6 : Virus influenza aviaires faiblement et hautement pathogènes.	27
Figure 7 : Evolution des VIA de sous-type H5.	37
Figure 8 : Réponse immunitaire adaptative et clairance virale.	46
Figure 9 : Facteurs influant sur le microbiote et sa régulation de la réponse immunitaire. ...	48
Figure 10 : Mucus digestif et respiratoire en microscopie confocale.....	54
Figure 11 : Scénarios possibles suite à l'émergence d'un VIAHP au sein d'un individu.....	59

Listes des Tableaux

Tableau 1 : Les huit segments des virus influenza et les protéines correspondantes.....	14
Tableau 2 : Exemple du calcul d'un index de pathogénicité.....	24
Tableau 3 : Les émergences de VIAHP dont le VIAFP précurseur est connu	31

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
AAV	Adeno-associated virus
ABX	Antibiotics
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNv	ARN viral
CBD	Cap binding complex
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DI ₅₀	Dose infectieuse 50
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animal
dpi	Days post infection
EID ₅₀	Egg infectious dose 50
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENVT	Ecole nationale vétérinaire de Toulouse
EU	European Union
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FP	Faiblement pathogène
GP43	Glycoprotéine 43
HA	Hémagglutinine
HBV	Hepatitis B virus
HDV	Hepatitis D virus
HP	Hautement pathogène
IFIT	Interferon induced proteins with tetratricopeptide repeats
IFN	Interféron

Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNOs	Nitric acid synthase
INRAe	Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IPIV	Indice de pathogénicité intra-veineuse
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2
LT	Lymphocyte T
LB	Lymphocyte B
LPS	Lipopolysaccharide
M1	Protéine de matrice 1
M2	Protéine de matrice 2
MAA	Ministère de l'agriculture et de l'alimentation
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MDCK	Madin-Darby canine kidney
Mx	Myxomavirus resistance
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
NA	Neuraminidase
NDV	Newcastle disease virus
NEP	Nuclear export protein
NGS	Next generation sequencing
NK	Natural killer
NI	Non infected
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
NOD	Nucleotide oligomerization domain
NP	Nucléo-protéine
NS1	Non structural protein 1
NS2	Non structural protein 2
NS3	Non structural protein 3

OAS-L	Oligoadenylate synthetase-like
OIE	Office international des épizooties
PA	Polymérase acide
PB1	Polymérase basique 1
PB2	Polymérase basique 2
PBS	Phosphate buffered saline
PC6	Proprotéine convertase 6
PCR	Polymerase chain reaction
POLRMT	Mitochondrial DNA-directed RNA polymerase
PRR	Pattern recognition receptor
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1
RLR	RIG-1-like receptor
RNP	Ribonucléoprotéine
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative PCR
SPF	Specific pathogen-free
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose 50
TLR	Toll like receptor
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
TMUV	Tembusu virus
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TPCK	L-(tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18
VIA	Virus influenza A
VIAFP	Virus influenza A faiblement pathogène
VIAHP	Virus influenza A hautement pathogène
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse

I. Introduction

A. Découverte et classification des virus influenza

Les virus influenza sont des virus enveloppés à ARN segmenté négatif appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae*, qui comprend également les *Isavirus*, les *Quararjavirus* et les *Thogotovirus*. Leur découverte remonte à 1933, avec l'isolement, à partir de furets, d'un virus influenza A par Wilson Smith, Christopher Andrewes et Patrick Laidlaw (Kuszevski and Brydak, 2000). Au cours des années qui suivirent, la recherche autour de ces virus et du développement de vaccins connu un formidable essor. On dénombrait trois genres de virus, les *Influenzavirus* A, B et C, jusqu'à l'isolement en 2011, chez un porc, d'un *Influenzavirus* suffisamment divergeant de ces derniers pour créer un nouveau genre, *Influenzavirus* D.

Les virus influenza A (VIA) sont ensuite classifiés en sous-types, selon leurs deux glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). A ce jour, on dénombre 18 HA et 11 NA, les HA étant séparées en deux groupes antigéniques différents (Krammer et al., 2018). La dénomination des virus se fait selon une nomenclature standard avec, dans l'ordre : le type (ici, A), l'espèce chez qui le virus a été isolé – s'il s'agit d'une espèce non humaine –, le lieu où le virus a été isolé, le numéro de l'isolat, l'année d'isolement et, enfin, le sous type. Par exemple, le virus A/Guinea Fowl/France/129/2015 (H5N9), correspond à l'isolat 129 d'un virus influenza A H5N9 isolé en France en 2015 chez une pintade.

B. Morphologie des virus influenza A

Les VIA sont pléomorphes : ils peuvent prendre une forme sphérique de 80 à 120 nm de diamètre environ ou une forme filamenteuse, pouvant aller jusqu'à 20 µm de long (Fujiyoshi et al., 1994; Rossman et al., 2012). Les virus sont enveloppés par une membrane lipidique obtenue en fin de cycle viral, suite au bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire. Cette enveloppe contient majoritairement HA et NA, avec un ratio d'au moins quatre HA pour une NA (Shaw and Palese, 2007), et la protéine de matrice 2 (M2) dans des proportions largement inférieures : environ une M2 pour 10 à 100 HA (Zebedee and Lamb, 1988). La membrane est tapissée sur sa face interne par la protéine de matrice 1 (M1). Enfin, sous cette couche, on trouve la nucléoprotéine (NP) et les complexes ribonucléoprotéines (RNP) : les 8

segments d'ARN négatif viraux encapsidés par NP et liés au complexe polymérase, constitué des deux polymérases basiques (PB1 et PB2) et de la polymérase acide (PA) (Bouvier and Palese, 2008) (Figure 1).

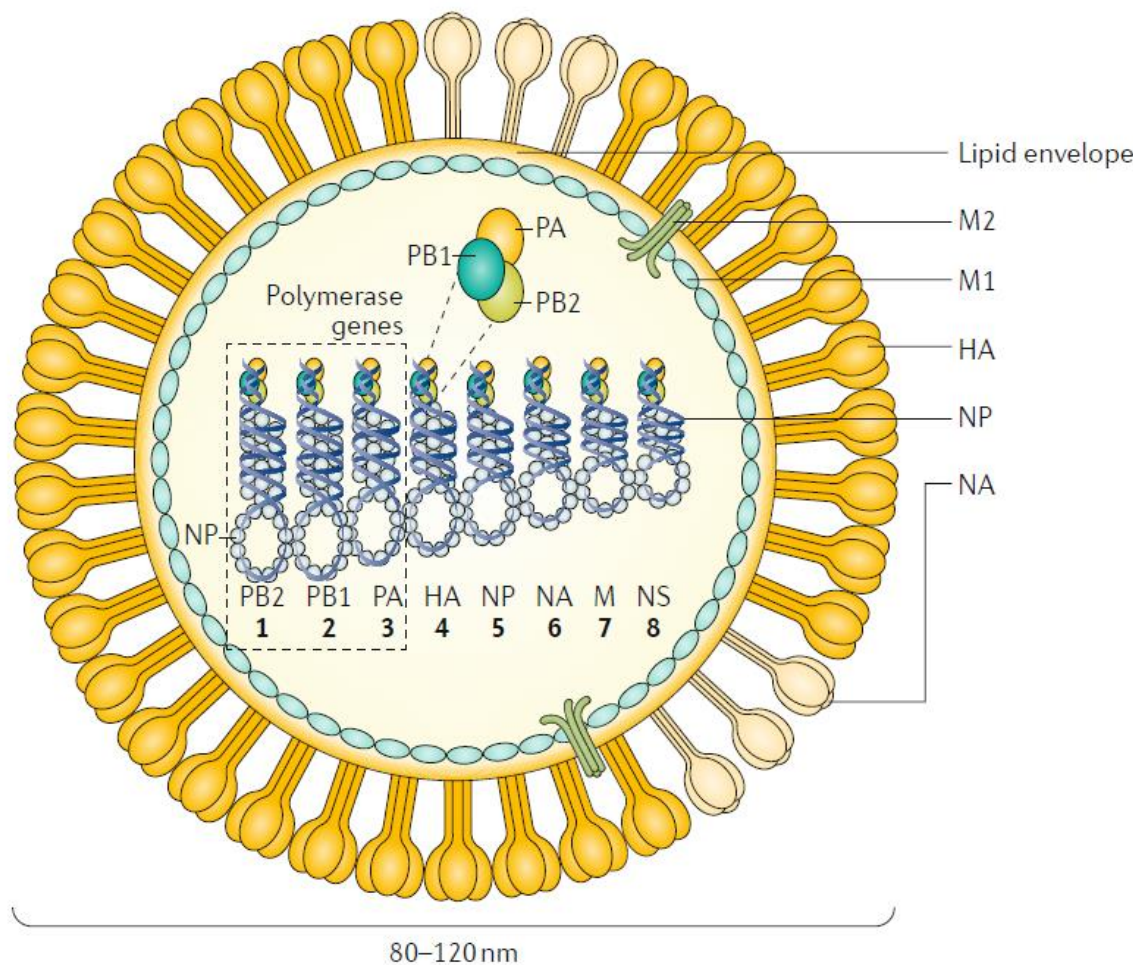


Figure 1 : Structure schématique d'un virus influenza A

Schéma représentant la forme sphérique des virus influenza A. D'après Krammer et al., 2018

C. Génome et protéines des virus influenza A

1. Structure

Le génome des VIA compte 8 segments d'ARN, classés par ordre décroissant de longueur. Les segments 1 et 2 codent pour une protéine, respectivement PB2 et PB1, mais également pour des protéines accessoires, que sont PB2-S1, PB1-F2 et PB1-N40. Le segment 3 code pour PA, ainsi que pour trois protéines accessoires, PA-X, PA-N155 et PA-182. Les segments 4, 5 et 6 codent uniquement pour une protéine, respectivement HA, NP et NA. Le segment 7 code pour

trois protéines, M1, M2 et M42 de même que le segment 8 qui code pour les protéines non structurales (NS) NS1, NS2 et NS3. NS2 est également appelée *nuclear export protein* (NEP). Les protéines accessoires sont produites grâce à l'épissage alternatif des ARNm, au glissement de phase de lecture ou à l'initiation de la traduction à partir de codons AUG autres que le premier (phénomène appelé *leaky scanning* en anglais). Les différentes protéines codées par les huit segments, ainsi que leurs fonctions associées, sont résumées dans le Tableau 1. Les extrémités des segments, hautement conservées, sont non-codantes ; on y trouve notamment les promoteurs du complexe polymérase, des signaux de polyadénylation ou des signaux d'assemblage (Bouvier and Palese, 2008). Les RNP ont une structure tige-boucle hélicoïdale, faisant quelques dizaines de nanomètres de long. Une extrémité forme une boucle, tandis que l'autre contient les extrémités 3' et 5', liées au complexe polymérase (Compans et al., 1972). NP est liée à l'ARN, à raison d'environ 12 nucléotides par site de fixation, un site étant espacé de l'autre d'environ 25 nucléotides (Williams et al., 2018). Les nombreux résidus arginine de NP, chargés positivement, interagissent avec les charges négatives des phosphates de l'ARN.

2. Segments du complexe polymérase et de la nucléoprotéine (NP)

Les trois plus longs segments du génome codent pour les trois protéines du complexe polymérase : PB2, PB1 et PA. Ces protéines s'associent à NP, elle-même associée à l'ARN viral (ARNv), via une structure dite en queue de poêle (Fodor et al., 1994; Hsu et al., 1987). Certaines portions de l'ARNv peuvent réaliser des appariements internes et ainsi former des structures secondaires, comme des tiges et des boucles (Dadonaite et al., 2019). La structure formée par les RNP virales est représentée en Figure 2.

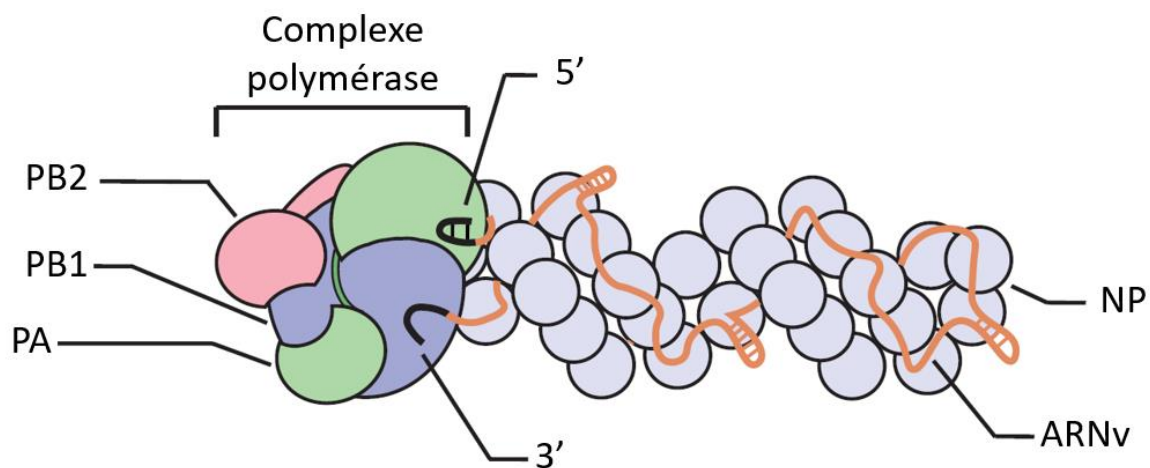


Figure 2 : Ribonucléoprotéine virale des virus influenza A.

Schéma représentant une ribonucléoprotéine virale, constituée d'un brin d'ARNv associé à NP, ainsi que du complexe polymérase, constitué des protéines PB1, PB2 et PA, se liant aux extrémités 3' et 5' de l'ARNv. Des structures secondaires peuvent être présentes sur ce dernier. D'après Fodor and Te Velthuis, 2020.

PB2 se fixe aux ARNm cellulaires en reconnaissant leur coiffe, qui est volée au cours du cycle viral, avec l'aide de PB1 et PA (Dias et al., 2009). L'épissage de l'ARNm codant pour PB2 permet également la production d'une autre protéine récemment découverte : PB2-S1. Cette protéine a, du moins *in vitro*, une fonction inhibitrice des voies de signalisation dépendant de RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*) (Yamayoshi et al., 2016).

PB1 se lie aux extrémités 3' et 5' des ARN viraux et complémentaires et possède l'activité catalytique du complexe polymérase : c'est cette sous-unité qui réalise la synthèse des nouveaux ARN. Le segment 2 code également, dans un cadre de lecture +1, pour la protéine accessoire PB1-F2 (Chen et al., 2001). Il s'agit d'un facteur de virulence pro-apoptotique, impliqué dans la pathogénèse, la dissémination et la transmission virales (James et al., 2016; McAuley et al., 2007; Ozawa et al., 2011). Une troisième protéine est produite par ce segment, à partir d'un codon d'initiation AUG différent de celui de PB1 : la protéine PB1-N40. Son expression est associée à une réplication virale plus efficace (Wise et al., 2009).

Enfin, PA, en s'associant à PB1 et PB2, participe à l'initiation de la synthèse des ARNm et, comme dit précédemment, au vol de coiffe, grâce à son activité endonucléase. Dans un cadre de lecture +1, la protéine PA-X est produite. Elle a différents rôles connus : la modulation de

l'expression de gènes cellulaires régulant le contrôle de l'inflammation, la différenciation cellulaire, ou encore, l'apoptose (Chaimayo et al., 2018; Jagger et al., 2012). Deux autres protéines, produites à partir des codons AUG 11 et 13, et correspondant donc à des formes tronquées de PA, ont été également découvertes : PA-N155 et PA-N182. La fonction exacte de ces protéines reste encore à déterminer (Muramoto et al., 2013; Vasin et al., 2014).

Le complexe polymérase joue un rôle capital dans le spectre d'hôtes, le tropisme tissulaire et la pathogénicité. Par exemple, la mutation du gène PB2 E627K est un facteur majeur d'adaptation aux mammifères (Subbarao et al., 1993).

Comme décrit précédemment, NP a un rôle structural et encapside l'ARN, mais elle participe également à la réplication du génome, en jouant un rôle de facteur d'élongation (Turrell et al., 2013) et en participant à l'import et à l'export nucléaires des RNP (Neumann et al., 1997).

3. Segment de l'hémagglutinine (HA)

HA est la glycoprotéine de surface majoritaire. Elle permet l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules cibles en se fixant aux acides sialiques et en entraînant ainsi l'endocytose du virus (Skehel and Wiley, 2000). Elle est synthétisée sous une forme immature, appelée HA0, constituée de deux parties, HA1 et HA2. Le clivage de HA0 par des protéases cellulaires est une étape clef, car il permettra ensuite l'exposition du peptide de fusion et la libération des RNP dans le cytoplasme. En l'absence de clivage, les particules virales ne sont pas infectieuses. HA1 contient la tête globulaire et le motif de liaison aux acides sialiques. HA2 contient la tige et le site de clivage. Le spectre d'hôtes et le tropisme tissulaire dépendent, entre autres, de l'affinité de HA pour les différents types d'acides sialiques, et de la capacité des protéases cellulaires à cliver HA0 (Mair et al., 2014; Steinhauer, 1999).

4. Segment de la neuraminidase (NA)

NA est la deuxième glycoprotéine de surface la plus abondante. Sa principale fonction est de cliver la liaison entre les acides sialiques et HA, lors du bourgeonnement viral. L'inhibition de cette activité sialidase conduit à l'accumulation de particules virales à la surface d'une cellule

infectée (Mori et al., 2015). NA contribue également à l'infectiosité en détruisant les mucines présentes dans le mucus respiratoire et joue un rôle probable dans l'accès aux cellules respiratoires (Cohen et al., 2013; Matrosovich et al., 2004a). La NA des VIA possède également un domaine de liaison aux acides sialiques (Du et al., 2020).

5. Segment des protéines de matrice (M)

Le gène M code pour les protéines de la matrice virale. S'il donne, grâce à l'épissage, quatre ARNm différents, seuls trois sont connus pour coder pour une protéine (Wise et al., 2009). La protéine de matrice la plus abondante de la particule virale est la protéine M1. Elle forme une couche sous l'enveloppe virale et joue un rôle d'initiation de l'assemblage, avant dernière étape du cycle viral (Reid et al., 2002). M1 est également importée dans le noyau, où elle se liera à NS2 et participera ainsi à l'export nucléaire des RNP (Akarsu et al., 2003; Cros and Palese, 2003). M2 est une protéine membranaire, servant de canal à protons et permettant l'acidification de la particule virale, une fois cette dernière endocytée (Watanabe et al., 2001). Elle joue également un rôle dans l'assemblage des particules virales (Chen et al., 2008). La troisième et dernière protéine est M42 ; elle jouerait un rôle compensatoire pour la perte de M2 chez certaines souches de virus (Wise et al., 2012). Les séquences nucléotidique et protéique de ce segment sont particulièrement conservées d'une souche de VIA à l'autre (Fouchier et al., 2000).

6. Segment des protéines non structurales (NS)

Le segment 8, le plus petit du génome, code pour trois protéines : NS1, NS2 (également appelée NEP) et NS3. NS1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la régulation de l'expression des gènes viraux et dans l'inhibition de la réponse antivirale de l'hôte (Soubies et al., 2010), notamment en agissant comme antagoniste de l'interféron (García-Sastre, 2001). Le domaine C-terminal de la protéine contient notamment des motifs connus pour augmenter la virulence du virus, comme un domaine PDZ interagissant avec les protéines cellulaires et augmentant la pathogénicité chez les mammifères (Bavagnoli et al., 2011). NS1 régule également la transcription et l'épissage des ARN viraux (Hale et al., 2008; Jackson et al., 2008). NS2 régule le transport des RNP nouvellement formées du noyau vers le cytoplasme (Akarsu

et al., 2003; Boulo et al., 2007), ainsi que la transcription et la réplication du génome viral (Robb et al., 2009). Enfin, NS3, issue de l'épissage de l'ARNm codant pour NS1, pourrait être associée à l'adaptation aux mammifères (Selman et al., 2012).

Tableau 1 : Les huit segments des virus influenza et les protéines correspondantes

D'après Bouvier et al., 2008 et Vasin et al., 2014.

Segment	Nom	Longueur (nucléotides)*	Protéine	Longueur (acides aminés)*	Fonctions
1	PB2	2341	PB2	759	Sous-unité du complexe polymérase. Reconnaissance de la coiffe des ARNm.
			PB2-S1	510	Inhibition des voies de signalisation RIG-1 (in vitro)
2	PB1	2341	PB1	757	Sous-unité du complexe polymérase. Activité catalytique : élongation des ARN.
			PB1-F2	90	Activité pro-apoptotique. Rôle dans la pathogénèse et la dissémination virale.
			PB1-N40	718	Augmente l'efficacité de la réplication virale.
3	PA	2233	PA	716	Sous-unité du complexe polymérase. Vol de coiffe.
			PA-X	252	Modulation de l'expression des gènes de l'hôte
			PA-N155	568	Inconnues
			PA-N182	535	Inconnues
4	HA	1778	HA	560	Glycoprotéine de surface majeure. Attachement et entrée dans les cellules. Fusion endosomale.
5	NP	1565	NP	498	Composant structural du complexe polymérase. Encapsidation des ARNv. Import et export nucléaires des RNP.
6	NA	1413	NA	465	Glycoprotéine de surface. Clivage des acides sialiques. Libération des virus lors du bourgeonnement.
7	M	1027	M1	252	Protéine virale la plus abondante. Tapise la bicouche lipidique. Participe à l'initiation de l'assemblage.
			M2	97	Canal à ions. Participe à l'assemblage.
			M42	99	Rôle compensatoire pour la perte de M2.
8	NS	890	NS1	217	Inhibition de la réponse interféron. Régulation de la transcription et de l'épissage.
			NS2	121	Transport des RNP depuis le noyau. Régulation de l'activité de la polymérase.
			NS3	174	Potentielle adaptation aux mammifères.

*Les longueurs en nucléotides et acides aminés sont celles du virus A/Anhui/1/2013 (H7N9).

La longueur des segments PB1, HA, NA et NS varie selon les sous-types et les souches.

D. Cycle viral

Les différentes étapes du cycle viral, détaillées dans les paragraphes suivant, sont présentées sur la Figure 3.

1. Récepteurs cellulaires

Tout cycle viral commence nécessairement par l'attachement d'un virus à sa cellule cible, ce qui implique un récepteur. Les récepteurs des VIA sont les acides sialiques, des monosaccharides ubiquitaires présents aux extrémités de nombreux glycoconjugués. Si les acides sialiques sont complexes et divers, on peut schématiquement les diviser en deux catégories, en fonction de leur liaison au galactose. Le carbonyle en C-2 de l'acide sialique peut se lier au galactose soit par son carbonyle en C-3, soit par son carbonyle en C-6, donnant ainsi deux configurations stériques différentes. On parle de liaison en $\alpha 2-3$ ou en $\alpha 2-6$ (Bouvier and Palese, 2008). Une HA donnée sera plus affine avec une configuration que l'autre : ceci explique en partie les différences de tropisme d'un VIA à l'autre, car la répartition des récepteurs et le ratio entre les deux configurations divergent selon l'espèce animale.

Les voies respiratoires hautes de l'homme comportent principalement des acides sialiques $\alpha 2-6$ galactose, contrairement aux voies respiratoires basses, les bronchioles étant riches en acides sialiques $\alpha 2-3$ galactose. Les espèces aviaires expriment majoritairement des acides sialiques $\alpha 2-3$ galactose (Couceiro et al., 1993; Matrosovich et al., 2004b). Un VIA aviaire a donc peu de probabilité de parvenir à infecter un homme et inversement. Si un être humain venait à inspirer un aérosol contenant une quantité importante de VIA aviaires, une contamination serait théoriquement possible. S'en suivrait probablement alors une pneumonie rapide et sévère, dont l'issue pourrait être fatale (Gambotto et al., 2008).

2. Attachement

La tête globulaire d'HA contient des motifs pouvant se lier aux acides sialiques présents aux extrémités des glycoprotéines membranaires (Skehel and Wiley, 2000). Cette liaison va permettre l'endocytose du virus. L'endosome va subir une acidification, capitale pour deux raisons. La première est que la baisse du pH entraîne un changement conformationnel de HA,

exposant ainsi son peptide de fusion. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane de l'endosome, créant un pore par lequel les RNP peuvent sortir (Sieczkarski and Whittaker, 2005; Stegmann, 2000). La deuxième est qu'elle permet une acidification interne de la particule virale : les ions hydrogènes de l'endosome sont pompés par M2, alors activée, ce qui fragilise les interactions protéine-protéine et permet la libération des RNP depuis la matrice vers le cytoplasme (Martin and Helenius, 1991).

3. Réplication, transcription et traduction

Les RNP sont activement dirigées dans le noyau de la cellule, lieu de synthèse de tous les ARN viraux, grâce à des signaux de localisation nucléaire qui interagissent avec des protéines comme les importines α et β (Boulo et al., 2011; Whittaker et al., 1996). A partir des segments d'ARN de polarité négative, le complexe polymérase du virus va synthétiser deux types d'ARN à polarité positive : des ARN messagers (ARNm) et des ARN complémentaires (ARNc). Les premiers serviront à la production des protéines virales, les seconds serviront de matrice pour la synthèse des nouveaux ARN génomiques viraux, de polarité négative. Si les ARNm cellulaires sont polyadénylés par une polymérase spécifique, ce n'est pas le cas des ARNm viraux. La formation de la queue poly-A de ces derniers est permise grâce à la présence de 5 à 7 résidus uracile situés 16 nucléotides avant l'extrémité 5' des ARNv. Ces résidus sont transcrits en adénine par la polymérase virale de manière répétée, amenant ainsi à la formation d'une queue poly-A (Fodor, 2013; Luo et al., 1991). Concernant la coiffe des ARN viraux, essentielle à l'initiation de la traduction, celle-ci est volée aux pré-ARNm cellulaires par un mécanisme impliquant les trois sous-unités du complexe polymérase, PA, PB1 et PB2 (Dias et al., 2009). Les ARNm viraux sont ensuite exportés dans le cytoplasme, suite à leur liaison au CBD (*cap binding complex*) nucléaire et au recrutement de facteurs cellulaires (Fodor, 2013), et traduits comme n'importe quels ARNm. L'export hors du noyau des ARN génomique sous la forme de RNP implique, comme évoqué précédemment, les protéines virales M1 et NEP (Akarsu et al., 2003; Cros and Palese, 2003). La réplication des ARN génomiques viraux à partir des ARNc se ferait sans l'intervention d'amorces : un binucléotide pppApG est formé à partir des résidus 4 et 5 de la séquence promoteur située à l'extrémité 3' de l'ARNc, puis se déplace jusqu'aux résidus 1 et 2, à partir desquels la polymérisation aura lieu (Deng et al., 2006). Au contraire de ce qui est observé durant la transcription, la réplication ne s'arrête pas à la fin de la série de

résidus uracile, mais se poursuit jusqu'à la fin de l'extrémité 5', possiblement grâce à l'intervention de NP, bien que le mécanisme sous-jacent soit encore inconnu (Beaton and Krug, 1986; Pflug et al., 2017). La synthèse d'ARN génomiques viraux serait 300 fois plus lente que celle des ARNm viraux (Reich et al., 2017).

HA, NA et M2 sont synthétisées par des ribosomes liés au réticulum endoplasmique. Après un passage par ce dernier et par l'appareil de Golgi, où des modifications post traductionnelles sont réalisées, ces trois protéines sont dirigées vers la membrane. Les autres ARNm viraux sont traduits par des ribosomes cytoplasmiques. Les ARN à polarité négative s'associent avec NP (Bouvier and Palese, 2008).

4. Assemblage et bourgeonnement

Les RNP, associées à M1 et NEP, sont amenées vers la face interne de la membrane et s'attachent aux zones riches en HA, NA, M1 et M2 (Boulo et al., 2007). Il a longtemps été communément admis que les segments d'ARN étaient regroupés au sein d'une particule virale selon un processus aléatoire. Or, une particule virale infectieuse doit comporter ses huit segments d'ARN différents. Un processus aléatoire ferait qu'environ 90% des virions seraient défectueux, du fait d'une mauvaise combinaison ou d'un nombre incorrect de segments (Bancroft and Parslow, 2002). Des travaux récents semblent indiquer que le processus soit plus sélectif : les segments d'ARN pourraient contenir à leurs extrémités certains signaux d'assemblage (Fujii et al., 2003; Muramoto et al., 2006) et les segments d'ARN interagiraient entre eux (Fournier et al., 2012; Gavazzi et al., 2013). Toutefois, la capacité à emballer efficacement huit segments dépendrait de la souche virale : la part représentée par les particules défectives ne contenant pas tous les segments peut varier d'une souche à une autre (Nakatsu et al., 2016).

Le bourgeonnement a ensuite lieu, probablement suite à l'accumulation de M1 sur la face interne de la bicouche lipidique (Reid et al., 2002). M2 participe également à l'initiation du bourgeonnement et à la libération des particules virales, notamment en provoquant la restructuration de la membrane et sa courbure (Madsen et al., 2018; Schmidt et al., 2013). HA va se lier aux acides sialiques, du fait de leur rapprochement, mais l'activité sialidase de NA va

permettre la libération des virions, par clivage des résidus terminaux des acides sialiques (Palese and Compans, 1976; Palese et al., 1974). Les particules virales nouvellement formées sont ainsi à même d'infecter de nouvelles cellules, et le cycle recommence.

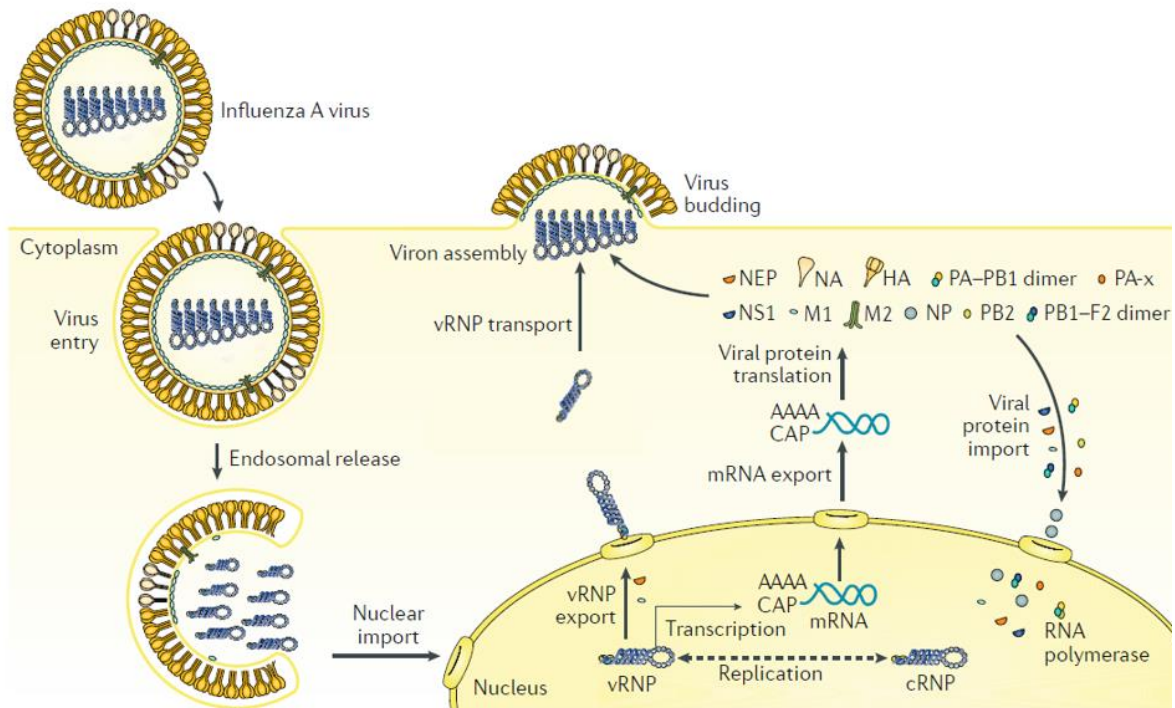


Figure 3 : Cycle viral des virus influenza A

Schéma représentant les différentes étapes du cycle viral des virus influenza A. D'après Krammer et al., 2018.

E. Evolution virale

Les virus influenza sont un bel exemple d'agents pathogènes en constante évolution, aptes à échapper au système immunitaire et représentant ainsi une menace perpétuelle pour l'homme comme pour l'animal. Même si un organisme a été exposé de nombreuses fois au virus ou a été vacciné à plusieurs reprises, une nouvelle contamination est possible, en dépit de l'immunité pré-existante. Deux mécanismes majeurs sont à l'origine de cette antigénicité sans cesse changeante : la dérive et la cassure antigéniques. Un troisième mécanisme, plus anecdotique, peut intervenir : la recombinaison génétique.

La dérive antigénique est un processus au cours duquel des mutations ponctuelles dans le génome viral introduisent des changements mineurs au niveau des épitopes viraux (Figure 4) (Both et al., 1983). La polymérase virale n'ayant pas d'activité correctrice, elle introduit ces mutations à chaque cycle de réplication (Steinhauer et al., 1992). Le taux d'erreur est estimé entre 10^{-5} et 10^{-6} par nucléotide (Einav et al., 2020). La plupart des mutations donnent des virions non viables ou ne changent que très peu – voire pas du tout – la conformation des épitopes. Certaines mutations vont toutefois altérer ces dernières, notamment sur les glycoprotéines HA et NA. Lorsqu'un déterminant antigénique change suffisamment, il n'est plus aussi bien reconnu par le système immunitaire et est alors rapidement sélectionné, les virus ne contenant pas la mutation en question étant neutralisés (Webby and Webster, 2001). Au fil des épidémies et des campagnes de vaccination, l'antigénicité des virus dérive ainsi progressivement. Ce phénomène a principalement lieu pour les régions particulièrement antigéniques, avec HA et NA en tête, tandis que le reste du génome change relativement peu (Fitch et al., 1991). Différentes méthodes, passant notamment par le développement de modèles mathématiques, permettent de prédire dans une certaine mesure dans quelle direction les souches humaines saisonnières évolueront (Agor and Özaltın, 2018; Lee et al., 2020).

Pour les espèces animales élevées en cycle court, comme le porc par exemple, la dérive antigénique existe, mais de manière plus modérée. Les animaux sont abattus avant de mettre en place une immunité adaptative et d'être infectés une deuxième fois, puis sont remplacés par de nouveaux animaux naïfs. Si la polymérase virale insère des mutations à chaque cycle de réplication, la pression de sélection exercée par le système est moindre, ce qui rend l'évolution génétique des virus plus lente et moins prédictible que pour les virus humains (Vijaykrishna et al., 2011). La dérive antigénique existe également chez les oiseaux, et notamment chez les espèces réservoirs, mais elle y est bien plus lente que chez les mammifères (Suarez, 2000; Webster et al., 1992).

Le deuxième phénomène est la cassure antigénique, causée par le réassortiment génétique, et est dû à la nature segmentée du génome viral (Figure 4). Cette fois-ci, contrastant avec l'évolution progressive de la dérive antigénique, on observe un échange complet de segments (Webster et al., 1982). Cette cassure est notamment rendue possible par le réservoir animal,

principalement constitué par les oiseaux aquatiques, qui contient des virus antigéniquement très distants (Cox and Subbarao, 2000). A ce jour, on rapporte respectivement 16 et 9 types d'HA et de NA différents (18 HA et 11 NA si l'on inclut les virus influenza des chauves-souris, qui sont phylogénétiquement proches des autres virus influenza A, mais pour autant incapables de faire des réassortiments avec eux). Lorsque le réassortiment concerne les segments codant pour HA et/ou NA, les conséquences peuvent être désastreuses pour la population humaine. Un tel changement peut être à l'origine d'un virus pour lequel l'immunité préexistante est faible, voire nulle, permettant ainsi une dissémination rapide du virus, voire une pandémie. Vient ensuite un moment où une immunité collective se met en place et la souche virale pandémique circulante devient alors progressivement un virus saisonnier, sujet à la dérive antigénique (Pica et al., 2012). A ce jour, une souche dérivée du H1N1 pandémique de 2009 circule toujours et fait partie, avec H3N2 et influenza B, des agents de la grippe saisonnière humaine. La cassure antigénique est également responsable des pandémies de 1957 et 1968 (Fang et al., 1981; Kawaoka et al., 1989). Par exemple, les segments HA, NA et PB1 du virus H2N2 pandémique de 1957 provenaient d'un virus aviaire. Afin de prévenir l'éventuelle émergence d'un nouveau virus influenza A pandémique, la circulation des souches zoonotiques, telles que H5N1, H5N6 et H7N9, est étroitement surveillée. Pour qu'un réassortiment génétique ait lieu, une même cellule doit être simultanément infectée par deux souches virales différentes. Théoriquement, 254 combinaisons sont possibles (256, en comptant les deux combinaisons parentales) (Li et al., 2010), mais en pratique, d'autres éléments interviennent, rendant certaines combinaisons plus susceptibles d'avoir lieu ou d'autres non viables. Par exemple, les différents éléments du complexe polymérase peuvent être incompatibles entre eux (Li et al., 2008). Ou encore, un virus réassortant peut se heurter aux différentes barrières d'espèces, comme l'affinité de HA pour les différents types d'acides sialiques, et ne pas être à l'origine d'une pandémie (Long et al., 2016).

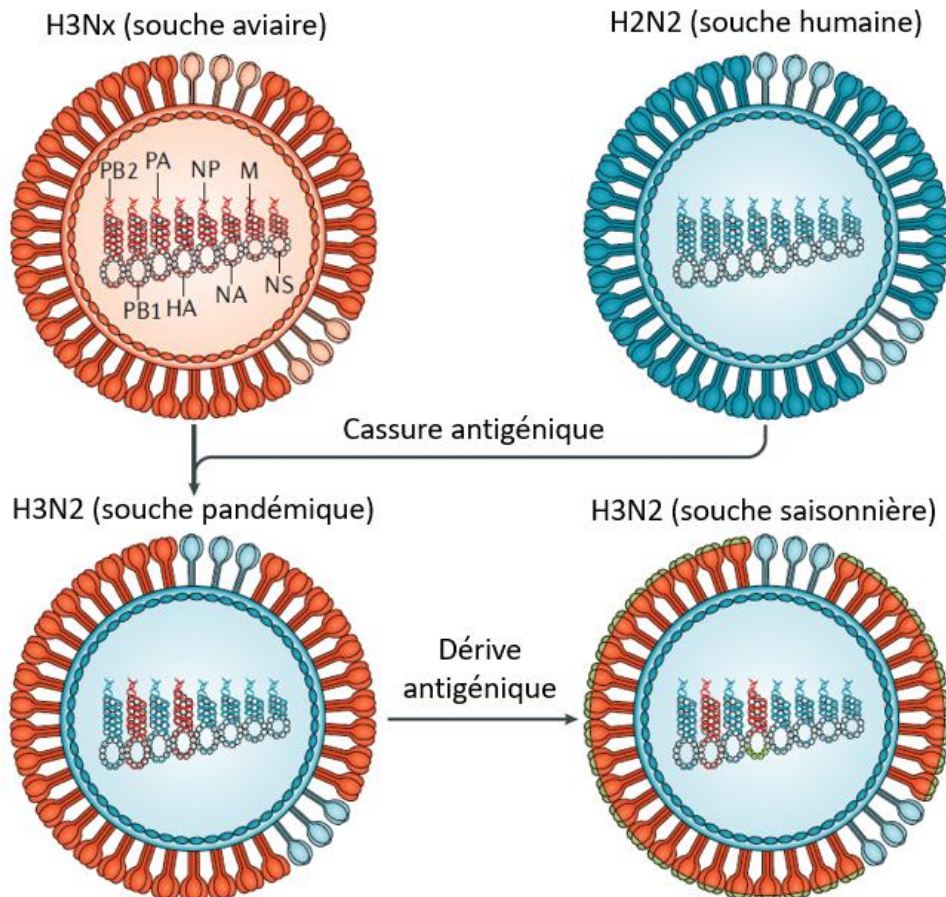


Figure 4 : Dérive et cassure antigéniques, illustration par l'exemple de la grippe de Hong-Kong

En 1968, un virus H2N2 humain saisonnier obtint par réassortiment les segments PB1 et HA d'un virus H3Nx aviaire, menant à une cassure antigénique et à l'émergence d'un H3N2 au potentiel pandémique. Depuis, ce virus est soumis à la dérive antigénique (les mutations engendrant de petits changements antigéniques permettant d'échapper à la réponse humorale de l'hôte étant sélectionnées) et son hémagglutinine évolue au fil des années. D'après Krammer et al., 2018.

Le troisième et dernier phénomène est la recombinaison génétique. Si ses conséquences sont généralement moins problématiques pour la santé humaine et animale que pour la dérive et la cassure antigéniques, la recombinaison génétique peut toutefois augmenter considérablement la pathogénicité d'un virus. On parle de recombinaison génétique lorsqu'un court fragment d'ARN (provenant de l'hôte ou du virus) est incorporé dans un des segments d'ARN viraux. Par exemple, les analyses de séquences du virus H7N3 hautement pathogène ayant émergé au Canada en 2005 ont montré qu'une partie du segment M s'était intégrée au

segment HA, dans la partie codant pour le site de clivage, conférant ainsi au virus une pathogénicité très augmentée (Pasick et al., 2005).

F. Spectre d'hôtes des virus influenza A

Les virus influenza infectent un large panel d'espèces. Les oiseaux aquatiques, particulièrement les Anseriformes (comme les canards, les oies et les cygnes) et les Charadriiformes (comme les mouettes et les sternes), constituent le réservoir de ces virus. Ils abritent, généralement de manière asymptomatique, des virus génétiquement et antigéniquement très divers (Taubenberger and Kash, 2010), couvrant les sous-types H1 à H16 et N1 à N9 (Long et al., 2019). Chez les autres Ordres, comme celui des Passeriformes (qui contient près de la moitié des espèces d'oiseaux), la prévalence des VIA est bien plus faible (Munster et al., 2007). Cette circulation virale pérenne chez les oiseaux aquatiques est régulièrement associée à la transmission de VIA à de nouvelles espèces hôtes : principalement les gallinacées, mais également les chevaux, les porcs, les carnivores domestiques et l'être humain (Figure 5). Pour que la transmission à un nouvel hôte soit stable, l'acquisition de mutations adaptatives (fonctions de la souche virale et de la nouvelle espèce hôte) est très souvent nécessaire. Ces mutations limiteront ensuite la capacité des virus à retourner circuler chez les espèces réservoirs (Swayne, 2007).

Au sein des mammifères, le spectre d'hôtes des VIA est très large, qu'il s'agisse d'animaux domestiques, comme le furet, le porc ou le cheval, ou d'animaux sauvages, allant des fourmiliers aux cétacés (Landolt and Olsen, 2007) (Figure 5). Chez l'être humain, ce sont les virus des sous-types H1, H2 et H3 qui ont circulé ces dernières décennies, la pandémie à H3N2 de 1968 ayant mis à un terme à la circulation du sous-type H2. Ces mêmes sous-types circulent chez le porc. Des infections humaines par des virus aviaires appartenant aux sous-types H5, H6, H7, H9 et H10 ont été décrites, suite à des contacts étroits avec des volailles domestiques, sans toutefois qu'il n'y ait de transmission interhumaine pérenne. Les sous-types H17 et H18 circulent uniquement chez les chauves-souris (Long et al., 2019). Des analyses phylogénétiques suggèrent que toutes les souches de VIA isolées chez des mammifères ont pour origine commune des virus influenza aviaires. Il n'est pas communément établi que les mammifères sauvages soient des hôtes stables pour les VIA : les épizooties observées pourraient être sporadiques et ne pas persister (Taubenberger and Kash, 2010).

Les espèces aviaires domestiquées appartenant à l'ordre des Galliformes (comme les poulets ou les cailles et les dindes) ne constituent pas un réservoir pour les VIA. En revanche, elles sont particulièrement sensibles à l'infection par des virus provenant des oiseaux sauvages. Dans la majorité des cas, un virus adapté aux Galliformes retournera difficilement circuler chez les espèces réservoirs (Swayne, 2007), mais il existe des exceptions, comme le H5N1 hautement pathogène.

Dans la suite de cette partie, nous allons nous consacrer uniquement aux VIA aviaires.

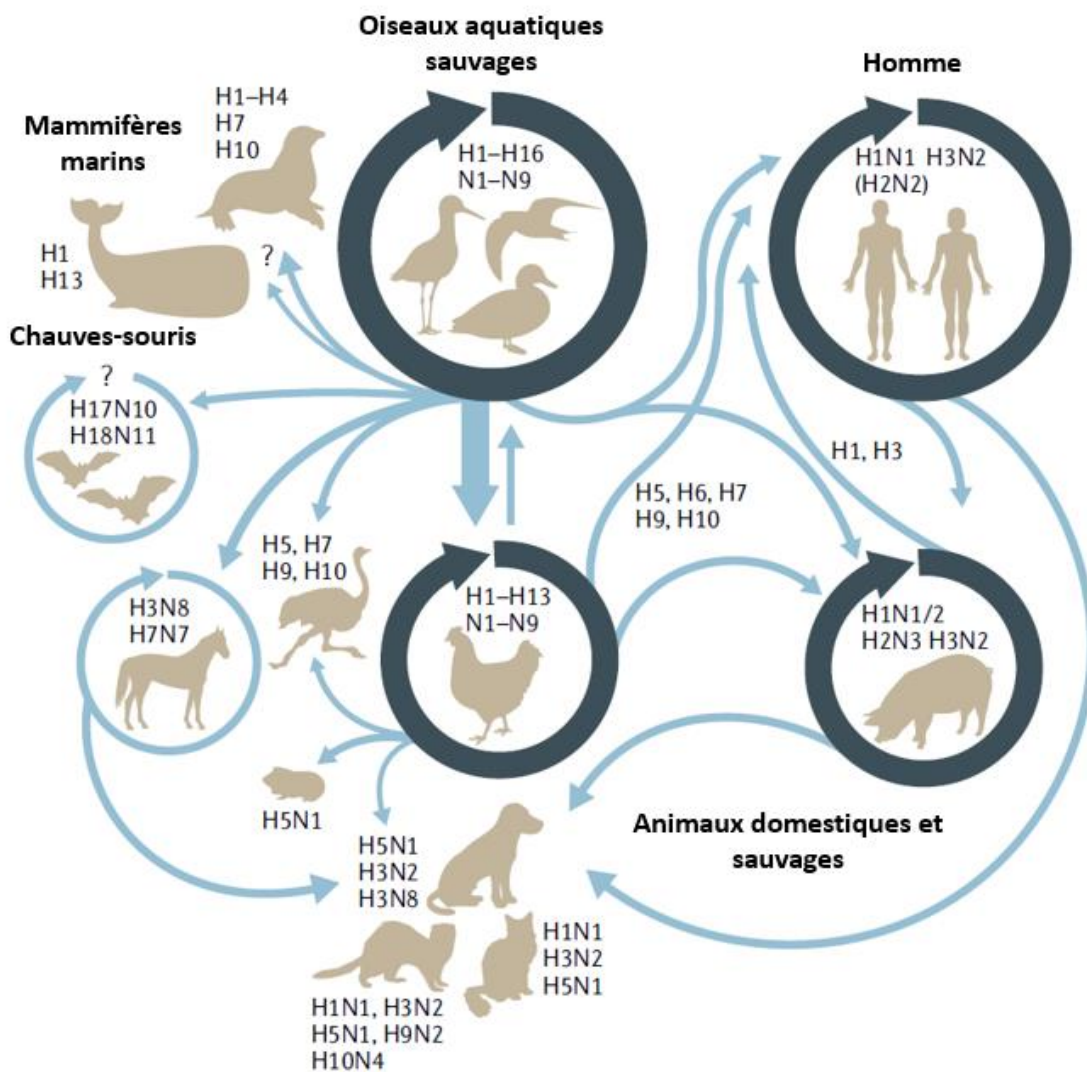


Figure 5 : Ecologie des virus influenza A.

Des sous-types circulent de manière prédominante chez certaines espèces (flèches bleu foncé). Certains sous-types peuvent passer d'une espèce à l'autre, parfois via un hôte intermédiaire et éventuellement suite à l'acquisition de mutations adaptatives (flèches bleu clair). D'après Long et al., 2019.

G. Phénotypes VIAFP et VIAHP

1. Critères de classification

Les virus influenza aviaires sont classifiés selon deux phénotypes : les virus influenza aviaires faiblement pathogènes (VIAFP) et les virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP). Ces phénotypes sont définis selon deux critères : l'index de pathogénicité intraveineuse (IPIV) et la séquence nucléotidique du site de clivage de HA.

Si, suivant l'inoculation intraveineuse de virus (préalablement amplifié sur œuf) chez des poulets âgés de quatre à huit semaines, la mortalité sur dix jours excède les 75%, le virus sera classifié comme VIAHP. Il en sera de même si l'inoculation intraveineuse chez dix poulets âgés de quatre à huit semaines donne un index de pathogénicité supérieur à 1,2. Cet index est calculé de la façon suivante : un score est attribué à chaque animal à chacun des dix jours post-infection, avec une valeur de 0 si l'animal est cliniquement sain, une valeur de 1 s'il est malade (ne présente qu'un seul signe clinique), une valeur de 2 s'il est sévèrement malade (en présente plusieurs), et une valeur de 3 s'il est mort. Le calcul du score moyen par animal et par jour permet de déterminer l'index (OIE, 2019). Le Tableau 2 propose un exemple de calcul d'un tel index.

Tableau 2 : Exemple du calcul d'un index de pathogénicité.

Dans cet exemple, le score moyen par animal et par jour est de $224/100 = 2,24$.

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	Total	Score
Sain	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	20x0	= 0
Malade	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3x1	= 3
Sévèrement malade	0	0	4	5	1	0	0	0	0	0	10x2	= 20
Mort	0	0	3	5	9	10	10	10	10	10	67x3	= 201
Total :											224	

Indépendamment de la pathogénicité, tout virus de sous-type H5 ou H7 ayant un site de clivage dont la séquence est déjà connue pour exister chez des VIAHP, sera lui-aussi traité

comme un VIAHP (OIE, 2019). Cette définition se retreint à ces deux sous-types, car, à ce jour, tous les VIAHP à avoir été identifiés étaient soit des H5, soit des H7.

2. VIAFP

Les VIAFP possèdent, dans la quasi-totalité des cas, un site de clivage monobasique (Figure 6) : la plupart du temps une unique arginine, parfois une lysine (Bertram et al., 2010). Un nombre limité de protéases *trypsin-like*, sécrétées quasi-exclusivement par les cellules des épithéliums digestif et respiratoire, peut reconnaître et cliver ce site. Des protéases bactériennes pourraient également intervenir (Tashiro et al., 1987). La réplication virale est donc limitée aux appareils digestifs et respiratoires, ces protéases n'étant pas exprimées par tous les types cellulaires (Klenk and Garten, 1994). Chez le canard, la multiplication virale peut être particulièrement intense dans l'intestin, avec de fortes charges virales excrétées dans les fèces (Webster et al., 1978). Les signes cliniques causés par l'infection varient selon la souche virale, l'espèce hôte, l'âge, la présence d'autres microorganismes et les paramètres environnementaux (Alexander, 2000; van Gils et al., 2007). La symptomatologie est généralement modérée et peut-être inexistante dans certains cas, notamment chez les canards et les autres espèces réservoirs (Kida et al., 1980). Si un VIAFP doit être cultivé *in vitro*, la présence de trypsine dans le milieu de culture est nécessaire à l'obtention de cycles de réplication multiples et de particules infectieuses (Klenk et al., 1975). Des variations de tropisme sont néanmoins possibles : sans qu'il y ait de réplication systémique, certains VIAFP peuvent se répliquer en dehors des appareils respiratoire et digestif, par exemple dans les reins (Slemons and Swayne, 1990) ou dans l'oviducte (de Wit et al., 2020) des poulets.

3. VIAHP

Le site de clivage des VIAHP est, lui, polybasique (Figure 6), avec plusieurs arginines ou lysines sur la séquence protéique. Ce site de clivage polybasique est reconnu par des protéases comme les furines ou la proprotéine convertase 6 (PC6), qui sont ubiquitaires et permettent ainsi au virus de se répliquer non plus uniquement dans les appareils respiratoire et digestif, mais de manière systémique (Stieneke-Gröber et al., 1992; Walker et al., 1994). Ce clivage est d'autant plus efficace qu'il a lieu de manière intracellulaire (Klenk et al., 1974), pendant l'étape

d'assemblage du cycle viral (Steinhauer, 1999). Ainsi, les particules virales sont déjà infectieuses lorsqu'elles bourgeonnent. Les signes cliniques varient ici aussi selon l'espèce, l'âge, la souche virale et les paramètres environnementaux. On peut aller d'une mortalité brutale sans signes annonciateurs, pouvant atteindre les 100% en 24h chez les espèces les plus sensibles, à une symptomatologie plus modérée, faisant intervenir plusieurs présentations cliniques. Ces dernières peuvent inclure des signes cliniques respiratoires (écoulements nasaux, toux, dyspnée), neurologiques (torticolis, ataxie), digestifs (diarrhée, anorexie) ou plus généraux (abattement, diminution des vocalises). Aucun d'entre eux n'est pathognomonique. Une morbidité élevée s'accompagne généralement d'une forte mortalité (OIE, 2019). Les canards peuvent, selon la souche virale, ne présenter aucun signe clinique, comme présenter une mortalité élevée. Prenons l'exemple de deux virus parmi ceux responsables des épizooties ayant frappé la France au cours des hivers 2015-2016 et 2016-2017, de sous-types respectivement H5N9 et H5N8, étudiés dans le cadre de cette thèse : l'infection de canards Pékin par le premier passe cliniquement inaperçue (Figuerola et al., 2020), tandis que celle par le deuxième cause d'importants troubles neurologiques, associés à une mortalité forte (Grund et al., 2018; Kleyheeg et al., 2017).

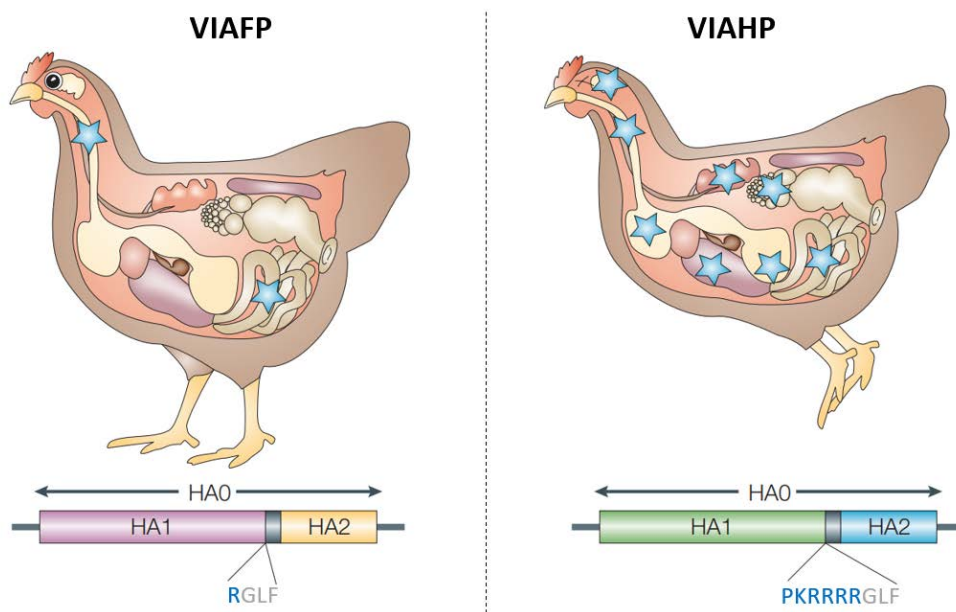


Figure 6 : Virus influenza aviaires faiblement et hautement pathogènes.

Le clivage protéolytique de la molécule précurseur HA0 en deux sous-unités HA1 et HA2 se fait au niveau d'un site de clivage qui est monobasique pour les VIAFP et polybasique pour les VIAHP. Les étoiles bleues indiquent les sites de réplication virale. La réplication des VIAFP est généralement limitée aux appareils respiratoires et digestifs, tandis que les VIAHP peuvent se répliquer de manière systémique. D'après Horimoto and Kawaoka, 2005.

4. Limites de la classification

Cette classification a toutefois ses limites, car certains virus atypiques existent et en voici quelques exemples. Deux virus appartenant au sous-type H10, H10N4 et H10N5, ont été isolés et remplissaient le critère concernant la pathogénicité, avec un IPIV supérieur à 1,2, malgré un site de clivage monobasique. Toutefois, inoculés par voie intranasale, ils n'entraînaient pas de mortalité et ont été classifiés comme VIAFP (Wood et al., 1996). De même, un H4N2 isolé chez des cailles possédait un site de clivage polybasique, mais un IPIV nul, le classant comme VIAFP (Wong et al., 2014). L'existence de sous-types H5 avec un site de clivage polybasique, mais un IPIV faible, a également été rapportée (Londt et al., 2007). Comme dit précédemment, les phénomènes de recombinaison au niveau de la séquence du site de clivage peuvent affecter la pathogénicité du virus : l'insertion de court fragments à cet endroit peut résulter en l'acquisition d'un site de clivage polybasique, avec une séquence atypique, comme cela a été le cas au Chili en 2002 (Suarez et al., 2004) et au Canada en 2004 (Pasick et al., 2005). Enfin, une récente étude a montré que certains virus HxN6 avaient, tout en gardant un site de clivage monobasique et un IPIV bas, la capacité de se répliquer de manière systémique *in vivo*

et en l'absence de trypsine *in vitro*, grâce à la neuraminidase N6 et un site de clivage atypique, reconnu par la thrombine (Kwon et al., 2019).

5. Obtention d'un site de clivage polybasique

L'étude épidémiologique des épizooties à VIAHP documentées au cours de ces dernières décennies semble indiquer que les VIAHP émergent suite à la réplication et à la transmission d'un VIAFP au sein des élevages de Galliformes (Abdelwhab et al., 2013). De plus, les VIAHP ne forment pas de groupe phylogénétiques distincts, mais ont systématiquement pour ancêtres communs des VIAFP, ce qui conforte cette hypothèse (Banks et al., 2000; Monne et al., 2014; Röhm et al., 1996). En 1994, au Mexique, un VIAFP de sous type H5N2 causant des symptômes respiratoires modérés a été isolé, avec des analyses sérologiques suggérant que le virus circulait au moins depuis l'année passée. Dans certains élevages, une augmentation sévère de la virulence du virus a été observée et les prélèvements réalisés ont révélé la présence d'un VIAHP H5N2. Les analyses phylogénétiques basées sur la séquence de HA ont montré que ce VIAHP avait émergé à partir du VIAFP au cours de deux événements distincts, à Puebla en 1993 et à Queretaro en 1994, et ont également indiqué que le VIAFP avait probablement été introduit dans le pays par les oiseaux migrateurs (Horimoto et al., 1995). Ainsi, l'hypothèse qu'un VIAHP pouvait émerger suite à la l'introduction d'un VIAFP au sein des galliformes était prouvée. D'autres scénarios similaires ont suivi : en octobre 2003, au Pakistan, un VIAFP H7N3 a été isolé chez des poules pondeuses et en novembre de la même année, un VIAHP H7N3 a soudainement émergé et s'est répandu en quelques semaines à travers le pays, jusqu'au contrôle de l'épizootie en juin 2004 seulement. Les analyses génétiques ont montré que le VIAHP avait émergé chez le poulet suite à l'insertion de plusieurs acides aminés basiques dans le site de clivage de HA du VIAFP (Naeem et al., 2007). On peut également citer les émergences des VIAHP H7N1 en Italie en 1999 (Banks et al., 2001; Monne et al., 2014) et H7N3 au Canada en 2004 (Pasick et al., 2005), pour lesquelles le VIAFP précurseur était connu. Néanmoins, la circulation d'un VIAFP dans les élevages de galliformes préalablement à l'émergence d'un VIAHP est un paramètre inconnu dans la plupart des épizooties (Richard et al., 2017). Une raison pouvant expliquer cela est que la circulation des VIAFP a fréquemment lieu à bas bruit, ne causant que peu à pas de signes cliniques, les virus passant ainsi souvent inaperçus.

Dans certains cas, l'implication des oiseaux sauvages dans l'introduction d'un VIAFP chez les Galliformes a été démontrée, comme par exemple en 1979, au Royaume-Uni, où des oiseaux sauvages ont été contraints de venir s'alimenter à proximité d'élevages de dindes du fait d'un hiver particulièrement rigoureux (Alexander and Spackman, 1981). Dans la majorité des cas cependant, le rôle joué par la faune sauvage reste inconnu (Richard et al., 2017).

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'acquisition d'un site de clivage polybasique. Celui le plus fréquemment observé est la duplication de codons déjà existants au niveau de la séquence codant pour le site de clivage. Des duplications multiples de codons codant pour des purines permettent de multiples insertions d'acides aminés basiques et l'acquisition d'un phénotype hautement pathogène. Il est également possible d'avoir des substitutions : le changement d'une base peut remplacer un acide aminé acide par un acide aminé basique et résulter en l'obtention d'un site de clivage polybasique (García et al., 1996; Horimoto et al., 1995). Enfin, la polymérase virale peut bégayer et insérer des adénines et des guanines, qui coderont pour des acides aminés basiques (García et al., 1996; Perdue et al., 1997).

Un autre mécanisme, évoqué précédemment, est possible : la recombinaison génétique. L'insertion de matériel génétique au niveau de la séquence codant pour le site de clivage peut résulter en l'obtention d'un phénotype HP, comme cela a été observé à plusieurs reprises, uniquement chez les sous-types H7 (Gultyaev et al., 2021). En voici deux exemples : au cours de l'hiver 1999-2000, 12 nucléotides ont été insérés à partir d'une source inconnue et ont rendu un H7N1 hautement pathogène en Italie (Banks et al., 2001) ; en 2012, au Mexique, l'insertion de 24 nucléotide à partir d'ARN ribosomal de poulet a permis à un H7N3 VIAFP de devenir un VIAHP (Maurer-Stroh et al., 2013).

A ce jour, 25 et 24 sites de clivage polybasiques différents ont été décrits, seulement chez les sous-types H5 et H7 respectivement (OFFLU, 2018). En laboratoire, l'introduction par génétique inverse d'un site de clivage polybasique chez des sous-types autres que H5 et H7 peut résulter en l'acquisition d'un phénotype hautement pathogène (Munster et al., 2010; Veits et al., 2012).

La liste des différentes émergences de VIAHP avec un précurseur VIAFP connu est résumée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Les émergences de VIAHP dont le VIAFP précurseur est connu

Sous-type	Pays	Année	Espèces	Mécanisme	Référence
H5N9	Etats-Unis	1966	Dinde	Possible réassortiment avec un H5N1	(Ping et al., 2012)
H7N7	Australie	1976	Poulet, canard	Duplication/insertion	(Bashiruddin et al., 1992)
	Allemagne	1979	Poulet	Insertion	(Röhm et al., 1996)
H5N2	Etats-Unis	1983	Poulet	Perte de glycosylation par la mutation HA T13K	(Deshpande et al., 1987)
	Mexique	1994-1995	Poulet	Insertion/substitution	(García et al., 1996; Horimoto et al., 1995; Perdue et al., 1997)
H7N3	Pakistan	1994-1995	Poulet	Insertion/substitution	(Abbas et al., 2010)
H7N1	Italie	1999-2000	Poulet, dinde, autres volailles domestiques	Recombinaison avec séquence inconnue	(Monne et al., 2014)
H7N3	Chili	2002	Poulet	Recombinaison avec NP	(Suarez et al., 2004)
H7N7	Pays-Bas	2003	Poulet	Possible réassortiment avec H7N3 et H10N7	(de Wit et al., 2010)
H7N3	Canada	2004	Poulet	Recombinaison avec M, substitution	(Pasick et al., 2005)
	Canada	2007	Poulet	Recombinaison avec un ARN de poulet	(Berhane et al., 2009)
H7N7	Royaume-Uni	2008	Poulet	Insertion/substitution	(Seekings et al., 2018)
	Espagne	2009	Poulet	Insertion	(Iglesias et al., 2010)
H5N2	Chine	2010	Poulet	Possible réassortiment avec H5N1 et H9N2	(Zhao et al., 2012)
H7N3	Mexique	2012	Poulet	Recombinaison avec ARN de poulet	(Kapczynski et al., 2013)
H7N7	Allemagne	2015	Poulet	Insertion/substitution	(Dietze et al., 2017)
H7N8	Etats-Unis	2016	Dinde	Insertion	(Killian et al., 2016)
H7N9	Etats-Unis	2017	Poulet	Insertion	(Lee et al., 2017)

6. Prédipositions génétiques des VIAFP

Une hypothèse, investiguée dès les années 90, serait que la séquence nucléotidique du site de clivage est particulièrement riche en purines chez les sous types H5 et H7, donnant lieu à l'apparition de structures secondaires de l'ARN non observées chez les autres virus. Ces structures favoriseraient les duplications, les insertions et le bégaiement de la polymérase dans cette région (García et al., 1996; Perdue et al., 1997). Ce n'est que récemment que la contribution des structures secondaires de l'ARN de type tige-boucle à l'apparition d'un site de clivage polybasique a été démontrée. Les conclusions d'une équipe japonaise ont été que plus la taille de la boucle était importante, plus la polymérase virale avait tendance à insérer des adénines ou des guanines, favorisant ainsi l'apparition des codons AAA, AAG, AGA ou AGG, codant pour les acides aminés lysine ou arginine (Nao et al., 2017). Ainsi, les sous types H5 et H7 seraient naturellement prédisposés à accepter des acides aminés basiques au niveau du site de clivage.

L'analyse de toutes les séquences nucléotidiques des sous-types H5 et N7 disponibles sur NCBI a montré que l'apparition d'un site de clivage polybasique était significativement corrélée à l'apparition d'autres mutations, présentes sur le segment HA, mais également sur les segments PB1 et PB2, et améliorant les capacités répliquatives du virus. Si cette analyse ne permettait de dire si les mutations étaient apparues préalablement ou après l'émergence du VIAHP, certaines d'entre elles pourraient avoir favorisé l'évolution vers le phénotype hautement pathogène (Escalera-Zamudio et al., 2020).

7. Quasi-espèce virale et émergence de VIAHP

Du fait du fort taux d'erreur de la polymérase virale et des phénomènes de réassortiment, les virus influenza sont d'une très grande variabilité. Pour un sous-type donné, comme H5N8, il existe un très large panel de souches différentes. Une souche donnée n'existe pas en tant qu'entité individuelle, mais sous la forme d'un nuage de variants, intimement proches sur le plan génétique, avec de légères variations : on parle de quasi-espèce virale (Eigen, 1993). En infectant un tapis cellulaire ou un animal avec un seul variant, au fur et à mesure des cycles de répllication, des mutations vont inexorablement apparaître et la population virale qui se

forme perd progressivement son homogénéité génomique. Ce concept est particulièrement connu pour le VIH (Nowak et al., 1990), mais a été rapporté pour de nombreux autres virus à ARN, comme le virus de l'hépatite C (Tsukiyama-Kohara and Kohara, 2017). Il confère au virus des avantages pour l'adaptation à l'hôte, la virulence, la transmission, l'échappement à la réponse immunitaire etc. (Domingo and Perales, 2019).

Lorsque, par le biais des mécanismes décrits précédemment, un VIAFP acquiert un site de clivage polybasique, le VIAHP nouvellement formé ne représente vraisemblablement qu'une fraction minime de la quasi-espèce. Pour que la modification génétique constitue un succès évolutif, le VIAHP nouvellement formé doit surpasser le VIAFP pour devenir un variant prédominant et ainsi être transmis à d'autres individus. En dépit de l'avantage sélectif majeur que possède le VIAHP, s'il ne parvient pas à cela, il ne peut y avoir émergence : la sélection positive des variants minoritaires de phénotype HP à partir du nuage de la quasi-espèce de variants FP est également un des mécanismes d'émergence. L'émergence réussie d'un VIAHP passerait donc par deux étapes successives : l'acquisition d'un site de clivage polybasique, puis la capacité à devenir prédominant au sein de la quasi-espèce virale.

La meilleure compréhension des phénomènes amenant à l'apparition d'un VIAHP ou à la sélection d'un VIAHP qui coexistait avec un VIAFP implique la mise au point de différents modèles, qui vont être détaillés par la suite.

8. Analyse des phénomènes d'émergence

Plusieurs modèles d'émergence ont été utilisés, dans le but de faire apparaître un VIAHP à partir d'un précurseur VIAFP, en faisant intervenir à chaque fois des passages viraux successif *in vitro*, *in ovo* et *in vivo*. La multiplication des passages permet d'avoir un très grand nombre de cycles viraux et de sélectionner progressivement les variants avec le meilleur fitness, comme cela peut être le cas lorsqu'une infection progresse dans un élevage. Le passage sur fibroblastes de poulet puis sur poulets d'un virus H5N2 a résulté en l'obtention de la sélection de variants hautement pathogènes (Brugh, 1988). Des passages successifs sur cellules embryonnaires de poulet d'un virus H7N7 isolé sur un mammifère marin a permis l'obtention d'un site de clivage polybasique et d'un phénotype hautement pathogène (Li et al., 1990). Un des inconvénients des modèles cellulaires est l'absence de système immunitaire, donc une pression de sélection très limitée. Les œufs embryonnés permettent de palier en partie à ce

problème, bien que le système immunitaire d'un embryon, même proche de l'éclosion, ne soit pas mature (Alkie et al., 2019). Ainsi, des VIAHP ont été obtenus par passages successifs sur œufs embryonnés de 14 jours de différents sous-types H5 de phénotype faiblement pathogène (Horimoto and Kawaoka, 1995). Les modèles *in vivo* ont l'avantage de faire intervenir un organisme entier, avec un système immunitaire mature, dès lors que les animaux sont suffisamment âgés. La pression sélective au sein de la quasi-espèce virale permet de reproduire ce qui se passe lorsqu'un VIAFP est naturellement transmis dans un élevage de gallinacées (Dlugolenski et al., 2011). Des VIAFP H5N2 et H5N3 sont devenus VIAHP par passages successifs chez des poulets (Ito et al., 2001; Soda et al., 2011). L'augmentation de la pathogénicité virale par passages successifs chez le poulet a également été observée pour d'autres virus, comme le virus de la maladie de Newcastle (Shengqing et al., 2002).

La quasi-totalité des émergences de VIAHP à partir d'un précurseur VIAFP rapportées ces dernières années a eu lieu dans des élevages commerciaux de volailles. Seules deux émergences ont été décrites dans des basses-cours (Dhingra et al., 2018) et à ce jour, une seule émergence dans la faune sauvage a été rapportée : celle d'un H5N3, en 1961, chez des sternes sauvages, proche des côtes de l'Afrique du Sud (Becker, 1966). Les animaux élevés dans les élevages commerciaux étant abattus relativement jeunes, ils n'ont généralement pas le temps de mettre en place une immunité adaptative et d'être infectés une seconde fois, ce qui n'est pas le cas des volailles élevées dans les basses-cours.

Les modèles faisant intervenir les passages successifs ne prennent toutefois pas en compte d'autres limites. Premièrement, il est possible que l'inoculum de départ, n'étant supposé contenir que le VIAFP, contienne quelques VIAHP, ce qui fait intervenir le concept de quasi-espèce virale. Des sous-populations virales, très différentes en termes de pathogénicité, pourraient coexister et être sélectionnées au cours des passages, sans qu'il y ait d'émergence réelle par l'introduction de mutations dans la séquence du site de clivage. Grâce au séquençage haut débit, la présence de VIAHP en quantité infime a par exemple été suspectée dans certains isolats de VIAFP obtenus lors des épizooties à H7N3 au Canada en 2004 (Pasick et al., 2005), à H7N1 en 1999 en Italie (Iqbal et al., 2014) et à H7N7 en Allemagne en 2015 (Dietze et al., 2017). Deuxièmement, ils ne prennent pas en compte la possibilité qu'un VIAHP

puisse apparaître, mais ne pas parvenir à être transmis aux autres animaux, par perte de la compétition avec le VIAFP parental.

S'il existe une claire association entre la clivabilité de HA *in vitro* et la pathogénicité du virus *in vivo*, la présence d'un site de clivage polybasique ne fait pas tout. Comme dit précédemment, certains virus sans site de clivage polybasique sont fortement pathogènes et certains virus avec un site de clivage polybasique ne le sont pas. De nombreuses autres mutations sont impliquées dans la pathogénicité, qu'elles soient localisées autour du site de clivage ou sur d'autres segments que HA. Par exemple, un facteur de pathogénicité bien décrit est la présence d'une NA tronquée. La délétion d'une vingtaine d'acide aminé sur la tige de NA est fréquemment observée chez les souches virales adaptées aux poulets (Li et al., 2011) et est associée à une augmentation de la réplication dans l'appareil respiratoire et de la mortalité (Hoffmann et al., 2012; Sun et al., 2013). Suite à cette délétion, l'équilibre entre les fonctions de HA et NA, respectivement la liaison aux acides sialiques et le clivage de ces derniers, est perturbé : l'activité sialidase de NA est diminuée, la flexibilité de la protéine et sa capacité à atteindre les acides sialiques étant moindres. Ainsi, la probabilité que HA se lie à des derniers est augmentée (Baigent and McCauley, 2001; Durrant et al., 2016). Toutefois, les raisons pour lesquelles l'émergence de virus influenza aviaires avec une activité sialidase diminuée est favorisée chez les poulets restent globalement méconnues (Mo et al., 2021).

H. Epidémiologie des VIAHP de sous-type H5

Au cours de ces dernières années, la circulation des VIAHP de sous-types H5 a connu une augmentation considérable, notamment dans la faune sauvage (Adlhoch et al., 2020). Pour cette raison, ainsi que parce que les VIAHP utilisés dans le cadre de ces travaux de thèse appartiennent aux sous-types H5N8 et H5N9, une brève présentation de leur épidémiologie s'impose. Si la première épizootie confirmée à VIAHP H5Ny remonte à 1959, ce n'est qu'en 1996 que la toute première souche d'un tel virus à avoir été décrite a été isolée (Xu et al., 1999). Elle a été identifiée en Chine et porte le nom A/Goose/Guangdong/1/1996 (H5N1). Depuis, les virus H5Ny de cette lignée n'ont cessé d'évoluer par dérive antigénique et ont été classés en clades et sous-clades, sur la base d'analyses phylogénétiques et de comparaisons de la séquence nucléotidique de HA. Par exemple, dans cette classification, dès lors que la

proportion de nucléotides différents excède 1,5% en comparaison à un clade connu, un nouveau clade (ou sous-clade) est créé. On obtient ainsi un code numérique décrivant le chemin évolutif suivi par les virus. Par exemple, le clade 2.1.2 appartient au clade 2.1, lui-même appartenant au clade 2 (Figure 7). Si de nombreux clades ont ainsi été créés, depuis 2010, les virus H5Ny de clade 2.3.4, et particulièrement le sous-type H5N8, sont progressivement devenus prédominants à l'échelle de la planète, en étant transportés sur de longues distances par les oiseaux migrateurs. Des épizooties causées par des virus H5N8 de clade 2.3.4 ont été rapportées par au moins 46 pays, dont la France, durant les hivers 2016-2017 et 2020-2021 (Guinat et al., 2018; Shi and Gao, 2021; Vergne et al., 2020). Des infections humaines par des virus H5Ny ont déjà eu lieu, avec des virus appartenant à divers clades, mais particulièrement pour le clade 2.3.4, avec l'implication des sous-types H5N1 et H5N6 (Bi et al., 2016; Yuen et al., 1998). La toute première infection humaine par un virus H5N8 a récemment été décrite, suite à une épizootie à VIAHP H5N8 de clade 2.3.4.4b dans un élevage de volaille en Russie (Pyankova et al., 2021). Ainsi, les programmes de surveillance virologique revêtent un intérêt majeur, à la fois pour la santé animale et la santé humaine.

L'épizootie à VIAHP ayant frappé la France au cours de l'hiver 2015-2016 est un cas particulier. Les virus responsables (H5N1, H5N2 et H5N9) seraient apparus suite à l'obtention d'un site de clivage polybasique par plusieurs substitutions nucléotidiques, et suite à de multiples réassortiments avec des virus H5Ny de lignée phylogénique eurasiennne, n'appartenant toutefois pas à la lignée A/Goose/Guangdong/1/1996, et ne présentant pas de potentiel zoonotique (Briand et al., 2017, 2018).

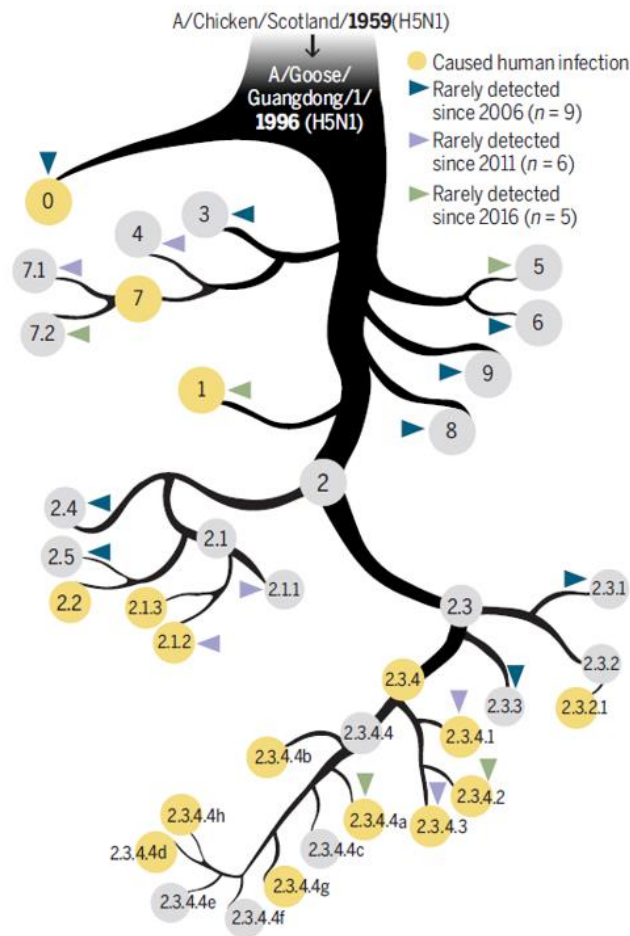


Figure 7 : Evolution des VIA de sous-type H5.

Les virus influenza de sous-type H5 sont phylogénétiquement classés en clades et sous-clades (dont les numéros sont donnés dans les cercles), en fonction de l'évolution de la séquence nucléotidique de HA. Les virus de clade 2.3.4 sont ceux majoritairement détectés ces dernières années. De nombreuses infections humaines par ces virus ont été décrites. D'après Shi et Gao, 2021.

I. Mesures de prévention dans les élevages

Comme dit précédemment, le rôle des oiseaux sauvages aquatiques, le réservoir des VIA, dans l'introduction de VIAFP ou de VIAHP dans les élevages avicoles est la plupart du temps méconnu. Toutefois, à plusieurs occasions, des études épidémiologiques ont montré qu'ils étaient probablement à l'origine de l'épizootie (Hanna et al., 2015; Keawcharoen et al., 2011; Verhagen et al., 2015). La claustration des oiseaux d'élevage, notamment lorsque la circulation

est forte dans la faune sauvage, paraît donc être une mesure efficace. Toutefois, priver d'accès à l'extérieur les animaux n'est pas une solution applicable au long terme, à la fois d'un point de vue de bien-être animal et d'un point de vue économique. De nombreux producteurs se tournent vers l'élevage extensif afin de répondre à une demande sociétale. Les labels Agriculture biologique et Label rouge imposent dans leur cahier des charges aux producteurs de fournir à leurs animaux l'accès à un parcours extérieur (EU, 2008; MAA, 2017). En revanche, l'accès aux points d'eau tels que des lacs ou des étangs devrait être limité au maximum, pour limiter les contacts avec le réservoir sauvage. Les mouvements d'animaux, notamment au sein de la filière foie gras, qui fait intervenir plusieurs types d'élevages, ainsi que les flux de matériel, ont déjà été incriminés dans la transmission virale. Pour y remédier, des mesures strictes de biosécurité doivent être mises en place : la quarantaine des animaux, la désinfection du matériel, la présence de sas, le principe de la marche en avant etc. (Delpont et al., 2018, 2020; Guinat et al., 2020). Bien que cela concerne principalement l'Asie, les marchés d'oiseaux vivants sont une source de transmission des VIA et doivent de ce fait être encadrés de manière stricte, voire abrogés (Zhou et al., 2015).

La vaccination des oiseaux d'élevage contre les VIAHP est interdite dans les pays de l'Union Européenne, à quelques exceptions près (EU, 2006). Elle réduit la mortalité et la morbidité, mais ne permet pas d'empêcher l'infection : les oiseaux infectés et vaccinés peuvent quand même transmettre le virus, lui permettant de circuler sans être facilement détecté. De plus, du fait de la dérive antigénique, un vaccin peut vite devenir obsolète (Swayne, 2006). Si lors de l'épizootie italienne à H7N1 en 1999-2000, l'utilisation d'un vaccin inactivé a été autorisée et a contribué au contrôle de la crise (Capua and Marangon, 2007), la vaccination ne porte pas toujours ses fruits. Par exemple, malgré la campagne de vaccination suite à une épizootie à VIAHP H7N3 au Pakistan en 1995, le virus a continué de circuler dans les années qui ont suivi (Naeem and Siddique, 2006). Au sein de l'Union Européenne, lorsque la vaccination est autorisée, les vaccins doivent être des vaccins DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animal*) de telle sorte à ce que la vaccination n'interfère pas avec les tests sérologiques utilisés dans le cadre du dépistage de la grippe aviaire (EU, 2006).

La circulation des virus dans les élevages est également étroitement surveillée par les vétérinaires et les laboratoires vétérinaires départementaux. Dès qu'un VIAFP ou un VIAHP de

sous-type H5 ou H7 est détecté dans un élevage, des mesures drastiques sont mises en place, passant par l'abattage des animaux (EU, 2006). Ces mesures, adoptées par l'Union Européenne, ont un impact économique et sociétal fort, et la législation des pays en voie de développement est généralement différente, la vaccination étant privilégiée.

J. Immunité antivirale dirigée contre les virus influenza

L'immunité antivirale innée, passant notamment par la réponse inflammatoire et les réponses interférons de types 1 et 3, joue un rôle capital dans la régulation des infections par les virus influenza. Le développement de la maladie pouvant être particulièrement rapide, notamment chez les poulets, où la mort peut survenir en l'espace de quelques jours, voire quelques heures, fait que la réponse adaptative n'a pas le temps de se mettre en place. La réponse immunitaire antivirale innée déclenchée par un VIAHP peut être schématisée en deux scénarios différents : d'une part, une réponse interféron (IFN) induisant un état antiviral et le contrôle de l'inflammation, et d'autre part, une hyperactivation des voies de signalisation pro-inflammatoires, contribuant à la mort des animaux.

1. Senseurs de l'immunité antivirale innée

Dès lors qu'un virus influenza infecte une cellule, des motifs viraux appelés PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) vont être reconnus par les senseurs de l'immunité, appelés les PRR (*pattern recognition receptors*). Les principaux senseurs impliqués dans la réponse anti-influenza sont les RLR (*RIG-1 like receptors*), les TLR (*toll-like receptors*) et les récepteurs de type NOD (*nucleotide oligomerization domain*). Les RLR comprennent trois récepteurs cytoplasmiques : RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*), qui est absent chez le poulet, MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) et LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). RIG-1 et MDA5 reconnaissent les ARN viraux et initient la cascade de signalisation de la voie interféron. Plus précisément, RIG-1 reconnaît les structures en queue de poêle formées par les extrémités complémentaires de chaque segment d'ARNv (Liu et al., 2015) ainsi que les courts ARNv produits suite à des erreurs de la polymérase virale (te Velthuis et al., 2018), tandis que MDA5 reconnaît les ARNm sans coiffe et les ARN double brin de taille supérieure à 1kb (Jiang et al., 2011; Pichlmair et al., 2009). RIG-1 revêt une importance

particulière dans la réponse interféron, car c'est ce récepteur qui entraîne la sécrétion d'interférons la plus précoce dans les cellules épithéliales suite à l'infection par un virus influenza (Evseev and Magor, 2019). Le gène RIG-1 étant absent chez les poulets, cela pourrait expliquer leur extrême sensibilité à l'infection (Magor et al., 2013), même si MDA5 pourrait compenser en partie cette absence (Liniger et al., 2012). LGP2 régule les voies de signalisation de RIG-1 et MDA5, notamment en facilitant la reconnaissance des ARN viraux par ces derniers (Saito et al., 2007; Satoh et al., 2010).

Chez l'homme, le TLR7 et le TLR8 reconnaissent les ARNv simple brin (Marcken et al., 2019), mais chez le poulet et le canard, seul le TLR7 est fonctionnel (MacDonald et al., 2008; Philbin et al., 2005). L'activation du TLR7 entraîne également l'activation de la cascade de signalisation de la voie interféron (Diebold et al., 2004). Ce TLR est exprimé de manière constitutive dans les poumons des canards et dans une moindre mesure dans ceux des poulets, ce qui pourrait contribuer à la moins bonne réponse de ces derniers en cas d'infection par un virus influenza (MacDonald et al., 2008). Le TLR3, présent chez les poulets et les canards (Jiao et al., 2012), détecte les ARN double brins, mais son rôle bénéfique en cas d'infection par un virus influenza est incertain (Le Goffic et al., 2006).

Enfin, les récepteurs de type NOD, en particulier l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*), entraînent la maturation et la sécrétion des interleukines (IL) pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Les mécanismes derrière l'activation de NLRP3 par les virus influenza sont toujours très méconnus, bien qu'il semblerait que les protéines virales M2 et PB1-F2 stimulent les voies de signalisation dépendant de NLRP3 (Ichinohe et al., 2010; McAuley et al., 2013; Pinar et al., 2017). NLRP3 est exprimé de manière constitutive dans l'appareil respiratoire des poulets (Ye et al., 2015), mais à ce jour, aucune étude concernant ce gène chez les canards n'a été publiée.

2. Réponse interféron de type 1

Les interférons de type 1, comprenant de nombreux sous-types d'IFN- α , l'IFN- β , ainsi d'autres IFN encore mal caractérisés (les IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ and IFN- ζ), sont des effecteurs antiviraux précoces, jouant un rôle prépondérant dans la réponse antivirale innée (McNab et

al., 2015). Grâce à leur effet paracrine, ils vont induire dans les cellules alentour un état antiviral, en stimulant des centaines de gènes, appelés les gènes stimulés par les interférons. Ces derniers modulent le métabolisme cellulaire et interagissent avec les composants viraux, limitant ainsi la réplication virale (Iwasaki and Pillai, 2014; Schoggins et al., 2011). Une réponse interféron de type 1 précoce est un élément crucial au bon contrôle de la réplication virale (García-Sastre, 2011). S'ils sont produits par plusieurs types cellulaires, les cellules dendritiques plasmocytoïdes les produisent en très grandes quantités et sont ainsi considérées comme des producteurs « professionnels » d'interféron (Liu, 2005).

Généralement, suite à l'infection par un VIAHP, les canards ont une réponse interféron précoce et modérée, atteignant son pic dans les 24 premières heures suivant l'infection. Ceci a, par exemple, été montré à plusieurs reprises avec les H5N1 de lignée eurasienne (Cagle et al., 2012; Saito et al., 2018; Vandervén et al., 2012). Si les taux d'interféron diminuent rapidement, l'expression des gènes stimulés par les interférons est, elle, plus étalée dans le temps. A l'inverse, les VIAFP induisent une faible réponse interféron chez les canards (Smith et al., 2015). Les poulets, quant à eux, sont aussi capables de mettre en place une réponse interféron, mais celle-ci ne parvient pas toujours à être maintenue dans le temps et se révèle souvent inefficace (Evseev and Magor, 2019).

L'interféron lambda, qui est un interféron de type 3, a ses voies de signalisation globalement identiques à celles des interférons de type 1, mais fait appel à d'autres récepteurs cellulaires. Si les récepteurs aux interférons de type 1 sont exprimés par de très nombreux types cellulaires, ceux à l'interféron lambda sont principalement exprimés par les cellules épithéliales (Donnelly and Kotenko, 2010).

L'état antiviral induit par les interférons de type 1 et de type 3 est dû à l'expression des gènes stimulés par les interférons. Ces gènes sont très nombreux et tous n'ont pas encore été caractérisés chez le poulet et le canard. Le gène *Myxomavirus resistance 1* (Mx1) est un des principaux gènes stimulés par les interférons impliqués dans la réponse immunitaire innée contre les virus influenza et un des mieux caractérisés. Dans cette partie, il sera pris comme exemple pour illustrer les effets antiviraux induits par les interférons. La protéine Mx1 bloque la réplication virale principalement par deux mécanismes : sa forme cytoplasmique séquestre NP, probablement par blocage des signaux de localisation nucléaire (Xiao et al., 2013) et sa

forme nucléaire inhibe la transcription de l'ARN en interagissant avec NP et PB2 (Turan et al., 2004). Toutes les souches virales ne sont pas sensibles à Mx1 de la même façon : les souches aviaires y seraient bien plus sensibles que les souches humaines (Dittmann et al., 2008). Cette sensibilité est déterminée par NP (Zimmermann et al., 2011) et le cluster d'acides aminés conférant la capacité d'échapper à l'action antivirale de Mx1 est hautement conservé au sein des souches humaines, révélant une forte pression de sélection (Mänz et al., 2013). Ceci représente une barrière d'espèce difficile à franchir : pour qu'une souche aviaire soit à même de devenir moins sensible à Mx1, de nombreux changements adaptatifs sont nécessaires.

L'activité antivirale de Mx1 dépend également de l'espèce. Chez l'homme, seule la forme cytoplasmique a des effets antiviraux (Pavlovic et al., 1990), alors que les deux formes, cytoplasmique et nucléaire, sont actives chez la souris (Arnheiter et al., 1980). Les effets de Mx1 chez les espèces aviaires sont encore soumis à controverse : si certaines études ont montré sa non implication dans le contrôle de la réplication virale chez le poulet et le canard (Bazzigher et al., 1993; Bernasconi et al., 1995), d'autres nuancent ces résultats en mettant en avant que certains polymorphismes d'un seul nucléotide confèreraient à Mx1 une légère activité antivirale chez le poulet (Ewald et al., 2011; Ko et al., 2004). Quoi qu'il en soit, le gène de Mx1 est sur-régulé chez le poulet et le canard suite à l'infection par un VIA (Ewald et al., 2011; Gao et al., 2018; Saito et al., 2018). Le gène Mx2 existe également, mais est très mal caractérisé chez les espèces aviaires, et n'aurait pas d'activité antivirale contre les virus influenza (Goujon et al., 2013).

3. Réponse inflammatoire

Les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques peuvent être infectés par les VIA, même si la réplication virale est limitée dans ces types cellulaires (Helft et al., 2012). L'infection de ces cellules entraîne leur activation : des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et le TNF- α (*tumor necrosis factor α*), sont sécrétées, entraînant le recrutement d'autres cellules de l'immunité innée, notamment les cellules *natural killer* (NK) et des monocytes pro-inflammatoires. Ceci, en plus de la réponse interféron, peut parvenir à contenir l'infection, par la mort des cellules infectées. Si cela ne suffit pas, cette étape est néanmoins cruciale, car elle participe la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative.

L'inflammation est plus précoce et mieux régulée chez les canards que chez les poulets. Par exemple, suite à l'infection par un virus H7N1 hautement pathogène, une forte mortalité a été observée chez les poulets, avec des charges virales fortes et une sur-régulation importante des cytokines pro inflammatoires aux jours 2 et 3 post infection. A l'inverse, les canards étaient asymptomatiques et cette sur-régulation, bien que présente, était brève et plus modérée (Cornelissen et al., 2013). Des résultats similaires ont été obtenus avec un virus H5N1 *in vivo*, avec notamment une plus forte induction de la *nitric acid synthase* (iNOs) chez le poulet (Burggraaf et al., 2011, 2014), et *in vitro* sur des fibroblastes de poulet et de canard (Liang et al., 2011).

Cette réponse inflammatoire peut néanmoins être délétère. La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires rend les capillaires autour du foyer inflammatoire poreux et attire, comme dit précédemment, d'autres cellules immunitaires. Si l'infiltration par ces dernières et par des fluides est trop importante dans l'appareil respiratoire, cela compromet l'oxygénation des hématies, voire obstrue les poumons par le développement d'un œdème, résultant en hypoxie et détresse respiratoire. Lorsque cela a lieu dans d'autres organes, comme le système nerveux central, l'issue peut également être fatale. On parle de tempête cytokinique. Ce phénomène est responsable de la mort fulgurante observée en cas d'infection par un VIAHP chez l'homme, la souris ou les oiseaux, canards compris (Burggraaf et al., 2014; Liu et al., 2016; Uyeki, 2009; Wei et al., 2013). Ces derniers ont toutefois moins tendance à faire de l'hyper inflammation que les autres espèces, par un meilleur contrôle de l'infection (Evseev and Magor, 2019).

Réponse interféron de type 1 et réponse inflammatoire sont intimement liées. La réponse interféron de type 1 est connue pour exercer un contrôle négatif sur les voies de signalisation pro-inflammatoires (Billiau, 2006; Guarda et al., 2011) et dans le cas d'une infection par un VIA, elle participe à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Arimori et al., 2013) et diminue le recrutement des neutrophiles (Shahangian et al., 2009).

S'il est clair que de grandes différences existent entre les poulets et les canards concernant leur réponse immunitaire innée, probablement du fait de l'absence de RIG-1 chez les poulets, il faut toutefois rester prudent sur certains aspects. Les doses inoculées chez les poulets au

cours des infections expérimentales sont très souvent plus faibles que celles employées chez les canards, rendant une comparaison directe impossible. D'autre part, il n'est pas toujours possible de comparer deux études, car de nombreux paramètres autres que les doses varient : l'âge et la race des animaux, les souches virales, le schéma expérimental ou encore les réactifs utilisés.

4. Réponse immunitaire adaptative

Pour les raisons citées lors de l'introduction de cette sous-partie, la réponse immunitaire adaptative n'a généralement pas le temps de se mettre en place lors d'infection par un VIAHP chez une espèce particulièrement sensible. En revanche, dès lors qu'elle est présente, elle joue un rôle fondamental dans l'élimination virale. Elle fait intervenir les réponses cellulaire et humorale, médiées par les lymphocytes T (L_T) et les lymphocytes B (L_B), qui sont activés suite à la présentation des antigènes viraux par les cellules présentatrices d'antigène, en particulier par les cellules dendritiques (Hufford et al., 2015).

La réponse cellulaire implique principalement deux populations lymphocytaires qui interagissent entre elles : les L_T CD4+ et les L_T CD8+. Ces cellules gagnent les lieux de l'infection soit en traversant les tissus, soit directement par la circulation sanguine. Les L_T CD4+ se polarisent en diverses sous-populations, selon leur environnement cytokinique. Ils possèdent différentes fonctions, comme la production de diverses cytokines, notamment l'interféron gamma (IFN- γ), qui active les cellules cytolytiques comme les cellules NK ou les monocytes (Miyauchi et al., 2016; Sell et al., 2019), contribuant ainsi à l'efficacité de la réponse immunitaire antivirale innée. Ils sont également indispensables à la commutation isotypique et à l'efficacité de l'immunité mémoire médiée par les L_T CD8+ (McKinstry et al., 2012; Sun and Bevan, 2003). Leur rôle dans le contrôle d'une infection par un VIA serait majoritairement indirect, via la production de cytokines et la stimulation des L_B .

Les cellules infectées présentent à leur surface des peptides appartenant à des protéines virales plutôt conservées, comme NP, M1 ou celles du complexe polymérase, permettant une protection croisée lors de l'infection par une autre souche (van de Sandt et al., 2012). Les L_T CD8+ sont activés suite à l'interaction entre ces peptides, le CMH de classe 1 et le TCR (T cell receptor) : ils deviennent alors des L_T cytotoxiques (LTC), capables de produire de l'IFN- γ , des molécules cytolytiques et certaines cytokines (Doherty et al., 2006). Un très faible niveau de stimulation du TCR est suffisant pour engendrer de la cytolyse, qui sera unilatérale (seule la

cellule ciblée mourra), permettant aux LTC de détruire un nombre important de cellules en peu de temps (Hufford et al., 2015). Les propriétés cytotoxiques des LTC reposent sur deux mécanismes différents : l'exocytose de granules contenant diverses protéases, injectés dans la cellule infectée grâce à l'action des perforines, et les voies de signalisation du TNF- α (Hufford et al., 2015). Une partie des LTC deviendra des L_T cytotoxiques mémoires, qui seront réactivés lors des infections futures.

Le rôle de la réponse humorale, médiée par les lymphocytes B, est connu depuis longtemps. En 1933, une étude montrait que des furets naïfs étaient protégés de l'infection par un VIA s'ils avaient préalablement reçu le sérum de furets déjà immunisés (Smith et al., 1933). Les anticorps produits par l'organisme sont principalement dirigés contre les glycoprotéines de surface, HA et NA, et peu contre les protéines internes comme NP et M1 ou M2 (Wrammert et al., 2008). Certains sites de la tête de HA sont particulièrement immuno-dominants et la plupart des anticorps dirigés contre eux seront neutralisants (Angeletti et al., 2017). Les immunoglobulines (Ig) A et G permettent de limiter la réplication virale (Doherty et al., 2006).

Les souris rendues expérimentalement incapables de produire des L_T CD4⁺ et les L_T CD8⁺ parviennent difficilement (voire pas du tout) à éliminer complètement les VIA de leurs poumons, tandis que des souris sauvages maîtrisent la réplication en l'espace de quelques jours (Figure 8), ce qui montre l'importance de la réponse adaptative (Doherty et al., 2006; Topham et al., 1997; Wells et al., 1981).

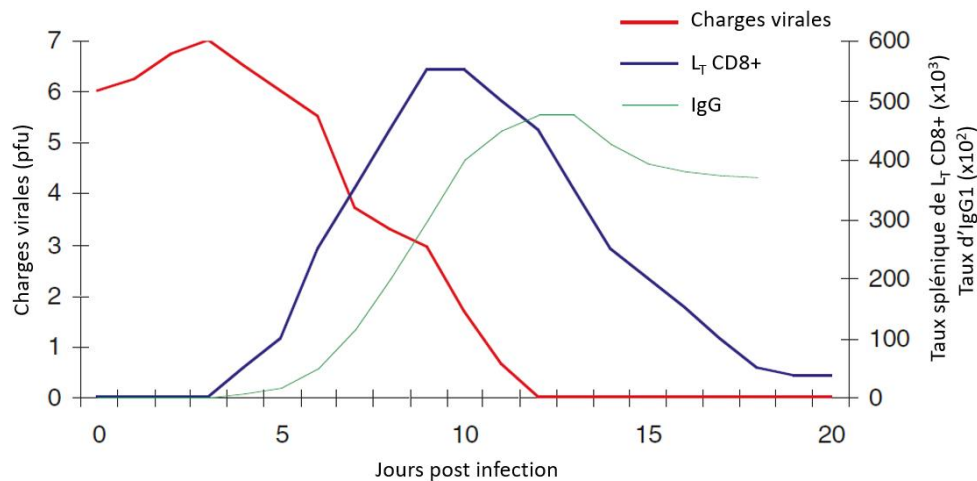


Figure 8 : Réponse immunitaire adaptative et clairance virale.

Graphique montrant la contribution des LTC et des immunoglobulines G (IgG) au contrôle de la réplication virale. D'après Doherty et al., 2006.

K. Interactions avec le microbiote et d'autres virus influenza A

Les virus influenza, comme la plupart des agents pathogènes, infectent leurs hôtes en passant par des muqueuses. Ces dernières abritent un écosystème complexe, constitué principalement de bactéries, mais aussi d'archées, de champignons, d'eucaryotes et voire même de virus, qu'on appelle le microbiote. Les rôles de cet écosystème vont bien au-delà des fonctions de digestion : le microbiote occupe une position capitale dans la santé de son hôte. Les organismes commensaux font notamment des muqueuses des environnements inhospitaliers pour de nombreux pathogènes, grâce à la production de biosurfactants, à l'excrétion de métabolites aux propriétés antimicrobiennes ou tout simplement par un phénomène de compétition pour les ressources (Sekirov and Finlay, 2009). De plus, sa simple présence participe à la maturation du système immunitaire, notamment des organes lymphoïdes secondaires intestinaux (Lee and Mazmanian, 2010). Les réponses immunitaires locales et systémiques sont intrinsèquement liées au microbiote intestinal, même lorsqu'il s'agit d'un agent pathogène à tropisme respiratoire (Macpherson and Harris, 2004) : on parle d'axe intestin poumon.

De plus, les co-infections virales sont loin d'être rares et un tissu peut ainsi être infecté par différents virus. C'est d'ailleurs ainsi que des virus réassortants peuvent émerger, suite à l'infection d'une même cellule par deux VIA différents. Lorsqu'un variant apparaît – un VIAHP

par exemple –, il se réplique en parallèle de ses précurseurs et nous allons voir que son émergence est loin d'être assurée.

Ainsi, lorsqu'un agent pathogène pénètre un organisme, il ne fait pas face à un environnement stérile, mais à un environnement façonné par ces organismes commensaux et où des infections actives par d'autres virus sont potentiellement déjà en cours. Ni le rôle du microbiote dans la maturation et la régulation du système immunitaire, ni les interactions entre bactéries et virus, ou entre virus, ne sont à ce jour complètement élucidés. Il semblerait toutefois que le microbiote joue un rôle protecteur lors d'une infection par un virus influenza et pourrait ainsi limiter l'émergence de VIAHP. De la même manière, en cas de co-infection virale, la réplication d'un virus pourrait influencer sur celle de l'autre, par un phénomène appelé interférence virale, et ainsi avoir un impact sur la probabilité qu'un VIAHP émerge.

1. Interactions avec le microbiote

Les virus influenza aviaires ont un tropisme à minima respiratoire et digestif, et les cellules immunitaires de ces deux appareils sont connectées via ce qu'on appelle l'axe intestin-poumon. Ainsi, les microbiotes respiratoires et digestifs interviennent dans la physiopathologie des infections par les virus influenza. De nombreux facteurs influent sur la richesse et la composition du microbiote, et ont ainsi des conséquences indirectes sur la modulation de la réponse immunitaire (Figure 9).

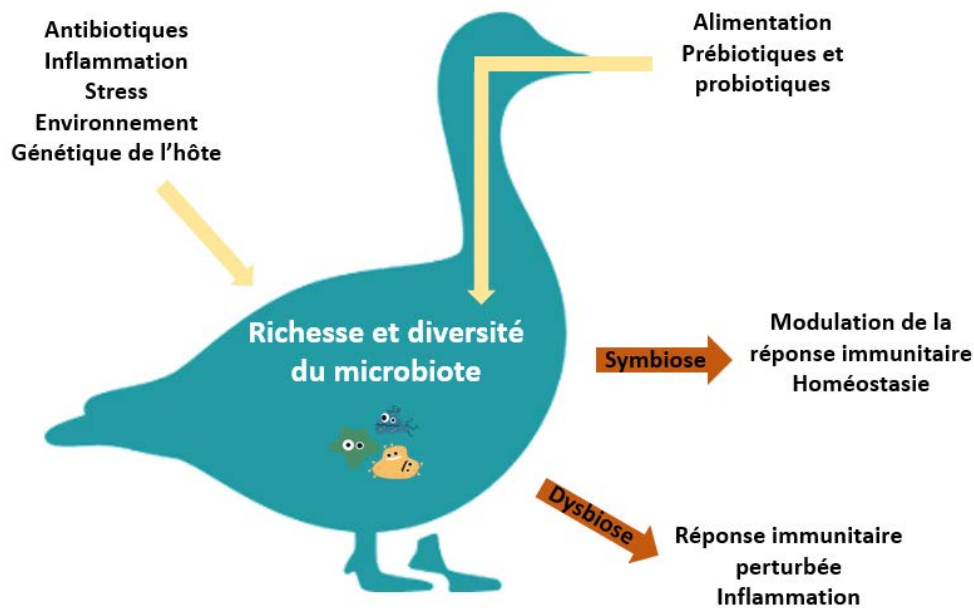


Figure 9 : Facteurs influant sur le microbiote et sa régulation de la réponse immunitaire.

L'alimentation et de nombreux facteurs dépendant de l'hôte et de l'environnement influent sur la richesse et la composition du microbiote. Un microbiote sain participe à la régulation de l'immunité, tandis qu'un microbiote déséquilibré peut amener à une mauvaise régulation de cette dernière et à de l'inflammation.

a. Modèles d'études

Etudier le rôle du microbiote dans la régulation d'une infection virale implique d'utiliser des modèles animaux. Les animaux traités aux antibiotiques et les animaux axéniques sont les modèles les plus utilisés. Toutefois, ces derniers présentent de nombreux inconvénients. Outre leur coût, le développement de leur système immunitaire est drastiquement modifié. Le système immunitaire d'une souris axénique est immature et incomplet par rapport à une souris élevée normalement : les plaques de Peyer sont de petite taille, les lymphocytes peu nombreux, les taux d'immunoglobulines diminués etc. (Smith et al., 2007). Les conclusions obtenues à partir d'études sur de tels animaux sont difficilement transposables aux modèles plus conventionnels. Ainsi, dans le cadre des infections par les VIA, la déplétion du microbiote par un traitement antibiotique à large spectre a été préférée par de nombreuses études. Le traitement classiquement employé dans ces études et dans le cadre de ces travaux de thèse comporte les molécules suivantes : néomycine, ampicilline, colistine, métronidazole, vancomycine, ainsi qu'un antifongique, l'amphotéricine B. Si les possibilités sont nombreuses

chez la souris, où des microbiotes standardisés sont instaurés à partir d'animaux axéniques, comme par exemple la flore Schaedler (Dewhirst et al., 1999), elles sont restreintes chez les espèces aviaires ce qui rend l'utilisation d'antibiotiques quasi indispensable.

Suite à un tel traitement, une augmentation des charges virales a été observée, chez la souris (Abt et al., 2012; Steed et al., 2017), comme chez le poulet (Yitbarek et al., 2018a, 2018b). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette mauvaise régulation de la réplication virale : l'altération de la réponse immunitaire antivirale est particulièrement mise en avant, mais d'autres facteurs pourraient contribuer, comme la disparition des interactions directes entre les bactéries commensales et le virus.

b. Déplétion microbienne et réponse immunitaire

Dans les études où un traitement antibiotique a préalablement déstabilisé le microbiote, la réponse antivirale innée tarde et peine à se mettre en place. L'activation des cytokines de l'inflammasome, comme NLRP3 ou les IL-1 β et IL-18, est diminuée, de même que la migration des cellules dendritiques aux sites de réplication virale (Ichinohe et al., 2011). L'expression des interférons de type 1 est moindre, avec une plus faible expression des gènes stimulés par les interférons chez les macrophages (Abt et al., 2012; Bradley et al., 2019). Chez le poulet, les rares études publiées vont dans le même sens, avec une réponse interféron diminuée et une faible expression de certaines cytokines (Yitbarek et al., 2018b). Une corrélation négative entre traitement antibiotique et infection par un virus H7N9 a également été notée chez l'homme (Qin et al., 2015).

La déplétion du microbiote a, de plus, un impact sur la réponse immunitaire adaptative. Chez un animal sain, suite à une infection, l'augmentation des concentrations en cytokines et chémokines sécrétées localement par les cellules de l'immunité innée entraîne la migration des lymphocytes vers le lieu d'infection. Chez un animal avec un microbiote absent ou fortement perturbé, ces concentrations diminuent, ce qui affecte le recrutement lymphocytaire. A titre d'exemple, le développement des cellules Th17 est lié à la production d'IL-1 β : en l'absence de microbiote, les taux d'IL-1 β diminuent et la génération des cellules Th17 est en conséquence altérée (Shaw et al., 2012). Les souris traitées aux antibiotiques

peinent à mettre en place une réponse à cellules CD4+, CD8+ et B, à moins de les inoculer avec des agonistes des TLR (Ichinohe et al., 2011).

Cet effet régulateur n'est pas propre aux infections par les VIA. Par exemple, la perturbation du microbiote par des traitements antibiotiques, même de courte durée, rend les souris bien plus sensibles aux infections par les flavivirus (Thackray et al., 2018). La présence d'un microbiote intact est également un prérequis à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace contre des bactéries pathogènes comme les salmonelles (Endt et al., 2010).

c. Métabolites bactériens

Les acides gras à courte chaîne (AGCC) sont parmi les molécules les plus abondantes produites par le microbiote intestinal. Ils participent au fonctionnement de l'immunité et du métabolisme cellulaire (Morrison and Preston, 2016). Les souris axéniques ont de très faibles concentrations en AGCC. Les bactéries commensales anaérobiques peuvent dégrader les carbohydrates, comme la cellulose, par la fermentation, générant ainsi des AGCC, dénommés acétate, propionate et butyrate. Acétate et propionate sont surtout produits par les Bacteroidetes (un phylum bactérien comprenant notamment les genres *Bacteroides* et *Bifidobacterium*), tandis que le butyrate l'est plutôt par les Firmicutes (un phylum bactérien comprenant notamment les ordres des *Clostridiales*, des *Bacillales* et des *Lactobacillales*) (Høverstad and Midtvedt, 1986; Macfarlane and Macfarlane, 2003). L'administration d'AGCC module l'hématopoïèse et résulte notamment en l'augmentation du nombre de cellules précurseurs des lignées myéloïdes, favorisant l'élimination des pathogènes (Balmer et al., 2014; Khosravi et al., 2014). Les AGCC participent également à la régulation de l'activation de l'inflammasome, de l'apoptose, de l'activation des cellules dendritiques etc. (Rooks and Garrett, 2016). Ces effets impliqueraient entre autres le récepteur GP43 (glycoprotéine 43) : en effet, les seuls ligands connus de ce récepteur sont les AGCC et les souris déficientes pour GP43 ont une réponse inflammatoire exacerbée dans différents modèles. Ce récepteur est principalement exprimé par les cellules inflammatoires et les cellules de l'immunité innée, comme les neutrophiles et les macrophages activés (Maslowski et al., 2009).

Les AGCC ne sont qu'un exemple parmi bien d'autres. On peut citer la désaminotyrosine, produite notamment par la dégradation bactérienne des flavonoïdes, qui, administrée chez la souris, augmente l'expression de plusieurs gènes stimulés par les interférons, probablement par

l'augmentation de la production d'interférons de type 1, et protégeant ainsi les animaux contre plusieurs virus, dont les VIA (Steed et al., 2017).

Les cellules immunitaires sont ainsi constamment exposées à un large panel de molécules, principalement des métabolites bactériens et des PAMP, qui seront reconnus par les PRR. Les bactéries commensales calibreraient le seuil de réactivité de plusieurs voies de signalisation de l'immunité, notamment la réponse interféron, par cette exposition à bas bruit. Le système immunitaire est ainsi maintenu dans un état de réactivité optimale (Abt et al., 2012; Bradley et al., 2019).

d. Interactions directes

Bien que cela ait probablement des conséquences plus marginales, les bactéries commensales peuvent directement interagir avec les virus et prévenir les infections. La bactérie *Enterococcus faecium* est capable d'adsorber à sa surface VIA, comme cela a été montré chez un modèle porcin (Wang et al., 2013). *Staphylococcus epidermidis*, une bactérie commensale des cavités nasales des mammifères et des oiseaux, synthétise une protéine extracellulaire se liant aux VIA (Chen et al., 2016; Kawano et al., 1996). Enfin, le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négative peut se lier aux virions et déstabiliser leur morphologie, diminuant ainsi leur stabilité (Bandoro and Runstadler, 2017). Dans ces trois exemples, la probabilité qu'un virus soit à même d'infecter une cellule cible est diminuée.

e. Intérêt des probiotiques

L'administration par voie orale de certains probiotiques et/ou prébiotiques pourrait réguler la réponse immunitaire faisant suite à l'infection par un VIA, et diminuer ainsi l'inflammation et les dégâts tissulaires. L'intérêt d'une supplémentation en probiotiques dans le cadre de l'infection par un virus grippal a été démontré pour la première fois en 1999 chez la souris : les animaux recevant quotidiennement une alimentation contenant une souche de *Bifidobacterium breve* avaient des titres en IgG significativement plus élevés, comparés aux animaux du groupe contrôle (Yasui et al., 1999). Depuis, de nombreuses autres études ont été publiées, chez la souris, le poulet et l'homme, faisant principalement intervenir les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Des souris ayant préalablement consommé *Lactobacillus*

paracasei CNCM I-1518 et infectées ensuite par un virus H3N2 avaient une meilleure présentation clinique par rapport aux souris non traitées. Ceci pourrait s'expliquer par la sécrétion passive d'IL-1 α et IL-1 β dans les poumons et par une expression précoce des gènes de l'inflammation. Le système immunitaire, ainsi pré-activé, arriverait à éliminer plus rapidement le virus (Belkacem et al., 2017). Ces résultats sont similaires à ceux observés dans la majorité des études, où l'expression des gènes de l'IL-1 α et de l'IL-1 β , mais également d'autres interleukines, était augmentée (Brisbin et al., 2010; Chen et al., 2017a; Perdigon et al., 2001). Des résultats contradictoires existent toutefois pour certaines cytokines. Par exemple, l'expression du gène du TNF- α était augmentée dans certaines études (Harata et al., 2010; Kawahara et al., 2015), mais diminuée dans d'autres (Hori et al., 2001; Takeda et al., 2011). Différentes souches de probiotiques et différents inocula viraux sont utilisés d'une étude à l'autre, ce qui pourrait tout à fait être à l'origine des différences observées. Si la majorité des études concernent le microbiote intestinal et l'administration orale de probiotiques, certaines s'intéressent au microbiote respiratoire avec une administration intranasale des probiotiques (Groeger et al., 2020).

Les études sont moins nombreuses chez les espèces aviaires, mais pointent dans la même direction. Par exemple, une étude coréenne a montré que le traitement par voie orale de poulets avec *Leuconostoc mesenteroides* YML003, une bactérie isolée sur du kimchi (du chou lacto-fermenté), résultait en une excrétion virale diminuée et une réponse interféron augmentée (Seo et al., 2012).

Les probiotiques permettent également d'améliorer l'immunité mucoale. Les taux IgA anti-influenza récoltés lors de lavages broncho-alvéolaires chez des souris sont augmentés chez les animaux traités oralement avec des lactobacilles (Waki et al., 2014; Youn et al., 2012). Les mécanismes derrière cette stimulation de la production d'IgA sont encore très méconnus, mais il semblerait que les bactéries administrées soient reconnues par Myd88 (*myeloid differentiation primary response 88*), qui est un acteur important dans la production d'IgA (Suzuki et al., 2010).

L'administration par voie orale de bactéries tuées ou de composants bactériens est, elle aussi, à même de moduler la réponse immunitaire suite à l'infection par un virus influenza. Le

traitement préalable de souris avec *Enterococcus faecalis* inactivée par chaleur diminuait morbidité et inflammation pulmonaire suite à l'infection par un virus H1N1 saisonnier. Plus intéressant encore, le traitement avec de l'acide lipoteichoïque, un composant de la paroi bactérienne, induisait des effets similaires, contrairement au traitement avec l'ADN de la bactérie. Même une bactérie tuée ou une partie de sa paroi seule pourraient ainsi maintenir leurs interactions avec les récepteurs cellulaires et entraîner des effets biologiques (Chen et al., 2017b).

f. Favorisation des infections virales par les bactéries digestives

La présence de bactéries peut parfois être profitable aux virus. Suite à l'infection par un poliovirus, la mortalité et l'excrétion virale sont diminuées chez les souris traitées aux antibiotiques. De plus, la pré-incubation de l'inoculum viral avec des bactéries Gram négatives, voire avec simplement des composés bactériens comme le LPS ou le peptidoglycane, augmente l'infectiosité du virus. Les reovirus, d'autres virus entériques, ont également une pathogénicité diminuée sur les animaux dont le microbiote a été déstabilisé par un traitement antibiotique (Kuss et al., 2011). Enfin, le *mouse mammary tumor virus* (MMTV), un rétrovirus de souris transmis par le lait, utilise le LPS pour déclencher la voie de signalisation du TLR4, induisant ainsi une diminution de la réponse antivirale par la sécrétion d'IL-10. Les femelles traitées aux antibiotiques ne transmettent pas le virus à leur progéniture (Kane et al., 2011).

g. Microbiote respiratoire

Moins bien caractérisé que le microbiote digestif et moins riche en microorganismes, le microbiote respiratoire jouerait également un rôle dans la régulation des infections virales respiratoires. Cela n'est guère surprenant, dans la mesure où les cellules de l'épithélium respiratoire, la principale cible des virus influenza, abritent à leur surface du mucus et tout un écosystème microbien commensal. Comme c'est le cas pour le mucus intestinal, la production du mucus respiratoire, qui joue un rôle de barrière à la fois physique et chimique, est intimement liée à la présence d'un microbiote en bonne santé (Figure 10) (Yun et al., 2014). Chez l'homme, la sensibilité à une infection par un virus influenza dépendrait en partie de la composition du microbiote respiratoire (Lee et al., 2019).

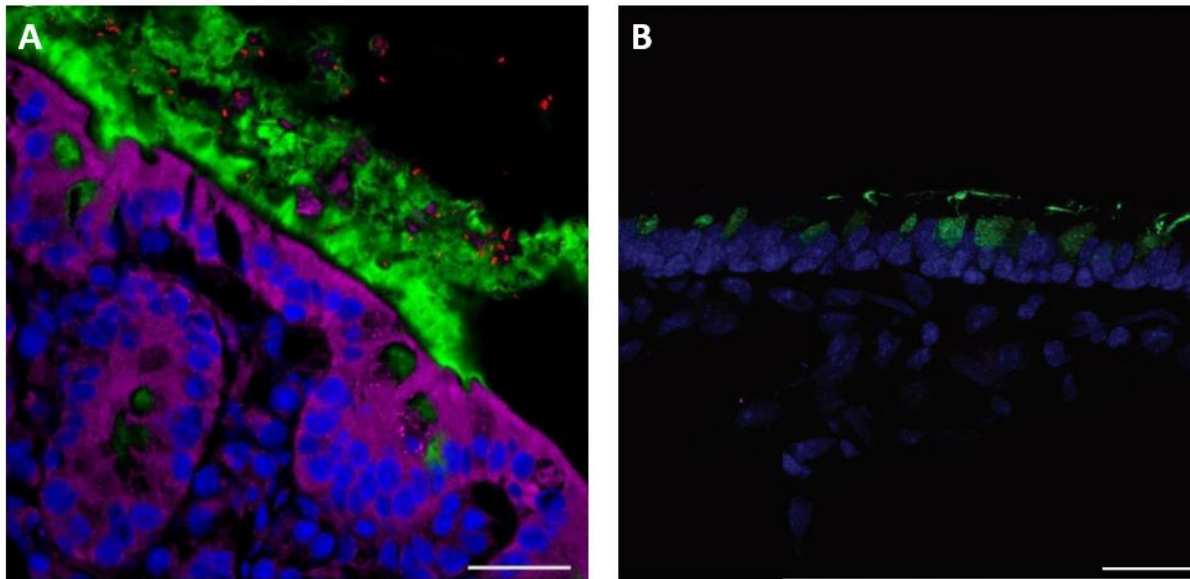


Figure 10 : Mucus digestif et respiratoire en microscopie confocale

A : Coupe de colon de souris, en microscopie confocale. Le mucus est marqué en vert, l'actine en violet, les bactéries en rouge et l'ADN en bleu. Barre d'échelle : 20µm. D'après Chassaing et al., 2015. B : Coupe de cornets nasaux de souris en microscopie confocale. Le mucus est marqué en vert et l'ADN en bleu. Barre d'échelle : 25µm. D'après Kennel et al., 2019.

Ces images montrent que les épithéliums digestifs et respiratoires sont tapissés d'une couche de mucus, bien plus importante dans l'appareil digestif, qui contient également une grande quantité de bactéries.

Les communautés bactériennes de l'arbre respiratoire pourraient également avoir un effet favorable aux virus. Notamment, elles protégeraient les particules virales de la dessiccation dans l'environnement, une fois expectorées, augmentant la durée pendant laquelle elles demeurent infectieuses. La transmission aéroportée d'un virus H1N1 était entièrement abolie dans une étude utilisant des furets traités aux antibiotiques par voie intranasale (Rowe et al., 2020). A l'inverse, les infections respiratoires par les virus influenza sont connues pour favoriser les surinfections bactériennes. L'exemple le plus frappant est peut-être la synergie qui existe entre les virus influenza et la bactérie *Streptococcus pneumoniae*. L'infection virale rend la bactérie plus transmissible à d'autres individus chez la souris (Richard et al., 2014) ou chez le furet (McCullers et al., 2010), notamment en entraînant une diminution du nombre de macrophages alvéolaires (Ghoneim et al., 2013), ou en augmentant l'adhérence des bactéries à l'épithélium (McCullers and Rehg, 2002). Une grande partie des victimes de la grippe

espagnole est morte secondairement à des surinfections bactériennes, causées par des bactéries communément trouvées dans l'appareil respiratoire supérieur, dont *Streptococcus pneumoniae* (Morens et al., 2008).

A ce jour, les interactions entre les virus influenza aviaires et le microbiote respiratoire des oiseaux restent très méconnues.

2. Interactions entre virus influenza

La principale interaction pouvant avoir lieu entre les virus influenza est bien évidemment le réassortiment, la capacité de ces virus à échanger des segments ayant été rendue célèbre par trois des quatre pandémies grippales ayant eu lieu entre 1918 et aujourd'hui. Pour qu'un tel échange ait lieu, une même cellule doit être infectée par au moins deux virus influenza différents : autrement dit, une coinfection est nécessaire. Au-delà de la génération de nouveaux variants, la réplication simultanée de deux virus permet de compenser la présence de particules semi-infectieuses et défectives, qui peuvent représenter la majorité d'une population virale (Russell et al., 2018). La présence de particules semi-infectieuses favorise d'ailleurs les réassortiments, ces particules n'étant pas à même de se répliquer seules sans la présence d'autres particules (infectieuses ou semi-infectieuses), qui apportent les gènes manquant (Fonville et al., 2015).

Cette coopération virale n'est pas limitée au cas des particules semi-infectieuses. On peut citer par exemple la coopération existant entre deux variants du H3N2 de la grippe saisonnière humaine, différenciables par une mutation de leur neuraminidase. Si le variant D151 est capable de se détacher facilement des cellules infectées, grâce à une activité sialidase efficace, son HA a une affinité réduite pour de nombreux acides sialiques (Gulati et al., 2013; Lin et al., 2012). A l'inverse, la NA du variant G151 se fixe facilement à ces derniers, ce qui compense le manque d'affinité de HA, mais son activité sialidase est faible (Zhu et al., 2012). Ainsi, un variant arrive difficilement dans les cellules et l'autre peine à en sortir. En coinfectant des MDCK avec les deux variants dans des proportions variables et en réalisant des passages successifs, les auteurs d'une étude ont montré qu'immanquablement, les deux populations virales arrivaient à un équilibre, où elles étaient présentes en quantités égales. De plus, les capacités de réplication du H3N2 étaient augmentées en comparaison aux mono-infections, montrant là un bel exemple de coopération virale (Xue et al., 2016).

Au contraire des virus circulant chez l'homme, une grande diversité de HA est observée chez les virus influenza aviaires, entraînant ainsi un fort taux de réassortiments dans le réservoir animal (Leonard et al., 2017; Wille et al., 2013). Cependant, plusieurs conditions doivent être remplies pour que deux virus (ou plus) se multiplient en parallèle dans une même cellule, qu'il s'agisse d'infections *in vitro* ou *in vivo*.

Premièrement, un certain délai entre les deux infections successives doit être respecté. Comparée à une infection simultanée par deux virus, une infection séquentielle ne donnera pas les mêmes résultats. Si deux virus pénètrent en même temps une même cellule, leur génome sera répliqué en même temps, et sous réserve de compatibilité des segments entre eux, des réassortiments auront inmanquablement lieu. En revanche, si un virus arrive après l'autre, passé un certain délai, ce second virus ne sera plus à même de se répliquer, voire de rentrer dans la cellule : on parle d'exclusion de surinfection, ce qui fait intervenir plusieurs mécanismes. Dans un modèle *in vitro*, deux études ont montré qu'en infectant des MDCK avec deux virus à 12 heures d'intervalle, le second virus parvenait à rentrer dans la cellule, mais ses segments d'ARN n'étaient pas importés dans le noyau et restaient dans le cytoplasme, ne pouvant ainsi pas être dupliqués par la polymérase virale (Dou et al., 2017; Marshall et al., 2013). Dès lors que le génome du premier virus est dans le noyau et que le processus de réplication a débuté, l'import nucléaire des ARN viraux est inhibé. Cela peut paraître logique d'un point de vue mécanistique, car à ce stade du cycle viral, les segments d'ARN sont exportés en dehors du noyau avant d'être ensuite empaquetés dans les virions en formation. Si les brins d'ARN continuaient d'être amenés au noyau, cela pourrait nuire au bon déroulement du cycle. Toutefois, en modèles *in vivo*, les choses sont plus complexes. Une étude chez le cobaye indique que ce délai pourrait être plus long qu'*in vitro* : en coinfectant les animaux à 12h d'intervalle, le taux de réassortiments était plus élevé qu'en cas de coinfection simultanée. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'un tel délai permettait au premier virus de réaliser un cycle complet de réplication et de diffuser dans les tissus, augmentant ainsi la probabilité que le second virus infecte des cellules nouvellement infectées par le premier virus. En amenant ce délai à 18h, la fréquence des réassortiments diminuait drastiquement (Marshall et al., 2013). Comparé à un tapis de culture cellulaire, un organisme est bien plus complexe, comporte beaucoup plus de cellules, ces dernières appartenant à des types différents et

n'étant pas nécessairement facilement accessibles comparé à des cellules cultivées *in vitro*, ce qui explique probablement les différences observées entre les études *in vitro* et *in vivo*.

Deuxièmement, la rapidité et l'efficacité de la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale jouent un rôle prépondérant dans la capacité de plusieurs virus différents à infecter une même cellule. Comme évoqué précédemment, suite à l'infection par un virus influenza, des interférons de type 1 sont produits par les cellules de l'immunité innée, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines. Les protéines antivirales comme Mx1 ou celles de la famille IFIT (*interferon induced proteins with tetratricopeptide repeats*) inhibent alors la réplication virale. Par effet paracrine, les cellules encore non infectées entrent dans un état antiviral, limitant ainsi l'excrétion virale et compromettant l'infection par d'autres virus. L'immunité antivirale innée se met en place rapidement, mais tous les virus ne semblent pas à même d'induire aussi rapidement cette réponse antivirale : par exemple, chez le furet, le virus H1N1 pandémique de 2009 entraînerait une réponse interféron plus rapidement que le virus H3N2 saisonnier (Laurie et al., 2015).

Enfin, la neuraminidase du premier virus à infecter la cellule entraîne rapidement la disparition des acides sialiques à la surface de cette dernière, supprimant ainsi les récepteurs cellulaires nécessaires à l'entrée d'un nouveau virus (Huang et al., 2008). D'autres facteurs, comme le tropisme cellulaire, l'espèce hôte, ou l'éventuelle immunité préexistante interviennent également dans la capacité de plusieurs virus à infecter simultanément un même hôte.

II. Hypothèses et objectifs

Des épizooties à VIAHP sont rapportées chaque année dans le monde. La France a elle-même connue trois épizooties ces quatre dernières années : une première avec l'émergence de plusieurs virus réassortants de sous-type H5 lors de l'hiver 2015-2016 (Briand et al., 2018) et deux autres avec l'introduction sur notre territoire de virus H5N8 lors des hivers 2016-2017 et 2020-2021 (Guinat et al., 2018; Vergne et al., 2020). Certains VIAHP sont capables de franchir la barrière d'espèce et d'infecter l'homme : l'évolution de tels virus vers des souches plus adaptées à l'homme pourrait résulter en l'apparition de virus à la fois pandémiques et mortels. Comprendre quels facteurs mènent à l'émergence et à la diffusion des VIAHP est donc un enjeu majeur pour la santé animale et pour la santé humaine et s'inscrit pleinement dans le concept « une seule santé ».

Premièrement, les appareils respiratoire et digestifs des oiseaux, qui sont les principaux sites de réplication des VIA, sont d'importants réservoirs de bactéries, champignons, virus, archées ou eucaryotes, qui peuvent être commensaux, opportunistes ou pathogènes. Les relations entre ces micro-organismes peuvent être neutres, mais des phénomènes de compétition ou de synergie peuvent avoir lieu. L'objectif de cette partie était de mieux comprendre comment les VIAHP interagissent avec ces organismes et de déterminer dans quelle mesure ces interactions ont un impact sur l'émergence de VIAHP.

Les bactéries commensales sont connues pour moduler la réponse immunitaire, notamment dans le cadre d'infections par des VIAFP chez l'homme, la souris et le poulet. De plus, au contraire des poulets, les canards tolèrent particulièrement bien la réplication de nombreux VIAHP. Cela nous a amenés à tester les hypothèses suivantes :

1. Le microbiote contribue au contrôle de la réplication virale des VIAHP chez le canard.
2. Le microbiote contribue à la faible symptomatologie régulièrement observée chez les canards en cas d'infection par un VIAHP.

La seconde partie de ces travaux de thèse avait pour objectif d'investiguer le rôle de l'espèce hôte dans l'émergence des VIAHP. Il est communément admis que les VIAHP émergent suite

à l'introduction chez les galliformes d'un VIAFP, la vaste majorité des émergences ayant eu lieu dans des élevages de poulets. Au contraire, les anatidés sont considérés comme des réservoirs pour les VIA (Dhingra et al., 2018) et non pas des oiseaux dans lesquels les VIAHP émergent. Ces éléments sont principalement fondés sur des observations épidémiologiques et n'ont jamais été prouvés expérimentalement. Indépendamment de l'espèce aviaire impliquée, lorsqu'un VIAHP émerge à partir d'un VIAFP précurseur, les deux virus se répliquent vraisemblablement en parallèle. Ainsi, trois scénarios sont théoriquement possibles (Figure 11) : premièrement, le VIAHP, en dépit de l'avantage sélectif majeur conféré par le site de clivage polybasique, pourrait ne pas parvenir à devenir un des variants majoritaires et être éteint par le VIAFP. Deuxièmement, au contraire, il pourrait prendre le dessus et devenir le variant majoritaire. Troisièmement, on pourrait avoir une situation intermédiaire, où le VIAHP se multiplierait à bas bruit par rapport au VIAFP. Dans ces deux derniers scénarios, le VIAHP peut être transmis à d'autres individus.

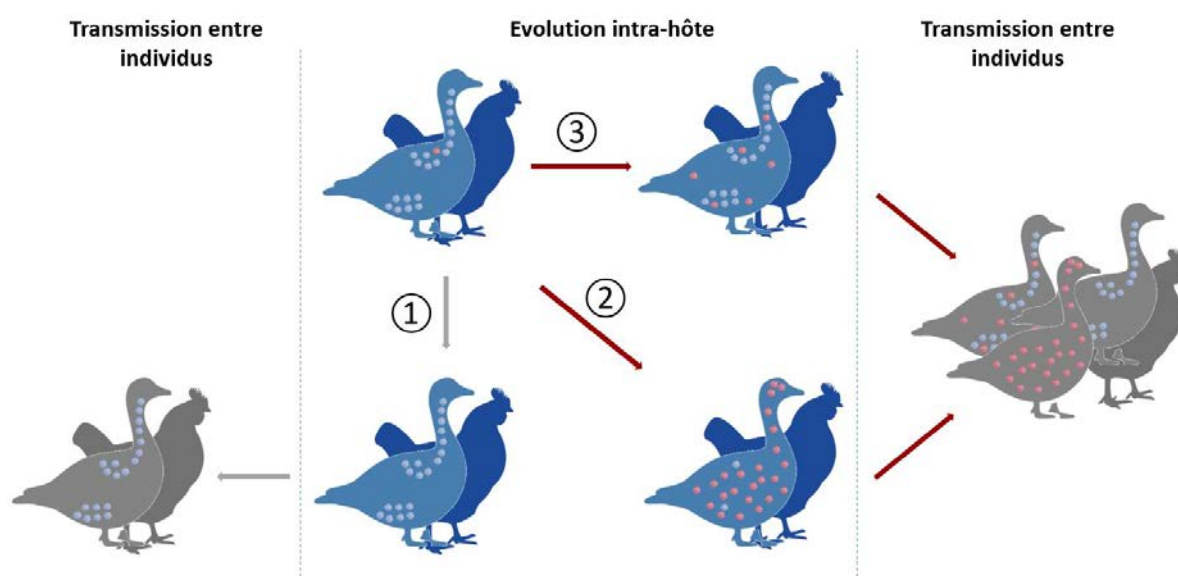


Figure 11 : Scénarios possibles suite à l'émergence d'un VIAHP au sein d'un individu

Lorsqu'un VIAHP (rouge) émerge à partir d'un VIAFP précurseur (bleu) au sein d'un hôte, l'hypothèse émise dans ces travaux de thèse est qu'il peut disparaître (1), du fait de facteurs dépendant de l'hôte comme de la souche virale, et ne jamais être transmis, ou bien parvenir à devenir un variant (plus ou moins majoritaire) de la quasi-espèce (2 et 3) et être transmis à d'autres individus.

Nous avons ainsi émis les hypothèses suivantes :

1. Des phénomènes d'interférence virale impactent la réplication du VIAHP et du VIAFP lorsque ces deux virus se répliquent en même temps au sein d'un même hôte.
2. La nature de ces phénomènes dépend de l'espèce hôte.

III. Résultats

Nous allons maintenant aborder les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, ces derniers s'articulant autour de deux sous-parties. La première s'intéresse aux interactions entre le microbiote et le virus lors d'une infection par un virus influenza aviaire H5N9 hautement pathogène chez le canard. Les données ont été obtenues suite à une infection expérimentale de canards Pékin dans une animalerie de niveau de biosécurité 3, et en faisant appel à des collaborations déjà présentes au sein de l'équipe, mais également grâce à la mise en place de nouvelles collaborations. Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle régulateur du microbiote sur la réplication virale et la réponse immunitaire. Ces travaux ont été publiés dans la revue américaine *Journal of Virology* et sont présentés ici sous la forme d'un article en langue anglaise. Ils ont également fait l'objet d'un article en français, rédigé à l'intention des vétérinaires praticiens, publié dans la revue la Dépêche Vétérinaire, ainsi que la création d'une bande dessinée dans le cadre de la fête de la science 2020. Article en français et bande dessinée sont présentés dans les annexes de ce manuscrit.

La seconde partie étudie la capacité d'un VIAHP à émerger lorsqu'il se réplique en parallèle d'un VIAFP présent en quantités importantes au sein d'un même animal. Comme dit précédemment, lorsqu'un VIAHP émerge à partir d'un précurseur VIAFP, les deux virus se répliquent en même temps : pour que le VIAHP nouvellement formé soit transmis à d'autres individus – que l'émergence soit réussie –, ce dernier doit vraisemblablement devenir un des variants majoritaires de la quasi-espèce virale. Pour mimer les conditions dans lesquelles un VIAHP émerge, nous avons donc coinfesté des animaux avec un mélange de VIAFP et VIAHP, en comparant deux espèces, le poulet et le canard. Les données ont été obtenues suite à plusieurs infections expérimentales, utilisant cette fois-ci un sous-type H5N8 hautement pathogène, généré par génétique inverse à partir d'un prélèvement terrain, et un sous-type H5N8 faiblement pathogène, généré par mutagénèse dirigée à partir du hautement pathogène et par génétique inverse.

Thomas Figueroa et moi-même sommes co-premier auteurs des deux articles scientifiques ci-dessous. Nous avons tous les deux participé à charge égale à la conceptualisation des expériences, à leur mise en application, à l'analyse des résultats et à la rédaction des articles.

A. Le microbiote contribue au contrôle de la réplication virale d'un VIAHP H5N9 chez le canard

Les oiseaux aquatiques et en particulier les canards jouent un rôle clef dans l'épidémiologie des virus influenza. Ils hébergent de manière souvent asymptomatique des virus influenza aviaires appartenant à de nombreux sous-types, jouant le rôle d'espèce réservoir, et les transportent d'un continent à l'autre au fil de leurs migrations. Alors que l'infection par un VIAHP peut résulter en une mortalité atteignant les 100% chez le poulet, les canards ne présentent généralement que peu de symptômes suite à l'infection, voire pas de symptômes du tout. Si plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette différence de sensibilité à l'infection, les mécanismes sous-jacents restent globalement méconnus. La principale hypothèse est la capacité des canards à mettre en place une réponse immunitaire antivirale innée précoce en comparaison par rapport aux poulets. La réponse immunitaire de ces derniers peine à se mettre en place, permettant ainsi au virus de se répliquer plus facilement, et les phénomènes d'immunopathologie sont plus communs (Evseev and Magor, 2019). Le microbiote participant à la régulation de la réponse immunitaire antivirale, comme cela a été montré chez la souris et commence à l'être chez le poulet, nous nous sommes demandé dans quelle mesure il pouvait contribuer à la moindre sensibilité des canards par rapport aux poulets. Nous avons ainsi réalisé une infection expérimentale avec un VIAHP H5N9 en comparant deux groupes de canards : un groupe de canard ayant préalablement reçu un traitement antibiotique à large spectre par voie orale, de telle sorte à fortement déstabiliser voire neutraliser le microbiote, et un groupe de canards sains.



The Microbiota Contributes to the Control of Highly Pathogenic H5N9 Influenza Virus Replication in Ducks

Thomas Figueroa,^a Pierre Bessière,^a Amelia Coggon,^a Kim M. Bouwman,^{b,c} Roosmarijn van der Woude,^b Maxence Delverdier,^a Monique H. Verheije,^c Robert P. de Vries,^b  Romain Volmer^a

^aUniversit   de Toulouse, ENVT, INRAE, UMR 1225, Toulouse, France

^bDepartment of Chemical Biology and Drug Discovery, Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

^cDepartment of Biomolecular Health Sciences, Division Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

T.F. and P.B. contributed equally to this article. Author order was determined in order of decreasing seniority.

ABSTRACT Ducks usually show little or no clinical signs following highly pathogenic avian influenza virus infection. In order to analyze whether the microbiota could contribute to the control of influenza virus replication in ducks, we used a broad-spectrum oral antibiotic treatment to deplete the microbiota before infection with a highly pathogenic H5N9 avian influenza virus. Antibiotic-treated ducks and nontreated control ducks did not show any clinical signs following H5N9 virus infection. We did not detect any significant difference in virus titers neither in the respiratory tract nor in the brain nor spleen. However, we found that antibiotic-treated H5N9 virus-infected ducks had significantly increased intestinal virus excretion at days 3 and 5 postinfection. This was associated with a significantly decreased antiviral immune response in the intestine of antibiotic-treated ducks. Our findings highlight the importance of an intact microbiota for an efficient control of avian influenza virus replication in ducks.

IMPORTANCE Ducks are frequently infected with avian influenza viruses belonging to multiple subtypes. They represent an important reservoir species of avian influenza viruses, which can occasionally be transmitted to other bird species or mammals, including humans. Ducks thus have a central role in the epidemiology of influenza virus infection. Importantly, ducks usually show little or no clinical signs even following infection with a highly pathogenic avian influenza virus. We provide evidence that the microbiota contributes to the control of influenza virus replication in ducks by modulating the antiviral immune response. Ducks are able to control influenza virus replication more efficiently when they have an intact intestinal microbiota. Therefore, maintaining a healthy microbiota by limiting perturbations to its composition should contribute to the prevention of avian influenza virus spread from the duck reservoir.

KEYWORDS avian viruses, duck, enteric viruses, immunoglobulins, influenza, innate immunity, interferons, microbiota, microflora, normal flora

Ducks have a central role in the epidemiology of influenza virus (1, 2). They have been shown to shed viruses belonging to multiple subtypes and represent the main reservoir of influenza viruses that can occasionally be transmitted to other animal species, including gallinaceous poultry, and occasionally mammals. Low pathogenic avian influenza viruses (LPAIVs) of the H5 and H7 subtype have the capacity to evolve to highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIVs). This evolution is due to the acquisition of a polybasic cleavage site at the hemagglutinin (HA) cleavage site, allowing the HA to be cleaved by intracellular ubiquitous proteases and the virus to

Citation Figueroa T, Bessière P, Coggon A, Bouwman KM, van der Woude R, Delverdier M, Verheije MH, de Vries RP, Volmer R. 2020. The microbiota contributes to the control of highly pathogenic H5N9 influenza virus replication in ducks. *J Virol* 94:e00289-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00289-20>.

Editor Stacey Schultz-Cherry, St. Jude Children's Research Hospital

Copyright    2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Romain Volmer, romain.volmer@envt.fr.

Received 20 February 2020

Accepted 23 February 2020

Accepted manuscript posted online 26 February 2020

Published 4 May 2020

spread systematically (3). In contrast, the HA of LPAIV is proteolytically matured by trypsin-like proteases expressed in the respiratory and digestive tract, thus restricting replication of LPAIV to these tissues in birds.

In chickens, HPAIV infection can reach 100% mortality in a few days, whereas ducks usually only exhibit mild, if any, clinical signs following HPAIV infection (4). The mechanisms contributing to the host species-dependent differences in pathogenicity are not fully understood. Ducks express the viral RNA sensor retinoic acid-induced gene I (RIG-I), which is absent in chickens (5). Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA-5) could compensate for the lack of RIG-I expression in chicken cells and mediate type I interferon (IFN) responses to influenza A virus infection (6). However, comparative studies have provided evidence that HPAIV infections are associated with a more rapid type I IFN immune response and reduced proinflammatory cytokines expression in ducks compared to chickens. This may lead to reduced immunopathology and therefore fewer clinical signs in ducks (7–11). Extensive tissue damage due to higher levels of viral replication and inflammation in multiple organs is probably the cause of the higher HPAIV-associated mortality in chickens compared to ducks.

The microbiota is now recognized as a regulator of many physiological functions in the host, reaching far beyond its contribution to digestion (12). Several studies have highlighted the role of the gut microbiota in shaping the antiviral immune response against influenza virus, in mammals, in which the virus replicates in the respiratory tract (13–17), as well as following LPAIV infection in chickens, in which the virus replicates in the respiratory and digestive tract (18, 19).

Altogether, these observations prompted us to investigate to what extent the microbiota could contribute to the control of HPAIV infection in ducks. By treating ducks with a broad-spectrum antibiotic (ABX) cocktail, we achieved a significant depletion of the intestinal and respiratory microbiota. Groups of nontreated and ABX-treated ducks were infected with a H5N9 HPAIV. We revealed that ABX-treated ducks had significantly higher viral excretion in the intestine, which correlated with an impaired intestinal antiviral immune response. This study thus demonstrates that the microbiota contributes to the control of avian virus replication in ducks.

RESULTS

Antibiotic treatment leads to a significant depletion of the microbiota. From 2 weeks of age, ABX-treated ducks were continuously treated with a broad-spectrum ABX cocktail via their drinking water (Fig. 1A). To assess the impact of the ABX-treatment on the microbiota, we quantified the number of 16S rRNA gene copies from fresh feces and tracheal swabs from nontreated control ducks and ABX-treated ducks. After 2 weeks of ABX treatment, we detected a $>10^2$ -fold depletion of the number of bacterial 16S rRNA gene copies detected in feces (Fig. 1B) and a >10 -fold depletion in tracheal swabs (Fig. 1C). Using 16S rRNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH), we detected bacteria aggregating as filaments in the vicinity of intestinal epithelial cells on ileal tissue section from nontreated control ducks (Fig. 1D). In contrast, no bacteria were detected by FISH in ileal samples originating from ABX-treated ducks. No bacteria were detected by FISH in respiratory tissues, regardless of the ABX treatment (data not shown), suggesting that the FISH technique is not sensitive enough to detect the respiratory microbiota, which is scarce in comparison to the intestinal microbiota. Altogether, these results demonstrate that the ABX treatment caused a significant reduction in the ducks' microbiota. Bacterial phylum-specific qPCR revealed that the ABX treatment caused a significant reduction in all major phyla composing the duck microbiota (Fig. 1E) (20). The ABX treatment did not induce any clinical signs or change in the ducks' behavior, nor did it diminish the quantity of water consumed. There was no significant difference in the average weights of ABX-treated and nontreated animals (data not shown). In addition, there was no difference in fecal consistency between ABX-treated and nontreated animals.

Impact of microbiota depletion on influenza virus replication. We inoculated ducks via the ocular, nasal and tracheal route with 3.6×10^6 egg infectious dose 50

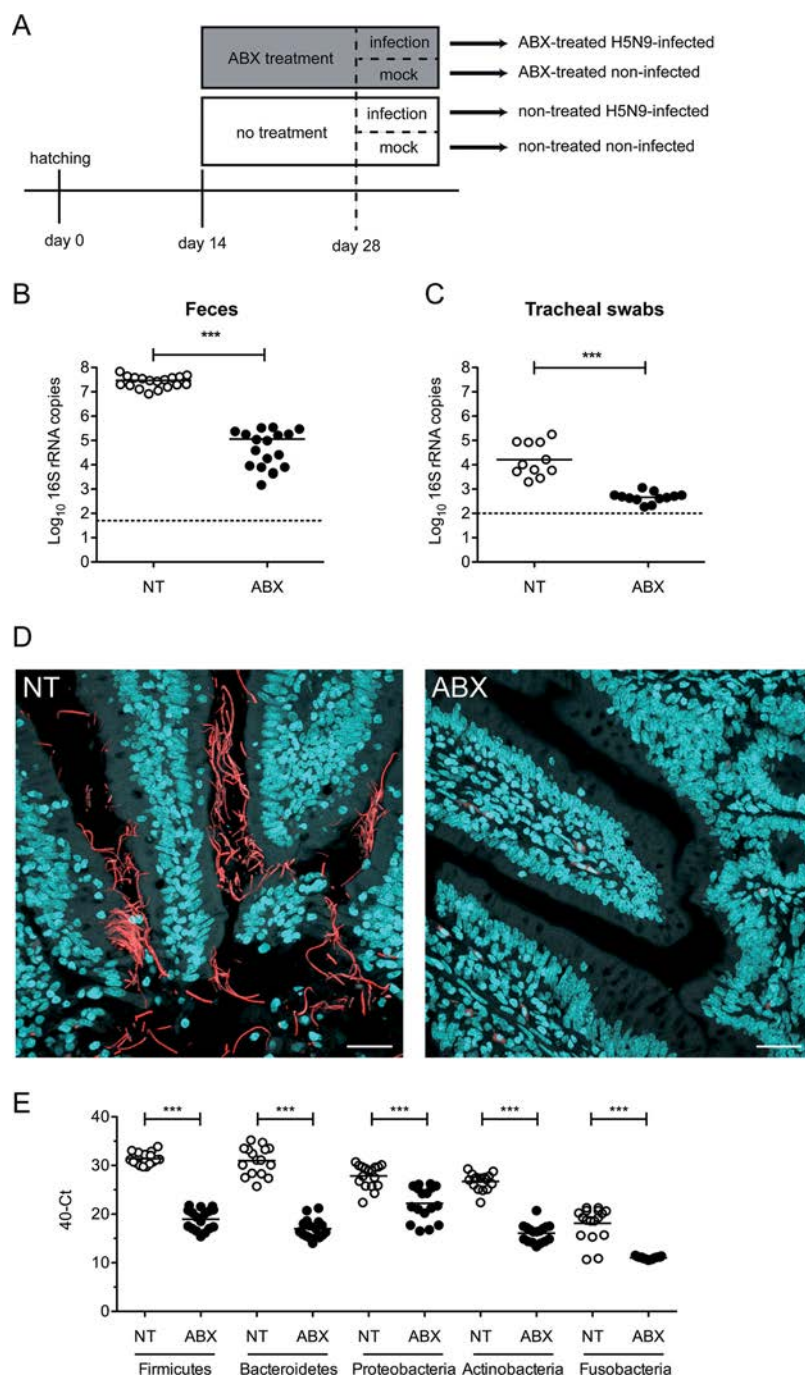


FIG 1 Antibiotic treatment for microbiota depletion. (A) Treatment timelines for nontreated and antibiotic (ABX)-treated ducks. Ducks received the ABX cocktail in drinking water. Fecal bacterial loads were determined at day 28 after 2 weeks of ABX treatment and prior to H5N9 virus inoculation. (B) 16S rRNA gene copies per g of feces. DNA was extracted from feces harvested on day 28 and analyzed by qPCR. (C) 16S rRNA gene copies per tracheal swab. DNA was extracted from tracheal swabs performed on day 28, vortexed in 500 μ l of sterile PBS, and analyzed by qPCR. (D) Ileum sections from NT or ABX-treated ducks were subjected to FISH with eubacterial 16S rRNA-specific Alexa 594-labeled probe and stained with DAPI. Scale bar, 25 μ m. (E) Quantification of specific bacterial phylum 16S rRNA gene DNA was performed from DNA extracted from feces harvested on day 28 and analyzed by qPCR. ***, $P < 0.001$.

(EID₅₀) of the A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9) HPAIV virus. ABX-treated ducks remained under the same ABX treatment for the whole duration of the experiment. Ducks did not show any clinical signs upon H5N9 infection in the nontreated and ABX-treated groups.

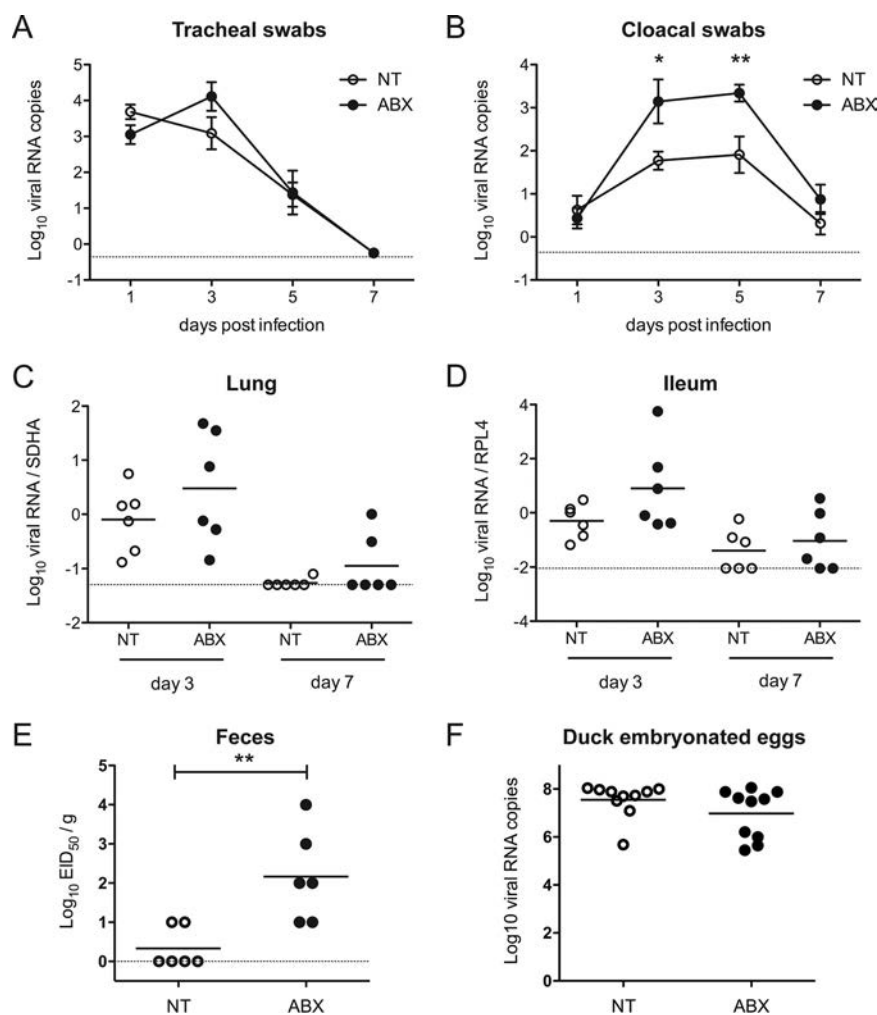


FIG 2 Consequences of microbiota depletion on H5N9 virus replication. NT or ABX-treated ducks were inoculated via the ocular, nasal, and tracheal routes with 3.6×10^6 EID₅₀ of the H5N9 HPAIV virus. Virus replication was analyzed by quantifying viral RNA by RT-qPCR from RNA extracted from tracheal swabs (A) or cloacal swabs (B). The curves represent the mean viral RNA load, and error bars correspond to the standard errors of the mean (SEM). Viral RNA load was analyzed from total RNA extracted from the lungs (C) and the ileum (D). Viral RNA was normalized with mRNA of the SDHA housekeeping gene in the lungs or the RPL4 housekeeping gene in the ileum. (E) Viral load in the feces of animals autopsied at 3 dpi was titrated on chicken embryonated eggs, and viral titers are expressed as EID₅₀/g. (F) Consequences of ABX treatment on H5N9 virus replication in embryonated duck eggs. Eleven-day-old embryonated duck eggs were injected with antibiotics (ABX) or left untreated (NT). Viral growth was analyzed by quantifying viral RNA by RT-qPCR from RNA extracted from allantoic fluids were collected at 72 h postinfection. Each dot represents an individual value, and the horizontal bar corresponds to the mean. The dotted line represents the limit of detection for each experiment. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

We evaluated the level of virus excretion by quantifying viral nucleic acids by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) from tracheal and cloacal swabs. Tracheal shedding was modestly increased in ABX-treated ducks at 3 days postinfection (dpi) (Fig. 2A). In contrast, cloacal shedding was significantly higher in ABX-treated animals at 3 and 5 dpi (Fig. 2B). We then analyzed viral load in organs harvested from animals autopsied at 3 and 7 dpi. Viral nucleic acid was detected in the brain and in the spleen of infected animals, as expected with a HPAIV, with no difference observed between ABX-treated-ducks and nontreated ducks (data not shown). In the lungs and ileum, the viral nucleic acid load was increased in ABX-treated-ducks compared to nontreated ducks at 3 dpi (Fig. 2C and D); however, the differences did not reach statistical significance. Finally, we measured infectious virus particles from fresh feces collected from individual ducks at 3 dpi. We detected a significantly higher number of infectious

virus particles in feces from ABX-treated ducks compared to nontreated ducks (Fig. 2E), thus confirming that ABX-induced depletion of the microbiota is associated with an increase of influenza virus fecal shedding in ducks.

To determine whether the ABX-treatment could have a direct microbiota-independent effect on virus replication, embryonated duck eggs were treated with either PBS or the ABX cocktail. One day later, eggs were then inoculated with 10^4 EID₅₀ H5N9 together with ABX in the ABX-treated eggs or with PBS in the nontreated eggs. We evaluated the level of virus replication by quantifying viral nucleic acids by RT-qPCR from allantoic fluids collected at 3 dpi. We detected equal amounts of viral RNA in nontreated and ABX-treated eggs (Fig. 2F). Since embryonated duck eggs are essentially devoid of bacterial flora (21), this result demonstrates that the ABX treatment-induced increase in H5N9 replication observed in ducks *in vivo* is not due to a direct effect of ABX on H5N9 replication but rather point to a microbiota-mediated effect.

Impact of microbiota depletion on the respiratory and intestinal epithelia.

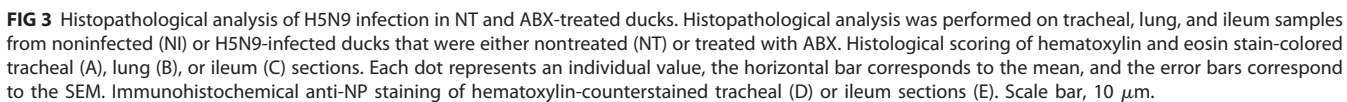
Histopathological analysis performed at 3 and 7 dpi revealed a diffuse to multifocal subacute tracheitis in ducks infected with H5N9 virus, which was equivalent in ABX-treated and nontreated animals. Inflammatory cellular infiltrates in the lamina propria were variably composed of mononuclear cells (lymphocytes, plasmocytes, and macrophages) and a few heterophils. We observed mild focal necrosis and exfoliation of the superficial mucosal epithelium, associated with loss of ciliature, regenerative epithelial hyperplasia and squamous epithelial metaplasia. Histological scores were low for infected animals and yet different from noninfected animals (Fig. 3A). Immunohistochemically, viral antigen was detected in epithelial cells of the trachea, similarly in ABX-treated and nontreated ducks infected with H5N9 virus (Fig. 3D). In the lungs, multifocal to focal subacute bronchitis was observed at 3 and 7 dpi in H5N9-infected ducks (Fig. 3B), characterized by regenerative epithelial hyperplasia and inflammatory cellular infiltrates in the lamina propria composed of mononuclear cells (lymphocytes, plasmocytes, and macrophages) and a few heterophils.

In the ileum, neither ABX treatment nor H5N9 infection was associated with any change in cell morphology and histological organization, both in the epithelium and in the chorion (Fig. 3C). Viral antigen was detected in differentiated epithelial cells of the ileum, as well as in desquamated cells in the intestinal lumen (Fig. 3E).

To gain further insight into the potential consequences of increased intestinal replication of H5N9 associated with depletion of the bacterial flora, we analyzed the expression of tight junction genes on ileal samples. The expression of zona occludens 1 (Fig. 4A) and Claudin-2 (Fig. 4B) mRNA was similar in all groups. In addition, we did not detect any change in the expression of lysozyme mRNA (Fig. 4C), a marker of Paneth cell function. We also analyzed the expression of the gene encoding mucin 2, a secreted high-molecular-weight glycoprotein, which is a component of the intestinal mucus. Mucin 2 expression was reduced specifically in H5N9-infected ducks treated with ABX (Fig. 4D). These results indicate that depletion of the bacterial flora may compromise intestinal integrity in response to HPAIV infection. Finally, we analyzed the expression of the mitochondrial function markers Mitochondrial transcription factor A (TFAM) and mitochondrial DNA-directed RNA polymerase (POLRMT), whose expression is commonly altered in response to intestinal injury (22, 23). We did not detect any change in the expression of TFAM (Fig. 4E) or POLRMT (Fig. 4F), suggesting that H5N9 infection and ABX treatment did not alter mitochondrial function.

To determine whether depletion of the intestinal bacterial flora could affect influenza virus receptor expression, we generated fluorescent trimeric H5 HA to detect H5N9 virus receptor expression levels and distribution on tissue sections (24). The intensity and distribution of H5N9 receptors were similar in the tracheas (Fig. 5A) and intestines (Fig. 5B) of ABX-treated and nontreated ducks. This result suggests that the increased replication of H5N9 in the intestinal tracts of ABX-treated ducks is not due to a difference in virus receptor expression.

Impact of microbiota depletion on the antiviral immune response. We then evaluated the impact of ABX-mediated microbiota depletion on the innate antiviral



jvi.asm.org 6

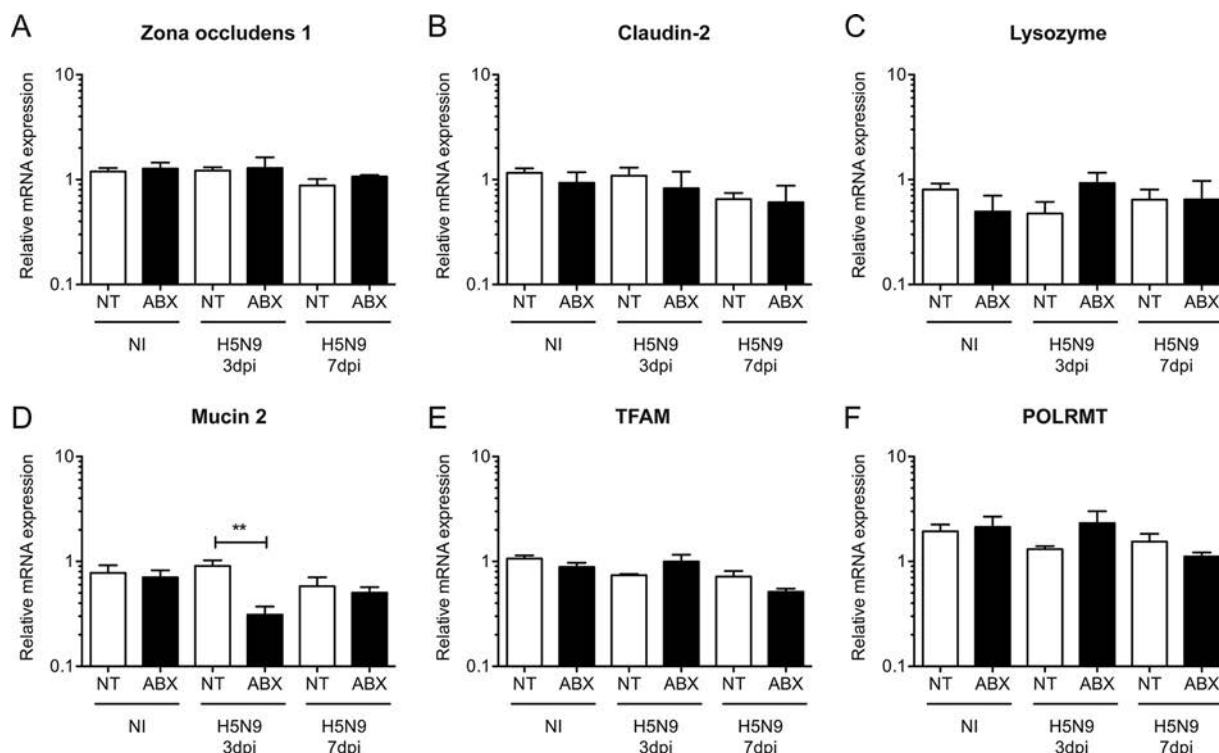


FIG 4 Analysis of intestinal integrity following H5N9 infection in NT and ABX-treated ducks. Analysis of mRNA gene expression from total RNA extracted from the ilea of noninfected (NI) or H5N9-infected ducks that were either nontreated (NT) or treated with ABX. RT-qPCR analysis of Zona occludens 1 (A), Claudin-2 (B), lysozyme (C), mucin 2 (D), mitochondrial transcription factor A (E), and mitochondrial DNA-directed RNA polymerase (F) mRNA levels in the ilea of ducks. mRNA levels were normalized to RPL4 levels. The results are expressed as means $\pm$ the SEM. **, $P < 0.01$.

Interestingly, ABX treatment was associated with a modest upregulation of IFN- α/β mRNA and type I IFN-induced genes expression regardless of the infection status.

In the ileum, we did not detect significant upregulation of alpha interferon (IFN- α) or IFN- β mRNA expression in ducks infected with HPAIV, regardless of the status of the microbiota (Fig. 6B). However, we observed an upregulation of type I IFN-induced genes in noninfected ABX-treated ducks (Fig. 6B) but the differences did not reach statistical significance. Interestingly, RIG-I mRNA transcripts were significantly reduced at 3 dpi in H5N9-infected ABX-treated ducks compared to H5N9-infected nontreated ducks (Fig. 6B), and this downregulation correlated with a significant reduction in type I IFN-induced gene expression at 3 dpi in H5N9-infected ABX-treated ducks compared to H5N9-infected nontreated ducks (Fig. 6B). Since the microbiota is required for IgA production in the intestine (25, 26), we measured IgA heavy-chain constant region mRNA expression in the intestine. We observed strongly reduced IgA heavy-chain constant region mRNA expression in the intestines of ABX-treated ducks, regardless of the H5N9 infection status (Fig. 7). Altogether, these results indicate that increased H5N9 replication in the intestine observed upon microbiota depletion is associated with an impaired intestinal immune response.

To determine whether the ABX-treatment could have a direct microbiota-independent effect on the innate antiviral immune response, we treated duck embryonic fibroblasts with the ABX cocktail and stimulated them with intracellularly delivered poly(I-C). We observed no change in IFIT5 and OAS-L mRNA expression following ABX treatment alone and no effect of ABX treatment on the level of upregulation of IFIT5 and OAS-L mRNA transcripts levels following poly(I-C) stimulation (Fig. 8). This result indicates that the ABX-treatment induced decrease in the intestinal antiviral innate immune response is not due to a direct effect of ABX treatment but rather points to a microbiota-mediated effect.

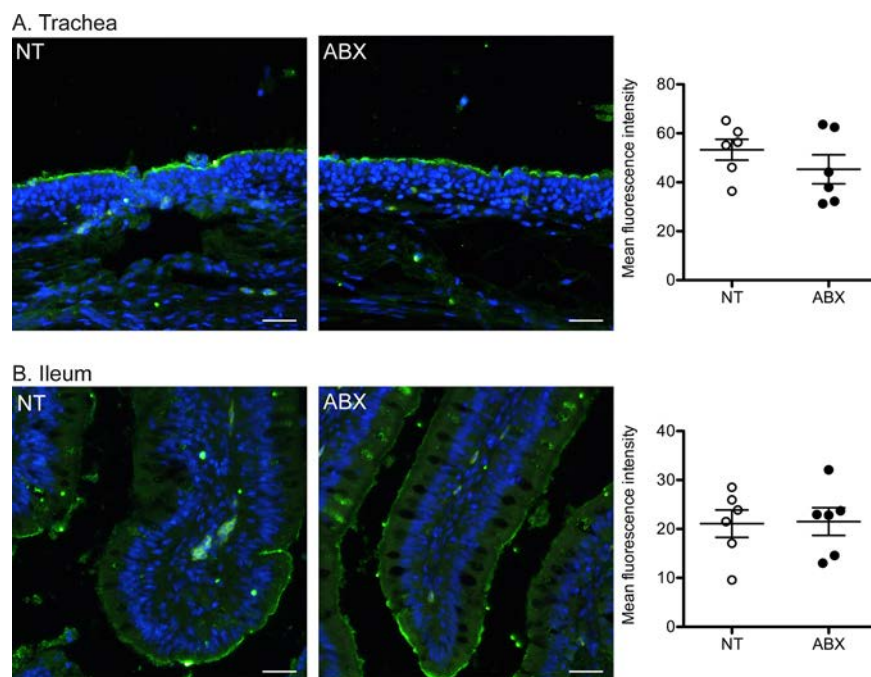


FIG 5 Analysis of H5N9 virus receptor expression. (A and B) Staining of tracheas (A) and ilea (B) from nontreated (NT) or ABX-treated ducks with trimeric HA from the H5N9 virus, precomplexed with α -strep-tag-488 conjugated mouse antibody and goat- α -mouse-488 conjugated antibody. Tissue sections were stained with DAPI (blue signal). Scale bar, 25 μ m. Quantification of H5 HA fluorescent tissue staining is shown on the right. Each dot represents the mean H5 HA fluorescence intensity for an animal. The horizontal bar corresponds to the mean of all animals within a group, and error bars correspond to the SEM.

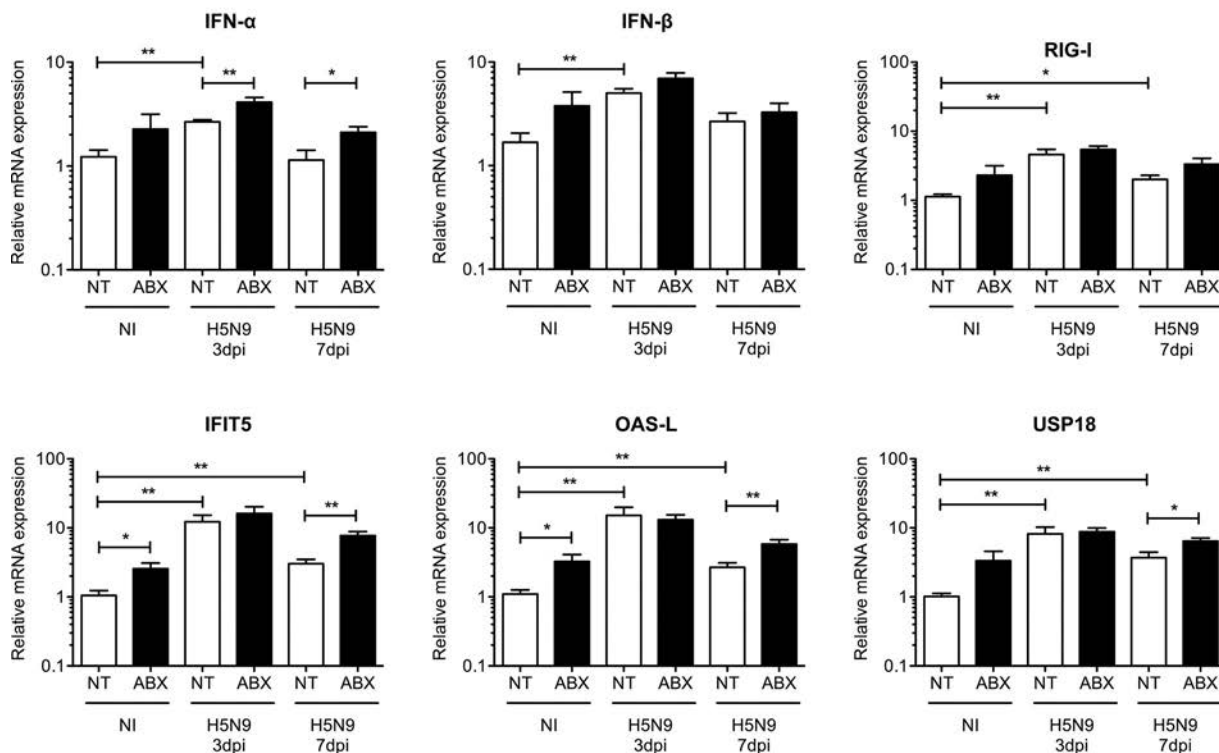
DISCUSSION

The A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9) HPAIV virus studied here is a field isolate collected from a duck farm in France during the 2015-2019 H5Nx epizootics. The first HPAIV detected during this epizootic was of the H5N1 subtype. Genetic analyses revealed that the HA was independent from the Gs/Gd/1/96-like H5 lineage and thus represented a new HPAIV emergence event (27). The virus has undergone multiple reassortment events during its circulation in France, leading to the cocirculation of H5N1, H5N2, and H5N9 HPAIV subtypes (28). Field observations provided evidence that clinical signs depended on the HPAIV subtype and the host species. Gallinaceous poultry exhibited a moderate increase in mortality, while waterfowl mostly showed no clinical signs of infection (28). Here, we performed the first experimental H5N9 HPAIV infection in ducks (*Anas platyrhynchos*), which confirmed that H5N9 HPAIV infection in ducks was not associated with clinical signs and only produced mild lesions detected microscopically in the respiratory tract.

The contribution of the microbiota to the control of influenza virus replication has been studied in mice, as well as in chickens infected with a LPAIV (13, 14, 16–19, 29). How the microbiota modulates HPAIV infection, or more generally influenza virus infection in ducks has to our knowledge never been investigated. Here, we provide evidence that ABX-mediated depletion of the microbiota caused an increase in H5N9 HPAIV replication in the digestive tract of ducks and was associated with a reduction of the antiviral immune response in the intestine. Similar results were observed in the digestive tract of chickens infected with a LPAIV (18, 19). Depletion of the microbiota in mice and chickens was associated with an increase in influenza virus replication in the respiratory tract (13, 14, 18, 19). In contrast, we did not detect a significant increase in influenza virus replication in the respiratory tracts of ducks, suggesting that this difference could be due to the viral strain or host factors.

We did not detect any effect of ABX cocktail treatment on H5N9 growth in duck

A. Lung



B. Ileum

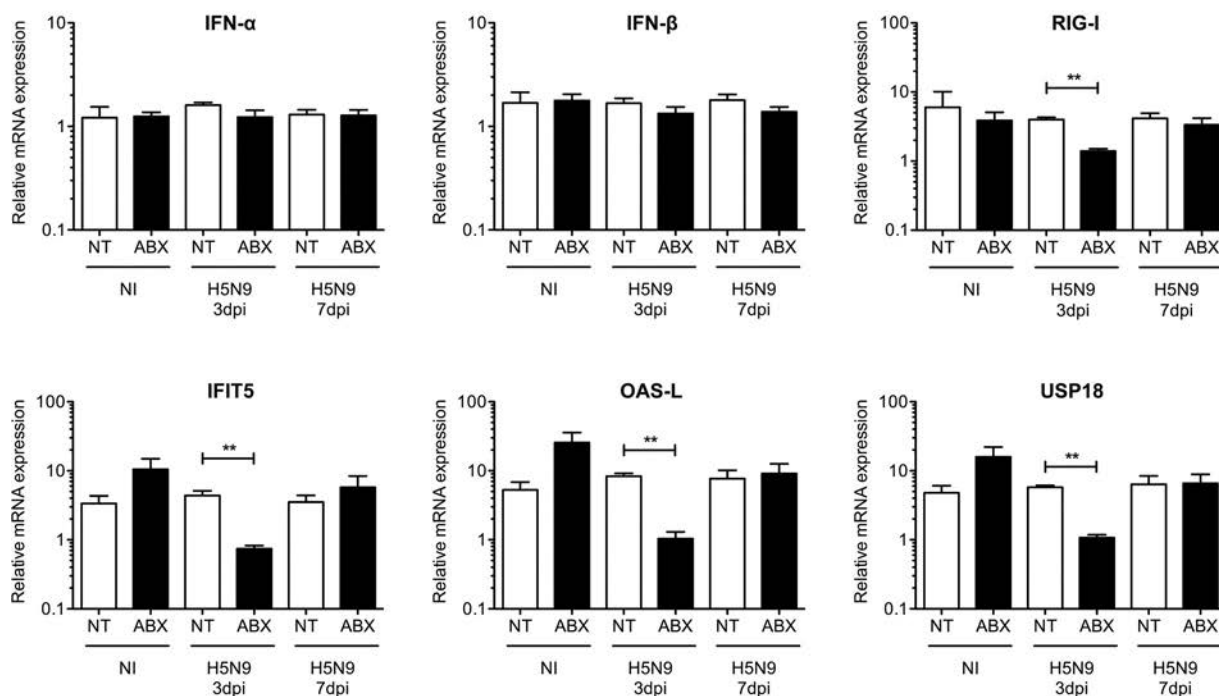


FIG 6 Analysis of the type I IFN immune response following H5N9 infection in NT and ABX-treated ducks. Analysis of mRNA gene expression from total RNA extracted from the lung (A) and ileum (B) of noninfected (NI) or H5N9-infected ducks that were either nontreated (NT) or treated with ABX. The mRNA expression levels of IFN- α , IFN- β , RIG-I, and of three type I IFN-induced genes—IFIT5, OAS-L, and USP18—were analyzed by RT-qPCR. The mRNA levels were normalized to the geometric means of RPL4/SDHA mRNA levels in the lung and RPL4/RPL30 mRNA levels in the ileum. The results are expressed as means $\pm$ the SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

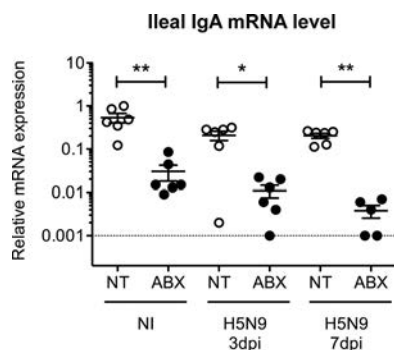


FIG 7 Analysis of the intestinal IgA heavy-chain mRNA expression after H5N9 infection in NT and ABX-treated ducks. IgA heavy-chain constant region mRNA expression levels were analyzed by RT-qPCR from total RNA extracted from the ileum of noninfected (NI) or H5N9-infected ducks that were either not treated (NT) or treated with ABX. IgA expression levels were normalized to RPL4 mRNA levels. Each dot represents an individual value, the horizontal bar corresponds to the mean, and error bars correspond to the SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

embryonic eggs. Since duck embryonic eggs are essentially devoid of microbiota, this result suggests that the increased H5N9 virus replication observed in 4-week-old ducks upon ABX treatment is not due to a direct toxic effect of the ABX cocktail on cell viability but rather to consequences of the ABX cocktail treatment on the microbiota. Several mechanisms could account for the increased virus replication observed in the digestive tract of ducks upon depletion of the microbiota with ABX (30). Bacteria (31) or bacterium-derived products, such as lipopolysaccharide (32), have been shown to trap or destabilize influenza virus and thus could directly impair influenza virus infection in the bacteria dense intestine. Upon depletion of the microbiota with ABX, we observed a reduction of RIG-I mRNA expression, which correlated with a reduction of the type I IFN-induced gene expression in the intestine following influenza virus infection. Thus, by impairing the innate antiviral immune response, depletion of the microbiota could indirectly promote influenza virus replication. The gut microbiota has been shown to stimulate the immune response to pathogens most likely through the constant low-level exposure of epithelial cells and immune cells present in the intestinal mucosa to microbiota-derived pathogen-associated molecular patterns, as well as to microbial metabolites (29, 33–35). In addition, an RNA-binding protein secreted by *Listeria monocytogenes* has recently been shown to stimulate RIG-I signaling, suggesting that proteins with similar function, produced by resident bacteria, could promote antiviral innate immune signaling in the intestine (36). This constant low-level stimu-

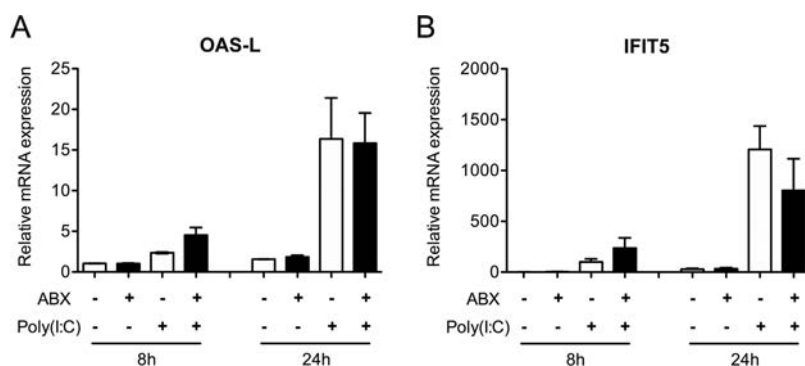


FIG 8 Analysis of the type I IFN immune response after poly(I:C) treatment in NT and ABX-treated duck embryonic fibroblasts. Duck embryonic fibroblasts (CCL-141 cell line) were untreated (NT) or treated with antibiotics (ABX) and subsequently stimulated with intracellularly delivered poly(I:C) for 8 or 24 h. The mRNA expression levels of the type I IFN-induced genes OAS-L and IFIT5 were analyzed by RT-qPCR. mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels. The results are expressed as means $\pm$ the SEM of two independent experiments.

lation is thought to maintain the immune system in an optimal state of reactivity allowing it to respond to pathogens via a timely innate immune response (17, 37, 38). The microbiota is also required for IgA production in the intestine (25, 26). In line with this observation, we detected a strong reduction of IgA heavy-chain constant region mRNA expression in the intestine of ABX-treated ducks. Decreased IgA levels could impair the clearance of influenza virus during the later stages of infection or upon reinfection.

While we detected a significant upregulation of type I IFN-induced genes expression in the respiratory tract of ducks infected with the H5N9 HPAIV, no upregulation could be detected in the digestive tract following H5N9 HPAIV infection. Since a significant reduction of type I IFN-induced gene expression was observed at 3 dpi in H5N9-infected ABX-treated ducks, the expression of type I IFN-induced genes in the digestive tract is not at its minimal level in noninfected ducks. These observations thus suggest that the basal expression level of type I IFN-induced genes in the digestive tracts of ducks may be constitutively high and could contribute to the efficient control of influenza virus replication in ducks through early inhibition of the viral life cycle.

Interestingly, type I IFN-induced gene expression was increased in the digestive and respiratory tracts of noninfected animals treated with ABX compared to nontreated noninfected animals. The ABX cocktail used in our experiments contained gentamicin, a member of the aminoglycoside class of ABX, which have been shown recently to induce type I IFN-induced gene expression through a Toll-like receptor 3-dependent pathway, independently of the microbiota (39). However, aminoglycosides stimulated type I IFN-induced gene expression locally and did not lead to increased type I IFN-induced gene expression in the respiratory tract when administered orally (39). In addition, we did not detect any effect of ABX cocktail treatment alone or in combination with poly(I:C) treatment on the expression of type I IFN-induced gene expression in duck embryonic fibroblasts. Therefore, in our experiments, how the ABX-cocktail led to an increase of type I IFN-induced gene expression remains unknown.

In association with the respiratory tract and internal organs, the digestive tract represents a major site of HPAIV replication and excretion in birds (7, 8, 11). Moreover, the digestive tract is the main site of LPAIV replication in ducks (9, 40–42). Thus, avian influenza viruses can be considered as adapted to the digestive tract in ducks. A number of studies have shown that the microbiota promotes infection by enteric viruses such as poliovirus, norovirus, or rotavirus through a variety of processes, including promotion of virus stability, attachment and entry, or evasion of the immune response (43–47). Our results thus highlight another type of interaction between an enteric virus and the microbiota since we observed impairment of avian influenza virus replication in the intestine of ducks harboring an intact microbiota compared to ABX-treated ducks.

Increased influenza virus replication and excretion in chickens (18, 19) and ducks treated with ABX raises questions about the risks associated with the use of ABX treatments in farmed animals. However, the ABX treatment used to deplete the gut microbiota in both our and the vast majority of experimental studies consists of a broad-spectrum ABX cocktail. This ABX cocktail is composed of six antimicrobial molecules, including molecules, which are not permitted to be used in veterinary medicine since their use is restricted to human medicine in hospital settings or to research. ABX treatments given to farmed animals mostly consist of one or two antimicrobial molecules and therefore should not have such a profound effect on the microbiota composition. Considering that ABX consumption for food animal production is forecasted to increase worldwide (48), further studies are needed to investigate whether narrow-spectrum ABX treatments given to farmed animals could also have consequences on virus replication and spread. In that respect, it is crucial to keep in mind that ABX treatments administered to farmed animals are critical to the well being of animals and the economic profitability of the vast majority of farms worldwide (49–51). ABX treatments are not the only cause of microbiota dysbiosis in food animals. Nutrition and environmental parameters at birth and during rearing have also been

shown to be associated with microbiota dysbiosis (52, 53). In addition, microbiota dysbiosis can also indirectly promote the spread and burden of infectious diseases by impairing the response to vaccines (54–57). In conclusion, further studies are needed to evaluate the consequences of microbiota dysbiosis and possible interventions with probiotics on the burden of infectious diseases (55, 58).

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. This study was carried out in compliance with European animal welfare regulation. The protocols were approved by the Animal Care and Use Committee (Comité d'Éthique en Science et Santé Animales—115) under protocol 13205-2018012311319709.

Animals and antibiotic treatment. One-day-old Pekin ducklings (*Anas platyrhynchos domesticus*, ST5 heavy) were obtained from a commercial hatchery (ORVIA—Cuvier de la Seigneurtière, Vieilleville, France). The study employed only female birds to minimize between-individual variability arising from sex. Birds were fed *ad libitum* with a starter diet. Ducks were housed for 2 weeks in a litter-covered floor pen in a biosafety level II facility at the National Veterinary School of Toulouse, France. They were then transferred into a biosafety level III facility, equipped with poultry isolators (I-Box; Noroit, Nantes, France) that were ventilated under negative pressure with HEPA-filtered air. A total of 36 ducks were randomly assigned to four groups: 6 nontreated noninfected animals (NT, NI), 6 ABX-treated noninfected animals (ABX, NI), 12 ABX-treated infected animals (ABX, H5N9), and 12 nontreated infected animals (NT, H5N9). Ducks of the ABX groups were treated through drinking water. ABX was administered at the following daily doses: 80 mg/kg vancomycin, 300 mg/kg neomycin, 200 mg/kg metronidazole, 0.2 g/kg ampicillin, and 24 mg/kg colistin. To prevent fungal overgrowth, ABX-treated ducks also received 2 mg/kg amphotericin B daily. The composition and posology of the ABX cocktail are similar to the ones described in other publications (14, 18, 59, 60). Water was changed every 2 days. ABX treatment started 2 weeks prior to infection and continued for the whole duration of the experiment. No difference in water consumption was observed between nontreated and ABX-treated ducks.

Virus and experimental infection. One day prior to infection, serum was collected from all the birds to ensure that they were serologically negative to influenza virus by using a commercial influenza A NP antibody competition enzyme-linked immunosorbent assay kit (ID Screen; ID-Vet, Montpellier, France) according to the manufacturer's instructions. The A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9) (GenBank accession numbers MN400993 to MN401000) HPAIV was propagated in 10-day-old specific-pathogen-free (SPF) embryonated chicken eggs (INRA PFIE, Nouzilly, France). Infectious allantoic fluid was harvested at 72 h postinoculation and titrated in 10-day-old SPF embryonated chicken eggs to determine the 50% egg infective dose (EID₅₀)/ml using the Reed-Muench method. When they were 4 weeks old, the ducks were infected with 3.6×10^6 EID₅₀ of virus via the ocular, nasal, and tracheal routes. Ducks of the noninfected groups received the equivalent volume of allantoic fluid collected from noninfected embryonated chicken eggs. Birds were observed for 7 days, and clinical signs were recorded. Tracheal and cloacal swabs were performed on all animals at days 0, 1, 3, 5, and 7 dpi. Half of the infected animals were euthanized and necropsied at 3 dpi, and the other half were euthanized and necropsied at 7 dpi.

Analysis of bacterial depletion. Fecal samples were collected 1 day prior to infection by placing ducks in individual clean plastic crates. DNA was extracted from 500 mg of feces and tracheal swabs vortexed in 500 μ l of sterile phosphate-buffered saline (PBS; PureLink microbiome DNA purification kit; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Canada) according to the manufacturer's instruction.

For 16S rRNA gene DNA quantification, microbial qPCR was performed with 2 μ l of extracted DNA according to the manufacturer's instructions (QuantiFast SYBR green PCR; Qiagen, Canada) using 16S-V5-F (AGCRAACAGGATTAGATAC) and 16S-V5-R (TGTGCGGGCCCCGTCAAT) primers to amplify the V5 region from 16S rRNA genes. Absolute quantification was performed using a standard curve based on a 10-fold serial dilution of plasmid containing the 16S-V5 region of *Escherichia coli*. Quantification of the specific phylum 16S rRNA gene DNA was performed in the same way using specific primers of five major bacteria phyla (Table 1), and quantification was performed using the 40-Ct method.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) staining of the ileum was performed as described previously (61). The tissue sections were incubated with the universal bacterial probe EUB338 (5'-GCTGCTCCCG TAGGAGT-3'; Eurogentec, Liège, Belgium) conjugated to Alexa Fluor 594. A "nonsense" probe (5'-CGA CGGAGGCATCCTCA-3') conjugated to Alexa Fluor 594 was used as a negative control. Tissue sections were mounted with Vectashield mounting medium containing DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole). Images were acquired on a Zeiss LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) at the cellular imaging facility of the CPTP (Toulouse, France).

Influenza virus quantification. Cloacal and tracheal swabs were briefly vortexed in 500 μ l of sterile PBS, and viral RNA was extracted from 140 μ l according to the manufacturer's instructions (QIAamp viral RNA; Qiagen, Toronto, Canada). Influenza virus nucleic load was determined by RT-qPCR using influenza virus segment M specific primers (IAV-M; Table 1) in 96-well plates according to the manufacturer's instructions (OneStep RT-PCR; Qiagen). Absolute quantification was performed using a standard curve based on a 10-fold serial dilution of a plasmid containing the A/Guinea Fowl/129/2015(H5N9) M gene. The EID₅₀ was determined by diluting 0.1 g of feces into 100 μ l of PBS containing the antibiotics vancomycin (500 mg/liter), neomycin (500 mg/liter), metronidazole (500 mg/liter), ampicillin (1 g/liter), and colistin (80 mg/liter) to avoid bacterial growth. Samples were centrifuged at $1,000 \times g$ at 4°C for 2 min to pellet the debris, and supernatants were diluted in antibiotic-complemented PBS with a 10 $\times$ dilution factor. For each sample, 100- μ l portions were injected into three 10-day-old SPF embryonated

TABLE 1 Primers used for qPCR^a

Gene	Accession no.	Primer sequence (5'–3')	Reference
CLDN1	XM_013108556.1	F: TCATGGTATGGCAACAGAGTGG R: TCATGGTATGGCAACAGAGTGG	64
IAV-M		F: CTTCTAACCGAGGTCGAAACG R: AGGGCATTGTTGGACAAAGCGTCTA	65
IFIT5	KF956064	F: TCCTGCGATATGCTGTATATTTAT R: GGTGTCACTGTAAAGGCTTTTCTCA	66
IFN- α	AB128861.1	F: CAACGACACGCAGCAAGC R: GGGTGTGGAAGAGGTGTTGG	40
IFN- β	KT428159	F: TCTACAGAGCCTTGCTGCAT R: TGTCGGTGTCCAAAGAGATGT	67
IgA	U27222.1	F: TCGCTCAAGGAACCCATCGT R: GCGGGACACGAGAACTTCA	64
GAPDH	AY436595.1	F: CCACTCCGGGGCACTGTCA R: AGCACCAGCATCTGCCACT	63
LYZ	XM_005008880.2	F: TAACACGACGGCTACAAACCG R: TTCCATCGCTGACATCCTCTT	64
MUC2	XM_005024513.2	F: GGCGCTCAATTCACATAAGTA R: TAAACTGATGGCTTCTATGCGG	64
OAS-L	KU569293.1	F: CCGCCAAGCTGAAGAACCTG R: CGCCCTGCTCCAGGTATAG	68
Pan-Actinobacteria		F: TACGGCCGCAAGGCTA R: TCRTCCCACTTCCTCCG	69
Pan-Bacteroides		F: CRAACAGGATTAGATACCCT R: GGTAAGTTCTCGCGTAT	69
Pan-Firmicutes		F: TGAAACTYAAAGGAATTGACG R: ACCATGCACCACCTGTC	69
Pan-Fusobacteria		F: GCCTCAGNTAGGGACAACAT R: GCYYACCTCTCCAGTACTCTAG	69
Pan-Gammaproteobacteria		F: TCGTCAGCTCGTGTGTGA R: CGTAAGGGCCATGATG	69
POLRMT	XM_027472517.1	F: CCACCAGAAGATCATGCAGC R: CGATGGTCAGCAGCTTTCTC	70
RIG-I	NM_001310380	F: GTGTATGGAGGAAAACCTATTCTTAAC R: GGAGGGTCATACCTGTTGTTTGT	71
RPL4	XM_027465643.1	F: AAGCTGAACCCATACGCCAA R: CCTGGGCTTAGCTGTAACC	63
RPL30	XM_027452502.1	F: GCAAAGCCAAGCTGGTCATC R: CTCAATGTTGTTCCGCTGT	63
SDHA	XM_027451817.1	F: GACACAGTGAAGGCTCCGA R: TCCAGCTCTATCAGGCGAG	63
TFAM	XM_013107580.1	F: AGCATCACAGAAGCAGGTTTA R: TGCCAGTCGTTTCCTCT	70
USP18	XM_005009931	F: AACCTGACGGCAGAAGAAGA R: GCACCGTGATCCTTCGTAGT	72
ZO-1	XM_021276271.2	F: TCAGCGAGATGAACGAGCC R: TCTGAAGGCTCTGACCTCTGG	70

^aCLDN1, Claudin-1; IAV-M: gene M of influenza A virus; IFIT5, interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5; IFN- α/β , interferons alpha and beta; IgA, immunoglobulin A; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; LYZ: lysozyme; MUC2, mucin 2; OAS-L, oligoadenylate synthetase-like; POLRMT, RNA polymerase mitochondrial; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; RPL4/30, ribosomal protein L4/L30; TFAM, mitochondrial transcription factor A; SDHA, succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A; USP18, ubiquitin specific peptidase 18; ZO-1, zonula occludens-1. F, forward; R, reverse.

chicken eggs, which were incubated for 72 h before the allantoic fluids were harvested. The presence of virus was revealed by a hemagglutination test.

Antibiotics treatment and infection of embryonated duck eggs. Eleven-day-old embryonated duck eggs were injected with antibiotics (ABX) to obtain the following concentrations in allantoic fluids: vancomycin (500 mg/liter), neomycin (500 mg/liter), metronidazole (500 mg/liter), ampicillin (1g/l) and colistin (80 mg/liter) or with sterile PBS (NT). After 24 h of incubation at 37°C, 10⁴ EID₅₀ of H5N9 virus were injected with 100 μ l of the ABX cocktail (ABX) or with PBS (NT). Allantoic fluids were collected at 72 h postinfection, and viral RNA was extracted from 140 μ l according to the manufacturer's instructions (QIAamp viral RNA; Qiagen). Influenza virus nucleic acid load was determined by RT-qPCR using influenza virus segment M-specific primers (IAV-M; Table 1) in 96-well plates according to the manufacturer's instructions (OneStep RT-PCR; Qiagen). Absolute quantification was performed using a standard curve based on a 10-fold serial dilution of a plasmid containing the A/Guinea Fowl/129/2015(H5N9) M gene.

Antibiotics and Poly(I-C) cell treatment. Duck embryonic fibroblasts (ATCC, CCL-141) were cultured in cell culture medium supplemented or not with the following antibiotics: vancomycin (500 mg/liter),

neomycin (500 mg/liter), metronidazole (500 mg/liter), ampicillin (1g/l) and colistin (80 mg/liter). After 24h, cell culture medium was renewed and cells were treated or not with Poly(I:C) (LMW)/LyoVec (Invivogen) at a final concentration of 1 μ g/ml during 8 or 24 h and subsequently harvested for RNA extraction according to the manufacturer's instructions (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel GmbH&Co, Germany). cDNA was synthesized by reverse transcription of 100 ng of total RNA using both oligo(dT)₁₈ (0.25 μ g) and random hexamer (0.1 μ g) and the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Ontario, Canada) according to manufacturer's instruction. Quantitative PCR for the analysis of IFIT5 and OAS-L mRNAs expression was performed in 96-well plates in a 20- μ l final volume according to the manufacturer's instructions (QuantiFast SYBR green PCR; Qiagen), along with 2 μ l of cDNA and a 1 μ M final concentration of each primer (Table 1). qPCR was performed on a LightCycler 96 (Roche, Mannheim, Germany) and relative quantification was carried out using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method with GAPDH mRNA expression for normalization.

RNA extraction from tissue samples and cDNA synthesis. For each organ, 30-mg portions of tissue were placed in tubes with beads (Precellys lysis kit; Stretton Scientific, Ltd., Stretton, United Kingdom) filled with 600 μ l of TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and mixed for 5 s at 6,000 rpm three times in a bead beater (Precellys 24; Bertin Technologies, Montigny-le Bretonneux, France). After TRIzol extraction, the aqueous phase was transferred to an RNA extraction column and processed according to the manufacturer's instructions (NucleoSpin RNA; Macherey-Nagel GmbH & Co, Germany). cDNA was synthesized by reverse transcription of 500 ng of total RNA using both oligo(dT)₁₈ (0.25 μ g) and random hexamer (0.1 μ g) and a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR from tissue samples. Quantitative PCR for the analysis of host genes expression was performed in 384-well plates in a final volume of 5 μ l using a Bravo automated liquid handling platform (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and a ViiA 7 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the GeT-TRIX platform (GénoToul, Génopole, Toulouse, France). Mixes were prepared according to the manufacturer's instructions (QuantiFast SYBR green PCR; Qiagen) with 1 μ l of 1:20 diluted cDNA and a final 1 μ M concentration of each primer (Table 1). Relative quantification was carried out by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (62), and the geometric means of two couples of housekeeping genes were validated in specific duck tissues, RPL4/RPL30 and RPL4/SDHA, for ileum and lung samples, respectively (63). Quantification of influenza virus nucleic acid load in tissues was performed in 96-well plates with a 20- μ l final volume according to the manufacturer's instructions (QuantiFast SYBR green PCR; Qiagen), along with 2 μ l of cDNA and a final 1 μ M concentration of each primer. We used influenza virus segment M-specific primers. For normalization, we used RPL30 for ileum samples and SDHA for lung samples, since they provided similar results to the geometric means of either RPL4/RPL30 or RPL4/SDHA. qPCR was performed on a LightCycler 96 (Roche), and relative quantification was carried out using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Histopathological examination. All animals were subjected to a complete postmortem examination. Tissue samples of the trachea (one transversal section in the proximal portion and another one in the terminal portion), lungs, ileum, cecum, colon, and brain were taken and stored in 10% neutral formalin. After fixation, tissues were processed in paraffin blocks, sectioned at 4 μ m, and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination. A board-certified veterinary pathologist who was blind to the experimental conditions assessed lesions histologically. Lesion intensity was graded as follows: 0, no lesion; 1, minimal; 2, slight; 3, moderate; 4, marked, or 5, severe.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections of trachea with a monoclonal mouse anti-nucleoprotein influenza A virus antibody (Argene 11-030; pronase 0.05% retrieval solution, 10 min at 37°C; antibody dilution 1/50, incubation overnight at 4°C). The immunohistochemical staining was revealed with a biotinylated polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase (HRP; Dako, LSAB2 system-HRP, K0675) and the diaminobenzidine HRP chromogen (Thermo Scientific, TA-125-HDX). Negative controls comprised sections incubated either without specific primary antibody or with another monoclonal antibody of the same isotype (IgG2).

H5 HA fluorescent tissue staining and quantification. A pCD5 plasmid was constructed with the HA sequence originating from A/Guinea Fowl/France/150207n/2015(H5N9) (GenBank [KU320887.1](#)), which has exactly the same amino acid sequence as the HA of A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9). The plasmid encodes for a GCN4 leucine zipper trimerization motif, followed by a 7-amino-acid cleavage recognition sequence of tobacco etch virus and a sfGFP fused to Strep-tag II (IBA, Germany) C terminally. The vector was transfected into HEK293S GNT1(−) cells (which are modified HEK293S cells lacking glucosaminyltransferase I activity [ATCC CRL-3022]) with polyethyleneimine I (PEI) in a 1:8 ratio (μ g of DNA: μ g of PEI). Tissues were stained with purified recombinant multimeric H5N9 as previously described (24). Quantification of H5 HA fluorescent tissue staining was done on coded images so that the investigator was blind to experimental conditions. For each animal, a minimum of 40 regions of interest corresponding to the plasma membrane of individual cells were manually drawn using the 6-pixel-thick curved line tool in ImageJ software. The fluorescence intensity was measured for each region of interest, and the mean fluorescence intensity of the regions of interest for each animal was then calculated and plotted.

Statistical analysis. Statistical significance was determined by using the Mann-Whitney test for individual time points. Statistical analyses were performed with Prism GraphPad software v5.01 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-Luc Guérin and Luc Robertet (Université de Toulouse, ENVT, INRA, UMR 1225, Toulouse, France) for providing clinical samples that enabled the isolation of the A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9) virus. We also thank Marie Souvestre and Luc Robertet for their assistance in the animal facility. We thank Sophie Allart and Astrid Canivet for technical assistance at the cellular imaging facility of INSERM UMR 1043, Toulouse, France. We thank the GeT-TRiX platform (GénoToul, Génopole, Toulouse, France) for access to the liquid handling platform and real-time PCR system.

This study was funded by the French National Agency for Research (ANR), project ANR-16-CE35-0005-01 Rule of Three to R.V. P.B. is supported by a Ph.D. scholarship funded by the Region Occitanie (France) and by the Chaire de Biosécurité at the École Nationale Vétérinaire de Toulouse (French Ministry of Agriculture). R.P.D.V. is a recipient of an ERC starting grant (802780) and a Beijerinck Premium of the Royal Dutch Academy of Sciences (KNAW).

REFERENCES

- Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WEP, Schutten M, Olsen B, Osterhaus A, Fouchier R. 2007. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog* 3:e61. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030061>.
- Osterhaus A, Munster VJ, Fouchier R. 2008. Epidemiology of avian influenza, p 1–10. In Klenk H-D, Matrosovich MN, Stech J (ed), *Monographs in virology*. Karger, Basel, Switzerland.
- Böttcher-Friebertshäuser E, Klenk H-D, Garten W. 2013. Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathog Dis* 69:87–100. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12053>.
- Swaine DE, Pantin-Jackwood M. 2009. Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals, p 87–122. In *Avian influenza*. John Wiley & Sons, Ltd, New York, NY.
- Barber MRW, Aldridge JR, Webster RG, Magor KE. 2010. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5913–5918. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001755107>.
- Liniger M, Summerfield A, Zimmer G, McCullough KC, Ruggli N. 2012. Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. *J Virol* 86:705–717. <https://doi.org/10.1128/JVI.00742-11>.
- Cornelissen J, Vervelde L, Post J, Rebel J. 2013. Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. *Avian Pathol* 42:347–364. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.807325>.
- Kuchipudi SV, Tellabati M, Sebastian S, Londt BZ, Jansen C, Vervelde L, Brookes SM, Brown IH, Dunham SP, Chang K-C. 2014. Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and proinflammatory responses. *Vet Res* 45:118. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0118-3>.
- Hoffmann TW, Munier S, Larcher T, Soubieux D, Ledevin M, Esnault E, Tourdes A, Croville G, Guérin J-L, Quéré P, Volmer R, Naffakh N, Marc D. 2012. Length variations in the NA stalk of an H7N1 influenza virus have opposite effects on viral excretion in chickens and ducks. *J Virol* 86:584–588. <https://doi.org/10.1128/JVI.05474-11>.
- Soubies SM, Hoffmann TW, Croville G, Larcher T, Ledevin M, Soubieux D, Quéré P, Guérin J-L, Marc D, Volmer R. 2013. Deletion of the C-terminal ESEV domain of NS1 does not affect the replication of a low-pathogenic avian influenza virus H7N1 in ducks and chickens. *J Gen Virol* 94:50–58. <https://doi.org/10.1099/vir.0.045153-0>.
- Burggraaf S, Karpala AJ, Bingham J, Lowther S, Selleck P, Kimpton W, Bean A. 2014. H5N1 infection causes rapid mortality and high cytokine levels in chickens compared to ducks. *Virus Res* 185:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.012>.
- Sommer F, Bäckhed F. 2013. The gut microbiota: masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11:227–238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>.
- Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, Paley MA, Antenus M, Williams KL, Erikson J, Wherry EJ, Artis D. 2012. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity* 37:158–170. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.011>.
- Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, Iwasaki A. 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5354–5359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019378108>.
- Oh JZ, Ravindran R, Chassaing B, Carvalho FA, Maddur MS, Bower M, Hakimpour P, Gill KP, Nakaya HI, Yarovinsky F, Sartor RB, Gewirtz AT, Pulendran B. 2014. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity* 41:478–492. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.08.009>.
- Rosshart SP, Vassallo BG, Angeletti D, Hutchinson DS, Morgan AP, Takeda K, Hickman HD, McCulloch JA, Badger JH, Ajami NJ, Trinchieri G, Pardo-Manuel de Villena F, Yewdell JW, Rehmann B. 2017. Wild mouse gut microbiota promotes host fitness and improves disease resistance. *Cell* 171:1015–1028.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.016>.
- Bradley KC, Finsterbusch K, Schnepf D, Crotta S, Llorian M, Davidson S, Fuchs SY, Staeheli P, Wack A. 2019. Microbiota-driven tonic interferon signals in lung stromal cells protect from influenza virus infection. *Cell Rep* 28:245–256.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.105>.
- Yitbarek A, Taha-Abdelaziz K, Hodgins DC, Read L, Nagy É, Weese JS, Caswell JL, Parkinson J, Sharif S. 2018. Gut microbiota-mediated protection against influenza virus subtype H9N2 in chickens is associated with modulation of the innate responses. *Sci Rep* 8:13189. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31613-0>.
- Yitbarek A, Alkie T, Taha-Abdelaziz K, Astill J, Rodriguez-Lecompte JC, Parkinson J, Nagy É, Sharif S. 2018. Gut microbiota modulates type I interferon and antibody-mediated immune responses in chickens infected with influenza virus subtype H9N2. *Benef Microbes* 9:417–427. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0088>.
- Vasai F, Brugirard Ricaud K, Bernadet MD, Cauquil L, Bouchez O, Combes S, Davail S. 2014. Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina moschata* (Muscovy) ducks. *FEMS Microbiol Ecol* 87:204–216. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12217>.
- Grond K, Sandercock BK, Jumpponen A, Zeglin LH. 2018. The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *J Avian Biol* 49:e01788. <https://doi.org/10.1111/jav.01788>.
- Srivillibhuthur M, Warder BN, Toke NH, Shah PP, Feng Q, Gao N, Bonder EM, Verzi MP. 2018. TFAM is required for maturation of the fetal and adult intestinal epithelium. *Dev Biol* 439:92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.015>.
- Liu J, Zhang Y, Li Y, Yan H, Zhang H. 2019. L-Tryptophan enhances intestinal integrity in diquat-challenged piglets associated with improvement of redox status and mitochondrial function. *Animals (Basel)* 9:E266. <https://doi.org/10.3390/ani9050266>.
- Nemanichvili N, Tomris I, Turner HL, McBride R, Grant OC, van der Woude R, Aldosari MH, Pieters RJ, Woods RJ, Paulson JC, Boons G-J, Ward AB, Verheije MH, de Vries RP. 2019. Fluorescent trimeric hemagglutinins reveal multivalent receptor binding properties. *J Mol Biol* 431:842–856. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.014>.

25. Crabbé PA, Bazin H, Eyssen H, Heremans JF. 1968. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut: the germ-free intestinal tract. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 34:362–375. <https://doi.org/10.1159/000230130>.
26. Robak OH, Heimesaat MM, Kruglov AA, Prepens S, Ninnemann J, Gutbier B, Reppe K, Hochrein H, Suter M, Kirschning CJ, Marathe V, Buer J, Horneff MW, Schnare M, Schneider P, Witzenthalm M, Bereswill S, Steinhoff U, Suttrop N, Sander LE, Chaput C, Opitz B. 2018. Antibiotic treatment-induced secondary IgA deficiency enhances susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 128:3535–3545. <https://doi.org/10.1172/JCI97065>.
27. Briand F-X, Schmitz A, Ogor K, Le Prioux A, Guillou-Cloarec C, Guillemot C, Allée C, Le Bras M-O, Hirschaud E, Quenault H, Touzain F, Cherbonnel-Pansart M, Lemaître E, Courtillon C, Gares H, Daniel P, Fediaevsky A, Massin P, Blanchard Y, Eterradossi N, van der Werf S, Jestin V, Niqueux E. 2017. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. *Euro Surveill* 22:30473. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.9.30473>.
28. Briand FX, Niqueux E, Schmitz A, Hirschaud E, Quenault H, Allée C, Le Prioux A, Guillou-Cloarec C, Ogor K, Le Bras MO, Gares H, Daniel P, Fediaevsky A, Martenot C, Massin P, Le Bouquin S, Blanchard Y, Eterradossi N. 2018. Emergence and multiple reassortments of French 2015–2016 highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *Infect Genet Evol* 61:208–214. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.007>.
29. Steed AL, Christophi GP, Kaiko GE, Sun L, Goodwin VM, Jain U, Esaulova E, Artyomov MN, Morales DJ, Holtzman MJ, Boon ACM, Lenschow DJ, Stappenbeck TS. 2017. The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science* 357:498–502. <https://doi.org/10.1126/science.aam5336>.
30. Li N, Ma W-T, Pang M, Fan Q-L, Hua J-L. 2019. The commensal microbiota and viral infection: a comprehensive review. *Front Immunol* 10:1551. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01551>.
31. Wang Z, Chai W, Burwinkel M, Twardziok S, Wrede P, Palissa C, Esch B, Schmidt M. 2013. Inhibitory influence of *Enterococcus faecium* on the propagation of swine influenza A virus *in vitro*. *PLoS One* 8:e53043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053043>.
32. Bandoro C, Runstadler JA. 2017. Bacterial lipopolysaccharide destabilizes influenza viruses. *mSphere* 2:e00267-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00267-17>.
33. Belkaid Y, Harrison OJ. 2017. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity* 46:562–576. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>.
34. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. 2016. The microbiome and innate immunity. *Nature* 535:65–74. <https://doi.org/10.1038/nature18847>.
35. Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, Lopez-Mejia IC, Riva E, Pernot J, Ubags N, Fajas L, Nicod LP, Marsland BJ. 2018. Dietary fiber confers protection against flu by shaping Ly6C⁺ patrolling monocyte hematopoiesis and CD8⁺ T cell metabolism. *Immunity* 48:992–1005.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.022>.
36. Pagliuso A, Tham TN, Allemand E, Robertin S, Dupuy B, Bertrand Q, Bécavin C, Koutero M, Najburg V, Nahori M-A, Tangy F, Stavru F, Bessonov S, Dessen A, Muchardt C, Lebreton A, Komarova AV, Cossart P. 2019. An RNA-binding protein secreted by a bacterial pathogen modulates RIG-I signaling. *Cell Host Microbe* 26:823–835.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.004>.
37. Mazel-Sanchez B, Yildiz S, Schmolke M. 2019. Ménage à trois: virus, host, and microbiota in experimental infection models. *Trends Microbiol* 27: 440–452. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.004>.
38. Libertucci J, Young VB. 2019. The role of the microbiota in infectious diseases. *Nat Microbiol* 4:35–45. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0278-4>.
39. Gopinath S, Kim MV, Rakib T, Wong PW, van Zandt M, Barry NA, Kaisho T, Goodman AL, Iwasaki A. 2018. Topical application of aminoglycoside antibiotics enhances host resistance to viral infections in a microbiota-independent manner. *Nat Microbiol* 3:611–621. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0138-2>.
40. Volmer C, Soubies SM, Grenier B, Guérin J-L, Volmer R. 2011. Immune response in the duck intestine following infection with low-pathogenic avian influenza viruses or stimulation with a Toll-like receptor 7 agonist administered orally. *J Gen Virol* 92:534–543. <https://doi.org/10.1099/vir.0.026443-0>.
41. Kida H, Yanagawa R, Matsuoka Y. 1980. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect Immun* 30:547–553.
42. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84:268–278. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90247-7).
43. Robinson CM. 2019. Enteric viruses exploit the microbiota to promote infection. *Curr Opin Virol* 37:58–62. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.06.002>.
44. Kuss SK, Best GT, Etheredge CA, Puijssers AJ, Frierson JM, Hooper LV, Dermody TS, Pfeiffer JK. 2011. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science* 334:249–252. <https://doi.org/10.1126/science.1211057>.
45. Kane M, Case LK, Kopaskie K, Kozlova A, MacDermid C, Chervonsky AV, Golovkina TV. 2011. Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science* 334:245–249. <https://doi.org/10.1126/science.1210718>.
46. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, Graves CL, Keyes LR, Grau KR, Gonzalez-Hernandez MB, Iovine NM, Wobus CE, Vinjé J, Tibbetts SA, Wallet SM, Karst SM. 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346:755–759. <https://doi.org/10.1126/science.1257147>.
47. Baldridge MT, Nice TJ, McCune BT, Yokoyama CC, Kambal A, Wheadon M, Diamond MS, Ivanova Y, Artyomov M, Virgin HW. 2015. Commensal microbes and interferon-λ determine persistence of enteric murine norovirus infection. *Science* 347:266–269. <https://doi.org/10.1126/science.1258025>.
48. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.
49. Adam CJM, Fontané N, Coviglio A, Delesalle L, Ducrot C, Paul MC. 2019. Epidemiological assessment of the factors associated with antimicrobial use in French free-range broilers. *BMC Vet Res* 15:219. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1970-1>.
50. van der Fels-Klerx HJ, Puister-Jansen LF, van Asselt ED, Burgers S. 2011. Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production. *J Anim Sci* 89:1922–1929. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3046>.
51. Pardon B, Cattri B, Dewulf J, Persoons D, Hostens M, De Bleecker K, Deprez P. 2012. Prospective study on quantitative and qualitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal calves. *J Antimicrob Chemother* 67:1027–1038. <https://doi.org/10.1093/jac/ckr570>.
52. Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E, Blanquet-Diot S. 2017. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends Microbiol* 25:851–873. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.004>.
53. Yeoman CJ, White BA. 2014. Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals. *Annu Rev Anim Biosci* 2:469–486. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114149>.
54. Harris VC, Haak BW, Handley SA, Jiang B, Velasquez DE, Hykes BL, Droit L, Berbers GAM, Kemper EM, van Leeuwen EMM, Boele van Hensbroek M, Wiersinga WJ. 2018. Effect of antibiotic-mediated microbiome modulation on rotavirus vaccine immunogenicity: a human, randomized-control proof-of-concept trial. *Cell Host Microbe* 24:197–207.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.005>.
55. Belkacem N, Serafini N, Wheeler R, Derrien M, Boucinha L, Couesnong A, Cerf-Bensussan N, Gomperts Boneca I, Di Santo JP, Taha M-K, Bourdet-Sicard R. 2017. *Lactobacillus paracasei* feeding improves immune control of influenza infection in mice. *PLoS One* 12:e0184976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184976>.
56. Hagan T, Cortese M, Rouphael N, Boudreau C, Linde C, Maddur MS, Das J, Wang H, Guthmiller J, Zheng N-Y, Huang M, Uphadhyay AA, Gardinassi L, Petitdemange C, McCullough MP, Johnson SJ, Gill K, Cervasi B, Zou J, Bretin A, Hahn M, Gewirtz AT, Bosinger SE, Wilson PC, Li S, Alter G, Khurana S, Golding H, Pulendran B. 2019. Antibiotics-driven gut microbiome perturbation alters immunity to vaccines in humans. *Cell* 178: 1313–1328.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.010>.
57. Yitbarek A, Astill J, Hodgins DC, Parkinson J, Nagy É, Sharif S. 2019. Commensal gut microbiota can modulate adaptive immune responses in chickens vaccinated with whole inactivated avian influenza virus subtype H9N2. *Vaccine* 37:6640–6647. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.046>.
58. Vitetta L, Saltzman ET, Thomsen M, Nikov T, Hall S. 2017. Adjuvant probiotics and the intestinal microbiome: enhancing vaccines and immunotherapy outcomes. *Vaccines (Basel)* 5. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040050>.
59. Simon K, Verwoolde MB, Zhang J, Smidt H, de Vries Reilingh G, Kemp B, Lammers A. 2016. Long-term effects of early life microbiota disturbance

- on adaptive immunity in laying hens. *Poult Sci* 95:1543–1554. <https://doi.org/10.3382/ps/pew088>.
60. Reikvam DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, McCoy KD, Macpherson AJ, Meza-Zepeda LA, Johansen F-E. 2011. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS One* 6:e17996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017996>.
 61. Elderman M, Sovran B, Hugenholtz F, Graversen K, Huijskes M, Houtsma E, Belzer C, Boekschoten M, P de V, Dekker J, Wells J, Faas M. 2017. The effect of age on the intestinal mucus thickness, microbiota composition and immunity in relation to sex in mice. *PLoS One* 12:e0184274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184274>.
 62. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
 63. Chapman JR, Helin AS, Wille M, Atterby C, Järhult JD, Fridlund JS, Waldenström J. 2016. A panel of stably expressed reference genes for real-time qPCR gene expression studies of mallards (*Anas platyrhynchos*). *PLoS One* 11:e0149454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149454>.
 64. Wen M, Zhao H, Liu G, Chen X, Wu B, Tian G, Cai J, Jia G. 2018. Effect of zinc supplementation on growth performance, intestinal development, and intestinal barrier-related gene expression in Pekin ducks. *Biol Trace Elem Res* 183:351–360. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1143-7>.
 65. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. 2000. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 38:4096–4101. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4096-4101.2000>.
 66. Vandervlen HA, Petkau K, Ryan-Jean KEE, Aldridge JR, Webster RG, Magor KE. 2012. Avian influenza rapidly induces antiviral genes in duck lung and intestine. *Mol Immunol* 51:316–324. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.03.034>.
 67. Li H, Zhai Y, Fan Y, Chen H, Zhang A, Jin H, Luo R. 2016. Molecular cloning and functional characterization of duck mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS). *Dev Comp Immunol* 56:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.11.004>.
 68. Saito LB, Diaz-Satizabal L, Evseev D, Fleming-Canepa X, Mao S, Webster RG, Magor KE. 2018. IFN and cytokine responses in ducks to genetically similar H5N1 influenza A viruses of varying pathogenicity. *J Gen Virol* 99:464–474. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001015>.
 69. Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods* 86:351–356. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>.
 70. Ruan D, Wang WC, Lin CX, Fouad AM, Chen W, Xia WG, Wang S, Luo X, Zhang WH, Yan SJ, Zheng CT, Yang L. 2019. Effects of curcumin on performance, antioxidation, intestinal barrier and mitochondrial function in ducks fed corn contaminated with ochratoxin A. *Animal* 13: 42–52. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000678>.
 71. Cornelissen J, Post J, Peeters B, Vervelde L, Rebel J. 2012. Differential innate responses of chickens and ducks to low-pathogenic avian influenza. *Avian Pathol* 41:519–529. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.732691>.
 72. Qian W, Wei X, Zhou H, Jin M. 2016. Molecular cloning and functional analysis of duck ubiquitin-specific protease 18 (USP18) gene. *Dev Comp Immunol* 62:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.04.008>.

B. Coinfections avec un couple VIAFP et VIAHP chez le poulet et le canard

La quasi-totalité des émergences de VIAHP documentées ont eu lieu chez les galliformes et plus précisément dans des élevages commerciaux de poulets ou de dindes (Dhingra et al., 2018), sans qu'il y ait de corrélation avec la taille de l'élevage ou sa nature industrielle (Richard et al., 2017). Sur la base de ces observations, il est communément admis que les VIAHP n'émergent que très rarement chez les anatidés, sans que cela n'ait été prouvé expérimentalement. Comme cela a été décrit précédemment, la physiopathologie d'une infection par un virus influenza aviaire, qu'il soit hautement ou faiblement pathogène, est radicalement différente selon que l'animal infecté est un poulet ou un canard. Des facteurs dépendant de l'espèce hôte pourrait ainsi moduler la capacité d'un VIAHP à émerger à partir d'un VIAFP. Pour déterminer le rôle de l'espèce hôte dans la capacité d'un VIAHP à émerger lorsqu'il est nettement minoritaire par rapport à son précurseur VIAFP, nous avons mis au point un modèle permettant d'étudier la seconde étape nécessaire à l'émergence d'un VIAHP : sa capacité à devenir un des variants majoritaires de la quasi-espèce virale. Pour cela, nous avons généré par génétique inverse et mutagenèse dirigée un couple VIAHP/VIAFP H5N8. En inoculant les animaux avec un mélange contenant les deux virus, le VIAHP étant minoritaire par rapport au VIAFP, nous avons cherché à reproduire cette seconde étape.

1 **The strength of the innate immune response drives the within-host**
2 **competition between highly and low pathogenic avian influenza**
3 **viruses**

4

5

6 Pierre Bessière^{1¶}, Thomas Figueroa^{1¶}, Amelia Coggon¹, Charlotte Foret-
7 Lucas¹, Alexandre Houffschmitt¹, Maxime Fusade-Boyer¹, Gabriel Dupré¹,
8 Maxence Delverdier¹, and Romain Volmer^{1*}

9 ¹ Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, Université de Toulouse, ENVT,
10 INRAE, IHAP, UMR 1225, Toulouse, France.

11

12 * Correspondence:

13 Dr Romain Volmer

14 romain.volmer@envt.fr

15 ¶ These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) emerge from low pathogenic avian influenza viruses (LPAIV) through the introduction of basic amino acids at the hemagglutinin (HA) cleavage site. Following viral evolution, the newly formed HPAIV likely represents a minority variant within the index host, predominantly infected with the LPAIV precursor. Using reverse-genetics engineered H5N8 viruses differing solely at the HA cleavage, we tested the hypothesis that the interaction between the minority HPAIV and the majority LPAIV could modulate the risk of HPAIV emergence and that the nature of the interaction could depend on the host species. In chickens, we observed that the H5N8_{LP} increased H5N8_{HP} replication and pathogenesis. By contrast, the H5N8_{LP} antagonized H5N8_{HP} replication and pathogenesis in ducks. Ducks mounted a more potent antiviral innate immune response than chickens against the H5N8_{LP}, which correlated with H5N8_{HP} inhibition. Our results provide evidence that HPAIV may be more likely to emerge in chickens than in ducks because of differences in the host response to HPAIV and LPAIV co-infections.

INTRODUCTION

Highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) outbreaks have a major impact on animal health, food security and economy, as well as on public health [1,2]. A better understanding of the factors leading to HPAIV emergence is therefore of paramount importance. Avian influenza viruses of H5 and H7 subtypes can become highly pathogenic through the introduction of multiple basic amino acids within the hemagglutinin (HA) cleavage site [3]. Several mechanisms account for these introductions: nucleotide substitutions and insertions or non-homologous recombination with viral or cellular RNAs [1,4,5]. The acquisition of a multi-basic cleavage site (MBCS) is a virus-dependent event that occurs in a bird infected with a parental low pathogenic avian influenza virus (LPAIV). To emerge successfully, the newly formed HPAIV must become a predominant variant in order to overcome the transmission bottleneck between individuals [6–8]. In order to achieve this, the newly formed HPAIV must therefore outcompete its LPAIV precursor within the individual in which it has arisen. We therefore suggest that HPAIV emergence is a two-step process: firstly, the acquisition of a MBCS, followed by the ability to become a predominant variant of the viral quasi-species within an individual.

Over the past decades, the vast majority of HPAIV emergences have been linked to H5 and H7 LPAIV circulation in *Galliformes* (such as chickens and turkeys) [1,2,4]. By contrast, *Anseriformes* (such as ducks and geese) are considered as reservoirs for LPAIV precursors, rather than a species in which HPAIV emerge [9–12]. These observations suggest that host factors could modulate HPAIV emergence. To our knowledge, this has never been investigated experimentally.

To model the intra-host competition between a newly formed HPAIV and its parental LPAIV, we co-infected embryonated eggs and chickens and ducks *in vivo* with a H5N8 HPAIV as a minority variant and a reverse-genetics engineered LPAIV that differed from the HPAIV only at the level of the HA cleavage site, as a majority variant. Our results demonstrate that chickens and ducks have opposite effects on the interaction between the

H5N8 HPAIV and LPAIV and that the HPAIV has a stronger selective advantage in chickens than in ducks. To our knowledge this is the first experimental evidence that HPAIV emergence could be more likely in chickens than in ducks.

RESULTS

Characterization of H5N8_{HP} and H5N8_{LP} viruses in cell culture

We used reverse-genetics to generate the wild-type H5N8_{HP} from a HPAIV isolated during the 2016 H5N8 epizootics in France [13]. This virus belonged to clade 2.3.4.4 group B, which caused high levels of mortality in *Galliformes* and in wild and domestic *Anseriformes* during the 2016-2017 HPAIV outbreak in Europe [13–16]. Using site-directed mutagenesis and reverse-genetics, we mutated the H5N8_{HP} HA polybasic cleavage site PLRELRLRLR/G to a monobasic cleavage site PQRETR/G to obtain the H5N8_{LP} virus with a typical LPAIV HA sequence (NCBI Genbank accession number: AB261853.1) [17]. The H5N8_{HP} and the H5N8_{LP} differed solely at the level of the HA cleavage site, as verified by whole genome sequencing following virus amplification in chicken embryonated eggs (Fig. 1A).

Viral growth kinetics was analyzed in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, in the DF-1 chicken fibroblast cell line and in the CCL-141 duck fibroblast cell line infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10⁻⁵ tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀). H5N8_{HP} replicated with similar kinetics in the absence or presence of exogenous trypsin, demonstrating that proteolytic processing of the HA MBCS was independent of trypsin-like proteases, as expected for a HPAIV (Fig. 1B). By contrast, H5N8_{LP} replication was severely impaired in the absence of trypsin, while its replication kinetics was indistinguishable from that of the H5N8_{HP} in the presence of trypsin (Fig. 1B). These results indicate that mutations introduced in the H5N8_{LP} HA have no negative impact on viral replication kinetics in cell culture beyond the expected trypsin-like proteases requirement for H5N8_{LP} HA proteolytic processing, as expected for a LPAIV.

H5N8_{HP} and H5N8_{LP} viruses co-infections *in ovo*

Next, we evaluated H5N8_{HP} and H5N8_{LP} replication in embryonated chicken (*Gallus gallus*) and Pekin duck (*Anas platyrhynchos domesticus*) eggs, as they have a complex cellular architecture and provide an intermediate model between monolayer cell culture and *in vivo* studies. To investigate how the host species modulated the interaction between a HPAIV and a LPAIV, we inoculated embryonated chicken and duck eggs via the allantoic cavity either with 10² egg infectious dose 50 (EID₅₀) H5N8_{HP} alone, with increasing doses of H5N8_{LP} alone, or with 10² EID₅₀ H5N8_{HP} in combination with increasing doses of H5N8_{LP} (Fig. 2A). We inoculated chicken eggs at day 10 and duck eggs at day 11 in order to work at similar development stages [18]. After 24 hours of incubation at 37°C, we harvested the allantoic fluid and quantified the level of virus replication by RT-qPCR using primers specific for H5N8_{HP} or H5N8_{LP} HA. In chicken eggs, we detected equivalent levels of viral RNA following inoculation with 10²EID₅₀ H5N8_{HP} alone or with H5N8_{LP} alone regardless of the inoculum dose (Fig. 2B). Upon co-infection with H5N8_{HP} and H5N8_{LP} in chicken eggs, the level of H5N8_{HP} and H5N8_{LP}-specific viral RNA did not differ from mono-infections regardless of the quantity of H5N8_{LP} (Fig. 2B). Thus, the replication of H5N8_{HP} is not affected by H5N8_{LP}, regardless of the amount of H5N8_{LP} co-inoculated in chicken eggs. In duck eggs, we detected similar levels of viral RNA following inoculation with 10² EID₅₀ H5N8_{HP} alone or with 10² EID₅₀ H5N8_{LP} alone (Fig. 2C). When duck eggs were infected simultaneously with H5N8_{HP} and H5N8_{LP}, we observed a decrease of H5N8_{HP} viral RNA levels that correlated with the amount of H5N8_{LP} co-inoculated, indicating that the H5N8_{LP} antagonized H5N8_{HP} replication in duck eggs (Fig. 2C). The *in ovo* experiments provide evidence that a ≥100-fold excess of H5N8_{LP} significantly antagonized H5N8_{HP} replication in duck eggs, while H5N8_{LP} did not affect H5N8_{HP} replication in chicken eggs regardless of the amount of H5N8_{LP}. This observation thus indicates that the H5N8_{HP} had a stronger selective advantage over the H5N8_{LP} in chicken embryonated eggs than in duck embryonated eggs.

Potential of HPAIV replication and pathogenesis by LPAIV in chickens

In a preliminary experiment (data not shown), we observed transient low-level oropharyngeal viral RNA shedding in 6/8 of the 10^6 EID₅₀ H5N8_{LP} infected chickens (*Gallus gallus*), whereas all chickens infected with 10^7 EID₅₀ H5N8_{LP} shed high levels of viral RNA for a prolonged time. No clinical signs were observed in chickens inoculated with H5N8_{LP}. We evaluated the H5N8_{HP} chicken infectious dose 50 at 6×10^3 EID₅₀. H5N8_{HP}-infected sick birds presented dyspnea that quickly progressed to severe dyspnea, associated with anorexia and lethargy. These results provided evidence that the H5N8_{HP} and H5N8_{LP} caused, respectively, commonly observed HPAIV and LPAIV-associated infection patterns in chickens [2].

Based on these results, we investigated the interaction between a HPAIV and a LPAIV in chickens. Four-week old chickens were assigned one of six groups: L7, H3, H4, L7H3, L7H4 or NI (Fig. 3A). L7 animals were infected with 10^7 EID₅₀ H5N8_{LP}. H3 animals were infected with 10^3 EID₅₀ H5N8_{HP}. H4 animals were infected with 10^4 EID₅₀ H5N8_{HP}. L7H3 animals were infected with a mixture of 10^7 EID₅₀ H5N8_{LP} and 10^3 EID₅₀ H5N8_{HP}. L7H4 animals were infected with a mixture of 10^7 EID₅₀ H5N8_{LP} and 10^4 EID₅₀ H5N8_{HP}. Finally, non-infected animals from group NI were administered vehicle only. Neither mortality nor clinical signs were observed in chickens from group L7 and group H3 (Fig. 3B). Chickens in the H4 group reached 45% mortality (Fig. 3B). When chickens were infected with a mixture of H5N8_{LP} and H5N8_{HP}, we observed an increase in mortality compared to H5N8_{HP} mono-infected chickens: mortality reached 18% in the L7H3 group, compared to 0% in the H3 group; and 72% in the L7H4 group, compared to 45% in the H4 group (Fig. 3B). Although the increase in mortality did not reach statistical significance, these results indicate that H5N8_{LP} and H5N8_{HP} synergized, resulting in increased pathogenesis in co-infected chickens compared to H5N8_{HP} mono-infected chickens.

We measured viral shedding from oropharyngeal and cloacal swabs by quantifying viral RNA using RT-qPCR with primers detecting specifically H5N8_{LP} or H5N8_{HP} HA sequences. Regardless of the experimental group, all

H5N8_{HP} swab-positive chickens eventually developed severe dyspnea and either died or were euthanized when they reached humane endpoints, as previously observed [19]. In line with the mortality rate (Fig 3B), no H5N8_{HP} swab-positive chicken was found in the H3 group, while only two chickens tested positive for H5N8_{HP} in the L7H3 group. Because of the low rate of infection in the H3 and L7H3 groups, these animals were excluded from further analyses. H5N8_{HP} oropharyngeal and cloacal shedding was higher in group L7H4 compared to group H4 at 2 days post-infection (dpi), but the difference was not statistically significant (Fig. 3C&D). Average H5N8_{HP} oropharyngeal and cloacal shedding remained otherwise similar between the L7H4 and the H4 groups and was not associated with different H5N8_{HP} transmission rates to contact chickens introduced in the poultry isolators at 1 dpi (data not shown). H5N8_{LP} oropharyngeal shedding did not differ between the L7 and L7H4 group (Fig. 3E).

H5N8_{LP} RNA was not detected from the lungs or brain of any animal, indicating that H5N8_{LP} replicated mostly in the upper respiratory tract of chickens. H5N8_{HP} viral RNA was detected at similar levels in the lungs and brain of moribund animals from groups L7H4 and H4 that were euthanized, but was not detected in the lungs and brain from animals autopsied at 1 and 3 dpi (Fig. 3F&G). These results indicate that H5N8_{HP} replicated in the upper respiratory tract in the early stages of infection (*i.e.* until 3 dpi). In line with the predominantly respiratory clinical signs observed in moribund animals, moderate viral antigen staining was detected by immunohistochemistry in the brain, while extensive viral antigen staining was detected in the lungs (Fig. 4).

We next evaluated the expression of host immune response markers using RT-qPCR. We observed a modest but significant upregulation of Mx and interferon gamma (IFN- γ) mRNA expression only in the lungs of moribund chickens (Fig. 5A&B). Mx is a type I IFN-induced gene whose expression is a good indicator of the amount of type I IFN active locally [20]. The lack of changes in Mx and IFN- γ mRNA expression in the lungs of animals at 1 and 3 dpi was probably related to the fact that no viral RNA could be detected in the lungs of these animals (Fig. 5A). Since oropharyngeal swabs were

mostly positive for viral RNA at any time post-infection, we analyzed the antiviral innate immune response in the upper respiratory tract by measuring Mx mRNA expression by RT-qPCR from RNA extracted from oropharyngeal swabs (Fig. 5C). Compared to NI animals, Mx mRNA was significantly increased in groups L7H4 and L7 at 1 dpi. At 2 and 3 dpi, Mx mRNA was significantly increased in groups L7H4 and H4. Interestingly, in group L7, Mx mRNA levels decreased rapidly and were not significantly different from NI chickens from 2 dpi onwards, indicating that H5N8_{LP} mono-infected chickens had a transient upregulation of Mx mRNA expression in the upper respiratory tract. Altogether, these results indicate that the chicken immune response to viral infection was modest and transient. In addition, the chicken immune response did not differ between H5N8_{HP} mono-infected birds (group H4) and H5N8_{LP} and H5N8_{HP} co-infected birds (group L7H4).

To gain insight into the reasons underlying the difference in mortality between H4 and L7H4, we plotted individual H5N8_{HP} oropharyngeal shedding curves from the onset of excretion to the death of the animal (Fig. 6A). We observed that the slopes of H5N8_{HP} excretion were significantly steeper in the L7H4 group than in the H4 group, suggesting that the rate of H5N8_{HP} growth was higher (Fig. 6B). In complement to this observation, we noticed that all H5N8_{LP} and H5N8_{HP} co-infected birds in the L7H4 group died within 48 hours following the first H5N8_{HP} positive swab (Fig. 6C). By contrast, H5N8_{HP} was shed significantly longer in H5N8_{HP} mono-infected birds from the H4 group (Fig. 6C). Thus, analysis of individual oropharyngeal excretion patterns revealed that H5N8_{HP} growth rate was higher when animals were co-infected with H5N8_{LP}, compared to H5N8_{HP} mono-infected chickens. In conclusion, these results show that there was synergy between H5N8_{LP} and H5N8_{HP} in co-infected chickens, resulting in increased H5N8_{HP} growth and pathogenesis compared to H5N8_{HP} mono-infected chickens.

Antagonism of HPAIV replication and pathogenesis by LPAIV in ducks

We inoculated groups of 4-week old Pekin ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*) with H5N8_{HP} alone, H5N8_{LP} alone, or a mixture containing both H5N8_{LP} and H5N8_{HP}. Ducks were assigned one of four groups: L7, H4, L7H4 or NI (Fig. 7A). L7 animals were infected with 10⁷ EID₅₀ H5N8_{LP}. H4 animals were infected with 10⁴ EID₅₀ H5N8_{HP}. L7H4 animals were infected with a mixture of 10⁷ EID₅₀ H5N8_{LP} and 10⁴ EID₅₀ H5N8_{HP}. Non-infected animals from group NI were administered vehicle only. Neither mortality nor clinical signs were observed in any duck of group L7 (Fig. 7B). Mortality reached 87% in the H4 group and was preceded by predominantly neurological clinical signs, in accordance with the pronounced neurotropism of clade 2.3.4.4 group B H5N8 viruses in ducks [14–16]. Mortality was significantly reduced to 37% in the L7H4 group. Thus, H5N8_{LP} antagonized H5N8_{HP} pathogenesis in co-infected ducks, in contrast to what we observed in chickens.

To determine how this related to the levels of virus replication, we analyzed H5N8_{LP} and H5N8_{HP} viral RNA shedding from oropharyngeal and cloacal swabs using RT-qPCR. Oropharyngeal H5N8_{HP} shedding was significantly reduced in group L7H4 compared to group H4 in the first days post-infection (dpi), with a hundred-fold difference at 1 dpi (p<0.001) and a ten-fold difference at 2 and 3 dpi (p<0.01) (Fig. 7C). Cloacal H5N8_{HP} shedding was also decreased in group L7H4, but the difference only reached statistical difference at day 3, with a ten-fold reduction (p<0.05) (Fig. 7D). There was no difference in H5N8_{LP} shedding between groups L7H4 and L7 (Fig. 7E).

Next, we analyzed viral RNA levels in the lungs and brain. H5N8_{LP} was not detected in the lungs or brain, indicating that H5N8_{LP} replicated mostly in the upper respiratory tract of ducks. In contrast to chickens, we detected H5N8_{HP} nucleic viral RNA from the lungs and brain of most animals at 1 and 3 dpi (Fig. 7F&G). H5N8_{HP} viral RNA load was decreased in the lungs and brain of H5N8_{LP} and H5N8_{HP} co-infected birds (group L7H4), compared to H5N8_{HP} mono-infected birds (group H4). High levels of H5N8_{HP} viral RNA were also detected in the lungs and brain of moribund ducks, which

developed predominantly neurological signs. Extensive viral antigen staining was detected by immunohistochemistry in the brain of moribund animals, while more modest viral antigen staining was observed in the lungs, with no difference between groups L7H4 and H4 (Fig. 8A&B).

We then evaluated the expression of host immune response markers in the lungs and brain using RT-qPCR. Mx mRNA expression was significantly increased in the lungs of infected ducks belonging to the L7H4 and H4 groups at 1 and 3 dpi, as well as in moribund animals (Fig. 9A). Compared to NI duck, we also observed an upregulation of Mx mRNA expression in the lungs of H5N8_{LP} mono-infected ducks (L7 group) at 1 and 3 dpi, although the difference did not reach statistical significance. IFN- γ mRNAs levels were significantly higher in the lungs of H5N8_{HP} mono-infected ducks (group H4) at 1 dpi compared to NI, L7H4 and L7 ducks (Fig. 9B). Similar results were observed in the brain (data not shown). To evaluate the antiviral innate immune response in the upper respiratory tract, we measured Mx mRNA expression by RT-qPCR from RNA extracted from oropharyngeal swabs. Compared to NI ducks, Mx mRNA was increased in all infected groups (Fig. 9C). In contrast to chickens, Mx mRNA expression level remained high in H5N8_{LP} mono-infected ducks from the L7 group (Fig. 9C).

To further compare the antiviral innate immune response in ducks and chickens, we plotted the levels of Mx mRNA as a function of the level of viral RNA in the lungs (Fig. 10A). We observed a correlation between the level of Mx mRNA and the level of viral RNA in ducks (Pearson $r=0.64$; $p<0.001$), confirming that the intensity of the antiviral innate immune response is proportional to the level of viral RNA, as previously reported [21–24]. This correlation was less visible in chickens, possibly because viral RNA was only found in the lungs of a limited number of chickens (Pearson $r=0.50$; $p=0.21$). The Mx/HA ratios were distributed to higher values in ducks compared to chickens (Fig. 10A), resulting in mean Mx/HA ratios that were significantly higher in ducks than in chickens (Fig. 10B). This result demonstrates that ducks mounted a more potent antiviral innate immune response against influenza virus infection than chickens.

DISCUSSION

To model the intra-host competition between a newly formed HPAIV and its parental LPAIV, we inoculated chickens and ducks with an H5N8_{HP} virus and an H5N8_{LP} virus differing solely at the level of the HA cleavage site. When inoculated alone, H5N8_{HP} replication and pathogenesis were equivalent in chickens and ducks. However, when chickens and ducks were co-inoculated with this pair of viruses, we found that the H5N8_{HP} had a stronger selective advantage over the H5N8_{LP} in chickens than in ducks. Surprisingly, we observed that the H5N8_{LP} increased H5N8_{HP} replication and pathogenesis in chickens. By contrast, we observed that the H5N8_{LP} antagonized H5N8_{HP} replication and pathogenesis in ducks. Thus, the nature of the interaction between the HPAIV and the parental LPAIV may be a critical determinant of HPAIV emergence, which we show here to depend on the host species.

The interaction between co-infecting viruses ranges from synergy to antagonism depending on the virus pairs and the host [25–31]. Functional complementation occurs when one virus provides a function that is absent or less efficient in the other virus. As the genomes of the H5N8_{HP} and H5N8_{LP} differ solely at the level of the HA cleavage site, it is unlikely that the H5N8_{LP} is able to provide a function missing in the H5N8_{HP}. We therefore speculate that the H5N8_{LP}-mediated increase in H5N8_{HP} replication and pathogenesis observed in chickens could be due to complementation of semi-infectious H5N8_{HP} particles by the H5N8_{LP} inoculated at a higher dosage [32]. Such complementation is likely to occur both in chickens and in ducks. However, this complementation may be undetectable in ducks due to the dominant effect of host-mediated antagonism between the H5N8_{LP} and the H5N8_{HP}. The antagonism between the H5N8_{LP} and the H5N8_{HP} is unlikely to be due to viral interference due to receptor or cell machinery usage, as no competition between the H5N8_{LP} and the H5N8_{HP} was observed in chickens, although the H5N8_{LP} replicated to higher levels and persisted longer in chickens than in ducks. Our results suggest that the competition between the H5N8_{LP} and the H5N8_{HP} was only

observed in ducks because ducks mounted a more pronounced antiviral innate immune response than chickens against the H5N8_{LP}. Indeed, in contrast to chickens, ducks have a functional RIG-I receptor, which has been proposed to contribute to the more efficient type I interferon mediated-antiviral innate immune response against influenza viruses observed in ducks compared to chickens [22,33–38]. The H5N8_{LP} and the H5N8_{HP} are likely to be intrinsically equally sensitive to the antiviral effects of type I interferon. However, a stronger antiviral innate immune response could impose a stronger selective pressure on the minority variant [39]. In line with this hypothesis, type I interferon antiviral innate immune response was shown to constitute a strong bottleneck shaping poliovirus population in mice [40]. We therefore suggest that the more pronounced antiviral innate immune response observed in ducks compared to chickens imposed a stronger selective pressure on the H5N8_{HP} minority variant, compared to the H5N8_{LP} inoculated at a higher dosage. The antiviral innate immune response may thus inhibit the selection of variants that arise through *de novo* mutations during infection of an individual, unless these variants have a strong selective advantage within this individual.

Recent work investigating the interaction between an H7N7 HPAIV and a closely related H7N7 LPAIV field isolate demonstrated that the LPAIV inhibited HPAIV replication in chickens when the LPAIV was inoculated at a ≥ 100 -fold higher dose [41]. These results indicate that the nature of the interaction between the HPAIV and the LPAIV may depend on the viral strain. If competition between a LPAIV and a HPAIV occurred in chickens, we speculate that the competition could even be stronger in ducks, because of the stronger antiviral innate immune-mediated selective pressure imposed on the minority HPAIV. However, further work is needed to properly address this question. These studies should ideally be performed using different pairs of reverse-genetics engineered HPAIV and LPAIV differing solely at the level of the HA cleavage site to specifically investigate how the selective advantage conferred by the MBCS depends on the host species.

Epidemiological investigations of HPAIV outbreaks indicate that the vast majority of HPAIV emerge upon replication and inter-individual transmission of a LPAIV in *Galliformes*, such as chickens and turkeys, although *Anseriformes*, such as ducks and geese, are considered as the main reservoirs for LPAIV [1,2,4,5]. In this study, we focused on the two main representatives of the *Galliformes* and *Anseriformes* orders: chickens, which are with current global production of 22 billion chickens the main source of animal protein for human consumption worldwide and Pekin ducks, which are also intensively raised in farms and represent the best characterized *Anseriformes* in respect to the interaction with influenza viruses [1,42]. Our results suggest that HPAIV would be more likely to emerge in chickens than in ducks because of differences in their response to influenza virus infection. How the host response could influence the interaction between the LPAIV and the newly formed HPAIV in other bird species, such as turkeys, or in wild dabbling or diving ducks, which have a prominent role in the ecology of avian influenza viruses will be the subject of future studies [1,2,9]. In addition to host factors, anthropic factors are also likely to play a major role in the emergence of HPAIV and may contribute to the higher frequency of HPAIV emergence observed in chickens that are usually raised at higher densities than ducks [5,43–45]. Estimating to which extent farming processes contribute to the emergence of HPAIV is however a difficult task and therefore their contribution to HPAIV emergence remains currently unclear.

To minimize the risk of HPAIV evolution, present European regulation and national regulations in many countries require the culling of all birds in flocks infected with H5 and H7 LPAIV [2]. Culling of H5 or H7 LPAIV infected flocks aims at eliminating LPAIV from the susceptible poultry population before they have a chance to evolve into HPAIV, and is therefore considered a preventive biosecurity measure. However, the broader public, breeders and professional breeder societies question the need for preventive culling for economical, animal welfare and breeder welfare issues [46]. Indeed, preventive culling of animals, especially healthy animals, which is commonly the case in LPAIV infected *Anseriformes*, is

394 poorly accepted. Identifying how host factors modulate HPAIV emergence
395 therefore provides important scientific data that may be taken into account
396 by animal health policy makers in the future.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

This study was carried out in compliance with European animal welfare regulation. The protocols were approved by the Animal Care and Use Committee (Comité d’Ethique en Science et Santé Animales – 115) under protocol 13025-2018012311319709.

Viruses

The eight segments from the HPAIV field isolate A/mulard duck/France/171201g/2017 (H5N8) were cloned in a pHW2000 plasmid vector using a set of universal primers in order to generate a reverse-genetics engineered wild-type HPAIV H5N8 (H5N8_{HP}) [47,48]. Using site-directed mutagenesis, a 9 nucleotides deletion was performed on the HA cleavage site sequence, along with two single nucleotide polymorphism on both sides of the deletion to obtain a reverse-genetics engineered LPAIV H5N8 (H5N8_{LP}) according to the manufacturer’s instructions (In-Fusion, Takara Bio, France). 2.5x10⁵ HEK 293T cells cultured in 6-well plates were transfected in Opti-MEM medium, using the lipophilic transfection reagent LTX with Plus reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Canada), either with 0.5µg of each seven common H5N8_{HP/LP} pHW2000 plasmids (PB2, PB1, PA, NA, NP, M and NS) and with 0.5µg of HA_{HP} or HA_{LP}. L-(tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone (TPCK) treated trypsin (TPCK-treated) was added 24 hours post-transfection at a 0.5µg/ml final concentration. 48 hours post-transfection, scraped cells and culture medium were transferred on MDCK cells grown with Opti-MEM supplemented with 0.5µg/ml TPCK-treated trypsin. 72 hours later, cell supernatant was collected. To produce viral stock, both viruses were then propagated in 10-day-old chicken specific-pathogen-free (SPF) embryonated chicken eggs (INRAE, PFIE, Nouzilly, France), by inoculation in the allantoic cavity of 100µL of 1:100 dilutions of infected MDCK cells supernatant. Infectious allantoic fluid was harvested at 72 hours postinoculation and titrated in 10-day-old SPF embryonated chicken eggs to determine the 50% egg infective dose (EID₅₀)/mL using the Reed-

Muench method. The identity of amplified viruses was verified by Sanger sequencing of each viral gene segment (H5N8_{HP}: accession numbers MK859904 to MK859911; H5N8_{LP}: accession numbers MK859926 to MK859933). These viruses were referenced by the French biotechnology ethics committee (Haut Conseil des Biotechnologies) and were manipulated exclusively in biosafety level 3 laboratories.

***In vitro* infections**

MDCK cells, DF-1 cells and CCL-141 cells were cultured in DMEM containing 1% antibiotics (penicillin/streptomycin) and 10% fetal bovine serum. When cells reach 90% confluency, they were washed with PBS and infected either with H5N8_{HP} or with H5N8_{LP} at a multiplicity of infection (MOI) of 10⁻⁵ TCID₅₀. After one hour, the inoculum was removed, cells were washed twice with PBS and Opti-MEM supplemented with 0.5µg/mL TPCK-treated trypsin (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Canada) was added. Viral RNA extraction was performed on 140µL supernatant collected at 1, 24, 48 and 72 hours post-infection according to the manufacturer's instructions (QIAamp viral RNA; Qiagen, Toronto, Canada). Influenza nucleic acid load was determined by RT-qPCR using primers targeting both H5N8_{LP} and H5N8_{HP} HA gene in a final volume of 10µL. Mixes were prepared according to the manufacturer's instructions (iTaq Universal SYBR green One-Step kit, BioRad) with 1µL of RNA and a final concentration of 0.3µM of each primer.

***In ovo* co-infection experiments**

Specific pathogen-free (SPF) White Leghorn (PA12) embryonated chicken eggs (PFIE, INRAE, Nouzilly, France) and Pekin Duck (ST5 Heavy) embryonated eggs (ORVIA-Couvoir de la Seigneurtière, Vieilleville, France) were respectively incubated for 10 and 11 days at 37°C to work at similar stages of development [18]. They were then inoculated in the allantoic cavity with 200µL virus diluted in PBS containing 1% antibiotics (penicillin/streptomycin). Eggs from group H2 were infected with 10² EID₅₀ H5N8_{HP}. Eggs from groups L2, L3, L4 and L5 were infected with 10²

EID₅₀, 10³ EID₅₀, 10⁴ EID₅₀, and 10⁵ EID₅₀ H5N8_{LP} respectively. Eggs from groups L2H2, L3H2, L4H2 and L5H2 were infected with a mixture of 10² EID₅₀ H5N8_{HP} and increasing doses of H5N8_{LP}: 10², 10³, 10⁴ and 10⁵ EID₅₀ H5N8_{LP} respectively. Each group contained 9 to 29 eggs from two to three independent experiments. 24 hours post-infection eggs were incubated at 4°C overnight and allantoic fluid was harvested for RNA extraction.

Animals and groups

Chickens and ducks experiment were conducted separately. One-day-old Pekin ducklings (*Anas platyrhynchos domesticus*, ST5 heavy) were obtained from a commercial hatchery (ORVIA-Couvoir de la Seigneurtière, Vieilleville, France) and one-day-old White Leghorn chicks (*Gallus gallus domesticus*, PA12) from a research hatchery (PFIE, INRAE, Nouzilly, France). Animals were fed *ad libitum* with a starter diet and housed in biosafety level II facilities for 2 weeks in a litter-covered floor pen at the National Veterinary School of Toulouse, France. They were then transferred into a biosafety level III facility, equipped with bird isolators (I-Box; Noroit, Nantes, France) ventilated under negative pressure with HEPA-filtered air. Chicken preliminary experiment: 39 chickens were randomly assigned to four groups: 10 animals were assigned to group H3 and were infected with 10³ EID₅₀ H5N8_{HP}. 10 animals were assigned to group H4 and were infected with 10⁴ EID₅₀ H5N8_{HP}. 8 animals were assigned to group L6 and were infected with 10⁶ EID₅₀ H5N8_{LP}. 11 animals were assigned to group L7 and were infected with 10⁷ EID₅₀ H5N8_{LP}.

Chickens co-infection experiment: A total of 130 chickens were randomly assigned to 4 groups: 26 animals (including 5 contact birds introduced 24 hours post-infection) were assigned to group H3 and were infected with 10³ EID₅₀ H5N8_{HP}. 26 animals (including 5 contact birds) were assigned to group H4 and were infected with 10⁴ EID₅₀ H5N8_{HP}. 21 animals were assigned to group L7 and were infected with 10⁷ EID₅₀ H5N8_{LP}. 26 animals (including 5 contact birds) were assigned to group L7H3 and were simultaneously infected with a mixture of 10⁷ EID₅₀ H5N8_{LP} and 10³ EID₅₀ H5N8_{HP}. 26 animals (including 5 contact birds) were assigned to group

L7H4 and were simultaneously infected with a mixture of 10^7 EID₅₀ H5N8_{LP} and 10^4 EID₅₀ H5N8_{HP}. 5 animals were assigned to the non-infected control group (NI).

Ducks co-infection experiment: A total of 64 ducks were randomly assigned to 4 groups: 21 animals (including 3 contact birds) were assigned to group H4 and were infected with 10^4 EID₅₀ H5N8_{HP}. 16 animals were assigned to group L7 and were infected with 10^7 EID₅₀ H5N8_{LP}. 21 animals (including 3 contact birds) were assigned to group L7H4 and were simultaneously infected with a mixture of 10^7 EID₅₀ H5N8_{LP} and 10^4 EID₅₀ H5N8_{HP}. 5 animals were assigned to the non-infected control group (NI).

***In vivo* experimental infections**

Serum was collected from all animals pre-infection to ensure that they were serologically negative to influenza virus by using a commercial influenza A NP antibody competition enzyme-linked immunosorbent assay kit (ID Screen; ID-Vet, Montpellier, France) according to the manufacturer's instructions. When they were 4-week-old, animals were infected through the choanal route using an inoculum volume of 100µL. Non-infected groups received the equivalent volume of allantoic fluid collected from non-infected SPF embryonated chicken eggs. Contact birds were introduced in the poultry isolators 1 day post-infection. Clinical signs were recorded over 8 to 9 days. Oropharyngeal and cloacal swabs were performed on all animals daily. 5 animals from each group were humanely euthanized and necropsied at 1 and 3 dpi. Moribund animals reaching humane termination criteria (as dyspnea, convulsions, severe lethargy) were humanely killed and also necropsied. For each necropsied animal, brain and lungs were collected and stored frozen in TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) or stored in 10% neutral formalin.

H5N8_{LP} and H5N8_{HP} quantification

Cloacal and oropharyngeal swabs from *in vivo* experiments were briefly vortexed in 500µL of sterile PBS and viral RNA was extracted from 200µL using a QiaCube automated platform according to the manufacturer's

instructions (Cador Pathogen QIAcube HT kit; Qiagen, Toronto, Canada). Allantoic fluids from *in ovo* experiments were collected and viral RNA was extracted from 140µL according to the manufacturer's instructions (QIAamp viral RNA; Qiagen, Toronto, Canada). cDNA was synthesized by reverse transcription of 5µL of RNA, using a HA-specific primer (5'-GTCCTTGCGACTG-3') and a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Influenza nucleic acid load was determined by qPCR using primers targeting either the polybasic or the monobasic HA cleavage site. qPCR was performed in 384-well plates in a final volume of 10µL using a Bravo automated liquid handling platform (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and a ViaaA 7 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the GeT-TRiX platform (GénoToul, Génopole, Toulouse, France). Mixes were prepared according to the manufacturer's instructions (iTaq SYBR green PCR, BioRad) with 2µL of cDNA and a final concentration of 0.5µM of each primer. Absolute quantification was performed using a standard curve based on 10-fold serial dilutions of plasmid containing either H5N8_{LP} or H5N8_{HP} HA gene.

RNA extraction from tissue samples and cDNA synthesis

For each organ, 30mg portions of tissue were placed in tubes with beads (Precellys lysis kit; Stretton Scientific, Ltd., Stretton, United Kingdom) filled with 1mL of TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and mixed for 5s at 6,000rpm three times in a bead beater (Precellys 24; Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). After TRIzol extraction, the aqueous phase was transferred to a RNA extraction column and processed according to the manufacturer's instructions (NucleoSpin RNA; Macherey-Nagel GmbH & Co, Germany). cDNA was synthesized by reverse transcription of 500ng of total RNA using either both oligo(dT)18 (0.25µg) and random hexamer (0.1µg) primers or HA-specific primer and a RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR from tissue samples

Quantitative PCR for the analysis of host genes expression was performed in 384-well plates in a final volume of 10µL using a Bravo automated liquid handling platform (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and a ViiA 7 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the GeT-TRiX platform (GenoToul, Genopole, Toulouse, France). Mixes were prepared according to the manufacturer's instructions (iTaQ SYBR green PCR, BioRad) with 2µl of 1:20 diluted cDNA and a final 0.5µM concentration of each primer (Table 1). Quantification of influenza virus nucleic acid load in tissues was performed in 96-well plates with a 10µL final volume according to the manufacturer's instructions (iTaQ SYBR green PCR, BioRad), along with 2µL of cDNA and a final 0.5µM concentration of H5N8_{HP} or H5N8_{LP} specific primers. qPCR was performed on a LightCycler 96 (Roche). Relative quantification was carried out by using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Chickens: RNA levels were normalized with the geometric mean of GAPDH/HPRT1 mRNA levels. Ducks: mRNA levels were normalized with the geometrics means of RPL4/RPL30 mRNA levels in the lungs and RPL4/GAPDH in the brain. Oropharyngeal Mx mRNA expression was performed in 96-well plates with a final volume of 10µL according to the manufacturer's instructions (iTaQ SYBR green one-step, BioRad), with 2µL RNA and a final 0.3µM concentration of each primer. Mx mRNA levels were normalized with GAPDH mRNA levels in chickens and ducks samples using the $2^{-\Delta Ct}$ method.

Immunohistochemistry

Tissue samples of the lungs and brain were taken and stored in 10% neutral formalin. After fixation, tissues were processed in paraffin blocks, sectioned at 4µm, and immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections with a monoclonal mouse anti-nucleoprotein influenza A virus antibody (Argene 11-030; pronase 0.05% retrieval solution, 10 min at 37°C: antibody dilution 1/50, incubation overnight at 4°C). The immunohistochemical staining was revealed with a biotinylated polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin conjugated with horseradish peroxidase (HRP; Dako, LSAB2 system-HRP, K0675) and the diaminobenzidine HRP

595 chromogen (Thermo Scientific, TA-125-HDX). Negative controls comprised
596 sections incubated either without specific primary antibody or with
597 another monoclonal antibody of the same isotype (IgG2).
598

599

600

Table 1: Primers used for qPCR

Gene name	Primers sequences (5' to 3')	NCBI accession number or Reference
HA H5N8 _{HP}	CCCAAACAGCCCTCTTT	
	GGCTCAGAAATAGTCCTCT	
HA H5N8 _{LP}	GCCATTTCATCCACAGTTGACA	
	CATGGTGCTGACAGTGGAGTCT	
HA H5N8 _{LP} and HP	GACCTCTGTTACCCAGGGAGCCT	
	GGACAAGCTGCGCTTACCCCT	
Chicken HPRT1	TGGTGGGGATGACCTCTCAA	[49]
	GGCCGATATCCCACACTTCG	
Chicken GAPDH	TCCTCTCTGGCAAAGTCCAAG	[50]
	CACAACATACTCAGCACCTGC	
Duck GAPDH	CCACTTCCGGGGCACTGTCA	AY436595.1
	AGCACCAGCATCTGCCCACT	
Chicken IFN-γ	ACACTGACAAGTCAAAGCCGC	[51]
	AGTCGTTCATCGGGAGCTTG	
Duck IFN-γ	ACCTCGTGGAAGTGTCAAACCT	AF087134
	CAGCTCACTCACAGCCTTGC	
Chicken Mx	CACTGCAACAAGCAAAGAAGGA	[52]
	TGATCAACCCCAAGGAAAA	
Duck Mx	TCACACGAAGGCTATTTTACTGG	Z21549
	GTCGCCGAAGTCATGAAGGA	
Duck RPL4	AAGCTGAACCCATACGCCAA	XM_005015528
	CCTGGGCCTTAGCTGTAACC	

Duck RPL30	GCAAAGCCAAGCTGGTCATC	XM_027452502.1
	CTCAATGTTGTTGCCGCTGT	

601 GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HPRT1, hypoxanthine
602 phosphoribosyltransferase 1; IFN- γ , interferon gamma; Mx, Mx Dynamin Like
603 GTPase; RPL4/30, ribosomal protein L4/L30; F, forward; R, reverse
604

REFERENCES

1. Lee D-H, Criado MF, Swayne DE. Pathobiological Origins and Evolutionary History of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021;11. doi:10.1101/cshperspect.a038679
2. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), More S, Bicout D, Bøtner A, Butterworth A, Calistri P, et al. Avian influenza. *EFSA J.* 2017;15: e04991. doi:10.2903/j.efsa.2017.4991
3. Böttcher-Friebertshäuser E, Garten W, Matrosovich M, Klenk HD. The Hemagglutinin: A Determinant of Pathogenicity. In: Compans RW, Oldstone MBA, editors. *Influenza Pathogenesis and Control - Volume I.* Cham: Springer International Publishing; 2014. pp. 3–34. doi:10.1007/82_2014_384
4. Abdelwhab E-SM, Veits J, Mettenleiter TC. Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry. *Virulence.* 2013;4: 441–452. doi:10.4161/viru.25710
5. Richard M, Fouchier R, Monne I, Kuiken T. Mechanisms and risk factors for mutation from low to highly pathogenic avian influenza virus. *EFSA Supporting Publications.* 2017;14: 1287E. doi:10.2903/sp.efsa.2017.EN-1287
6. McCrone JT, Lauring AS. Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission. *Current Opinion in Virology.* 2018;28: 20–25. doi:10.1016/j.coviro.2017.10.008
7. Hughes J, Allen RC, Baguelin M, Hampson K, Baillie GJ, Elton D, et al. Transmission of Equine Influenza Virus during an Outbreak Is Characterized by Frequent Mixed Infections and Loose Transmission Bottlenecks. *PLOS Pathogens.* 2012;8: e1003081. doi:10.1371/journal.ppat.1003081
8. Varble A, Albrecht RA, Backes S, Crumiller M, Bouvier NM, Sachs D, et al. Influenza A Virus Transmission Bottlenecks Are Defined by Infection Route and Recipient Host. *Cell Host & Microbe.* 2014;16: 691–700. doi:10.1016/j.chom.2014.09.020
9. Bodewes R, Kuiken T. Changing Role of Wild Birds in the Epidemiology of Avian Influenza A Viruses. *Adv Virus Res.* 2018;100: 279–307. doi:10.1016/bs.aivir.2017.10.007
10. Wahlgren J. Influenza A viruses: an ecology review. *Infect Ecol Epidemiol.* 2011;1. doi:10.3402/iee.v1i0.6004
11. Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, et al. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLOS Pathog.* 2007;3: e61. doi:10.1371/journal.ppat.0030061
12. van Dijk JG, Verhagen JH, Wille M, Waldenström J. Host and virus ecology as determinants of influenza A virus transmission in wild birds. *Curr Opin Virol.* 2018;28: 26–36. doi:10.1016/j.coviro.2017.10.006
13. Guinat C, Nicolas G, Vergne T, Bronner A, Durand B, Courcoul A, et al. Spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 spread, France, 2016

- 644 to 2017. *Eurosurveillance*. 2018;23: 1700791. doi:10.2807/1560-
645 7917.ES.2018.23.26.1700791
- 646 14. More S, Bicot D, Bøtner A, Butterworth A, Calistri P, Depner K, et al. Urgent request on
647 avian influenza. *EFSA Journal*. 2017;15: e04687.
648 doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4687>
- 649 15. Grund C, Hoffmann D, Ulrich R, Naguib M, Schinköthe J, Hoffmann B, et al. A novel
650 European H5N8 influenza A virus has increased virulence in ducks but low zoonotic
651 potential. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7: 132. doi:10.1038/s41426-018-0130-1
- 652 16. Kleyheeg E, Slaterus R, Bodewes R, Rijks JM, Spierenburg MAH, Beerens N, et al. Deaths
653 among Wild Birds during Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Outbreak,
654 the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2017;23: 2050–2054. doi:10.3201/eid2312.171086
- 655 17. Hiono T, Okamatsu M, Igarashi M, McBride R, de Vries RP, Peng W, et al. Amino acid
656 residues at positions 222 and 227 of the hemagglutinin together with the
657 neuraminidase determine binding of H5 avian influenza viruses to sialyl Lewis X. *Arch*
658 *Viol*. 2016;161: 307–316. doi:10.1007/s00705-015-2660-3
- 659 18. Li S, Bai S, Qin X, Zhang J, Irwin DM, Zhang S, et al. Comparison of whole embryonic
660 development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the
661 chicken (*Gallus gallus*). *Poultry Science*. 2019;98: 3278–3291. doi:10.3382/ps/pez133
- 662 19. Leyson C, Youk S-S, Smith D, Dimitrov K, Lee D-H, Larsen LE, et al. Pathogenicity and
663 genomic changes of a 2016 European H5N8 highly pathogenic avian influenza virus
664 (clade 2.3.4.4) in experimentally infected mallards and chickens. *Virology*. 2019;537:
665 172–185. doi:10.1016/j.virol.2019.08.020
- 666 20. Holzinger D, Jorns C, Stertz S, Boisson-Dupuis S, Thimme R, Weidmann M, et al.
667 Induction of MxA Gene Expression by Influenza A Virus Requires Type I or Type III
668 Interferon Signaling. *Journal of Virology*. 2007;81: 7776–7785. doi:10.1128/JVI.00546-
669 06
- 670 21. Baccam P, Beauchemin C, Macken CA, Hayden FG, Perelson AS. Kinetics of Influenza A
671 Virus Infection in Humans. *Journal of Virology*. 2006;80: 7590–7599.
672 doi:10.1128/JVI.01623-05
- 673 22. Soubies SM, Hoffmann TW, Croville G, Larcher T, Ledevin M, Soubieux D, et al. Deletion
674 of the C-terminal ESEV domain of NS1 does not affect the replication of a low-
675 pathogenic avian influenza virus H7N1 in ducks and chickens. *J Gen Virol*. 2013;94: 50–
676 58. doi:10.1099/vir.0.045153-0
- 677 23. Volmer C, Soubies SM, Grenier B, Guérin J-L, Volmer R. Immune response in the duck
678 intestine following infection with low-pathogenic avian influenza viruses or stimulation
679 with a Toll-like receptor 7 agonist administered orally. *J Gen Virol*. 2011;92: 534–543.
680 doi:10.1099/vir.0.026443-0
- 681 24. Hagenaars TJ, Fischer E a. J, Jansen CA, Rebel JMJ, Spekrijse D, Vervelde L, et al.
682 Modelling the Innate Immune Response against Avian Influenza Virus in Chicken. *PLOS*
683 *ONE*. 2016;11: e0157816. doi:10.1371/journal.pone.0157816

- 684 25. Kumar N, Sharma S, Barua S, Tripathi BN, Rouse BT. Virological and Immunological
685 Outcomes of Coinfections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018;31.
686 doi:10.1128/CMR.00111-17
- 687 26. DaPalma T, Doonan BP, Trager NM, Kasman LM. A systematic approach to virus–virus
688 interactions. *Virus Research*. 2010;149: 1–9. doi:10.1016/j.virusres.2010.01.002
- 689 27. Opatowski L, Baguelin M, Eggo RM. Influenza interaction with cocirculating pathogens
690 and its impact on surveillance, pathogenesis, and epidemic profile: A key role for
691 mathematical modelling. *PLOS Pathogens*. 2018;14: e1006770.
692 doi:10.1371/journal.ppat.1006770
- 693 28. Phipps KL, Ganti K, Jacobs NT, Lee C-Y, Carnaccini S, White MC, et al. Collective
694 interactions augment influenza A virus replication in a host-dependent manner. *Nat*
695 *Microbiol*. 2020;5: 1158–1169. doi:10.1038/s41564-020-0749-2
- 696 29. Andreu-Moreno I, Bou J-V, Sanjuán R. Cooperative nature of viral replication. *Sci Adv*.
697 2020;6. doi:10.1126/sciadv.abd4942
- 698 30. Bou J-V, Geller R, Sanjuán R. Membrane-Associated Enteroviruses Undergo Intercellular
699 Transmission as Pools of Sibling Viral Genomes. *Cell Rep*. 2019;29: 714–723.e4.
700 doi:10.1016/j.celrep.2019.09.014
- 701 31. Domingo-Calap P, Segredo-Otero E, Durán-Moreno M, Sanjuán R. Social evolution of
702 innate immunity evasion in a virus. *Nat Microbiol*. 2019;4: 1006–1013.
703 doi:10.1038/s41564-019-0379-8
- 704 32. Brooke CB. Population Diversity and Collective Interactions during Influenza Virus
705 Infection. *Journal of Virology*. 2017;91. doi:10.1128/JVI.01164-17
- 706 33. Kuchipudi SV, Tellabati M, Sebastian S, Londt BZ, Jansen C, Vervelde L, et al. Highly
707 pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with
708 elevated host immune and pro-inflammatory responses. *Vet Res*. 2014;45: 118.
709 doi:10.1186/s13567-014-0118-3
- 710 34. Cornelissen JBWJ, Vervelde L, Post J, Rebel JMJ. Differences in highly pathogenic avian
711 influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens
712 and ducks. *Avian Pathol*. 2013;42: 347–364. doi:10.1080/03079457.2013.807325
- 713 35. Cornelissen JBWJ, Post J, Peeters B, Vervelde L, Rebel JMJ. Differential innate responses
714 of chickens and ducks to low-pathogenic avian influenza. *Avian Pathol*. 2012;41: 519–
715 529. doi:10.1080/03079457.2012.732691
- 716 36. Burggraaf S, Karpala AJ, Bingham J, Lowther S, Selleck P, Kimpton W, et al. H5N1
717 infection causes rapid mortality and high cytokine levels in chickens compared to
718 ducks. *Virus Res*. 2014;185: 23–31. doi:10.1016/j.virusres.2014.03.012
- 719 37. Barber MRW, Aldridge JR, Webster RG, Magor KE. Association of RIG-I with innate
720 immunity of ducks to influenza. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107: 5913–5918.
721 doi:10.1073/pnas.1001755107

- 722 38. Magor KE, Miranzo Navarro D, Barber MRW, Petkau K, Fleming-Canepa X, Blyth GAD, et
723 al. Defense genes missing from the flight division. *Developmental & Comparative*
724 *Immunology*. 2013;41: 377–388. doi:10.1016/j.dci.2013.04.010
- 725 39. Zwart MP, Elena SF. Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their
726 Potential Impact on Evolution. *Annu Rev Virol*. 2015;2: 161–179. doi:10.1146/annurev-
727 virology-100114-055135
- 728 40. Kuss SK, Etheredge CA, Pfeiffer JK. Multiple host barriers restrict poliovirus trafficking in
729 mice. *PLoS Pathog*. 2008;4: e1000082. doi:10.1371/journal.ppat.1000082
- 730 41. Graaf A, Ulrich R, Maksimov P, Scheibner D, Koethe S, Abdelwhab EM, et al. A viral race
731 for primacy: co-infection of a natural pair of low and highly pathogenic H7N7 avian
732 influenza viruses in chickens and embryonated chicken eggs. *Emerg Microbes Infect*.
733 2018;7: 204. doi:10.1038/s41426-018-0204-0
- 734 42. Poultry species | Gateway to poultry production and products | Food and Agriculture
735 Organization of the United Nations. [cited 9 Mar 2021]. Available:
736 <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/poultry-species/en/>
- 737 43. Dhingra MS, Artois J, Dellicour S, Lemey P, Dauphin G, Von Dobschuetz S, et al.
738 Geographical and Historical Patterns in the Emergences of Novel Highly Pathogenic
739 Avian Influenza (HPAI) H5 and H7 Viruses in Poultry. *Front Vet Sci*. 2018;5.
740 doi:10.3389/fvets.2018.00084
- 741 44. M.c JD, A S, Der GJV, G K. Intra- and interspecies transmission of H7N7 highly pathogenic
742 avian influenza virus during the avian influenza epidemic in the Netherlands in 2003.
743 2009;28: 333–340. doi:10.20506/rst.28.1.1859
- 744 45. Capua I, Marangon S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. *Avian*
745 *Pathol*. 2000;29: 289–294. doi:10.1080/03079450050118403
- 746 46. Organization WH. Addressing ethical issues in pandemic influenza planning: discussion
747 papers. World Health Organization; 2008.
- 748 47. Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system
749 for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*.
750 2000;97: 6108–6113. doi:10.1073/pnas.100133697
- 751 48. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. Universal primer set for the full-
752 length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*. 2001;146: 2275–2289.
- 753 49. Garrido D, Chanteloup NK, Trottereau A, Lion A, Bailleul G, Esnault E, et al.
754 Characterization of the Phospholipid Platelet-Activating Factor As a Mediator of
755 Inflammation in Chickens. *Front Vet Sci*. 2017;4. doi:10.3389/fvets.2017.00226
- 756 50. Figueroa T, Boumart I, Coupeau D, Rasschaert D. Hyperediting by ADAR1 of a new
757 herpesvirus lncRNA during the lytic phase of the oncogenic Marek's disease virus.
758 *Journal of General Virology*,. 2016;97: 2973–2988. doi:10.1099/jgv.0.000606
- 759 51. Brisbin JT, Gong J, Parvizi P, Sharif S. Effects of lactobacilli on cytokine expression by
760 chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17: 1337–1343.
761 doi:10.1128/CVI.00143-10

762 52. James J, Smith N, Ross C, Iqbal M, Goodbourn S, Digard P, et al. The cellular localization
 763 of avian influenza virus PB1-F2 protein alters the magnitude of IFN2 promoter and
 764 NFkB-dependent promoter antagonism in chicken cells. Journal of General Virology,.
 765 2019;100: 414–430. doi:10.1099/jgv.0.001220

766

767

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-Luc Guérin, Marie Souvestre and Luc Robertet (Ecole nationale vétérinaire de Toulouse) for providing clinical samples that enabled the isolation of the A/mulard duck/France/171201g/2017 (H5N8) virus. This work was funded by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE35-0005-01) to RV. PB was supported by a Ph.D. scholarship funded by the Region Occitanie (France) and by the Chaire de Biosécurité at the École Nationale Vétérinaire de Toulouse (French Ministry of Agriculture). MFB and GD are supported by PhD scholarships funded by the French Ministry of Research and Education.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.B., T.F. and R.V. conceptualized and designed experiments. P.B., T.F., A.C., C.F.L., A.H., M.F.B., G.D., M.D. and R.V. performed experiments. P.B., T.F. and R.V. analysed data. R.V. acquired funding. P.B. and R.V drafted the manuscript. All authors reviewed and edited the final manuscript before submission.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

MATERIALS & CORRESPONDANCE

Correspondence and material requests should be addressed to Romain Volmer (romain.volmer@envt.fr).

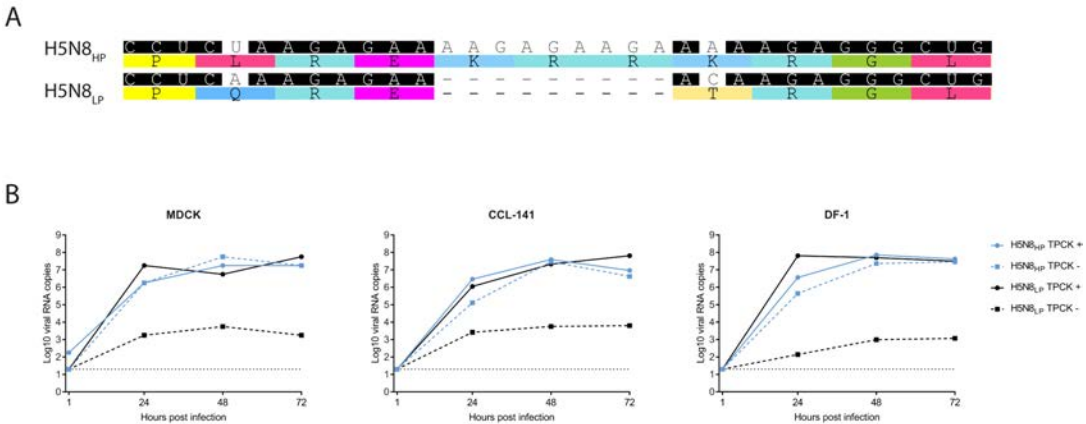


Fig. 1. Characterization of H5N8_{HP} and H5N8_{LP} viruses in cell culture. (A) Sequence alignment of H5N8_{HP} and H5N8_{LP} HA cleavage sites. **(B)** H5N8_{HP} and H5N8_{LP} growth kinetics in the absence or presence of exogenous trypsin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, DF-1 cells and CCL-141 cells. Cells were infected at a MOI of 10⁻⁵ TCID₅₀. HA RNA load was analyzed by RT-qPCR using primers common to H5N8_{HP} and H5N8_{LP}. The dotted line represents the limit of detection for each experiment. Results are representative of an experiment performed three times.

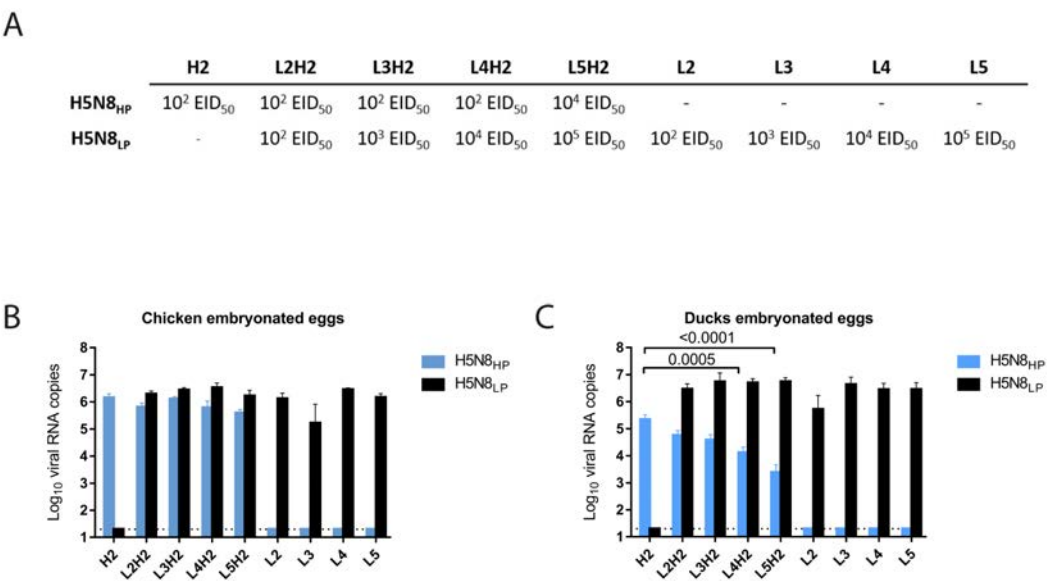


Fig. 2. H5N8_{HP} has a stronger advantage over H5N8_{LP} in embryonated chicken eggs than in embryonated duck eggs. (A) EID₅₀ doses used in the *in ovo* experiments. **(B-C)** Chicken **(B)** and duck **(C)** embryonated eggs were infected in the allantoic cavity either with H5N8_{HP} or H5N8_{LP} alone, or with a combination of both. Following a 24 hours incubation at 37°C, viral RNA was extracted from the allantoic fluid and HA levels were determined by RT-qPCR using H5N8_{HP} or H5N8_{LP} specific primers. Statistical analysis: chicken embryonated eggs: n=9 (experiment performed twice); duck embryonated eggs: n=26 (experiment performed three times); one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are expressed as means ± SEM. The dotted line represents the limit of detection for each experiment.

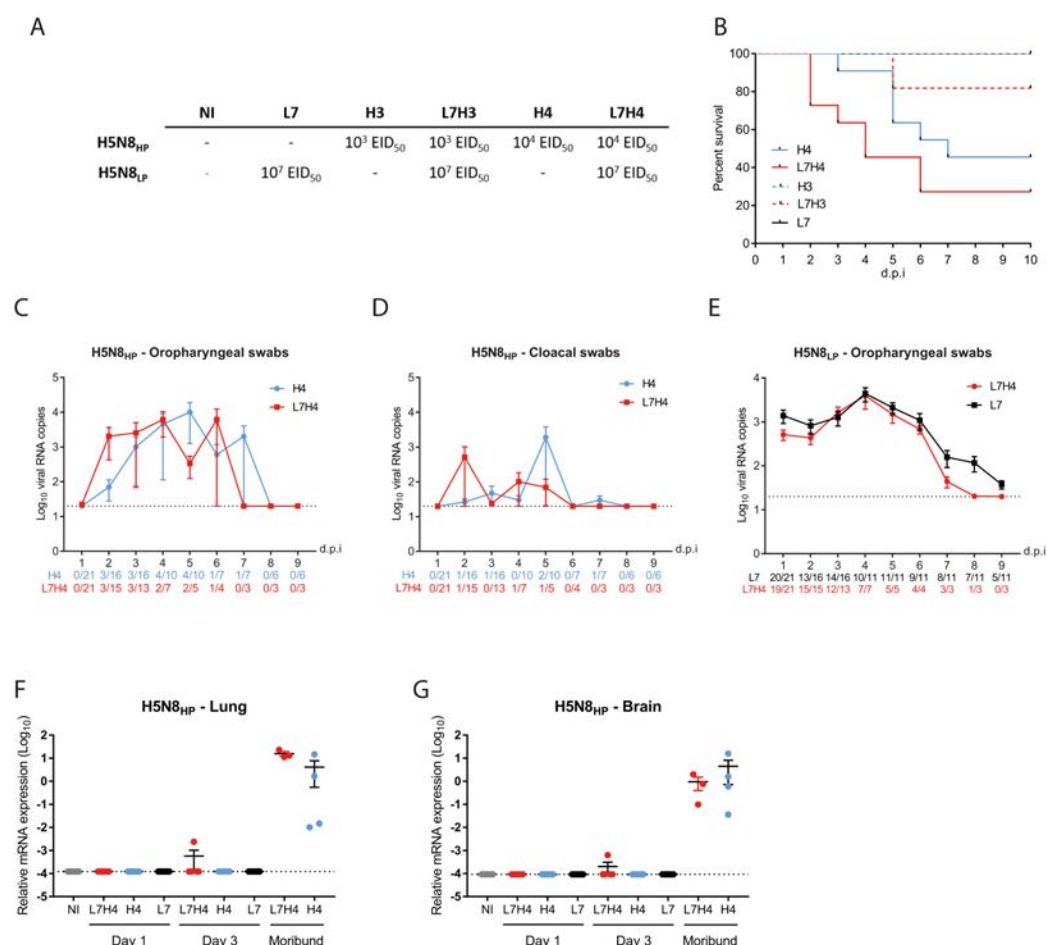


Fig. 3. H5N8_{HP} and H5N8_{LP} coinfection in chickens results in increased pathogenesis. Chickens were inoculated via the choanal route with H5N8_{LP} alone (L7), H5N8_{HP} alone (H3 and H4) or with a combination of H5N8_{LP} and H5N8_{HP} (L7H3 and L7H4). **(A)** EID₅₀ doses used in the *in vivo* chicken experiments. **(B)** Survival curves. Statistical analysis: Log-rank (Mantel-Cox) test. **(C-E)** Viral shedding was analyzed by quantifying HA RNA levels by RT-qPCR using H5N8_{HP} specific primers from RNA extracted from oropharyngeal swabs **(C)** and cloacal swabs **(D)** or by RT-qPCR using H5N8_{LP} specific primers from RNA extracted from oropharyngeal swabs **(E)**. Numbers of H5N8_{HP} or H5N8_{LP} swab-positive animals are indicated below each time point. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney test. Results are expressed as means $\pm$ SEM. The dotted line represents the limit of detection. **(F-G)** H5N8_{HP} load was analyzed from total RNA extracted from the lungs **(F)** and the brain **(G)** using H5N8_{HP} specific primers. HA RNA levels were normalized using the 2^{- Δ Ct} method. Statistical analysis:

one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are expressed as means $\pm$ SEM. The dotted line represents the limit of detection. dpi, days post-infection.

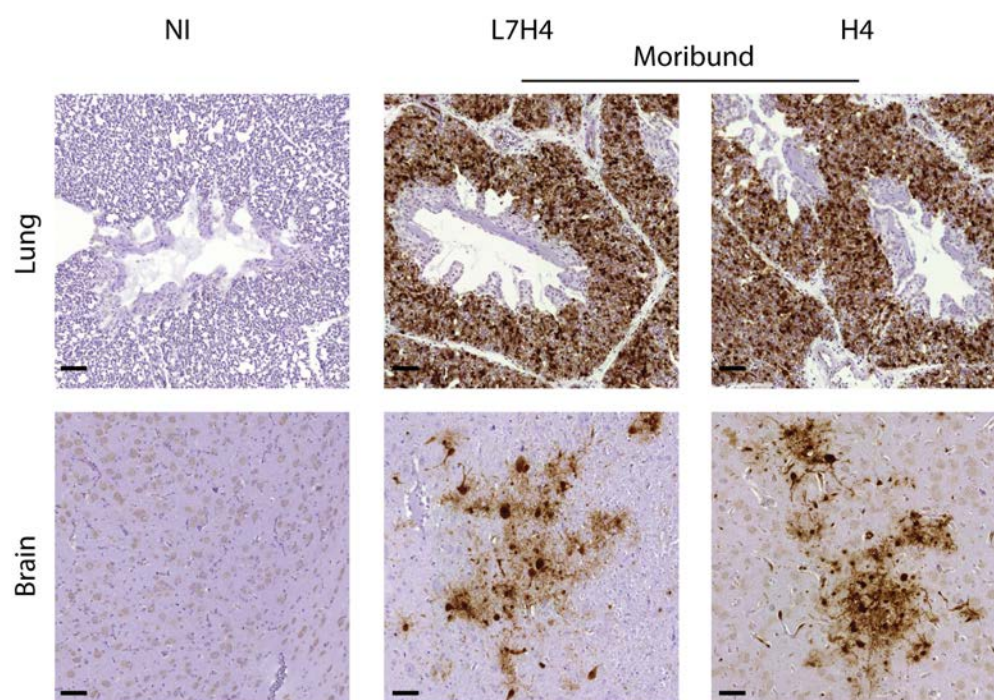


Fig. 4. Immunohistochemical anti-NP staining of hematoxylin-counterstained chickens lung or brain sections. Analysis was performed on non-infected (NI) and moribund chickens. Scale bar, 50 μ m.

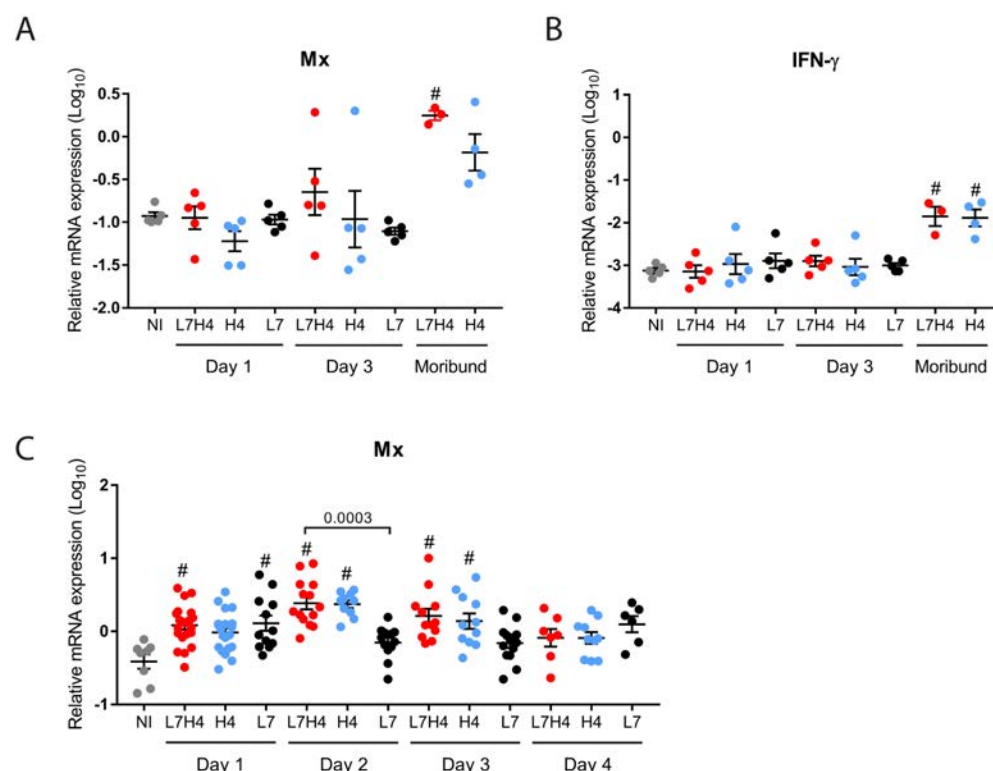


Fig. 5. Mx and IFN-γ mRNA expression following chickens infection. (A-B) mRNA expression levels of Mx **(A)** and IFN-γ **(B)** determined by RT-qPCR performed on lung total RNA. **(C)** mRNA expression levels of Mx determined by RT-qPCR performed on RNA extracted from oropharyngeal swabs. mRNA levels were normalized using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Statistical analysis: one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are expressed as means $\pm$ SEM. #, $p < 0.05$ compared to non-infected (NI) animals.

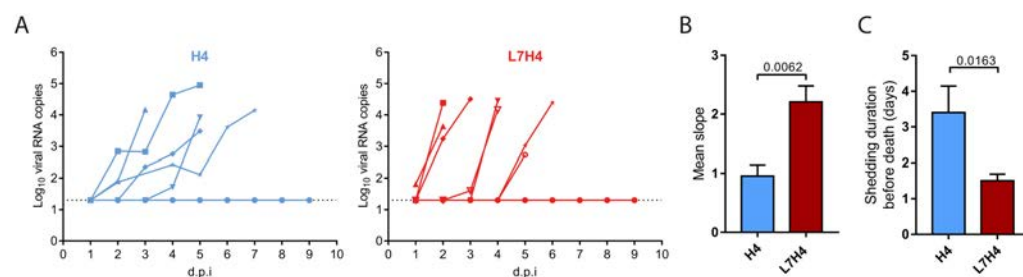


Fig. 6. H5N8_{HP} and H5N8_{LP} coinfection in chickens results in higher H5N8_{HP} growth. (A) Individual H5N8_{HP} oropharyngeal shedding curves in H4 chickens (blue lines) and L7H4 chickens (red lines). Each curve corresponds to a single animal from the onset of H5N8_{HP} excretion to death. **(B)** The slopes of individual H5N8_{HP} excretion curves were calculated. **(C)** H5N8_{HP} shedding duration: number of days where chickens were H5N8_{HP} oropharyngeal swab-positive. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney test. Results are expressed as means $\pm$ SEM. The dotted line corresponds to the limit of detection. dpi, days post-infection.

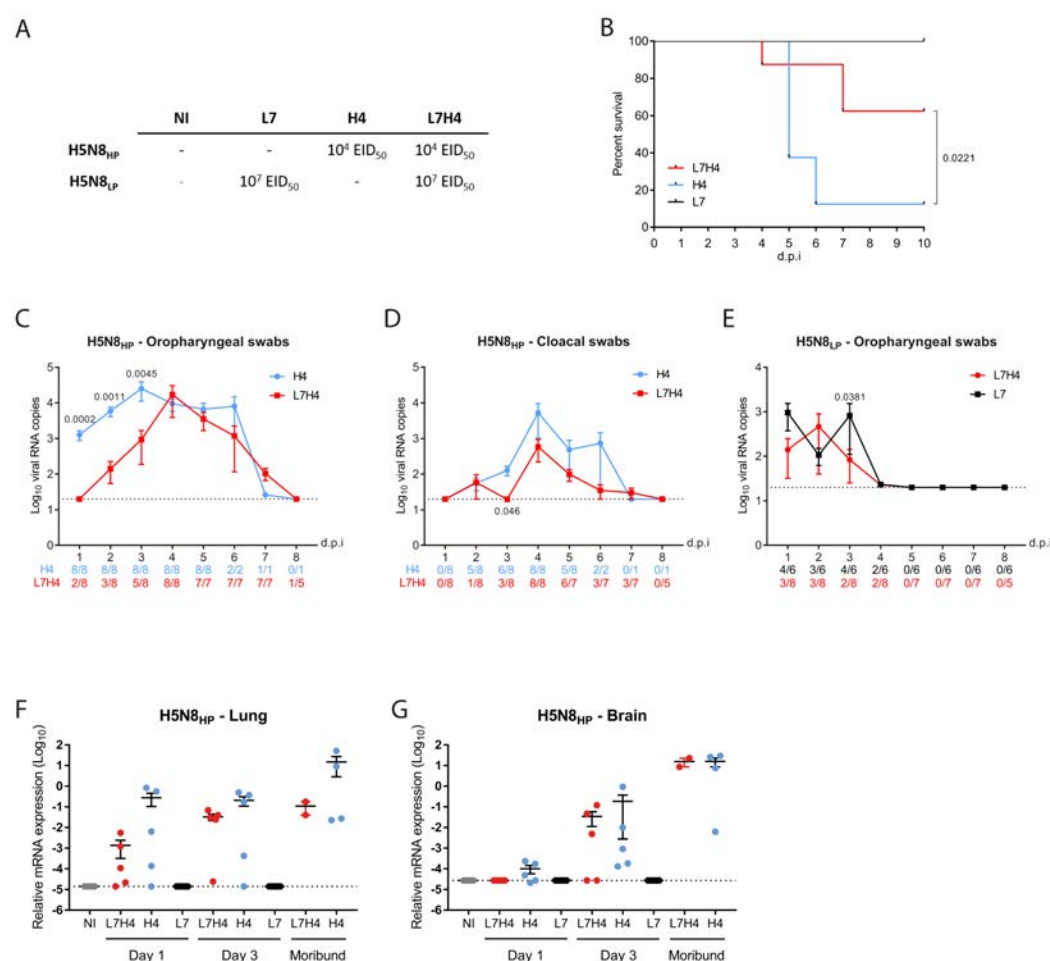


Fig. 7. H5N8_{HP} and H5N8_{LP} coinfection in ducks results in decreased pathogenesis. Ducks were inoculated via the choanal route with H5N8_{LP} alone (L7), H5N8_{HP} alone (H4) or with a combination of H5N8_{LP} and H5N8_{HP} (L7H4). **(A)** EID₅₀ doses used in the *in vivo* duck experiments. **(B)** Survival curves. Statistical analysis: Log-rank (Mantel-Cox) test. **(C-E)** Viral shedding was analyzed by quantifying HA RNA levels by RT-qPCR using H5N8_{HP} specific primers from RNA extracted from oropharyngeal swabs **(C)** and cloacal swabs **(D)** or by RT-qPCR using H5N8_{LP} specific primers from RNA extracted from oropharyngeal swabs **(E)**. Numbers of H5N8_{HP} or H5N8_{LP} swab-positive animals are indicated below each time point. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney test. Results are expressed as means $\pm$ SEM. The dotted line represents the limit of detection. **(F-G)** H5N8_{HP} load was analyzed from total RNA extracted from the lungs **(F)** and the brain **(G)** using H5N8_{HP} specific primers. HA RNA levels were

normalized using the $2^{-\Delta C_t}$ method. Statistical analysis: one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are expressed as means $\pm$ SEM. The dotted line represents the limit of detection. dpi, days post-infection.

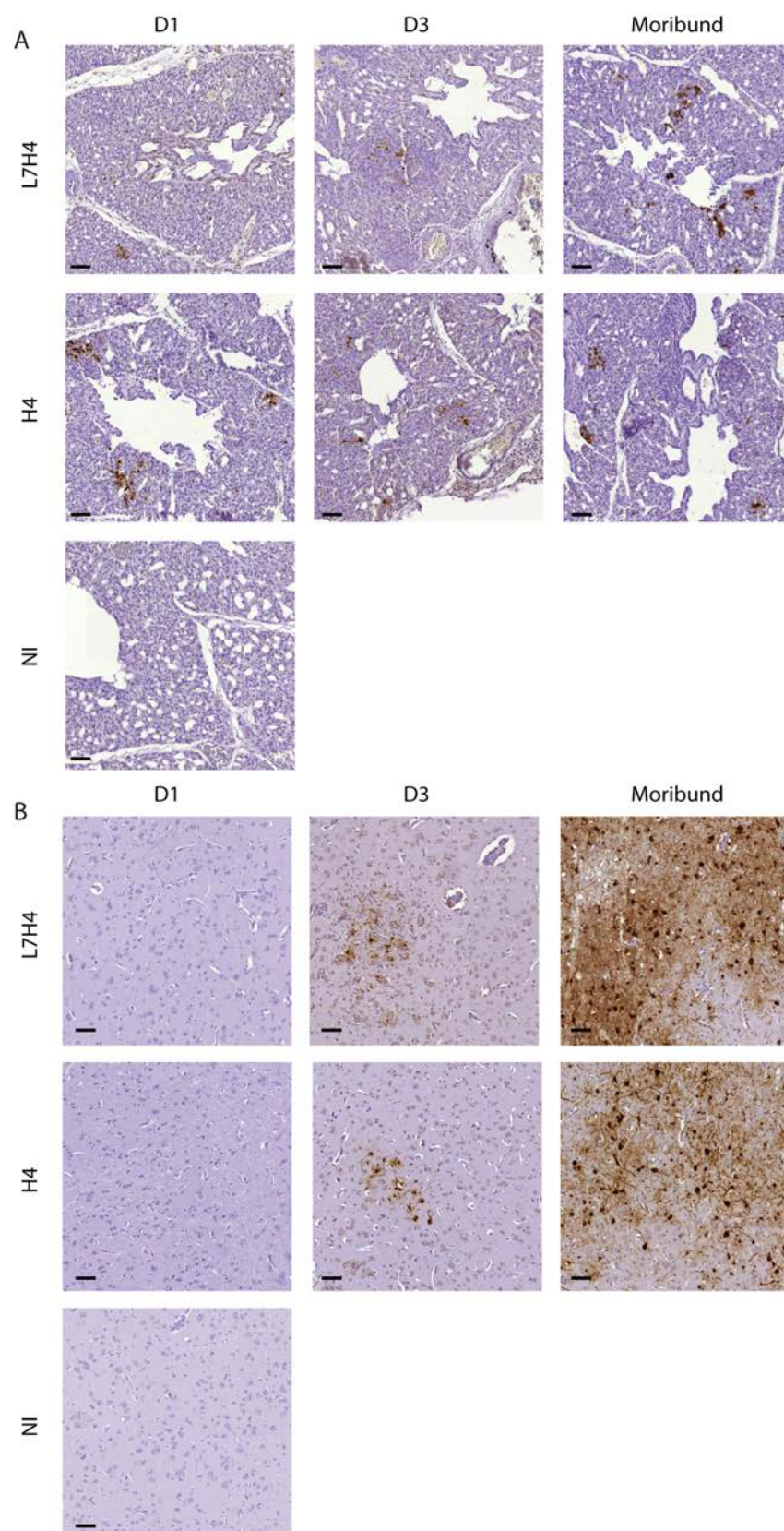


Fig. 8. Immunohistochemical anti-NP staining of hematoxylin-counterstained ducks lung or brain sections. Analysis was performed on

ducks necropsied at 1 (D1) and 3 days (D3) post infection, moribund ducks
and non-infected (NI) ducks. **(A)** Lung. **(B)** Brain. Scale bar, 50 μ m.

801

802

803

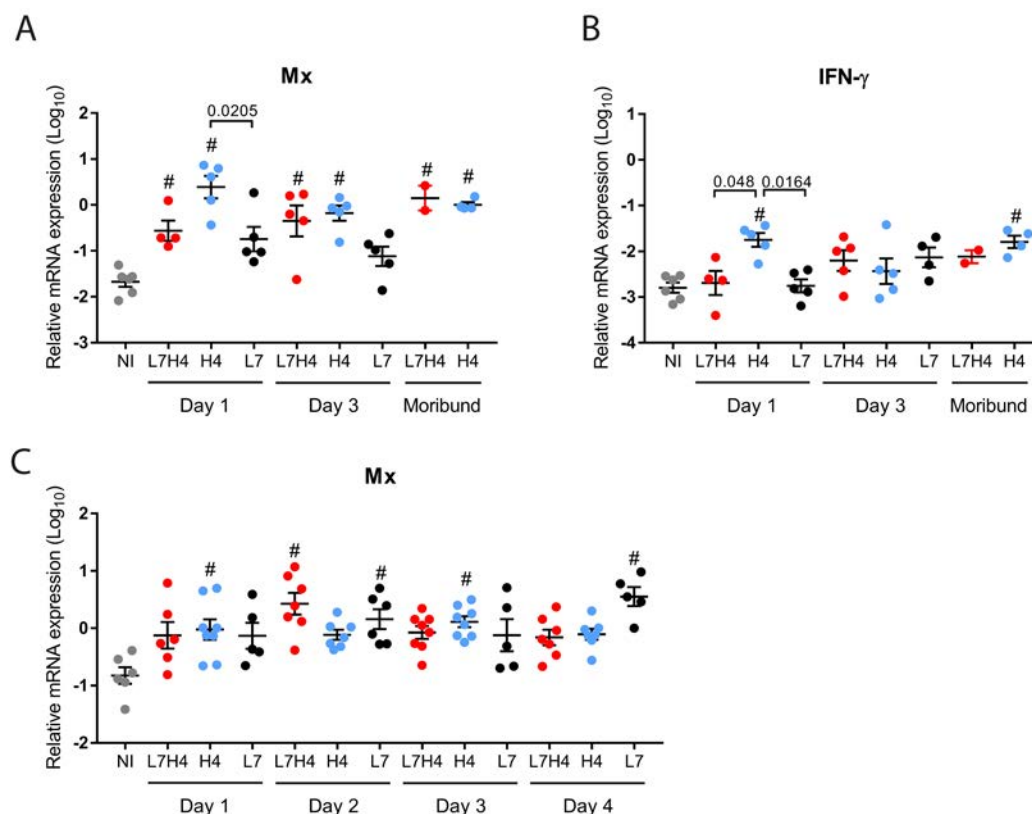


Fig. 9. Mx and IFN-γ mRNA expression following infection in ducks. (A-B) mRNA expression levels of Mx **(A)** and IFN-γ **(B)** determined by RT-qPCR performed on lung total RNA. **(C)** mRNA expression levels of Mx determined by RT-qPCR performed on RNA extracted from oropharyngeal swabs. mRNA levels were normalized using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Statistical analysis: one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Results are expressed as means $\pm$ SEM. #, $p < 0.05$ compared to non-infected (NI) animals.

804

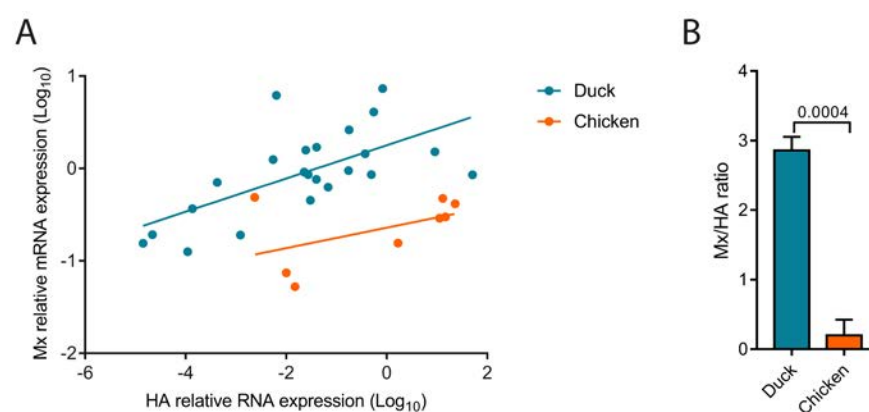


Fig. 10. Ducks mount a more potent antiviral innate immune response compared to chickens. (A) Correlation between Mx mRNA levels and viral RNA levels in the lungs. **(B)** Mean Mx/HA ratios. Mx mRNA and HA RNA levels were normalized using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Statistical analysis: two-tailed Mann-Whitney test. Results are expressed as means $\pm$ SEM.

IV. Discussion

La bonne gestion des épizooties à virus influenza aviaires hautement pathogènes est à la fois un enjeu économique et un enjeu de santé publique. Économique, car la production mondiale de volailles surpasse de loin celle des autres espèces domestiques. La France est par exemple un des plus grands producteurs mondiaux de volailles et était, en 2020, le quatrième plus grand producteur d'Europe, avec une production avoisinant le milliard d'oiseaux par an (Eurostat, 2021). L'épizootie à VIAHP H5N8 ayant frappé le sud du pays au cours de l'hiver 2016-2017 a eu impact financier et social particulièrement important, avec l'abattage de 6,8 millions de volailles (Guinat et al., 2018) et les conséquences de celle de l'hiver 2020-2021 seront probablement tout aussi importantes. Au cours de ces deux épizooties, des mesures drastiques ont été mises en place pour contenir la propagation virale, comme le confinement des animaux ou l'abattage préventif des oiseaux élevés jusque dans les 10 kilomètres autour des foyers connus. Ces mesures n'ont toutefois pas été suffisantes et les épizooties ont continué de progresser, montrant à quel point limiter la circulation virale dans une région avec une grande densité d'élevages était difficile.

Au-delà de ces considérations économiques, les virus influenza représentent une menace pour la santé publique, du fait de leur caractère zoonotique. Les infections humaines par des virus d'origine aviaire restent rares, mais sont souvent fatales. Par exemple, l'infection en 1997 par un VIAHP H5N1 de 18 personnes à Hong-Kong a résulté en la mort de 6 d'entre elles (Peiris et al., 2004). Des éléments récents laissent entendre que les virus H5N8 de clade 2.3.4.4b soit également zoonotiques, mais les quelques personnes à avoir été infectées n'ont pas présenté de symptôme (Pyankova et al., 2021). Si un virus d'origine aviaire parvenait à être suffisamment adapté à l'homme pour qu'une transmission interhumaine soit possible, cela pourrait résulter en une pandémie particulièrement grave. Mieux maîtriser les épizooties à virus influenza aviaires chez les oiseaux domestiques revient à réduire le risque qu'un virus franchisse la barrière d'espèce et soit capable d'infecter l'homme (Peiris et al., 2016).

Pour toutes ces raisons, la meilleure connaissance de l'émergence et de la propagation des VIAHP revêt un intérêt majeur. Comme expliqué précédemment, l'émergence d'un VIAHP passe par deux étapes et, à ce jour, ne concerne que les virus de sous-types H5 et H7. La première étape consiste en l'acquisition d'un site de clivage polybasique, par des substitutions

ou insertions nucléotides, ou par des phénomènes de recombinaison. Toutefois, pour que le VIAHP nouvellement formé puisse réellement émerger et être transmis à d'autres individus, une deuxième étape est nécessaire : la capacité à devenir un des variants majoritaires de la quasi espèce virale. Le VIAHP se répliquant en parallèle de son précurseur VIAFP, un phénomène de compétition au sein de l'hôte peut intervenir et causer l'extinction du VIAHP avant qu'il ne soit transmis à d'autres hôtes.

Les travaux de ce projet de thèse se sont intéressés à cette deuxième étape et ont été divisés en deux grandes parties : (i) étudier le rôle régulateur du microbiote sur la réplication d'un VIAHP chez le canard ; (ii) étudier l'influence de l'espèce hôte sur la capacité d'un VIAHP à devenir un des variants majoritaires lorsque le VIAFP précurseur est toujours présent en quantités importantes. Des prélèvements réalisés sur le terrain ont été utilisés pour isoler les virus A/Guinea Fowl/France/129/2015 (H5N9) et A/mulard duck/France/171201g/2017 (H5N8). Si le virus H5N9 a été utilisé dans la première partie de ces travaux de thèse, c'est parce que nous voulions mieux comprendre sa pathogénicité chez le canard et notamment déterminer si la présence d'un microbiote sain contribuait à l'absence de signes cliniques en cas d'infection, la majeure partie des infections naturelles étant asymptomatiques (Briand et al., 2018). Au grand désarroi de l'équipe, la culture du H5N9 sur cellules s'est révélée infructueuse, le virus ne se multipliant correctement qu'*in ovo* et *in vivo* dans notre laboratoire, ce qui n'était pas le cas du H5N8. L'absence de réplication en culture cellulaire était un paramètre rédhibitoire pour la suite des expériences. En effet, nous voulions modifier la séquence nucléotidique du site de clivage de l'hémagglutinine par mutagenèse dirigée, afin d'obtenir un site de clivage monobasique, et générer le virus mutant par génétique inverse, ce qui aurait été impossible à réaliser sur un virus ne se multipliant pas *in vitro*. Ainsi, le H5N9 n'a plus été utilisé et a été remplacé par le H5N8 pour la suite des expériences.

A. Le microbiote : une barrière à l'émergence des VIAHP

Au cours de ces dernières années, les recherches autour du microbiote au sens large se sont particulièrement développées. Alors que les bactéries étaient autrefois uniquement considérées comme des agents pathogènes, on sait désormais que les bactéries commensales jouent un rôle majeur dans la physiologie animale, de par la production de vitamines, la digestion des aliments ou encore la régulation de la réponse immunitaire (Kau et al., 2011;

Maslowski and Mackay, 2011; Thaïss et al., 2016). Si le rôle régulateur du microbiote sur la réplication des virus influenza a été établi chez la souris (Abt et al., 2012) et plus récemment chez le poulet (Yitbarek et al., 2018c), il ne l'avait encore jamais été chez le canard, ni en ce qui concerne les VIAHP. Nous avons montré qu'en déstabilisant sévèrement le microbiote des canards avec un traitement antibiotique à large spectre, la réplication virale était significativement augmentée dans l'intestin, cela étant corrélé à une diminution de la réponse immunitaire innée dans ce même organe. Si les autres études chez le poulet et la souris sont arrivées aux mêmes conclusions en ce qui concerne l'intestin, elles ont également trouvé des résultats similaires dans l'appareil respiratoire. Dans notre cas, l'excrétion virale trachéale du VIAHP H5N9 était équivalente chez les canards traités aux antibiotiques et les canards non traités. Cette différence pourrait être propre à la souche virale utilisée ou propre aux canards – des investigations plus approfondies seraient nécessaires pour le démontrer. Si les VIAHP peuvent provoquer une symptomatologie sévère chez les poulets, avec des taux de mortalité importants, ce n'est pas habituellement le cas chez les canards, possiblement parce que ces derniers mettent en place une réponse immunitaire antivirale précoce et modérée (Pantin-Jackwood and Swayne, 2009). Ici, malgré la diminution de la réponse interféron et l'augmentation de la réplication virale, les animaux dont le microbiote a été déstabilisé n'ont pas présenté de signes cliniques.

Ainsi, en contribuant au contrôle de la réplication virale, un microbiote intègre permet de limiter l'excrétion et la transmission virales, et constitue donc une barrière à l'émergence de VIAHP. Or, le microbiote est une entité relativement fragile, pouvant être déstabilisée par plusieurs facteurs. Un de ces derniers est les traitements antibiotiques, couramment utilisés en élevage en cas de maladie bactérienne. Dans notre étude, les molécules utilisées n'étaient absolument pas représentatives des traitements recommandés classiquement en médecine vétérinaire – certaines étant d'ailleurs réservées à l'usage hospitalier. Notre but était d'éradiquer le plus possible les bactéries commensales et non pas de se rapprocher des pratiques observées sur le terrain. Toutefois, il est fort probable que l'administration pendant quelques jours d'un antibiotique à usage vétérinaire, comme par exemple l'ampicilline, ait un impact néfaste sur le microbiote et puisse profiter à la réplication virale, si un virus influenza venait à infecter l'élevage. Bien que cela n'ait encore jamais été investigué chez le poulet ou le canard, une étude chez la souris a montré qu'un traitement à l'ampicilline, sans surdosage,

par voie orale et de seulement trois jours, suffisait à augmenter la sensibilité à l'infection par le virus West-Nile (Thackray et al., 2018). On peut donc supposer que cela soit vrai également chez les oiseaux d'élevage. Quand bien même un traitement antibiotique aurait un impact minime sur le microbiote et ses capacités régulatrices, à l'échelle de l'élevage entier, l'augmentation de l'excrétion virale suite à une infection par un VIAHP pourrait être significative. La possibilité d'avoir recours aux antibiotiques en élevage reste malgré tout indispensable, à la fois pour des considérations économiques et pour le bien-être animal. Toutefois, la mise en place d'un tel traitement devrait toujours être réfléchie et les molécules à spectre étroit privilégiées, non seulement pour limiter l'apparition de bactéries résistantes, mais également pour limiter l'impact sur les bactéries commensales. L'utilisation des antibiotiques pourrait augmenter de 67% d'ici 2030, du fait d'une augmentation de la demande en viande dans les pays en développement (Boeckel et al., 2015). Des études plus approfondies sur l'impact des traitements classiquement utilisés en élevages avicoles sur la circulation des virus influenza seront les bienvenues.

Un autre paramètre ayant un impact majeur sur la richesse et la composition du microbiote est l'alimentation. Si les études sont rares chez le poulet et le canard, elles sont abondantes chez la souris. Une méta-analyse a montré en 2019 qu'un régime riche en graisses induisait des changements dans la composition du microbiote murin et ce de manière reproductible et réversible (Bisanz et al., 2019). La nature de la ration alimentaire influe sur la présence de bactéries responsables de la production d'acides gras à courte chaîne (Duncan et al., 2007), connus pour leur effet immuno-régulateur, comme développé précédemment. Si ces phénomènes étaient investigués chez les espèces aviaires, les conclusions seraient très probablement similaires. D'autres études mettent en garde sur le stress des animaux, qui pourrait également altérer le microbiote, notamment dans les premiers jours de vie (O'Mahony et al., 2009).

Des animaux élevés dans un environnement sain où l'utilisation des antibiotiques est raisonnée, et nourris de manière appropriée, seront donc plus à même de contrôler la réplication d'un virus influenza, limitant ainsi la propagation virale.

B. Les interactions entre variants à l'échelle de l'individu

Au cours d'une infection par un virus influenza, chez l'homme comme chez l'animal, un nombre gigantesque de virions est produit – jusqu'à 10^{14} (Russell et al., 2012), soit plus qu'il n'y a d'étoiles dans notre galaxie. Comme décrit précédemment, par différents processus, un nuage de variants tous génétiquement très proches va progressivement se former. Certains de ces variants acquerront un avantage sélectif par rapport aux autres : pour ce qui est des souches aviaires, cela peut notamment être l'obtention d'un site de clivage polybasique chez un oiseau, ou encore, l'obtention de la mutation E627K, qui augmente l'activité polymérase du virus chez les mammifères (Subbarao et al., 1993). Ce phénomène est loin de se limiter aux virus influenza et peut s'appliquer aux quasi-espèces de manière générale. Lorsqu'un nouveau variant apparaît au sein d'un hôte, il est vraisemblablement minoritaire et en compétition avec ses progéniteurs : dans la plupart des cas, ses cellules cibles et ses récepteurs cellulaires seront les mêmes (Leeks et al., 2018). Pour que l'émergence soit réussie d'un point de vue évolutif, le variant nouvellement formé doit donc se répliquer suffisamment pour ne pas être éteint par ses précurseurs et parvenir à être transmis à d'autres individus. Ainsi, une émergence réussie passe par deux étapes : l'obtention de l'avantage sélectif, puis la capacité à devenir un des variants prédominants de la quasi-espèce virale. Certains cas de coopération entre variants ont toutefois été décrits – la coopération entre deux variants du virus H3N2 a notamment été évoquée dans l'introduction du manuscrit.

Intuitivement, on pourrait penser que les variants possédant un avantage sélectif colossal – par exemple, un VIAHP venant d'émerger au sein d'un poulet infecté par un VIAFP – gagnera systématiquement la compétition avec ses progéniteurs. En pratique, ce n'est pas toujours le cas. En utilisant un VIAHP H7N7 et son précurseur H7N7, une équipe allemande a simultanément infecté des poulets avec les deux virus à différents ratios. Elle a montré que lorsque le VIAHP était trop minoritaire par rapport au VIAFP, il ne parvenait pas à se répliquer au-delà du seuil de détection (Graaf et al., 2018). D'autres études, utilisant cette fois-ci différents variants du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) en culture cellulaire, sont arrivées à des conclusions similaires : les variants avec de forts avantages sélectifs ne gagnent pas nécessairement la compétition avec leurs précurseurs (Moya et al., 2000; de la Torre and Holland, 1990).

Si la compétition entre variants est trop forte, l'émergence n'est donc pas garantie. Trois principaux facteurs vont influencer sur cette compétition : la réponse immunitaire, le moment où le variant apparaît et la spécificité tissulaire.

Peu de temps après l'infection, les PRR activent des voies de signalisations immunitaire et inflammatoire, mettant ainsi en place un état antiviral. Notamment, les interférons de type 1 et 3 limitent la réplication virale et augmentent de ce fait la compétition. L'effet des interférons résulte en une diminution drastique de la diversité virale : si cela n'a pas été spécifiquement étudié chez les virus influenza, c'est un phénomène bien connu lors d'infection par le virus de l'hépatite C (Farci et al., 2002) et il est fort probable que ce soit également le cas en cas d'infection par un virus influenza. Cette perte de diversité virale pourrait ainsi provoquer la disparition des variants minoritaires. Au contraire, un retard dans la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale innée augmente la diversité et encourage l'émergence de variants, comme cela a été montré pour les virus influenza chez la souris (Honce et al., 2020).

Le moment de l'apparition du variant est un paramètre majeur. Puisque l'acquisition d'une mutation est un phénomène stochastique, elle peut avoir lieu à n'importe quel stade de l'infection. Plus un variant apparaît tôt, plus le ratio variant/progéniteurs sera élevé. Au contraire, un variant apparaissant tardivement aura probablement un ratio qui lui sera défavorable (Xue et al., 2018). Toutefois, une infection longue laisse plus de temps aux mutations pour apparaître. Chez un individu sain, l'infection par un virus grippal est résolue en l'espace de quelques jours, tandis qu'en cas d'immuno-dépression, la réplication virale peut s'étaler sur des semaines. Cela est bien illustré par l'acquisition de mutations conférant la résistance à l'oseltamivir : si ces mutations apparaissent rarement chez les individus lambda, elles apparaissent quasi-systématiquement chez les individus immuno-déprimés (Xue et al., 2018).

Certains variants n'ont pas le même tropisme que leurs progéniteurs, ce qui peut avoir un impact sur leur émergence. Lorsqu'un variant est capable de se répliquer dans un autre tissu, il gagne une niche où l'immunité locale est possiblement moins forte et où le précurseur n'est pas présent. Par exemple, un VIAHP a un tropisme tissulaire bien plus large qu'un VIAFP : en parvenant à quitter son lieu de réplication initial, il pourrait augmenter ses chances d'émerger. Ce phénomène est également bien illustré par le virus Tembusu (TMUV) qui appartient à la

famille des *Flaviviridae* et infecte les canards. Les premières souches isolées se répliquaient principalement dans la rate et étaient transmises par les moustiques. Elles se répliquaient excessivement mal dans l'appareil respiratoire et ne parvenaient pas à être transmises de canard à canard. Un nouveau variant, portant la mutation P156S sur la protéine E, est apparu : cette mutation a causé une réplication accrue dans les poumons, permettant alors au virus d'être efficacement transmis entre animaux, indépendamment de la présence des moustiques (Yan et al., 2018). Ce changement de tropisme tissulaire a facilité l'émergence du variant 156S, ce dernier pouvant alors être transmis via des aérosols, mais son émergence a pu être facilitée par la diminution de la compétition avec son progéniteur, incapable de se répliquer efficacement dans le poumon.

Ces éléments de réflexion autour des interactions intra-hôte entre variants viraux ont fait l'objet d'un article de synthèse dans la revue *PloS Pathogen*, présenté en annexe de ce manuscrit.

C. Modulation de la compétition entre les VIAHP et VIAFP H5N8 par la réponse immunitaire antivirale innée

Dans la seconde partie de ces travaux de thèse, nous avons étudié la compétition entre un variant (un VIAHP H5N8) et son progéniteur (un VIAFP H5N8) chez deux espèces, le poulet et le canard. Les deux virus ayant été inoculé simultanément, le facteur « moment de l'apparition » était fixé. En revanche, la compétition était influencée par la réponse immunitaire antivirale innée et par le changement de tropisme tissulaire du variant. Avec le ratio variant/progéniteur utilisé au moment de l'inoculation, le VIAHP n'a jamais été éteint par le VIAFP. Toutefois, la cinétique de son excrétion a été impactée par la réplication en parallèle du VIAFP.

Nous avons montré que la réplication du VIAHP H5N8 était plus intense lorsque les poulets étaient également infectés avec un progéniteur potentiel VIAFP, tandis que le phénomène inverse se produisait chez les canards. La réplication étant augmentée chez les poulets, cela impliquerait que le VIAFP était à même de compenser une fonction manquante chez le VIAHP.

Pourtant, les deux virus étaient identiques, à l'exception du site de clivage de leur hémagglutinine. Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse que des particules semi-infectieuses, incapables de se multiplier seules, étaient produites lors la réplication du VIAHP en quantités relativement importantes. Le VIAFP utilisé, généré par mutagenèse dirigée et génétique inverse, se répliquait globalement mieux chez les poulets que chez les canards : chez les poulets, l'excrétion virale était importante et prolongée, et tous les animaux étaient infectés. Au contraire, l'infection des canards résultait en une excrétion faible et transitoire. Ainsi, le taux de coinfections chez les poulets était vraisemblablement plus élevé, permettant alors au VIAFP d'apporter les gènes manquant ou défectueux au VIAHP. Chez le canard, la réplication du VIAFP était possiblement trop faible pour que cet effet soit significatif.

Un nombre colossal de particules défectives est produit lors de la réplication d'un virus influenza : on estime que seuls 0,1 à 10% des virions produits sont infectieux. Le taux de particules non infectieuses dépend toutefois fortement de la souche virale (Diefenbacher et al., 2018). Une infection humaine par un virus grippal pouvant facilement résulter en la production de 10^{12} virions, cela signifie que 10^{11} virions défectueux seront potentiellement produits (Einav et al., 2020) ! Lors du cycle viral, malgré un processus d'assemblage incroyablement sélectif, de nombreux virions comptent moins de huit segments (Nakatsu et al., 2016) ou comportent un segment d'ARN cellulaire à la place d'un segment d'ARN viral (Noda et al., 2018). Certains virions ont beau avoir leurs huit segments d'ARN, des mutations non-synonymes empêchant l'expression d'un gène ou résultant en une protéine non fonctionnelle peuvent avoir été introduites par la polymérase virale (Pauly et al., 2017; Russell et al., 2018). Dans ces trois cas, les virions ne pourront se multiplier que si la cellule est infectée par un autre virus qui apportera les gènes ou les protéines manquants.

Nous avons également révélé la présence d'un antagonisme entre le VIAHP et le VIAFP chez le canard, nous amenant à la conclusion que le VIAHP H5N8 utilisé avait un avantage sélectif moindre chez cette espèce. Le VIAFP, inoculé en grandes quantités (nous avons inoculé 1000 fois plus de VIAFP que de VIAHP), entraîne la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale innée prolongée chez le canard, et transitoire chez le poulet. De plus, la réponse mise en place par les canards, à quantité de virus égale, est plus intense que chez les poulets. Ces éléments nous ont amené à émettre l'hypothèse que l'interférence virale observée chez

les canards était potentiellement due à cette réponse immunitaire antivirale innée (du moins, en partie). Les deux virus utilisés étant similaires en tout point à l'exception du site de clivage de l'hémagglutinine, ils étaient vraisemblablement aussi sensibles l'un que l'autre aux interférons. En revanche, une réponse immunitaire précoce et intense pourrait imposer une pression de sélection plus forte sur le variant minoritaire – ici, le VIAHP – et ainsi inhiber son émergence. De plus, cette réponse immunitaire est probablement à l'origine de la moindre réplication du VIAFP chez le canard, ce qui a possiblement limité le nombre de cellules coinfectées par les deux virus, diminuant ainsi le phénomène de coopération virale que nous pensons avoir mis en évidence chez le poulet.

La mise en place d'un état antiviral diminuant voire empêchant complètement la réplication d'un second virus lors d'infections séquentielles avec deux virus influenza a déjà été évoquée dans l'introduction de ce manuscrit. C'est probablement grâce à ce phénomène, ainsi qu'à l'immunité croisée, que les coinfections avec deux virus influenza ne sont pas fréquemment observées chez l'homme (Falchi et al., 2008; Sonoguchi et al., 1985), ce qui se traduit par un faible taux de réassortiments durant les infections humaines (Leonard et al., 2017). Dans notre étude, les deux virus ont été inoculés de manière simultanée : aucune étude ne s'étant intéressée aux coinfections séquentielles avec deux VIA, ni chez le poulet, ni chez le canard, nous n'avons pas pris le risque d'infecter d'abord les animaux avec le VIAFP, puis avec le VIAHP. En effet, en cas d'infection séquentielle, l'infection par le second virus peut être compromise par des phénomènes d'exclusion de surinfection (Lowen, 2017). Ainsi, la dose infectieuse 50 (DI₅₀) du VIAHP aurait pu être drastiquement diminuée par l'état antiviral induit par le VIAFP, ce qui aurait rendu nos expériences préliminaires (visant à déterminer les DI₅₀ des virus) inexploitable.

Chez le poulet, lorsque nous avons utilisé une dose de VIAHP inférieure à la DI₅₀, la réplication de ce dernier semble avoir été facilitée par la réplication en parallèle du VIAFP, bien que nos résultats n'aient pas été statistiquement significatifs. En effet, nous avons observé de la mortalité en cas d'infection par les deux virus, tandis qu'aucun des animaux ayant été mono-infectés n'est mort ou n'a présenté des signes cliniques. En utilisant des doses plus faibles de VIAHP chez le canard, afin de diminuer le ratio VIAHP/VIAFP, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'émergence du VIAHP aurait été compromise, quand bien même son

tropisme tissulaire était bien plus large que celui du VIAFP. D'une part, le VIAHP inoculé seul aurait pu se répliquer de manière correcte, tandis qu'en cas d'inoculation simultanée avec le VIAFP, il aurait pu ne jamais passer au-delà du seuil de détection, du fait de l'interférence due à la réponse immunitaire antivirale innée. Quoi qu'il en soit, nos observations confortent les données épidémiologiques, évoquées dans l'introduction du manuscrit, qui indiquent que les VIAHP émergeraient plutôt chez les galliformes et non pas les ansériformes.

Nos résultats divergent de ceux de l'équipe de Graaf, publiée en 2018, où la coinfection simultanée avec un VIAHP et un VIAFP H7N7 chez le poulet résultait en une compétition entre les deux virus (Graaf et al., 2018). On peut émettre l'hypothèse que des facteurs propres aux souches virales utilisées interviennent et que si ce couple de virus avait été utilisé chez le canard, la compétition n'en aurait été que plus grande. Notamment, toutes les souches virales n'ont pas la même capacité à contrer la réponse interféron avec la protéine NS1 (Ayllon et al., 2012; Dankar et al., 2013; Solórzano et al., 2005) : on peut donc supposer que plus l'activité de cette dernière est importante, moins la réponse interféron de type 1 est intense et moins l'interférence virale est marquée. De la même manière, toutes les souches virales ne sont pas adaptées de la même manière à une espèce donnée (Schrauwen and Fouchier, 2014). Il faut ajouter à cela les facteurs dépendant de l'espèce hôte, voire même de l'individu, dans la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale innée.

D. Interactions entre virus à l'échelle des populations

Jusqu'à présent, nous avons évoqué les interactions entre virus à l'échelle de l'individu. A l'échelle de l'élevage, la circulation simultanée du VIAFP progéniteur pourrait également limiter l'émergence du VIAHP, en induisant un état antiviral non spécifique. Si le VIAHP émerge au sein d'un individu alors que la quasi-totalité de ses congénères ont déjà été infectés par le VIAFP, ce dernier aura entraîné la mise en place d'une réponse interféron, voire déjà induit la sécrétion d'anticorps spécifiques. Ainsi, des VIAHP pourraient parvenir à être excrétés, sans pour autant parvenir à infecter d'autres individus. A l'inverse, si un VIAHP émerge au début de l'épizootie, de nombreux animaux pourront vraisemblablement être infectés. Ce

phénomène d'interférence virale due à l'état antiviral induit par la réponse immunitaire innée n'est pas propre aux interactions entre variants et intervient également lorsque des virus de genres différents circulent.

Il n'est pas rare de détecter la circulation simultanée de plusieurs virus dans un élevage, comme par exemple un virus influenza associé à un virus de la maladie de Newcastle (NDV) (Costa-Hurtado et al., 2015; Gowthaman et al., 2019). Dans une étude ayant réalisé des coinfections avec un VIAHP et un virus NDV, les auteurs ont non seulement montré un antagonisme entre les deux virus lorsqu'ils étaient inoculés à des œufs embryonnés, mais ont également montré que l'effet observé dépendait de la souche de VIAHP utilisée. La réplication de NDV était fortement diminuée par un VIAHP H5N8 et l'était un peu moins par un VIAHP H5N1 (Soliman et al., 2019), soulignant là aussi la possible importance des facteurs viraux. Dans certains cas, l'infection simultanée par deux virus peut néanmoins résulter en une évolution clinique exacerbée (Erfan et al., 2019; Yan et al., 2020). Ce phénomène d'interférence virale est également observé chez l'homme lors des différentes épidémies hivernales dues à des virus respiratoires. Des études épidémiologiques ont montré que les pics d'incidence des épidémies impliquant ces derniers (VIA, VRS, rhinovirus, coronavirus etc.) étaient généralement séparés (van Asten et al., 2016; Opatowski et al., 2018; Schultz-Cherry, 2015). La circulation du virus H1N1 pandémique de 2009 aurait également retardé l'épidémie à rhinovirus en France cette année-là (Casalegno et al., 2010). Certaines de ces observations épidémiologiques ont également été confirmées *ex vivo* (Essaidi-Laziosi et al., 2020) et *in vivo* (Chan et al., 2018).

Ainsi, l'émergence d'un VIAHP est régie par de très nombreux phénomènes, impliquant des facteurs viraux, environnementaux, dépendant de l'hôte, et également une part non négligeable de hasard.

V. Perspectives

Ces travaux de thèse ont été divisés en deux parties : d'un côté, le rôle régulateur du microbiote sur la réplication virale et la réponse immunitaire de l'hôte, et d'autre part, la compétition intra-hôte entre un VIAHP et son précurseur VIAFP. Une troisième partie aurait permis de les relier en répondant à la question suivante : l'issue de la compétition entre le couple H5N8 VIAHP/VIAFP utilisé dans la seconde partie des résultats (chapitre II. B) aurait-elle été différente si le microbiote des animaux avait préalablement été fortement destabilisé par un traitement antibiotique ? Nous avons montré que la réponse immunitaire antivirale innée des canards était plus intense que celle des poulets, que les animaux aient été infectés avec le VIAFP ou le VIAHP. Nous avons également montré que la forte destabilisation du microbiote des canards entraînait une diminution de la réponse immunitaire antivirale innée ainsi qu'une augmentation de la réplication virale. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse suivante : le phénomène d'interférence virale observé chez les canards suite à l'infection par le couple VIAHP/VIAFP aurait été moindre en cas de déplétion du microbiote.

Les deux parties des résultats pourraient également être approfondies. L'intérêt des prébiotiques et des probiotiques en cas d'infection par un virus a été discuté dans l'introduction de ce manuscrit, mais n'a pas été étudié chez les canards et les poulets en ce qui concerne les VIAHP. De tels traitements seraient faciles à mettre en place, notamment lorsque des antibiotiques sont utilisés pour traiter des maladies bactériennes, afin de limiter l'impact négatif sur le microbiote.

Les coinfections avec un couple VIAFP/VIAHP sont un modèle expérimental d'émergence de VIAHP. Ce modèle pourrait être exploité avec d'autres virus, mais également d'autres animaux. Il serait notamment très intéressant d'utiliser le couple de H7N7 utilisé par Graaf et al., afin de vérifier notre hypothèse : la compétition observée par les auteurs entre les deux virus chez le poulet serait exacerbée chez le canard. D'autres espèces aviaires pourraient également être utilisées : notamment des ansériformes sauvages, ces derniers ayant un rôle majeur dans l'éco-épidémiologie des VIA.

VI. Bibliographie

- Abbas, M.A., Spackman, E., Swayne, D.E., Ahmed, Z., Sarmento, L., Siddique, N., Naeem, K., Hameed, A., and Rehmani, S. (2010). Sequence and phylogenetic analysis of H7N3 avian influenza viruses isolated from poultry in Pakistan 1995-2004. *Virology* 7, 137.
- Abdelwhab, E.-S.M., Veits, J., and Mettenleiter, T.C. (2013). Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry. *Virulence* 4, 441–452.
- Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., Doering, T.A., Alenghat, T., Sonnenberg, G.F., Paley, M.A., Antenus, M., Williams, K.L., Erikson, J., et al. (2012). Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* 37, 158–170.
- Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J.L., Kuiken, T., Marangon, S., Niqueux, É., Staubach, C., Smietanka, K., Terregino, C., Stede, Y.V. der, et al. (2020). Avian influenza overview – update on 19 November 2020, EU/EEA and the UK. *EFSA Journal* 18, e06341.
- Agor, J.K., and Özaltın, O.Y. (2018). Models for predicting the evolution of influenza to inform vaccine strain selection. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 14, 678–683.
- Akarsu, H., Burmeister, W.P., Petosa, C., Petit, I., Müller, C.W., Ruigrok, R.W.H., and Baudin, F. (2003). Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J* 22, 4646–4655.
- Alexander, D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* 11.
- Alexander, D.J., and Spackman, D. (1981). Characterisation of influenza A viruses isolated from turkeys in England during March-May 1979. *Avian Pathol* 10, 281–293.
- Alkie, T.N., Yitbarek, A., Hodgins, D.C., Kulkarni, R.R., Taha-Abdelaziz, K., and Sharif, S. (2019). Development of innate immunity in chicken embryos and newly hatched chicks: a disease control perspective. *Avian Pathology* 48, 288–310.
- Angeletti, D., Gibbs, J.S., Angel, M., Kosik, I., Hickman, H.D., Frank, G.M., Das, S.R., Wheatley, A.K., Prabhakaran, M., Leggat, D.J., et al. (2017). Defining B cell immunodominance to viruses. *Nat Immunol* 18, 456–463.
- Arimori, Y., Nakamura, R., Yamada, H., Shibata, K., Maeda, N., Kase, T., and Yoshikai, Y. (2013). Type I interferon limits influenza virus-induced acute lung injury by regulation of excessive inflammation in mice. *Antiviral Research* 99, 230–237.
- Arnheiter, H., Haller, O., and Lindenmann, J. (1980). Host gene influence on interferon action in adult mouse hepatocytes: specificity for influenza virus. *Virology* 103, 11–20.
- van Asten, L., Bijkerk, P., Fanoy, E., van Ginkel, A., Suijkerbuijk, A., van der Hoek, W., Meijer, A., and Vennema, H. (2016). Early occurrence of influenza A epidemics coincided with changes in occurrence of other respiratory virus infections. *Influenza Other Respi Viruses* 10, 14–26.

- Ayllon, J., Hale, B.G., and García-Sastre, A. (2012). Strain-specific contribution of NS1-activated phosphoinositide 3-kinase signaling to influenza A virus replication and virulence. *J Virol* 86, 5366–5370.
- Baigent, S.J., and McCauley, J.W. (2001). Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 79, 177–185.
- Balmer, M.L., Schürch, C.M., Saito, Y., Geuking, M.B., Li, H., Cuenca, M., Kovtonyuk, L.V., McCoy, K.D., Hapfelmeier, S., Ochsenbein, A.F., et al. (2014). Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. *J. Immunol.* 193, 5273–5283.
- Bancroft, C.T., and Parslow, T.G. (2002). Evidence for Segment-Nonspecific Packaging of the Influenza A Virus Genome. *J Virol* 76, 7133–7139.
- Bandoro, C., and Runstadler, J.A. (2017). Bacterial Lipopolysaccharide Destabilizes Influenza Viruses. *MSphere* 2.
- Banks, J., Speidel, E.C., McCauley, J.W., and Alexander, D.J. (2000). Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch. Virol.* 145, 1047–1058.
- Banks, J., Speidel, E.S., Moore, E., Plowright, L., Piccirillo, A., Capua, I., Cordioli, P., Fioretti, A., and Alexander, D.J. (2001). Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Archives of Virology* 146, 963–973.
- Bashiruddin, J.B., Gould, A.R., and Westbury, H.A. (1992). Molecular pathotyping of two avian influenza viruses isolated during the Victoria 1976 outbreak. *Aust Vet J* 69, 140–142.
- Bavagnoli, L., Dundon, W.G., Garbelli, A., Zecchin, B., Milani, A., Parakkal, G., Baldanti, F., Paolucci, S., Volmer, R., Tu, Y., et al. (2011). The PDZ-Ligand and Src-Homology Type 3 Domains of Epidemic Avian Influenza Virus NS1 Protein Modulate Human Src Kinase Activity during Viral Infection. *PLoS One* 6.
- Bazzigher, L., Schwarz, A., and Staeheli, P. (1993). No Enhanced Influenza Virus Resistance of Murine and Avian Cells Expressing Cloned Duck Mx Protein. *Virology* 195, 100–112.
- Beaton, A.R., and Krug, R.M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6282–6286.
- Becker, W.B. (1966). The isolation and classification of Tern virus: Influenza Virus A/Tern/South Africa/1961. *Epidemiology & Infection* 64, 309–320.
- Belkacem, N., Serafini, N., Wheeler, R., Derrien, M., Boucinha, L., Couesnon, A., Cerf-Bensussan, N., Gomperts Boneca, I., Di Santo, J.P., Taha, M.-K., et al. (2017). *Lactobacillus paracasei* feeding improves immune control of influenza infection in mice. *PLOS ONE* 12, e0184976.

- Berhane, Y., Hisanaga, T., Kehler, H., Neufeld, J., Manning, L., Argue, C., Handel, K., Hooper-McGrevy, K., Jonas, M., Robinson, J., et al. (2009). Highly pathogenic avian influenza virus A (H7N3) in domestic poultry, Saskatchewan, Canada, 2007. *Emerg Infect Dis* *15*, 1492–1495.
- Bernasconi, D., Schultz, U., and Staeheli, P. (1995). The Interferon-Induced Mx Protein of Chickens Lacks Antiviral Activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *15*, 47–53.
- Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Kühl, A., and Pöhlmann, S. (2010). Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Reviews in Medical Virology* *20*, 298–310.
- Bi, Y., Chen, Q., Wang, Q., Chen, J., Jin, T., Wong, G., Quan, C., Liu, J., Wu, J., Yin, R., et al. (2016). Genesis, Evolution and Prevalence of H5N6 Avian Influenza Viruses in China. *Cell Host Microbe* *20*, 810–821.
- Billiau, A. (2006). Anti-inflammatory properties of Type I interferons. *Antiviral Research* *71*, 108–116.
- Bisanz, J.E., Upadhyay, V., Turnbaugh, J.A., Ly, K., and Turnbaugh, P.J. (2019). Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to a High-Fat Diet. *Cell Host & Microbe* *26*, 265-272.e4.
- Boeckel, T.P.V., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A., and Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *PNAS* *112*, 5649–5654.
- Both, G.W., Sleight, M.J., Cox, N.J., and Kendal, A.P. (1983). Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J. Virol.* *48*, 52–60.
- Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W.H., and Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* *124*, 12–21.
- Boulo, S., Akarsu, H., Lotteau, V., Müller, C.W., Ruigrok, R.W.H., and Baudin, F. (2011). Human importin alpha and RNA do not compete for binding to influenza A virus nucleoprotein. *Virology* *409*, 84–90.
- Bouvier, N.M., and Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine* *26 Suppl 4*, D49-53.
- Bradley, K.C., Finsterbusch, K., Schnepf, D., Crotta, S., Llorian, M., Davidson, S., Fuchs, S.Y., Staeheli, P., and Wack, A. (2019). Microbiota-Driven Tonic Interferon Signals in Lung Stromal Cells Protect from Influenza Virus Infection. *Cell Reports* *28*, 245-256.e4.
- Briand, F.-X., Schmitz, A., Ogor, K., Le Prioux, A., Guillou-Cloarec, C., Guillemoto, C., Allée, C., Le Bras, M.-O., Hirchaud, E., Quenault, H., et al. (2017). Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. *Eurosurveillance* *22*.

- Briand, F.X., Niqueux, E., Schmitz, A., Hirchaud, E., Quenault, H., Allée, C., Le Prioux, A., Guillou-Cloarec, C., Ogor, K., Le Bras, M.O., et al. (2018). Emergence and multiple reassortments of French 2015–2016 highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *Infection, Genetics and Evolution* 61, 208–214.
- Brisbin, J.T., Gong, J., Parvizi, P., and Sharif, S. (2010). Effects of Lactobacilli on Cytokine Expression by Chicken Spleen and Cecal Tonsil Cells. *CVI* 17, 1337–1343.
- Brugh, M. (1988). Highly pathogenic virus recovered from chickens infected with mildly pathogenic 1986 isolates of H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis.* 32, 695–703.
- Burggraaf, S., Bingham, J., Payne, J., Kimpton, W.G., Lowenthal, J.W., and Bean, A.G.D. (2011). Increased inducible nitric oxide synthase expression in organs is associated with a higher severity of H5N1 influenza virus infection. *PLoS ONE* 6, e14561.
- Burggraaf, S., Karpala, A.J., Bingham, J., Lowther, S., Selleck, P., Kimpton, W., and Bean, A.G.D. (2014). H5N1 infection causes rapid mortality and high cytokine levels in chickens compared to ducks. *Virus Research* 185, 23–31.
- Cagle, C., Wasilenko, J., Adams, S.C., Cardona, C.J., To, T.L., Nguyen, T., Spackman, E., Suarez, D.L., Smith, D., Shepherd, E., et al. (2012). Differences in pathogenicity, response to vaccination, and innate immune responses in different types of ducks infected with a virulent H5N1 highly pathogenic avian influenza virus from Vietnam. *Avian Dis.* 56, 479–487.
- Capua, I., and Marangon, S. (2007). The use of vaccination to combat multiple introductions of Notifiable Avian Influenza viruses of the H5 and H7 subtypes between 2000 and 2006 in Italy. *Vaccine* 25, 4987–4995.
- Casalegno, J.S., Ottmann, M., Bouscambert Duchamp, M., Escuret, V., Billaud, G., Frobert, E., Morfin, F., and Lina, B. (2010). Rhinoviruses delayed the circulation of the pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in France. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 326–329.
- Chaimayo, C., Dunagan, M., Hayashi, T., Santoso, N., and Takimoto, T. (2018). Specificity and functional interplay between influenza virus PA-X and NS1 shutoff activity. *PLOS Pathogens* 14, e1007465.
- Chan, K.F., Carolan, L.A., Korenkov, D., Druce, J., McCaw, J., Reading, P.C., Barr, I.G., and Laurie, K.L. (2018). Investigating Viral Interference Between Influenza A Virus and Human Respiratory Syncytial Virus in a Ferret Model of Infection. *J Infect Dis* 218, 406–417.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., and Gewirtz, A.T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96.
- Chen, B.J., Leser, G.P., Jackson, D., and Lamb, R.A. (2008). The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J. Virol.* 82, 10059–10070.
- Chen, C.-J., Wu, G.-H., Kuo, R.-L., and Shih, S.-R. (2017a). Role of the intestinal microbiota in the immunomodulation of influenza virus infection. *Microbes and Infection* 19, 570–579.

- Chen, H.-W., Liu, P.-F., Liu, Y.-T., Kuo, S., Zhang, X.-Q., Schooley, R.T., Rohde, H., Gallo, R.L., and Huang, C.-M. (2016). Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* counteracts influenza virus. *Sci Rep* 6, 27870.
- Chen, M.-F., Weng, K.-F., Huang, S.-Y., Liu, Y.-C., Tseng, S.-N., Ojcius, D.M., and Shih, S.-R. (2017b). Pretreatment with a heat-killed probiotic modulates monocyte chemoattractant protein-1 and reduces the pathogenicity of influenza and enterovirus 71 infections. *Mucosal Immunol* 10, 215–227.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O’Neill, R., Schickli, J., Palese, P., et al. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7, 1306–1312.
- Cohen, M., Zhang, X.-Q., Senaati, H.P., Chen, H.-W., Varki, N.M., Schooley, R.T., and Gagneux, P. (2013). Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology Journal* 10, 321.
- Compans, R.W., Content, J., and Duesberg, P.H. (1972). Structure of the Ribonucleoprotein of Influenza Virus. *J Virol* 10, 795–800.
- Cornelissen, J.B.W.J., Vervelde, L., Post, J., and Rebel, J.M.J. (2013). Differences in highly pathogenic avian influenza viral pathogenesis and associated early inflammatory response in chickens and ducks. *Avian Pathology* 42, 347–364.
- Costa-Hurtado, M., Afonso, C.L., Miller, P.J., Shepherd, E., Cha, R.M., Smith, D., Spackman, E., Kapczynski, D.R., Suarez, D.L., Swayne, D.E., et al. (2015). Previous infection with virulent strains of Newcastle disease virus reduces highly pathogenic avian influenza virus replication, disease, and mortality in chickens. *Veterinary Research* 46, 97.
- Couceiro, J.N., Paulson, J.C., and Baum, L.G. (1993). Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.* 29, 155–165.
- Cox, N.J., and Subbarao, K. (2000). Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu. Rev. Med.* 51, 407–421.
- Cros, J.F., and Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* 95, 3–12.
- Dadonaite, B., Gilbertson, B., Knight, M.L., Trifkovic, S., Rockman, S., Laederach, A., Brown, L.E., Fodor, E., and Bauer, D.L.V. (2019). The structure of the influenza A virus genome. *Nat Microbiol* 4, 1781–1789.
- Dankar, S.K., Miranda, E., Forbes, N.E., Pelchat, M., Tavassoli, A., Selman, M., Ping, J., Jia, J., and Brown, E.G. (2013). Influenza A/Hong Kong/156/1997(H5N1) virus NS1 gene mutations F103L and M106I both increase IFN antagonism, virulence and cytoplasmic localization but differ in binding to RIG-I and CPSF30. *Virol J* 10, 243.

- Delpont, M., Blondel, V., Robertet, L., Duret, H., Guerin, J.-L., Vaillancourt, J.-P., and Paul, M.C. (2018). Biosecurity practices on foie gras duck farms, Southwest France. *Prev Vet Med* 158, 78–88.
- Delpont, M., Racicot, M., Durivage, A., Fornili, L., Guerin, J.-L., Vaillancourt, J.-P., and Paul, M.C. (2020). Determinants of biosecurity practices in French duck farms after a H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza epidemic: The effect of farmer knowledge, attitudes and personality traits. *Transbound Emerg Dis*.
- Deng, T., Vreede, F.T., and Brownlee, G.G. (2006). Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* 80, 2337–2348.
- Deshpande, K.L., Fried, V.A., Ando, M., and Webster, R.G. (1987). Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 36–40.
- Dewhirst, F.E., Chien, C.C., Paster, B.J., Ericson, R.L., Orcutt, R.P., Schauer, D.B., and Fox, J.G. (1999). Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3287–3292.
- Dhingra, M.S., Artois, J., Dellicour, S., Lemey, P., Dauphin, G., Von Dobschuetz, S., Van Boeckel, T.P., Castellan, D.M., Morzaria, S., and Gilbert, M. (2018). Geographical and Historical Patterns in the Emergences of Novel Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5 and H7 Viruses in Poultry. *Front. Vet. Sci.* 5.
- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., and Ruigrok, R.W.H. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914–918.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Sousa, C.R. e (2004). Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science* 303, 1529–1531.
- Diefenbacher, M., Sun, J., and Brooke, C.B. (2018). The parts are greater than the whole: the role of semi-infectious particles in influenza A virus biology. *Current Opinion in Virology* 33, 42–46.
- Dietze, K., Graaf, A., Homeier-Bachmann, T., Grund, C., Forth, L., Pohlmann, A., Jeske, C., Wintermann, M., Beer, M., Conraths, F.J., et al. (2017). From low to high pathogenicity—Characterization of H7N7 avian influenza viruses in two epidemiologically linked outbreaks. *Transboundary and Emerging Diseases* 0.
- Dittmann, J., Stertz, S., Grimm, D., Steel, J., García-Sastre, A., Haller, O., and Kochs, G. (2008). Influenza A virus strains differ in sensitivity to the antiviral action of Mx-GTPase. *J. Virol.* 82, 3624–3631.

- Dlugolenski, D., Jones, L., Saavedra, G., Tompkins, S.M., Tripp, R.A., and Mundt, E. (2011). Passage of low-pathogenic avian influenza (LPAI) viruses mediates rapid genetic adaptation of a wild-bird isolate in poultry. *Arch. Virol.* *156*, 565–576.
- Doherty, P.C., Turner, S.J., Webby, R.G., and Thomas, P.G. (2006). Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol* *7*, 449–455.
- Domingo, E., and Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genet.* *15*, e1008271.
- Donnelly, R.P., and Kutenko, S.V. (2010). Interferon-Lambda: A New Addition to an Old Family. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *30*, 555–564.
- Dou, D., Hernández-Neuta, I., Wang, H., Östbye, H., Qian, X., Thiele, S., Resa-Infante, P., Kouassi, N.M., Sender, V., Hentrich, K., et al. (2017). Analysis of IAV Replication and Co-infection Dynamics by a Versatile RNA Viral Genome Labeling Method. *Cell Rep* *20*, 251–263.
- Du, W., Wolfert, M.A., Peeters, B., van Kuppeveld, F.J.M., Boons, G.-J., de Vries, E., and de Haan, C.A.M. (2020). Mutation of the second sialic acid-binding site of influenza A virus neuraminidase drives compensatory mutations in hemagglutinin. *PLoS Pathog* *16*, e1008816.
- Duncan, S.H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A.M., Flint, H.J., and Lopley, G.E. (2007). Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 1073–1078.
- Durrant, J.D., Bush, R.M., and Amaro, R.E. (2016). Microsecond Molecular Dynamics Simulations of Influenza Neuraminidase Suggest a Mechanism for the Increased Virulence of Stalk-Deletion Mutants. *J Phys Chem B* *120*, 8590–8599.
- Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci. Am.* *269*, 42–49.
- Einav, T., Gentles, L.E., and Bloom, J.D. (2020). SnapShot: Influenza by the Numbers. *Cell* *182*, 532-532.e1.
- Endt, K., Stecher, B., Chaffron, S., Slack, E., Tchitchek, N., Benecke, A., Van Maele, L., Sirard, J.-C., Mueller, A.J., Heikenwalder, M., et al. (2010). The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal Salmonella diarrhea. *PLoS Pathog.* *6*, e1001097.
- Erfan, A.M., Selim, A.A., Helmy, S.A., Eriksson, P., and Naguib, M.M. (2019). Chicken anaemia virus enhances and prolongs subsequent avian influenza (H9N2) and infectious bronchitis viral infections. *Vet Microbiol* *230*, 123–129.
- Escalera-Zamudio, M., Golden, M., Gutiérrez, B., Thézé, J., Keown, J.R., Carrique, L., Bowden, T.A., and Pybus, O.G. (2020). Parallel evolution in the emergence of highly pathogenic avian influenza A viruses. *Nature Communications* *11*, 5511.
- Essaidi-Laziosi, M., Geiser, J., Huang, S., Constant, S., Kaiser, L., and Tapparel, C. (2020). Interferon-Dependent and Respiratory Virus-Specific Interference in Dual Infections of Airway Epithelia. *Scientific Reports* *10*, 10246.

EU (2006). (2006) COUNCIL DIRECTIVE 2005/94/EC of 20 December 2005 on Community measures for the control of avian influenza and repealing Directive 92/40/EEC. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005L0094&from=en>.

EU (2008). Règlement (CE) N°889/2008 de la Commission du 5 septembre 2008.

Eurostat (2021). Eurostat - Data Explorer. Available from: <http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>.

Evseev, D., and Magor, K.E. (2019). Innate Immune Responses to Avian Influenza Viruses in Ducks and Chickens. *Veterinary Sciences* 6, 5.

Ewald, S.J., Kapczynski, D.R., Livant, E.J., Suarez, D.L., Ralph, J., McLeod, S., and Miller, C. (2011). Association of Mx1 Asn631 variant alleles with reductions in morbidity, early mortality, viral shedding, and cytokine responses in chickens infected with a highly pathogenic avian influenza virus. *Immunogenetics* 63, 363–375.

Falchi, A., Arena, C., Andreoletti, L., Jacques, J., Leveque, N., Blanchon, T., Lina, B., Turbelin, C., Dorléans, Y., Flahault, A., et al. (2008). Dual infections by influenza A/H3N2 and B viruses and by influenza A/H3N2 and A/H1N1 viruses during winter 2007, Corsica Island, France. *J Clin Virol* 41, 148–151.

Fang, R., Min Jou, W., Huylebroeck, D., Devos, R., and Fiers, W. (1981). Complete structure of A/duck/Ukraine/63 influenza hemagglutinin gene: animal virus as progenitor of human H3 Hong Kong 1968 influenza hemagglutinin. *Cell* 25, 315–323.

Farci, P., Strazzer, R., Alter, H.J., Farci, S., Degioannis, D., Coiana, A., Peddis, G., Usai, F., Serra, G., Chessa, L., et al. (2002). Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 3081–3086.

Figueroa, T., Bessière, P., Coggon, A., Bouwman, K.M., Woude, R. van der, Delverdier, M., Verheije, M.H., Vries, R.P. de, and Volmer, R. (2020). The Microbiota Contributes to the Control of Highly Pathogenic H5n9 Influenza Virus Replication in Ducks. *Journal of Virology*.

Fitch, W.M., Leiter, J.M., Li, X.Q., and Palese, P. (1991). Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4270–4274.

Fodor, E. (2013). The RNA polymerase of influenza a virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol* 57, 113–122.

Fodor, E., and Te Velhuis, A.J.W. (2020). Structure and Function of the Influenza Virus Transcription and Replication Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10, a038398.

Fodor, E., Pritlove, D.C., and Brownlee, G.G. (1994). The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol* 68, 4092–4096.

Fonville, J.M., Marshall, N., Tao, H., Steel, J., and Lowen, A.C. (2015). Influenza Virus Reassortment Is Enhanced by Semi-infectious Particles but Can Be Suppressed by Defective Interfering Particles. *PLOS Pathogens* 11, e1005204.

- Fouchier, R.A.M., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G.F., and Osterhaus, A.D.M.E. (2000). Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4096–4101.
- Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J.-C., Sirbat, J.-D., Cavalier, A., Rolland, J.-P., Thomas, D., Lina, B., Isel, C., et al. (2012). Interaction network linking the human H3N2 influenza A virus genomic RNA segments. *Vaccine* 30, 7359–7367.
- Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., and Kawaoka, Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2002–2007.
- Fujiyoshi, Y., Kume, N.P., Sakata, K., and Sato, S.B. (1994). Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *EMBO J* 13, 318–326.
- Gambotto, A., Barratt-Boyes, S.M., de Jong, M.D., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2008). Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet* 371, 1464–1475.
- Gao, P., Xiang, B., Li, Y., Li, Y., Sun, M., Kang, Y., Xie, P., Chen, L., Lin, Q., Liao, M., et al. (2018). Therapeutic Effect of Duck Interferon-Alpha Against H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection in Peking Ducks. *J. Interferon Cytokine Res.* 38, 145–152.
- García, M., Crawford, J.M., Latimer, J.W., Rivera-Cruz, E., and Perdue, M.L. (1996). Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *Journal of General Virology*, 77, 1493–1504.
- García-Sastre, A. (2001). Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 279, 375–384.
- García-Sastre, A. (2011). Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Res.* 162, 12–18.
- Gavazzi, C., Isel, C., Fournier, E., Moules, V., Cavalier, A., Thomas, D., Lina, B., and Marquet, R. (2013). An in vitro network of intermolecular interactions between viral RNA segments of an avian H5N2 influenza A virus: comparison with a human H3N2 virus. *Nucleic Acids Res.* 41, 1241–1254.
- Ghoneim, H.E., Thomas, P.G., and McCullers, J.A. (2013). Depletion of Alveolar Macrophages during Influenza Infection Facilitates Bacterial Superinfections. *The Journal of Immunology* 191, 1250–1259.
- van Gils, J.A., Munster, V.J., Radersma, R., Liefhebber, D., Fouchier, R.A.M., and Klaassen, M. (2007). Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. *PLoS ONE* 2, e184.
- Goujon, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hué, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559–562.

- Gowthaman, V., Singh, S.D., Dhama, K., Ramakrishnan, M.A., Malik, Y.P.S., Gopala Krishna Murthy, T.R., Chitra, R., and Munir, M. (2019). Co-infection of Newcastle disease virus genotype XIII with low pathogenic avian influenza exacerbates clinical outcome of Newcastle disease in vaccinated layer poultry flocks. *VirusDis.* 30, 441–452.
- Graaf, A., Ulrich, R., Maksimov, P., Scheibner, D., Koethe, S., Abdelwhab, E.M., Mettenleiter, T.C., Beer, M., and Harder, T. (2018). A viral race for primacy: co-infection of a natural pair of low and highly pathogenic H7N7 avian influenza viruses in chickens and embryonated chicken eggs. *Emerging Microbes & Infections* 7, 204.
- Groeger, D., Schiavi, E., Grant, R., Kurnik-Łucka, M., Michalovich, D., Williamson, R., Beinke, S., Kiely, B., Akdis, C.A., Hessel, E.M., et al. (2020). Intranasal *Bifidobacterium longum* protects against viral-induced lung inflammation and injury in a murine model of lethal influenza infection. *EBioMedicine* 60, 102981.
- Grund, C., Hoffmann, D., Ulrich, R., Naguib, M., Schinköthe, J., Hoffmann, B., Harder, T., Saenger, S., Zscheppang, K., Tönnes, M., et al. (2018). A novel European H5N8 influenza A virus has increased virulence in ducks but low zoonotic potential. *Emerg Microbes Infect* 7, 132.
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Förster, I., Farlik, M., Decker, T., Du Pasquier, R.A., Romero, P., et al. (2011). Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity* 34, 213–223.
- Guinat, C., Nicolas, G., Vergne, T., Bronner, A., Durand, B., Courcoul, A., Gilbert, M., Guérin, J.-L., and Paul, M.C. (2018). Spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 spread, France, 2016 to 2017. *Euro Surveill* 23.
- Guinat, C., Comin, A., Kratzer, G., Durand, B., Delesalle, L., Delpont, M., Guérin, J.-L., and Paul, M.C. (2020). Biosecurity risk factors for highly pathogenic avian influenza (H5N8) virus infection in duck farms, France. *Transbound Emerg Dis* 67, 2961–2970.
- Gulati, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Couch, R.B., Griesemer, S.B., George, K.S., Webster, R.G., and Air, G.M. (2013). Human H3N2 Influenza Viruses Isolated from 1968 To 2012 Show Varying Preference for Receptor Substructures with No Apparent Consequences for Disease or Spread. *PLOS ONE* 8, e66325.
- Gulyaev, A.P., Spronken, M.I., Funk, M., Fouchier, R.A.M., and Richard, M. (2021). Insertions of codons encoding basic amino acids in H7 hemagglutinins of influenza A viruses occur by recombination with RNA at hotspots near snoRNA binding sites. *RNA* 27, 123–132.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortín, J., and Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89, 2359–2376.
- Hanna, A., Banks, J., Marston, D.A., Ellis, R.J., Brookes, S.M., and Brown, I.H. (2015). Genetic Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N8) Virus from Domestic Ducks, England, November 2014. *Emerg Infect Dis* 21, 879–882.

- Harata, G., He, F., Hiruta, N., Kawase, M., Kubota, A., Hiramatsu, M., and Yausi, H. (2010). Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Letters in Applied Microbiology* 50, 597–602.
- Helft, J., Manicassamy, B., Guermonprez, P., Hashimoto, D., Silvin, A., Agudo, J., Brown, B.D., Schmolke, M., Miller, J.C., Leboeuf, M., et al. (2012). Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection. *J Clin Invest* 122, 4037–4047.
- Hoffmann, T.W., Munier, S., Larcher, T., Soubieux, D., Ledevin, M., Esnault, E., Tourdes, A., Croville, G., Guérin, J.-L., Quéré, P., et al. (2012). Length Variations in the NA Stalk of an H7N1 Influenza Virus Have Opposite Effects on Viral Excretion in Chickens and Ducks. *Journal of Virology* 86, 584–588.
- Honce, R., Karlsson, E.A., Wohlgemuth, N., Estrada, L.D., Meliopoulos, V.A., Yao, J., and Schultz-Cherry, S. (2020). Obesity-Related Microenvironment Promotes Emergence of Virulent Influenza Virus Strains. *MBio* 11.
- Hori, T., Kiyoshima, J., Shida, K., and Yasui, H. (2001). Effect of Intranasal Administration of *Lactobacillus casei* Shirota on Influenza Virus Infection of Upper Respiratory Tract in Mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 593–597.
- Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (1995). Molecular changes in virulent mutants arising from avirulent avian influenza viruses during replication in 14-day-old embryonated eggs. *Virology* 206, 755–759.
- Horimoto, T., and Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 3, 591–600.
- Horimoto, T., Rivera, E., Pearson, J., Senne, D., Krauss, S., Kawaoka, Y., and Webster, R.G. (1995). Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico. *Virology* 213, 223–230.
- Høverstad, T., and Midtvedt, T. (1986). Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J. Nutr.* 116, 1772–1776.
- Hsu, M.T., Parvin, J.D., Gupta, S., Krystal, M., and Palese, P. (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 8140–8144.
- Huang, I.-C., Li, W., Sui, J., Marasco, W., Choe, H., and Farzan, M. (2008). Influenza A Virus Neuraminidase Limits Viral Superinfection. *JVI* 82, 4834–4843.
- Hufford, M.M., Kim, T.S., Sun, J., and Braciale, T.J. (2015). The effector T cell response to influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 386, 423–455.
- Ichinohe, T., Pang, I.K., and Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol* 11, 404–410.

- Ichinohe, T., Pang, I.K., Kumamoto, Y., Peaper, D.R., Ho, J.H., Murray, T.S., and Iwasaki, A. (2011). Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *PNAS* 108, 5354–5359.
- Iglesias, I., Martínez, M., Muñoz, M.J., Torre, A.D.L., and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2010). First Case of Highly Pathogenic Avian Influenza in Poultry in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 57, 282–285.
- Iqbal, M., Reddy, K.B., Brookes, S.M., Essen, S.C., Brown, I.H., and McCauley, J.W. (2014). Virus Pathotype and Deep Sequencing of the HA Gene of a Low Pathogenicity H7N1 Avian Influenza Virus Causing Mortality in Turkeys. *PLoS ONE* 9, e87076.
- Ito, T., Goto, H., Yamamoto, E., Tanaka, H., Takeuchi, M., Kuwayama, M., Kawaoka, Y., and Otsuki, K. (2001). Generation of a Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus from an Avirulent Field Isolate by Passaging in Chickens. *J Virol* 75, 4439–4443.
- Iwasaki, A., and Pillai, P.S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 315–328.
- Jackson, D., Hossain, M.J., Hickman, D., Perez, D.R., and Lamb, R.A. (2008). A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4381–4386.
- Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.-A., Wills, N.M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., et al. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337, 199–204.
- James, J., Howard, W., Iqbal, M., Nair, V.K., Barclay, W.S., and Shelton, H. (2016). Influenza A virus PB1-F2 protein prolongs viral shedding in chickens lengthening the transmission window. *J Gen Virol* 97, 2516–2527.
- Jiang, M., Österlund, P., Sarin, L.P., Poranen, M.M., Bamford, D.H., Guo, D., and Julkunen, I. (2011). Innate Immune Responses in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Highly Dependent on the Size and the 5' Phosphorylation of RNA Molecules. *The Journal of Immunology* 187, 1713–1721.
- Jiao, P.R., Wei, L.M., Cheng, Y.Q., Yuan, R.Y., Han, F., Liang, J., Liu, W.L., Ren, T., Xin, C.A., and Liao, M. (2012). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of the Muscovy duck Toll-like receptor 3 (MdTLR3) gene. *Poult Sci* 91, 2475–2481.
- Kane, M., Case, L.K., Kopaskie, K., Kozlova, A., MacDearmid, C., Chervonsky, A.V., and Golovkina, T.V. (2011). Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science* 334, 245–249.
- Kapczynski, D.R., Pantin-Jackwood, M., Guzman, S.G., Ricardez, Y., Spackman, E., Bertran, K., Suarez, D.L., and Swayne, D.E. (2013). Characterization of the 2012 Highly Pathogenic Avian Influenza H7N3 Virus Isolated from Poultry in an Outbreak in Mexico: Pathobiology and Vaccine Protection. *Journal of Virology* 87, 9086–9096.

- Kau, A.L., Ahern, P.P., Griffin, N.W., Goodman, A.L., and Gordon, J.I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474, 327–336.
- Kawahara, T., Takahashi, T., Oishi, K., Tanaka, H., Masuda, M., Takahashi, S., Takano, M., Kawakami, T., Fukushima, K., Kanazawa, H., et al. (2015). Consecutive oral administration of *Bifidobacterium longum* MM-2 improves the defense system against influenza virus infection by enhancing natural killer cell activity in a murine model. *Microbiology and Immunology* 59, 1–12.
- Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., Yagi, M., Saito, T., and Okamoto, R. (1996). Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2072–2077.
- Kawaoka, Y., Krauss, S., and Webster, R.G. (1989). Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J. Virol.* 63, 4603–4608.
- Keawcharoen, J., van den Broek, J., Bouma, A., Tiensin, T., Osterhaus, A.D.M.E., and Heesterbeek, H. (2011). Wild Birds and Increased Transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) among Poultry, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17, 1016–1022.
- Kennel, C., Gould, E.A., Larson, E.D., Salcedo, E., Vickery, T., Restrepo, D., and Ramakrishnan, V.R. (2019). Differential Expression of Mucins in Murine Olfactory Versus Respiratory Epithelium. *Chem Senses* 44, 511–521.
- Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J.G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H.S., and Mazmanian, S.K. (2014). Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe* 15, 374–381.
- Kida, H., Yanagawa, R., and Matsuoka, Y. (1980). Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect Immun* 30, 547–553.
- Killian, M.L., Kim-Torchetti, M., Hines, N., Yingst, S., DeLiberto, T., and Lee, D.-H. (2016). Outbreak of H7N8 Low Pathogenic Avian Influenza in Commercial Turkeys with Spontaneous Mutation to Highly Pathogenic Avian Influenza. *Genome Announc* 4.
- Klenk, H.D., and Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* 2, 39–43.
- Klenk, H.D., Wöllert, W., Rott, R., and Scholtissek, C. (1974). Association of influenza virus proteins with cytoplasmic fractions. *Virology* 57, 28–41.
- Klenk, H.D., Rott, R., Orlich, M., and Blödorn, J. (1975). Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68, 426–439.
- Kleyheeg, E., Slaterus, R., Bodewes, R., Rijks, J.M., Spierenburg, M.A.H., Beerens, N., Kelder, L., Poen, M.J., Stegeman, J.A., Fouchier, R.A.M., et al. (2017). Deaths among Wild Birds during Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 23, 2050–2054.

- Ko, J.H., Takada, A., Mitsuhashi, T., Agui, T., and Watanabe, T. (2004). Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631. *Animal Genetics* 35, 119–122.
- Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P.C., Palese, P., Shaw, M.L., Treanor, J., Webster, R.G., et al. (2018). Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4, 3.
- Kuss, S.K., Best, G.T., Etheredge, C.A., Pruijssers, A.J., Frierson, J.M., Hooper, L.V., Dermody, T.S., and Pfeiffer, J.K. (2011). Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis. *Science* 334, 249–252.
- Kuszewski, K., and Brydak, L. (2000). The epidemiology and history of influenza. *Biomed Pharmacother* 54, 188–195.
- Kwon, H., Kim, Y.-I., Park, S.-J., Kim, E.-H., Kim, S., Si, Y.-J., Song, M.-S., Pascua, P.N.Q., Govorkova, E.A., Webster, R.G., et al. (2019). A Novel Neuraminidase-Dependent Hemagglutinin Cleavage Mechanism Enables the Systemic Spread of an H7N6 Avian Influenza Virus. *MBio* 10, e02369-19, /mbio/10/6/mBio.02369-19.atom.
- Landolt, G.A., and Olsen, C.W. (2007). Up to new tricks - a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Anim Health Res Rev* 8, 1–21.
- Laurie, K.L., Guarnaccia, T.A., Carolan, L.A., Yan, A.W.C., Aban, M., Petrie, S., Cao, P., Heffernan, J.M., McVernon, J., Mosse, J., et al. (2015). Interval Between Infections and Viral Hierarchy Are Determinants of Viral Interference Following Influenza Virus Infection in a Ferret Model. *J Infect Dis*. 212, 1701–1710.
- Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., Alexopoulou, L., Escriou, N., Flavell, R., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2006). Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. *PLoS Pathog* 2, e53.
- Lee, Y.K., and Mazmanian, S.K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 330, 1768–1773.
- Lee, D.-H., Torchetti, M.K., Killian, M.L., Berhane, Y., and Swayne, D.E. (2017). Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, Tennessee, USA, March 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1860–1863.
- Lee, E.K., Tian, H., and Nakaya, H.I. (2020). Antigenicity prediction and vaccine recommendation of human influenza virus A (H3N2) using convolutional neural networks. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 16, 2690–2708.
- Lee, K.H., Gordon, A., Shedden, K., Kuan, G., Ng, S., Balmaseda, A., and Foxman, B. (2019). The respiratory microbiome and susceptibility to influenza virus infection. *PLoS ONE* 14, e0207898.
- Leeks, A., Segredo-Otero, E.A., Sanjuán, R., and West, S.A. (2018). Beneficial coinfection can promote within-host viral diversity. *Virus Evolution* 4.

- Leonard, A.S., McClain, M.T., Smith, G.J.D., Wentworth, D.E., Halpin, R.A., Lin, X., Ransier, A., Stockwell, T.B., Das, S.R., Gilbert, A.S., et al. (2017). The effective rate of influenza reassortment is limited during human infection. *PLOS Pathogens* 13, e1006203.
- Li, C., Hatta, M., Watanabe, S., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2008). Compatibility among Polymerase Subunit Proteins Is a Restricting Factor in Reassortment between Equine H7N7 and Human H3N2 Influenza Viruses. *JVI* 82, 11880–11888.
- Li, C., Hatta, M., Nidom, C.A., Muramoto, Y., Watanabe, S., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2010). Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4687–4692.
- Li, J., zu Dohna, H., Cardona, C.J., Miller, J., and Carpenter, T.E. (2011). Emergence and Genetic Variation of Neuraminidase Stalk Deletions in Avian Influenza Viruses. *PLoS One* 6.
- Li, S.Q., Orlich, M., and Rott, R. (1990). Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes. *J. Virol.* 64, 3297–3303.
- Liang, Q., Luo, J., Zhou, K., Dong, J., and He, H. (2011). Immune-related gene expression in response to H5N1 avian influenza virus infection in chicken and duck embryonic fibroblasts. *Mol. Immunol.* 48, 924–930.
- Lin, Y.P., Xiong, X., Wharton, S.A., Martin, S.R., Coombs, P.J., Vachieri, S.G., Christodoulou, E., Walker, P.A., Liu, J., Skehel, J.J., et al. (2012). Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *PNAS* 109, 21474–21479.
- Liniger, M., Summerfield, A., Zimmer, G., McCullough, K.C., and Ruggli, N. (2012). Chicken Cells Sense Influenza A Virus Infection through MDA5 and CARDIF Signaling Involving LGP2. *Journal of Virology* 86, 705–717.
- Liu, Y.-J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275–306.
- Liu, G., Park, H.-S., Pyo, H.-M., Liu, Q., and Zhou, Y. (2015). Influenza A Virus Panhandle Structure Is Directly Involved in RIG-I Activation and Interferon Induction. *J. Virol.* 89, 6067–6079.
- Liu, Q., Zhou, Y., and Yang, Z. (2016). The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol* 13, 3–10.
- Londt, B.Z., Banks, J., and Alexander, D.J. (2007). Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in in vivo tests. *Avian Pathol.* 36, 347–350.
- Long, J.S., Giotis, E.S., Moncorgé, O., Frise, R., Mistry, B., James, J., Morisson, M., Iqbal, M., Vignal, A., Skinner, M.A., et al. (2016). Species difference in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction. *Nature* 529, 101–104.
- Long, J.S., Mistry, B., Haslam, S.M., and Barclay, W.S. (2019). Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology* 17, 67–81.

- Lowen, A.C. (2017). Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. *Annu. Rev. Virol.* 4, 105–121.
- Luo, G.X., Luytjes, W., Enami, M., and Palese, P. (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J. Virol.* 65, 2861–2867.
- MAA (2017). Cahier des charges du label rouge n°LA 08/87 “Poulet blanc fermier élevé en plein air, entier et découpes, frais.” 55.
- MacDonald, M.R.W., Xia, J., Smith, A.L., and Magor, K.E. (2008). The duck toll like receptor 7: genomic organization, expression and function. *Mol Immunol* 45, 2055–2061.
- Macfarlane, S., and Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62, 67–72.
- Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 478–485.
- Madsen, J.J., Grime, J.M.A., Rossman, J.S., and Voth, G.A. (2018). Entropic forces drive clustering and spatial localization of influenza A M2 during viral budding. *PNAS* 115, E8595–E8603.
- Magor, K.E., Miranzo Navarro, D., Barber, M.R.W., Petkau, K., Fleming-Canepa, X., Blyth, G.A.D., and Blaine, A.H. (2013). Defense genes missing from the flight division. *Developmental & Comparative Immunology* 41, 377–388.
- Mair, C.M., Ludwig, K., Herrmann, A., and Sieben, C. (2014). Receptor binding and pH stability - how influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1153–1168.
- Mänz, B., Dornfeld, D., Götz, V., Zell, R., Zimmermann, P., Haller, O., Kochs, G., and Schwemmler, M. (2013). Pandemic influenza A viruses escape from restriction by human MxA through adaptive mutations in the nucleoprotein. *PLoS Pathog.* 9, e1003279.
- Marcken, M. de, Dhaliwal, K., Danielsen, A.C., Gautron, A.S., and Dominguez-Villar, M. (2019). TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Sci. Signal.* 12.
- Marshall, N., Priyamvada, L., Ende, Z., Steel, J., and Lowen, A.C. (2013). Influenza Virus Reassortment Occurs with High Frequency in the Absence of Segment Mismatch. *PLoS Pathog* 9, e1003421.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991). Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol.* 65, 232–244.
- Maslowski, K.M., and Mackay, C.R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* 12, 5–9.

- Maslowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., Rolph, M.S., Mackay, F., Artis, D., et al. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 461, 1282–1286.
- Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., and Klenk, H.-D. (2004a). Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Journal of Virology* 78, 12665–12667.
- Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., and Klenk, H.-D. (2004b). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4620–4624.
- Maurer-Stroh, S., Lee, R.T., Gunalan, V., and Eisenhaber, F. (2013). The highly pathogenic H7N3 avian influenza strain from July 2012 in Mexico acquired an extended cleavage site through recombination with host 28S rRNA. *Virol J* 10, 139.
- McAuley, J.L., Hornung, F., Boyd, K.L., Smith, A.M., McKeon, R., Bennink, J., Yewdell, J.W., and McCullers, J.A. (2007). Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe* 2, 240–249.
- McAuley, J.L., Tate, M.D., MacKenzie-Kludas, C.J., Pinar, A., Zeng, W., Stutz, A., Latz, E., Brown, L.E., and Mansell, A. (2013). Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. *PLoS Pathog* 9, e1003392.
- McCullers, J.A., and Rehg, J.E. (2002). Lethal Synergism between Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae*: Characterization of a Mouse Model and the Role of Platelet-Activating Factor Receptor. *The Journal of Infectious Diseases* 186, 341–350.
- McCullers, J.A., McAuley, J.L., Browall, S., Iverson, A.R., Boyd, K.L., and Henriques Normark, B. (2010). Influenza Enhances Susceptibility to Natural Acquisition of and Disease due to *Streptococcus pneumoniae* in Ferrets. *The Journal of Infectious Diseases* 202, 1287–1295.
- McKinstry, K.K., Strutt, T.M., Kuang, Y., Brown, D.M., Sell, S., Dutton, R.W., and Swain, S.L. (2012). Memory CD4⁺ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms. *J Clin Invest* 122, 2847–2856.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O’Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15, 87–103.
- Miyauchi, K., Sugimoto-Ishige, A., Harada, Y., Adachi, Y., Usami, Y., Kaji, T., Inoue, K., Hasegawa, H., Watanabe, T., Hijikata, A., et al. (2016). Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. *Nat Immunol* 17, 1447–1458.
- Mo, J., Youk, S., Pantin-Jackwood, M.J., Suarez, D.L., Lee, D.-H., Killian, M.L., Bergeson, N.H., and Spackman, E. (2021). The pathogenicity and transmission of live bird market H2N2 avian influenza viruses in chickens, Pekin ducks, and guinea fowl. *Veterinary Microbiology* 260, 109180.

Monne, I., Fusaro, A., Nelson, M.I., Bonfanti, L., Mulatti, P., Hughes, J., Murcia, P.R., Schivo, A., Valastro, V., Moreno, A., et al. (2014). Emergence of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from a Low-Pathogenic Progenitor. *Journal of Virology* 88, 4375–4388.

Morens, D.M., Taubenberger, J.K., and Fauci, A.S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* 198, 962–970.

Mori, K., Murano, K., Ohniwa, R.L., Kawaguchi, A., and Nagata, K. (2015). Oseltamivir Expands Quasispecies of Influenza Virus through Cell-to-cell Transmission. *Scientific Reports* 5, 9163.

Morrison, D.J., and Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200.

Moya, A., Elena, S.F., Bracho, A., Miralles, R., and Barrio, E. (2000). The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6967–6973.

Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W.E.P., Schutten, M., Olsen, B., et al. (2007). Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog* 3, e61.

Munster, V.J., Schrauwen, E.J.A., Wit, E. de, Brand, J.M.A. van den, Bestebroer, T.M., Herfst, S., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., and Fouchier, R.A.M. (2010). Insertion of a Multibasic Cleavage Motif into the Hemagglutinin of a Low-Pathogenic Avian Influenza H6N1 Virus Induces a Highly Pathogenic Phenotype. *Journal of Virology* 84, 7953–7960.

Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2006). Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J. Virol.* 80, 2318–2325.

Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., and Kawaoka, Y. (2013). Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *Journal of Virology* 87, 2455–2462.

Naeem, K., and Siddique, N. (2006). Use of strategic vaccination for the control of avian influenza in Pakistan. *Dev Biol (Basel)* 124, 145–150.

Naeem, K., Siddique, N., Ayaz, M., and Jalalee, M.A. (2007). Avian influenza in Pakistan: outbreaks of low- and high-pathogenicity avian influenza in Pakistan during 2003-2006. *Avian Dis.* 51, 189–193.

Nakatsu, S., Sagara, H., Sakai-Tagawa, Y., Sugaya, N., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2016). Complete and Incomplete Genome Packaging of Influenza A and B Viruses. *MBio* 7.

Nao, N., Yamagishi, J., Miyamoto, H., Igarashi, M., Manzoor, R., Ohnuma, A., Tsuda, Y., Furuyama, W., Shigeno, A., Kajihara, M., et al. (2017). Genetic Predisposition To Acquire a Polybasic Cleavage Site for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Hemagglutinin. *MBio* 8, e02298-16, /mbio/8/1/e02298-16.atom.

Neumann, G., Castrucci, M.R., and Kawaoka, Y. (1997). Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *Journal of Virology* 71, 9690–9700.

Noda, T., Murakami, S., Nakatsu, S., Imai, H., Muramoto, Y., Shindo, K., Sagara, H., and Kawaoka, Y. (2018). Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. *Nat Commun* 9.

Nowak, M.A., May, R.M., and Anderson, R.M. (1990). The evolutionary dynamics of HIV-1 quasispecies and the development of immunodeficiency disease. *AIDS* 4, 1095–1103.

OFFLU (2018). OIE/FAO Network of Expertise on Animal Influenza: Influenza A Cleavage Sites Report 2018.

OIE (2019). OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.3.4 - Avian influenza (infection with avian influenza viruses). p.

O'Mahony, S.M., Marchesi, J.R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A.-M., Quigley, E.M.M., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2009). Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses. *Biological Psychiatry* 65, 263–267.

Opatowski, L., Baguelin, M., and Eggo, R.M. (2018). Influenza interaction with cocirculating pathogens and its impact on surveillance, pathogenesis, and epidemic profile: A key role for mathematical modelling. *PLoS Pathog* 14, e1006770.

Ozawa, M., Basnet, S., Burley, L.M., Neumann, G., Hatta, M., and Kawaoka, Y. (2011). Impact of amino acid mutations in PB2, PB1-F2, and NS1 on the replication and pathogenicity of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses. *J. Virol.* 85, 4596–4601.

Palese, P., and Compans, R.W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J. Gen. Virol.* 33, 159–163.

Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., and Compans, R.W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61, 397–410.

Pantin-Jackwood, M.J., and Swayne, D.E. (2009). Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *Rev Sci Tech* 28, 113–136.

Pasick, J., Handel, K., Robinson, J., Copps, J., Ridd, D., Hills, K., Kehler, H., Cottam-Birt, C., Neufeld, J., Berhane, Y., et al. (2005). Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J. Gen. Virol.* 86, 727–731.

Pauly, M.D., Procario, M.C., and Luring, A.S. (2017). A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *ELife* 6, e26437.

Pavlovic, J., Zürcher, T., Haller, O., and Staeheli, P. (1990). Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. *Journal of Virology* 64, 3370–3375.

- Peiris, J., Yu, W., Leung, C., Cheung, C., Ng, W., Nicholls, J., Ng, T., Chan, K., Lai, S., Lim, W., et al. (2004). Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *The Lancet* 363, 617–619.
- Peiris, J.S.M., Cowling, B.J., Wu, J.T., Feng, L., Guan, Y., Yu, H., and Leung, G.M. (2016). Interventions to reduce zoonotic and pandemic risks from avian influenza in Asia. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 252–258.
- Perdigón, G., Fuller, R., and Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol* 2, 27–42.
- Perdue, M.L., García, M., Senne, D., and Fraire, M. (1997). Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Research* 49, 173–186.
- Pflug, A., Lukarska, M., Resa-Infante, P., Reich, S., and Cusack, S. (2017). Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res* 234, 103–117.
- Philbin, V.J., Iqbal, M., Boyd, Y., Goodchild, M.J., Beal, R.K., Bumstead, N., Young, J., and Smith, A.L. (2005). Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 114, 507–521.
- Pica, N., Hai, R., Krammer, F., Wang, T.T., Maamary, J., Eggink, D., Tan, G.S., Krause, J.C., Moran, T., Stein, C.R., et al. (2012). Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2573–2578.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.-P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., and Reis e Sousa, C. (2009). Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol* 83, 10761–10769.
- Pinar, A., Dowling, J.K., Bitto, N.J., Robertson, A.A.B., Latz, E., Stewart, C.R., Drummond, G.R., Cooper, M.A., McAuley, J.L., Tate, M.D., et al. (2017). PB1-F2 Peptide Derived from Avian Influenza A Virus H7N9 Induces Inflammation via Activation of the NLRP3 Inflammasome. *J Biol Chem* 292, 826–836.
- Ping, J., Selman, M., Tyler, S., Forbes, N., Keleta, L., and Brown, E.G. (2012). Low-pathogenic avian influenza virus A/turkey/Ontario/6213/1966 (H5N1) is the progenitor of highly pathogenic A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9). *J Gen Virol* 93, 1649–1657.
- Pyankova, O.G., Susloparov, I.M., Moiseeva, A.A., Kolosova, N.P., Onkhonova, G.S., Danilenko, A.V., Vakalova, E.V., Shendo, G.L., Nekeshina, N.N., Noskova, L.N., et al. (2021). Isolation of clade 2.3.4.4b A(H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020. *Eurosurveillance* 26, 2100439.
- Qin, N., Zheng, B., Yao, J., Guo, L., Zuo, J., Wu, L., Zhou, J., Liu, L., Guo, J., Ni, S., et al. (2015). Influence of H7N9 virus infection and associated treatment on human gut microbiota. *Scientific Reports* 5.

- Reich, S., Guilligay, D., and Cusack, S. (2017). An in vitro fluorescence based study of initiation of RNA synthesis by influenza B polymerase. *Nucleic Acids Research* 45, 3353–3368.
- Reid, A.H., Fanning, T.G., Janczewski, T.A., McCall, S., and Taubenberger, J.K. (2002). Characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus matrix gene segment. *J. Virol.* 76, 10717–10723.
- Richard, A.L., Siegel, S.J., Erikson, J., and Weiser, J.N. (2014). TLR2 Signaling Decreases Transmission of *Streptococcus pneumoniae* by Limiting Bacterial Shedding in an Infant Mouse Influenza A Co-infection Model. *PLOS Pathogens* 10, e1004339.
- Richard, M., Fouchier, R., Monne, I., and Kuiken, T. (2017). Mechanisms and risk factors for mutation from low to highly pathogenic avian influenza virus. 26.
- Robb, N.C., Smith, M., Vreede, F.T., and Fodor, E. 2009 (2009). NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *Journal of General Virology* 90, 1398–1407.
- Röhm, C., Süss, J., Pohle, V., and Webster, R.G. (1996). Different Hemagglutinin Cleavage Site Variants of H7N7 in an Influenza Outbreak in Chickens in Leipzig, Germany. *Virology* 218, 253–257.
- Rooks, M.G., and Garrett, W.S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 16, 341–352.
- Rossman, J.S., Leser, G.P., and Lamb, R.A. (2012). Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *J. Virol.* 86, 10950–10960.
- Rowe, H.M., Livingston, B., Margolis, E., Davis, A., Meliopoulos, V.A., Echlin, H., Schultz-Cherry, S., and Rosch, J.W. (2020). Respiratory Bacteria Stabilize and Promote Airborne Transmission of Influenza A Virus. *MSystems* 5.
- Russell, A.B., Trapnell, C., and Bloom, J.D. (2018). Extreme heterogeneity of influenza virus infection in single cells. *Elife* 7.
- Russell, C.A., Fonville, J.M., Brown, A.E.X., Burke, D.F., Smith, D.L., James, S.L., Herfst, S., Boheemen, S. van, Linster, M., Schrauwen, E.J., et al. (2012). The Potential for Respiratory Droplet–Transmissible A/H5N1 Influenza Virus to Evolve in a Mammalian Host. *Science* 336, 1541–1547.
- Saito, L.B., Diaz-Satizabal, L., Evseev, D., Fleming-Canepa, X., Mao, S., Webster, R.G., and Magor, K.E. (2018). IFN and cytokine responses in ducks to genetically similar H5N1 influenza A viruses of varying pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 99, 464–474.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *PNAS* 104, 582–587.
- van de Sandt, C.E., Kreijtz, J.H.C.M., and Rimmelzwaan, G.F. (2012). Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. *Viruses* 4, 1438–1476.

- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., and Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I– and MDA5-mediated antiviral responses. *PNAS* *107*, 1512–1517.
- Schmidt, N.W., Mishra, A., Wang, J., DeGrado, W.F., and Wong, G.C.L. (2013). Influenza Virus A M2 Protein Generates Negative Gaussian Membrane Curvature Necessary for Budding and Scission. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 13710–13719.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse array of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* *472*, 481–485.
- Schrauwen, E.J., and Fouchier, R.A. (2014). Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerging Microbes & Infections* *3*, 1–10.
- Schultz-Cherry, S. (2015). Viral Interference: The Case of Influenza Viruses. *J Infect Dis.* *212*, 1690–1691.
- Seekings, A.H., Slomka, M.J., Russell, C., Howard, W.A., Choudhury, B., Nuñez, A., Löndt, B.Z., Cox, W., Ceeraz, V., Thorén, P., et al. (2018). Direct evidence of H7N7 avian influenza virus mutation from low to high virulence on a single poultry premises during an outbreak in free range chickens in the UK, 2008. *Infection, Genetics and Evolution* *64*, 13–31.
- Sekirov, I., and Finlay, B.B. (2009). The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol* *587*, 4159–4167.
- Sell, S., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2019). Mouse Models Reveal Role of T-Cytotoxic and T-Reg Cells in Immune Response to Influenza: Implications for Vaccine Design. *Viruses* *11*.
- Selman, M., Dankar, S.K., Forbes, N.E., Jia, J.-J., and Brown, E.G. (2012). Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg Microbes Infect* *1*, e42.
- Seo, B.J., Rather, I.A., Kumar, V.J.R., Choi, U.H., Moon, M.R., Lim, J.H., and Park, Y.H. (2012). Evaluation of *Leuconostoc mesenteroides* YML003 as a probiotic against low-pathogenic avian influenza (H9N2) virus in chickens. *Journal of Applied Microbiology* *113*, 163–171.
- Shahangian, A., Chow, E.K., Tian, X., Kang, J.R., Ghaffari, A., Liu, S.Y., Belperio, J.A., Cheng, G., and Deng, J.C. (2009). Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J Clin Invest* *119*, 1910–1920.
- Shaw, M.L., and Palese, P. (2007). *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. *Fields Virology*, 5th Ed. Lippincott Williams and Wilkins 3059.
- Shaw, M.H., Kamada, N., Kim, Y.-G., and Núñez, G. (2012). Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J. Exp. Med.* *209*, 251–258.

- Shengqing, Y., Kishida, N., Ito, H., Kida, H., Otsuki, K., Kawaoka, Y., and Ito, T. (2002). Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. *Virology* 301, 206–211.
- Shi, W., and Gao, G.F. (2021). Emerging H5N8 avian influenza viruses. *Science* 372, 784–786.
- Sieczkarski, S.B., and Whittaker, G.R. (2005). Viral entry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285, 1–23.
- Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–569.
- Slemons, R.D., and Swayne, D.E. (1990). Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.* 34, 277–284.
- Smith, J., Smith, N., Yu, L., Paton, I.R., Gutowska, M.W., Forrest, H.L., Danner, A.F., Seiler, J.P., Digard, P., Webster, R.G., et al. (2015). A comparative analysis of host responses to avian influenza infection in ducks and chickens highlights a role for the interferon-induced transmembrane proteins in viral resistance. *BMC Genomics* 16, 574.
- Smith, K., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.* 19, 59–69.
- Smith, W., Andrewes, C.H., and Laidlaw, P.P. (1933). A VIRUS OBTAINED FROM INFLUENZA PATIENTS. *The Lancet* 222, 66–68.
- Soda, K., Cheng, M.-C., Yoshida, H., Endo, M., Lee, S.-H., Okamatsu, M., Sakoda, Y., Wang, C.-H., and Kida, H. (2011). A Low Pathogenic H5N2 Influenza Virus Isolated in Taiwan Acquired High Pathogenicity by Consecutive Passages in Chickens. *Journal of Veterinary Medical Science* *advpub*, 1101270446–1101270446.
- Soliman, M.A., Nour, A.A., and Erfan, A.M. (2019). Quantitative evaluation of viral interference among Egyptian isolates of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1 and H5N8) with the lentogenic and velogenic Newcastle disease virus genotype VII in specific pathogen-free embryonated chicken eggs model. *Vet World* 12, 1833–1839.
- Solórzano, A., Webby, R.J., Lager, K.M., Janke, B.H., García-Sastre, A., and Richt, J.A. (2005). Mutations in the NS1 Protein of Swine Influenza Virus Impair Anti-Interferon Activity and Confer Attenuation in Pigs. *Journal of Virology* 79, 7535–7543.
- Sonoguchi, T., Naito, H., Hara, M., Takeuchi, Y., and Fukumi, H. (1985). Cross-subtype protection in humans during sequential, overlapping, and/or concurrent epidemics caused by H3N2 and H1N1 influenza viruses. *J Infect Dis* 151, 81–88.
- Soubies, S.M., Volmer, C., Croville, G., Loupias, J., Peralta, B., Costes, P., Lacroux, C., Guérin, J.-L., and Volmer, R. (2010). Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. *J. Virol.* 84, 6733–6747.

- Steed, A.L., Christophi, G.P., Kaiko, G.E., Sun, L., Goodwin, V.M., Jain, U., Esaulova, E., Artyomov, M.N., Morales, D.J., Holtzman, M.J., et al. (2017). The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon. *Science* 357, 498–502.
- Stegmann, T. (2000). Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* 1, 598–604.
- Steinhauer, D.A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258, 1–20.
- Steinhauer, D.A., Domingo, E., and Holland, J.J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122, 281–288.
- Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11, 2407–2414.
- Suarez, D.L. (2000). Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology* 74, 15–27.
- Suarez, D.L., Senne, D.A., Banks, J., Brown, I.H., Essen, S.C., Lee, C.-W., Manvell, R.J., Mathieu-Benson, C., Moreno, V., Pedersen, J.C., et al. (2004). Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerging Infect. Dis.* 10, 693–699.
- Subbarao, E.K., London, W., and Murphy, B.R. (1993). A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67, 1761–1764.
- Sun, J.C., and Bevan, M.J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339–342.
- Sun, Y., Tan, Y., Wei, K., Sun, H., Shi, Y., Pu, J., Yang, H., Gao, G.F., Yin, Y., Feng, W., et al. (2013). Amino Acid 316 of Hemagglutinin and the Neuraminidase Stalk Length Influence Virulence of H9N2 Influenza Virus in Chickens and Mice. *J Virol* 87, 2963–2968.
- Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Sitnik, K., Kitamura, H., Agace, W.W., and Fagarasan, S. (2010). The Sensing of Environmental Stimuli by Follicular Dendritic Cells Promotes Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity* 33, 71–83.
- Swayne, D.E. (2006). Principles for vaccine protection in chickens and domestic waterfowl against avian influenza: emphasis on Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza. *Ann N Y Acad Sci* 1081, 174–181.
- Swayne, D.E. (2007). Understanding the Complex Pathobiology of High Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Birds. *Avian Diseases* 51, 242–249.
- Takeda, S., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Kawahara, S., Yoshida, H., Watanabe, W., Muguruma, M., and Kurokawa, M. (2011). Efficacy of oral administration of heat-killed probiotics from Mongolian dairy products against influenza infection in mice: Alleviation of influenza infection by its immunomodulatory activity through intestinal immunity. *International Immunopharmacology* 11, 1976–1983.

- Tashiro, M., Ciborowski, P., Klenk, H.D., Pulverer, G., and Rott, R. (1987). Role of *Staphylococcus* protease in the development of influenza pneumonia. *Nature* 325, 536–537.
- Taubenberger, J.K., and Kash, J.C. (2010). Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host & Microbe* 7, 440–451.
- Thackray, L.B., Handley, S.A., Gorman, M.J., Poddar, S., Bagadia, P., Briseño, C.G., Theisen, D.J., Tan, Q., Hykes, B.L., Lin, H., et al. (2018). Oral Antibiotic Treatment of Mice Exacerbates the Disease Severity of Multiple Flavivirus Infections. *Cell Reports* 22, 3440–3453.e6.
- Thaiss, C.A., Zmora, N., Levy, M., and Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65–74.
- Topham, D.J., Tripp, R.A., and Doherty, P.C. (1997). CD8⁺ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* 159, 5197–5200.
- de la Torre, J.C., and Holland, J.J. (1990). RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *Journal of Virology* 64, 6278–6281.
- Tsukiyama-Kohara, K., and Kohara, M. (2017). Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci* 19.
- Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., Saito, S., Numajiri, A., and Nagata, K. (2004). Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* 32, 643–652.
- Turrell, L., Lyall, J.W., Tiley, L.S., Fodor, E., and Vreede, F.T. (2013). The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 4, 1591.
- Uyeki, T.M. (2009). Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: review of clinical issues. *Clin. Infect. Dis.* 49, 279–290.
- Vandervan, H.A., Petkau, K., Ryan-Jean, K.E.E., Aldridge, J.R., Webster, R.G., and Magor, K.E. (2012). Avian influenza rapidly induces antiviral genes in duck lung and intestine. *Mol. Immunol.* 51, 316–324.
- Vasin, A.V., Temkina, O.A., Egorov, V.V., Klotchenko, S.A., Plotnikova, M.A., and Kiselev, O.I. (2014). Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins. *Virus Research* 185, 53–63.
- Veits, J., Weber, S., Stech, O., Breithaupt, A., Gräber, M., Gohrbandt, S., Bogs, J., Hundt, J., Teifke, J.P., Mettenleiter, T.C., et al. (2012). Avian influenza virus hemagglutinins H2, H4, H8, and H14 support a highly pathogenic phenotype. *PNAS* 109, 2579–2584.
- te Velhuis, A.J.W., Long, J.C., Bauer, D.L.V., Fan, R.L.Y., Yen, H.-L., Sharps, J., Siegers, J.Y., Killip, M.J., French, H., Oliva-Martín, M.J., et al. (2018). Mini viral RNAs act as innate immune agonists during influenza virus infection. *Nature Microbiology* 3, 1234–1242.

- Vergne, T., Gubbins, S., Guinat, C., Bauzile, B., Delpont, M., Chakraborty, D., Gruson, H., Roche, B., Andraud, M., Paul, M., et al. (2020). Inferring within-flock transmission dynamics of highly pathogenic avian influenza (H5N8) in France, 2020. *BioRxiv* 2020.12.21.423436.
- Verhagen, J.H., van der Jeugd, H.P., Nolet, B.A., Slaterus, R., Kharitonov, S.P., de Vries, P.P., Vuong, O., Majoor, F., Kuiken, T., and Fouchier, R.A. (2015). Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways. *Euro Surveill* 20.
- Vijaykrishna, D., Smith, G.J.D., Pybus, O.G., Zhu, H., Bhatt, S., Poon, L.L.M., Riley, S., Bahl, J., Ma, S.K., Cheung, C.L., et al. (2011). Long-term evolution and transmission dynamics of swine influenza A virus. *Nature* 473, 519–522.
- Waki, N., Yajima, N., Suganuma, H., Buddle, B.M., Luo, D., Heiser, A., and Zheng, T. (2014). Oral administration of *Lactobacillus brevis* KB290 to mice alleviates clinical symptoms following influenza virus infection. *Letters in Applied Microbiology* 58, 87–93.
- Walker, J.A., Molloy, S.S., Thomas, G., Sakaguchi, T., Yoshida, T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1994). Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *J. Virol.* 68, 1213–1218.
- Wang, Z., Chai, W., Burwinkel, M., Twardziok, S., Wrede, P., Palissa, C., Esch, B., and Schmidt, M.F.G. (2013). Inhibitory influence of *Enterococcus faecium* on the propagation of swine influenza A virus in vitro. *PLoS ONE* 8, e53043.
- Watanabe, T., Watanabe, S., Ito, H., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2001). Influenza A Virus Can Undergo Multiple Cycles of Replication without M2 Ion Channel Activity. *J Virol* 75, 5656–5662.
- Webby, R.J., and Webster, R.G. (2001). Emergence of influenza A viruses. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 356, 1817–1828.
- Webster, R.G., Yakhno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., and Murti, K.G. (1978). Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268–278.
- Webster, R.G., Laver, W.G., Air, G.M., and Schild, G.C. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature* 296, 115–121.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 56, 152–179.
- Wei, L., Jiao, P., Song, Y., Cao, L., Yuan, R., Gong, L., Cui, J., Zhang, S., Qi, W., Yang, S., et al. (2013). Host immune responses of ducks infected with H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses of different pathogenicities. *Vet. Microbiol.* 166, 386–393.
- Wells, M.A., Albrecht, P., and Ennis, F.A. (1981). Recovery from a viral respiratory infection. I. Influenza pneumonia in normal and T-deficient mice. *J Immunol* 126, 1036–1041.
- Whittaker, G., Bui, M., and Helenius, A. (1996). The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell Biol.* 6, 67–71.

- Wille, M., Tolf, C., Avril, A., Latorre-Margalef, N., Wallerström, S., Olsen, B., and Waldenström, J. (2013). Frequency and patterns of reassortment in natural influenza A virus infection in a reservoir host. *Virology* 443, 150–160.
- Williams, G.D., Townsend, D., Wylie, K.M., Kim, P.J., Amarasinghe, G.K., Kutluay, S.B., and Boon, A.C.M. (2018). Nucleotide resolution mapping of influenza A virus nucleoprotein-RNA interactions reveals RNA features required for replication. *Nat Commun* 9, 465.
- Wise, H.M., Foeglein, A., Sun, J., Dalton, R.M., Patel, S., Howard, W., Anderson, E.C., Barclay, W.S., and Digard, P. (2009). A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *Journal of Virology* 83, 8021–8031.
- Wise, H.M., Hutchinson, E.C., Jagger, B.W., Stuart, A.D., Kang, Z.H., Robb, N., Schwartzman, L.M., Kash, J.C., Fodor, E., Firth, A.E., et al. (2012). Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLoS Pathog* 8.
- de Wit, E., Munster, V.J., van Riel, D., Beyer, W.E.P., Rimmelzwaan, G.F., Kuiken, T., Osterhaus, A.D.M.E., and Fouchier, R.A.M. (2010). Molecular Determinants of Adaptation of Highly Pathogenic Avian Influenza H7N7 Viruses to Efficient Replication in the Human Host. *Journal of Virology* 84, 1597–1606.
- de Wit, J.J., Fabri, T.H.F., Molenaar, R.J., Dijkman, R., de Bruijn, N., and Bouwstra, R. (2020). Major difference in clinical outcome and replication of a H3N1 avian influenza strain in young pullets and adult layers. *Avian Pathology* 49, 286–295.
- Wong, S.-S., Yoon, S.-W., Zanin, M., Song, M.-S., Oshansky, C., Zaraket, H., Sonnberg, S., Rubrum, A., Seiler, P., Ferguson, A., et al. (2014). Characterization of an H4N2 Influenza Virus from Quails with a Multibasic Motif in the Hemagglutinin Cleavage Site. *Virology* 0, 72–80.
- Wood, G.W., Banks, J., Strong, I., Parsons, G., and Alexander, D.J. (1996). An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathol.* 25, 799–806.
- Wrammert, J., Smith, K., Miller, J., Langley, W.A., Kokko, K., Larsen, C., Zheng, N.-Y., Mays, I., Garman, L., Helms, C., et al. (2008). Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453, 667–671.
- Xiao, H., Killip, M.J., Staeheli, P., Randall, R.E., and Jackson, D. (2013). The Human Interferon-Induced MxA Protein Inhibits Early Stages of Influenza A Virus Infection by Retaining the Incoming Viral Genome in the Cytoplasm. *J Virol* 87, 13053–13058.
- Xu, X., Subbarao, null, Cox, N.J., and Guo, Y. (1999). Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 261, 15–19.

- Xue, K.S., Hooper, K.A., Ollodart, A.R., Dingens, A.S., and Bloom, J.D. (2016). Cooperation between distinct viral variants promotes growth of H3N2 influenza in cell culture. *ELife* 5, e13974.
- Xue, K.S., Moncla, L.H., Bedford, T., and Bloom, J.D. (2018). Within-Host Evolution of Human Influenza Virus. *Trends in Microbiology* 26, 781–793.
- Yamayoshi, S., Watanabe, M., Goto, H., and Kawaoka, Y. (2016). Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. *J. Virol.* 90, 444–456.
- Yan, D., Shi, Y., Wang, H., Li, G., Li, X., Wang, B., Su, X., Wang, J., Teng, Q., Yang, J., et al. (2018). A Single Mutation at Position 156 in the Envelope Protein of Tembusu Virus Is Responsible for Virus Tissue Tropism and Transmissibility in Ducks. *J Virol* 92.
- Yan, T., Zhu, S., Wang, H., Li, C., Diao, Y., and Tang, Y. (2020). Synergistic pathogenicity in sequential coinfection with fowl adenovirus type 4 and avian orthoreovirus. *Vet Microbiol* 251, 108880.
- Yasui, H., Kiyoshima, J., Hori, T., and Shida, K. (1999). Protection against Influenza Virus Infection of Mice Fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 186–192.
- Ye, J., Yu, M., Zhang, K., Liu, J., Wang, Q., Tao, P., Jia, K., Liao, M., and Ning, Z. (2015). Tissue-specific expression pattern and histological distribution of NLRP3 in Chinese yellow chicken. *Vet Res Commun* 39, 171–177.
- Yitbarek, A., Alkie, T., Taha-Abdelaziz, K., Astill, J., Rodriguez-Lecompte, J.C., Parkinson, J., Nagy, É., and Sharif, S. (2018a). Gut microbiota modulates type I interferon and antibody-mediated immune responses in chickens infected with influenza virus subtype H9N2. *Beneficial Microbes* 1–12.
- Yitbarek, A., Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D.C., Read, L., Nagy, É., Weese, J.S., Caswell, J.L., Parkinson, J., and Sharif, S. (2018b). Gut microbiota-mediated protection against influenza virus subtype H9N2 in chickens is associated with modulation of the innate responses. *Sci Rep* 8, 13189.
- Yitbarek, A., Alkie, T., Taha-Abdelaziz, K., Astill, J., Rodriguez-Lecompte, J.C., Parkinson, J., Nagy, É., and Sharif, S. (2018c). Gut microbiota modulates type I interferon and antibody-mediated immune responses in chickens infected with influenza virus subtype H9N2. *Beneficial Microbes* 9, 417–427.
- Youn, H.-N., Lee, D.-H., Lee, Y.-N., Park, J.-K., Yuk, S.-S., Yang, S.-Y., Lee, H.-J., Woo, S.-H., Kim, H.-M., Lee, J.-B., et al. (2012). Intranasal administration of live *Lactobacillus* species facilitates protection against influenza virus infection in mice. *Antiviral Res.* 93, 138–143.
- Yuen, K.Y., Chan, P.K., Peiris, M., Tsang, D.N., Que, T.L., Shortridge, K.F., Cheung, P.T., To, W.K., Ho, E.T., Sung, R., et al. (1998). Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351, 467–471.

- Yun, Y., Srinivas, G., Kuenzel, S., Linnenbrink, M., Alnahas, S., Bruce, K.D., Steinhoff, U., Baines, J.F., and Schaible, U.E. (2014). Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. *PLoS One* 9, e113466.
- Zebedee, S.L., and Lamb, R.A. (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.* 62, 2762–2772.
- Zhao, S., Suo, L., and Jin, M. (2012). Genetic Characterization of a Novel Recombinant H5N2 Avian Influenza Virus Isolated from Chickens in Tibet. *Journal of Virology* 86, 13836–13837.
- Zhou, P., Ma, J., Lai, A., Gray, G.C., Su, S., and Li, S. (2015). Avian influenza A(H7N9) virus and mixed live poultry-animal markets in Guangdong province: a perfect storm in the making? *Emerg Microbes Infect* 4, e63.
- Zhu, X., McBride, R., Nycholat, C.M., Yu, W., Paulson, J.C., and Wilson, I.A. (2012). Influenza virus neuraminidases with reduced enzymatic activity that avidly bind sialic Acid receptors. *J Virol* 86, 13371–13383.
- Zimmermann, P., Mänz, B., Haller, O., Schwemmle, M., and Kochs, G. (2011). The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses. *J. Virol.* 85, 8133–8140.

VII. Annexes



RÔLE RÉGULATEUR DU MICROBIOTE sur les infections virales

Pierre BESSIERE

Dès les premiers instants suivant la naissance, le microbiote commence à se développer. Il s'agit d'un vaste écosystème, principalement constitué de bactéries, mais aussi de levures, champignons et protozoaires, voire même de virus, qui colonisent la peau et les muqueuses. Plusieurs études ont démontré l'implication du microbiote dans le fonctionnement du système immunitaire et la régulation des infections virales, notamment pour les virus influenza. Le microbiote aurait un rôle protecteur reposant sur plusieurs aspects : par exemple, un effet de barrière physique, ou encore, un rôle de stimulateur du système immunitaire, permettant à ce dernier de réagir de manière précoce et plus efficace en cas d'infection par un agent pathogène.



NOTRE ÉTUDE

Nous avons investigué le rôle potentiel du microbiote intestinal dans la régulation d'une infection par un virus influenza aviaire hautement pathogène chez le canard, en utilisant un virus responsable de l'épizootie française de l'hiver 2015-2016 : le virus A/Guinea Fowl/France/129/2015(H5N9).

Deux groupes de canards ont été comparés : un dont le microbiote intestinal a été significativement déplété (ABX) par un traitement antibiotique à large spectre (incluant des molécules à usage hospitalier, non représentatif des pratiques de terrain), et un n'ayant pas reçu de traitement (NT) (cf. fig. 1).

Après avoir vérifié l'efficacité de la déplétion du microbiote par diverses techniques, incluant des techniques d'imagerie (cf. photos 1 et 2), les animaux ont été infectés. Ces expériences ont été réalisées dans des animaleries respectant les niveaux de biosécurité en vigueur (niveau 3), afin d'empêcher la diffusion de virus ou de bactéries à l'extérieur des installations expérimentales.

Figure 2 : Excrétion virale intestinale du virus H5N9 hautement pathogène, détectée par RT-qPCR.

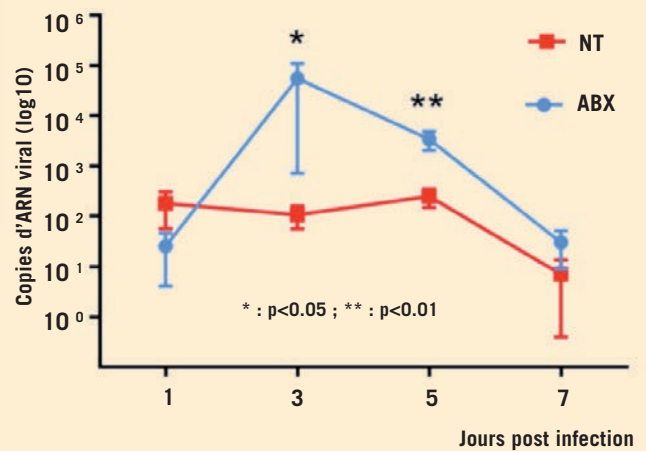
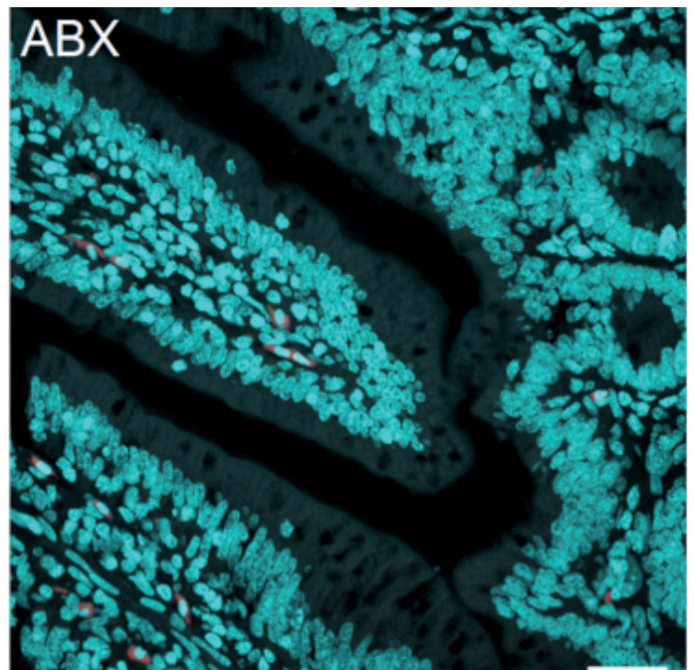
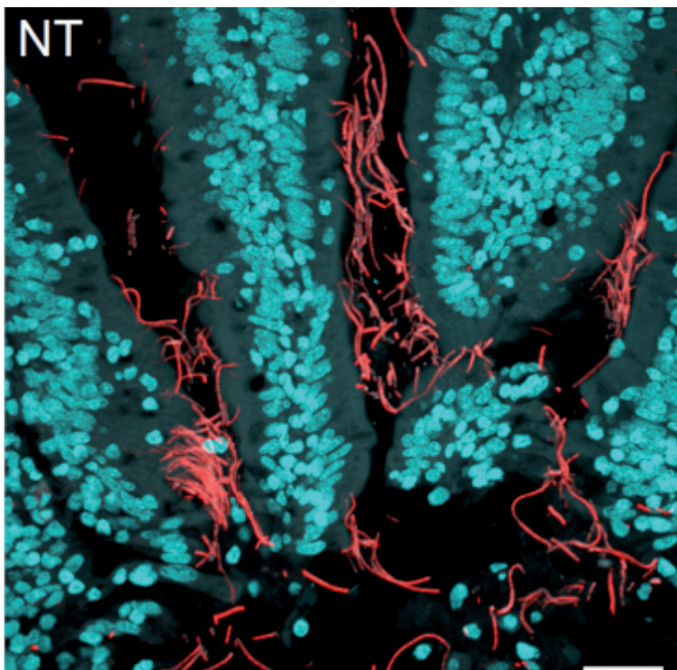
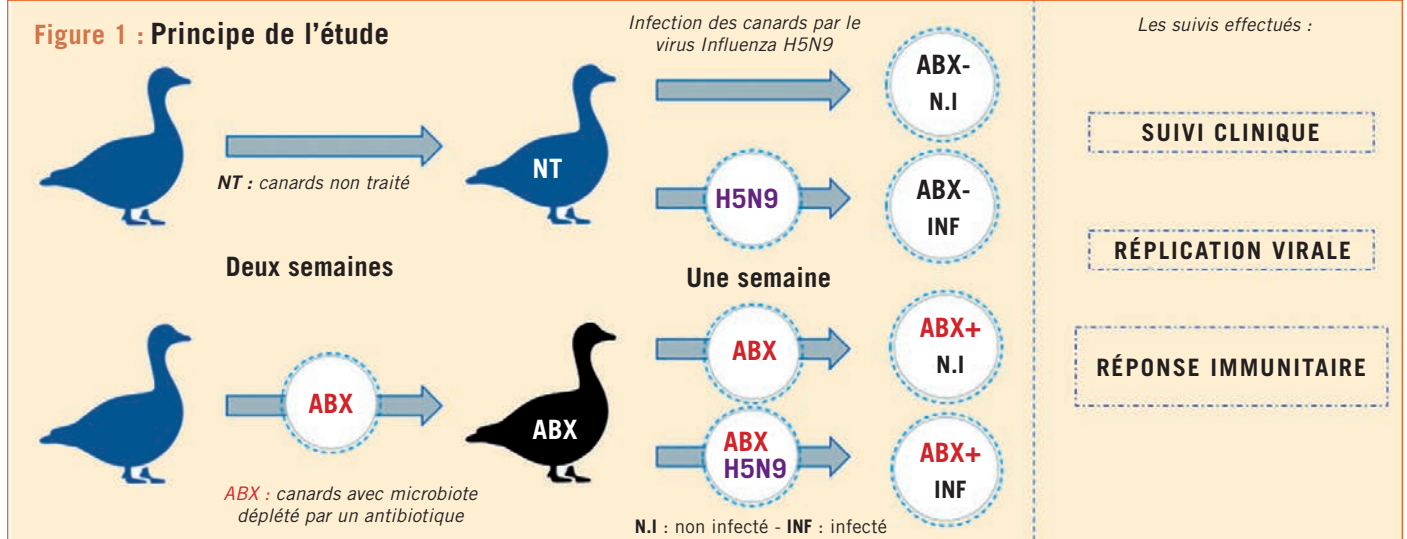


Figure 1 : Principe de l'étude



Photos 1 et 2 : Vérification de l'efficacité de la déplétion bactérienne intestinale. Coupes histologiques d'iléon de canard, dont les cellules ont été marquées en bleu et les bactéries en rouge (NT : animal non traité (NT). ABX : animal dont le microbiote a été déplété. Barre d'échelle : 25µm).

Crédit : INRAE-ENVIT



L'analyse de la réplication virale a montré que les animaux traités aux antibiotiques avaient une excrétion virale intestinale significativement plus élevée à trois et cinq jours post-infection (cf. fig. 2). La réponse immunitaire antivirale innée intestinale des animaux traités aux antibiotiques était diminuée, avec une diminution significative de l'expression des gènes stimulés par les interférons. Cette diminution est probablement à l'origine d'une augmentation de la réplication virale au niveau intestinal chez ces animaux.

LE SYSTÈME IMMUNITAIRE MAINTENU DANS UN ÉTAT DE RÉACTIVITÉ OPTIMALE

Ces résultats montrent que le microbiote participe à la régulation d'une infection par un virus influenza.

La principale hypothèse pour expliquer ces effets protecteurs est une stimulation à bas-bruit du système immunitaire. Les cellules épithéliales et immunitaires des muqueuses sont constamment exposées aux bactéries commensales et aux métabolites qu'elles produisent, ce qui les maintient dans un état de réactivité optimale. Ainsi, lorsqu'un agent pathogène est identifié par le système immunitaire, celui-ci réagit de manière rapide et adaptée.

Lorsque le microbiote est absent ou fortement déstabilisé, la réponse immunitaire est retardée et peut être disproportionnée. Notamment, des macrophages isolés à partir de souris dont le microbiote a été déplété peinent à produire une réponse interféron, un effecteur capital de la réponse antivirale innée.

D'autres mécanismes entrent en jeu tels que la production de mucus, un gel visqueux pouvant capturer les virus, ou les immunoglobulines de type A étant par exemple intimement liées à la présence du microbiote.

UNE PROTECTION CONTRE LA GRIPPE, MAIS PAS QUE...

Notre étude s'est intéressée aux virus influenza aviaires chez le canard et ses résultats sont en accord avec ce que l'on peut trouver dans la littérature scientifique concernant d'autres espèces animales.

Concernant les virus influenza, des effets similaires ont été obtenus chez le poulet et la souris, chez qui la présence d'un microbiote intact diminuait les signes cliniques et l'excrétion virale.

Le microbiote est un atout non négligeable en cas d'infection virale, mais aussi bactérienne ou parasitaire. De nombreuses études chez la souris ont révélé l'importance d'un microbiote intact en cas d'infection par des bactéries (comme *Salmonella*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Clostridium difficile*), par des virus (comme celui de la dengue, Zika ou West Nile) ou encore par *Leishmania*.

Pour des raisons pratiques, peu d'études se sont intéressées à d'autres espèces animales, mais leurs conclusions seraient vraisemblablement similaires. Il existe toutefois des exceptions : les réovirus, par exemple, détournent les fonctions du microbiote. Leurs interactions avec les bactéries commensales favorisent la

stabilité des virions et l'infection des cellules cibles.

Peut-être plus important encore, des études récentes pointent du doigt l'importance du microbiote dans la réponse vaccinale. Si en cas d'altération de la richesse et de la diversité du microbiote, le système immunitaire est perturbé, il est logique de penser qu'un vaccin sera moins efficace. A titre d'exemple, des poulets avec une dysbiose importante répondent moins bien à une vaccination anti-influenza, leurs taux d'anticorps étant plus bas que la normale.

La réponse vaccinale est également optimale chez les enfants avec un microbiote intact, comme cela a par exemple été montré pour les vaccins anti rotavirus ou choléra.

UN ALLIÉ NATUREL À PROTÉGER

Ainsi, avoir un microbiote en bonne santé semble important en cas d'infection virale. La conséquence directe qui en découle est que tout ce qui pourrait inutilement compromettre sa richesse et sa composition doit être évité : une antibio-prophylaxie non nécessaire, des paramètres environnementaux non adaptés au moment du sevrage, une alimentation déséquilibrée etc. À l'inverse, des solutions existent pour renforcer l'effet protecteur du microbiote. L'administration de probiotiques, comme des souches de *Lactobacillus* sp, pourrait atténuer les symptômes et l'excrétion virale, en cas d'infection par un virus influenza, que ce soit chez l'homme ou l'animal.

Enfin, les acides gras à courte chaîne (comme le propionate ou le butyrate), produits dans le tube digestif par la fermentation bactérienne des fibres, ont des propriétés anti-inflammatoires limitant les symptômes en cas d'infection par un virus influenza. Pour qu'ils soient produits en proportions suffisantes, des fibres fermentescibles doivent être apportées par l'alimentation, d'où l'intérêt d'une ration alimentaire équilibrée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abt, M.C., Osborne, L.C., Monticelli, L.A., Doering, T.A., Alenghat, T., Sonnenberg, G.F., Paley, M.A., Antenus, M., Williams, K.L., Erikson, J., et al. (2012). Commensal Bacteria Calibrate the Activation Threshold of Innate Antiviral Immunity. *Immunity* 37, 158–170.

Li, N., Ma, W.-T., Pang, M., Fan, Q.-L., and Hua, J.-L. (2019). The Commensal Microbiota and Viral Infection: A Comprehensive Review. *Front. Immunol.* 10.

Maslowski, K.M., and Mackay, C.R. (2011). Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat. Immunol.* 12, 5–9.

Wilks, J., and Golovkina, T. (2012). Influence of Microbiota on Viral Infections. *PLoS Pathog* 8.

Yitbarek, A., Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D.C., Read, L., Nagy, É., Weese, J.S., Caswell, J.L., Parkinson, J., and Sharif, S. (2018). Gut microbiota-mediated protection against influenza virus subtype H9N2 in chickens is associated with modulation of the innate responses. *Sci Rep* 8, 13189.

Présentation vidéo de l'étude :

https://www.youtube.com/watch?v=du_bXKoPetI

<https://www.facebook.com/watch/?v=2243802059057705>

DES BACTÉRIES CONTRE LA GRIPPE

Nous avons tous entendu parler de la grippe aviaire, cette grippe des oiseaux provoquée par les virus influenza aviaires. Généralement faiblement pathogènes, ces virus sont hébergés dans le tube digestif des oiseaux, notamment des canards, qui les transportent d'un continent à l'autre lors de leurs migrations. Mais il arrive à ces virus de muter et de devenir hautement pathogènes. Ils causent alors des ravages au sein des élevages et de la faune sauvage, et peuvent représenter un risque pour l'homme.

J'étudie les capacités protectrices du microbiote intestinal face à ce type d'infection. Composé d'une multitude de bactéries hébergées dans l'intestin, il façonne et stimule le système immunitaire. Son pouvoir protecteur naturel, particulièrement précieux en cas de maladie, pourrait être mis à mal par les traitements antibiotiques. Fort heureusement, l'utilisation de ces derniers est de plus en plus réglementée, que ce soit pour l'homme ou pour les animaux.

POUR EN SAVOIR PLUS



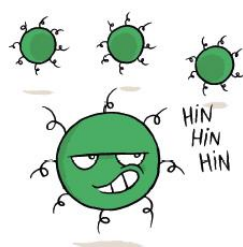
TITRE ORIGINAL DE LA THÈSE

Émergence de virus influenza aviaires hautement pathogènes : l'interface hôte, virus et microbiote

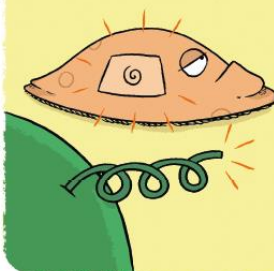


Unité mixte de recherche Interactions hôtes-agents pathogènes, INRA-École nationale vétérinaire de Toulouse

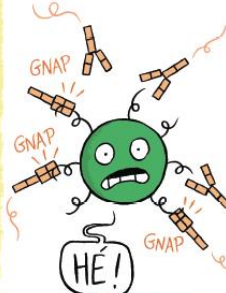
UN VIRUS NE SE REPRODUIT PAS TOUT SEUL. UNE FOIS QU'IL A PÉNÉTRÉ DANS UN ORGANISME, POUR SE MULTIPLIER, IL DOIT FORCER UNE CELLULE À FABRIQUER DES RÉPLIQUES DE LUI-MÊME.



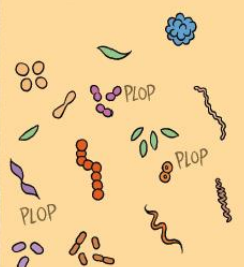
DES PROTÉINES DÉPASSENT DE SON ENVELOPPE. CHACUNE FAIT OFFICE DE « CLEF » PERMETTANT D'OUVRIR UNE « SERRURE » DE LA CELLULE, AFIN D'AVOIR ACCÈS À SON CENTRE DE PRODUCTION ET DE LA DÉTOURNER DE SA TÂCHE.



POUR EMPÊCHER L'INVASION, L'ORGANISME PEUT, PAR EXEMPLE, FABRIQUER DES ANTICORPS QUI VONT NEUTRALISER CES CLEFS.



LES BACTÉRIES, ELLES, SONT PLUS GROSSES QUE LES VIRUS ET TRÈS DIVERSES.



POUR SE MULTIPLIER, ELLES SE DIVISENT.

LEUR PRÉSENCE MASSIVE DANS LE CORPS* PERMET DE CONSTITUER UNE BARRIÈRE PHYSIQUE LIMITANT LES INTRUSIONS.



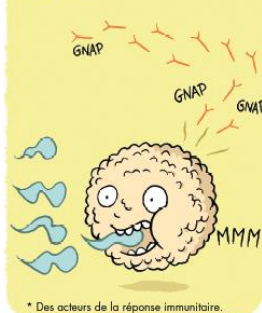
* Généralement on y dénombre au moins 10 fois plus de bactéries que de cellules.

ELLES ÉMETTENT DES COMPOSÉS CHIMIQUES. S'IL EXISTE DES BACTÉRIES QUI PEUVENT PARFOIS CAUSER DES MALADIES...



... LA PLUPART, AU CONTRAIRE, SONT TRÈS FAVORABLES À L'ORGANISME !

PAR EXEMPLE, CERTAINS DE CES COMPOSÉS STIMULENT LES GLOBULES BLANCS* ET LES RENDENT PLUS RÉACTIFS.



* Des acteurs de la réponse immunitaire.

LE CONTACT ENTRE CELLULES DU CORPS ET BACTÉRIES SE RÉVÉLANT TOXIQUE, LE CORPS SÉCRÈTE UN MUCUS TENANT LES BACTÉRIES À BONNE DISTANCE.



CETTE SÉCRÉTION PERMET ÉGALEMENT DE LUTTER CONTRE LES VIRUS, CAR ELLE CONTIENT DES LEURES QU'ILS CONFONDENT AVEC LES SERRURES DE LA CELLULE.



L'ENSEMBLE DES MICRO-ORGANISMES* COHABITANT AVEC L'ORGANISME EST APPELÉ LE MICROBIOTE. LE PLUS CONNU EST CELUI DE L'INTESTIN, MAIS ON EN TROUVE AUSSI SUR LA PEAU, DANS LE SYSTÈME RESPIRATOIRE, DANS LES ORGANES SEXUELS...



* Des bactéries, des leures, des champignons et même certains virus.

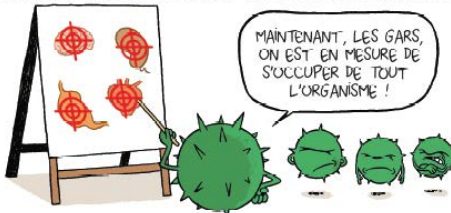
J'ÉTUDIE CELUI QUI SE TROUVE DANS L'INTESTIN DU CANARD, HÔTE PRINCIPAL D'UN TYPE DE VIRUS SUR LESQUELS JE TRAVAILLE : LES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES*.



* Responsables de la grippe touchant les oiseaux, dite « grippe aviaire ».

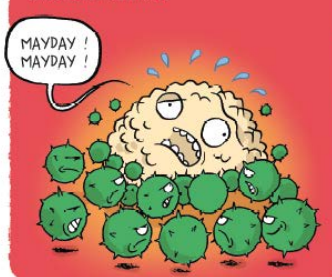
2

CES VIRUS PROLIFÈRENT DANS LES APPAREILS DIGESTIFS ET RESPIRATOIRES DES OISEAUX PAR CONTACT ENTRE INDIVIDUS OU PAR LE BIAIS DES EXCRÈMENTS, SANS NéCESSAIREMENT CAUSER DE SYMPTÔMES CHEZ LE CANARD. MAIS, TOUT EN SE MULTIPLIANT, LE VIRUS ACCUMULE LES MUTATIONS...



CERTAINES MUTATIONS, HEUREUSEMENT PEU FRÉQUENTES, PEUVENT RENDRE LE VIRUS HAUTEMENT PATHOGÈNE.

EN CAS D'ALTÉRATION DU MICROBIOTE, LA PROLIFÉRATION DES VIRUS EST FACILITÉE, CAR LA RÉPONSE IMMUNITAIRE EST CONSIDÉRABLEMENT DIMINUÉE.



QU'IL S'AGISSE DE GRANDS OU DE PETITS ÉLEVAGES, OU MÊME DE LA FAUNE SAUVAGE, LA PROGRESSION DE LA MALADIE PEUT ÊTRE FULGURANTE.



LES ACTIVITÉS HUMAINES (EMPIÈTEMENT SUR LE MONDE SAUVAGE, ÉCHANGES INTERNATIONAUX, ETC.) PEUVENT FAVORISER L'ÉMERGENCE DE MALADIES VIRALES RESTÉES INÉDITES.



3

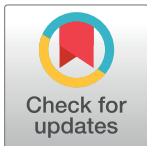
PEARLS

From one to many: The within-host rise of viral variants

Pierre Bessière , Romain Volmer *

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Université de Toulouse, ENVT, INRAE, IHAP, UMR 1225, Toulouse, France

* romain.volmer@envt.fr



Over the course of a viral infection, a tremendous number of virions are produced: up to 10^{14} —more than there are stars in the Milky Way [1].

These viruses do not exist as a genetically identical population. Genetic changes are constantly occurring, especially for RNA viruses, creating a cloud of genetically related variants [2]. Viral evolution within the infected host is shaped by host and viral factors.

Repeatedly, in the history of viral diseases, new strains have emerged with selective advantages, such as drug resistance or enhanced transmissibility. For example, a few months after the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emergence, variants with enhanced infectivity have spread worldwide [3]. At the origin of each of these emergences, at least one infected host has been the scene of a competition between the newly arisen variant and its progenitors.

Viral populations face bottlenecks (events reducing the population size, and, therefore, its genetic diversity) that can be divided into 2 categories: transmission bottlenecks and within-host bottlenecks, which we will discuss here [4]. We propose that, in order to emerge, a variant has to overcome the within-host bottlenecks by winning the competition against its progenitors, allowing it to be transmitted and selected.

OPEN ACCESS

Citation: Bessière P, Volmer R (2021) From one to many: The within-host rise of viral variants. PLoS Pathog 17(9): e1009811. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009811>

Editor: Wendy Maury, University of Iowa, UNITED STATES

Published: September 2, 2021

Copyright: © 2021 Bessière, Volmer. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE35-0005-01) and (ANR-20-COV5-0004) to RV. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

A competition between the newly formed variant and its progenitors

When a variant appears from one progenitor through de novo mutations, it likely represents a minority variant, which can cause an evolutionary issue: Progenitor and offspring are replicating in parallel and most commonly target the same cell population. For the emergence to be evolutionary successful, the newly formed variant must be transmitted to another individual. Although transmission bottlenecks are intriguingly complex, becoming one of the majority variants likely increases the transmission probability. If a variant does not reach sufficient proportions, its transmission could be jeopardized. Conversely, beyond a certain proportion threshold, a variant will have more chances of being transmitted. An emergence is thus a 2-step process: firstly, the acquisition of a selective advantage, and, secondly, the ability to out-compete the progenitors and be transmitted to other individuals.

In summary, we hypothesize that 3 scenarios can occur following the rise of a new variant within one individual (Fig 1). (1) The newly formed variant may fail to gain sufficient primacy over its precursors to be transmitted, resulting in a failed emergence. (2) The newly formed variant may outcompete or (3) coexist in lower proportions with its progenitors. In cases 2 and 3, the new variant may be transmitted, and the emergence can be evolutionarily successful.

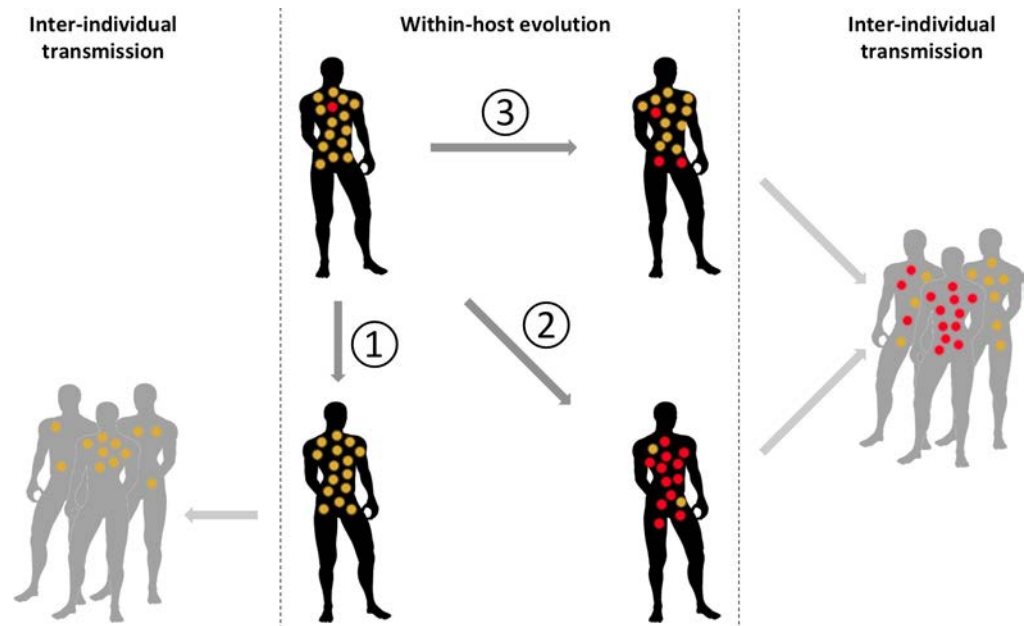


Fig 1. The 3 scenarios following variant apparition within one infected individual. Red: newly formed variant; yellow: progenitors.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009811.g001>

Variants do not necessarily interact with each other in a competitive way: One variant might be able to provide a function missing in another variant, resulting in viral cooperation. Xue and colleagues elegantly demonstrated *in vitro* that coinfection with 2 influenza variants in different proportions, one variant being proficient at cell entry and the other at cell exit, converged to an equilibrium in which both variants reached approximately the same proportions [5]. However, synergistic interactions between variants of one viral species remain anecdotal compared to competitive ones [6].

A huge selective advantage may not be enough

Intuitively, variants with a huge selective advantage, such as antiviral drug-resistant variants emerging during drug treatment or immune response-elusive variants, are likely to systematically gain primacy over their precursors. In practice, however, variants with substantial selective advantages may not always be selected, as it was demonstrated by coinfecting cells with different ratios of vesicular stomatitis virus (VSV) faster-replicating variants and wild-type virus [7]. Similarly, highly pathogenic avian influenza viruses, which reach higher viral loads and are more easily transmitted than their low pathogenic progenitors, are not always selected [8]. Thus, even if they have a selective advantage, variants may not always manage to become predominant enough and be transmitted if the within-host competition between the newly emerged variant and its progenitor is too strong. At least 3 major intertwined factors drive the within-host emergence of a minority variant: innate immune response, timing of appearance, and tissue specificity.

Innate immunity prevents variants emergence

Rapidly, following infection, intracellular viral sensors trigger immune and inflammatory pathways, resulting in the establishment of an antiviral state, dominated by type I and type III interferons (IFNs) [9]. This immune response exerts a tremendous selective pressure on viral

populations: By restraining viral replication, they increase the within-host competition. For example, in patients infected with IFN-sensitive strains of hepatitis C virus (HCV), type I IFN treatment resulted in a dramatic reduction in genetic diversity [10]. Also, by using influenza A-infected obese mice, which displayed a dampened innate immune response, a recent study showed that a delayed IFN response could lead to higher viral diversity and promoted minority variant emergence, while IFN treatment resulted in decreased viral diversity [11]. A strong type I IFN response may cause the disappearance of variants that arise. The innate immunity can therefore affect viral populations and prevent minority variants emergence through viral diversity reduction. However, under certain circumstances, innate immunity can also drive the emergence of less IFN-sensitive variants, as shown during HIV infection [12].

Timing is critical

The acquisition of a mutation may occur at any time during the course of an infection. Logically, a long infection provides more time for *de novo* mutations to arise. Influenza viruses almost always gain oseltamivir resistance in immunocompromised oseltamivir-treated patients, who experience infections lasting weeks, if not months, while resistance does rarely arise in immunocompetent patients, for which viral clearance is usually a matter of days [13]. Logically, the earlier a new variant appears, the more likely it is to become predominant. If a variant was to appear in the very first viral replication cycles in a given host, the mutation(s) responsible for its selective advantage will be found at a higher frequency in the viral population [13]. On the contrary, a late-appearing variant will likely be a needle in a haystack, and the likelihood of its transmission to another host might be lower.

Change in tissue tropism can promote variant emergence

Some mutations can affect tissue tropism. Notably, influenza A virus sialic acid receptors are not distributed equally along the respiratory tract. In humans, α 2,6-linked sialic acids are mostly found in the upper respiratory tract, while the lower respiratory tract contains high proportions of α 2,3-linked sialic acids [14]. Avian influenza strains preferentially bind to α 2,3-linked sialic acids, and, consequently, avian influenza virus infections are predominantly restricted to lower lungs in humans [14]. If an avian-derived variant able to bind α 2,6-linked sialic acids emerged within a human, it would have the opportunity to reach the upper respiratory tract and replicate remotely from its progenitors. As a consequence, we hypothesize that this variant would reach a niche where there is no competition with its progenitors for resources and where local immunity is still low. Change in tissue tropism is also well illustrated by other viruses, such as duck Tembusu virus (TMUV) or porcine respiratory coronavirus (PRCV). The P156S variant of TMUV, a mosquito-borne virus belonging to the Flaviridae family, is able to replicate efficiently in the respiratory tract, while its progenitor mostly replicates in the spleen [15]. Similarly, PRCV emerged following a deletion in the spike gene of its progenitor, the transmissible gastroenteritis virus (TGEV). While TGEV replicates in the digestive tract, PRCV replicates in the respiratory system [16]. These changes in tropism certainly promoted emergence through the acquired ability to be transmitted through respiratory droplets. However, successful emergence may have been further promoted by the lowered within-host competition of these variants with their progenitors.

Concluding remarks

A variant may fail to be transmitted because it appeared too late and did not have time to reach sufficient proportions before the infection was abrogated by the host immune response. Similarly, when a viral infection results in the death of its host, the transmission likelihood

diminishes with the time interval between variant emergence and host's death. Thus, if a variant was to gain a huge selective advantage, without the right conditions, its emergence would come to nothing. These obstacles likely limit the emergence of potentially dangerous variants—for example, no mammalian to mammalian transmissible H5N1 virus has emerged yet, even though studies in the ferret model have suggested that only a few amino acid substitutions were required for airborne transmission [1].

At a population level, other factors can prevent transmission. A selective advantage in one context can be detrimental in another, depending on the host genetic background and immune status [17]. Vaccination provides specific immunity and limits transmission, but co-circulating viruses may also hamper variants emergence. Infection by one virus can prevent or at least delay infection with a different virus through type I and type III IFNs and the induction of a nonspecific antiviral state [18,19].

Deep sequencing technologies, mathematical modeling, and in vivo infections with mixtures containing variants at different ratios provide the tools for within-host viral diversity analysis and for a better understanding of the epidemiological and evolutionary forces that drive variants emergence.

References

1. Russell CA, Fonville JM, Brown AEX, Burke DF, Smith DL, James SL, et al. The Potential for Respiratory Droplet–Transmissible A/H5N1 Influenza Virus to Evolve in a Mammalian Host. *Science*. 2012; 336:1541–7. <https://doi.org/10.1126/science.1222526> PMID: 22723414
2. Domingo E, Perales C. Viral quasispecies. *PLoS Genet*. 2019; 15:e1008271. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008271> PMID: 31622336
3. Hou YJ, Chiba S, Halfmann P, Ehre C, Kuroda M, Dinno KH, et al. SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. *Science*. 2020; 370:1464–8. <https://doi.org/10.1126/science.abe8499> PMID: 33184236
4. Zwart MP, Elena SF. Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their Potential Impact on Evolution. *Annu Rev Virol*. 2015; 2:161–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055135> PMID: 26958911
5. Xue KS, Hooper KA, Ollodart AR, Dingens AS, Bloom JD. Cooperation between distinct viral variants promotes growth of H3N2 influenza in cell culture. *Elife*. 2016; 5:e13974. <https://doi.org/10.7554/eLife.13974> PMID: 26978794
6. Domingo-Calap P, Segredo-Otero E, Durán-Moreno M, Sanjuán R. Social evolution of innate immunity evasion in a virus. *Nat Microbiol*. 2019; 4:1006–13. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0379-8> PMID: 30833734
7. de la Torre JC, Holland JJ. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol*. 1990; 64:6278–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.12.6278-6281.1990> PMID: 2173792
8. Graaf A, Ulrich R, Maksimov P, Scheibner D, Koethe S, Abdelwhab EM, et al. A viral race for primacy: co-infection of a natural pair of low and highly pathogenic H7N7 avian influenza viruses in chickens and embryonated chicken eggs. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7:204. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0204-0> PMID: 30514922
9. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 2019; 50:907–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025> PMID: 30995506
10. Farci P, Strazzera R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, et al. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:3081–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.052712599> PMID: 11880647
11. Honce R, Karlsson EA, Wohlgemuth N, Estrada LD, Meliopoulos VA, Yao J, et al. Obesity-Related Microenvironment Promotes Emergence of Virulent Influenza Virus Strains. *mBio*. 2020; 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.03341-19> PMID: 32127459
12. Doyle T, Goujon C, Malim MH. HIV-1 and interferons: who's interfering with whom? *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13:403–13. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3449> PMID: 25915633
13. Xue KS, Moncla LH, Bedford T, Bloom JD. Within-Host Evolution of Human Influenza Virus. *Trends Microbiol*. 2018; 26:781–93. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.007> PMID: 29534854
14. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 2006; 440:435–6. <https://doi.org/10.1038/440435a> PMID: 16554799

15. Yan D, Shi Y, Wang H, Li G, Li X, Wang B, et al. A Single Mutation at Position 156 in the Envelope Protein of Tembusu Virus Is Responsible for Virus Tissue Tropism and Transmissibility in Ducks. *J Virol*. 2018;92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00427-18> PMID: 29899104
16. Turlewicz-Podbielska H, Pomorska-Mól M. Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Viol Sin*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00364-0> PMID: 33723809
17. Elena SF, Agudelo-Romero P, Lalić J. The Evolution of Viruses in Multi-Host Fitness Landscapes. *Open Virol J*. 2009; 3:1–6. <https://doi.org/10.2174/1874357900903010001> PMID: 19572052
18. Nickbakhsh S, Mair C, Matthews L, Reeve R, Johnson PCD, Thorburn F, et al. Virus–virus interactions impact the population dynamics of influenza and the common cold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911083116> PMID: 31843887
19. Ingle H, Lee S, Ai T, Orvedahl A, Rodgers R, Zhao G, et al. Viral complementation of immunodeficiency confers protection against enteric pathogens via interferon-λ. *Nat Microbiol*. 2019; 4:1120–8. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0416-7> PMID: 30936486

Émergence de virus influenza aviaires hautement pathogènes : la triade hôte, microbiote et virus

Résumé

Les virus influenza aviaires faiblement pathogènes (VIAFP) appartenant aux sous-types H5 et H7 sont capables d'évoluer en virus influenza aviaires hautement pathogènes (VIAHP), suite à l'obtention d'un site de clivage polybasique (SCPB) au niveau de leur hémagglutinine (HA). HA peut alors être clivée par des protéases intracellulaires ubiquitaires et le virus est ainsi capable de se répliquer systématiquement. L'acquisition d'un SCPB est un événement virus-dépendant, ayant lieu au sein d'un animal infecté par un VIAFP parental. Pour que l'émergence soit réussie, le VIAHP nouvellement formé doit probablement devenir un variant majoritaire, afin d'être transmis à d'autres individus. Nous avons étudié les paramètres menant à l'émergence de VIAHP et cette thèse a été divisée en deux parties : premièrement, nous avons évalué les capacités régulatrices du microbiote sur l'infection par un VIAHP. En administrant à des canards un mélange d'antibiotiques à large spectre, nous avons fortement déstabilisé leur microbiote. Animaux sains et traités aux antibiotiques ont ensuite été infectés avec un VIAHP. Nous avons montré que l'excrétion virale était significativement augmentée chez les animaux traités aux antibiotiques, ceci étant corrélé à une altération de la réponse immunitaire antivirale innée. Deuxièmement, afin de modéliser la compétition intra-hôte entre un VIAHP nouvellement apparu et son précurseur VIAFP, nous avons réalisé des coinfections *in vivo* et *in ovo* chez le poulet et le canard, en utilisant un VIAHP comme variant minoritaire et un VIAFP, identique en tout point au VIAHP, à l'exception du site de clivage, comme variant majoritaire. Nous avons montré que les interactions entre ces deux virus étaient radicalement différentes chez le poulet et chez le canard, et que le VIAHP avait un avantage sélectif moindre chez ce dernier. Ces travaux apportent de nouvelles connaissances sur les conditions menant à l'émergence de VIAHP, dont les épizooties ont un impact majeur sur la santé animale, l'économie et la santé publique.

Summary

Low pathogenic avian influenza viruses (LPAIV) of the H5 and H7 subtype have the capacity to evolve to highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV), following the acquisition of a multi-basic cleavage site (MBCS) at the hemagglutinin (HA) cleavage site. This evolution allows the HA to be cleaved by intracellular ubiquitous proteases and the virus to spread systemically. The acquisition of MBCS is a virus-dependent event that occurs in a bird infected with a parental LPAIV. To emerge successfully, the newly formed HPAIV probably must become a predominant variant in order to overcome the transmission bottleneck between individuals. We investigated the factors leading to HPAIV emergence and the PhD was divided in two parts: firstly, we investigated to what extent the microbiota could contribute to the control of HPAIV infection in ducks. By treating ducks with a broad-spectrum antibiotic cocktail, we achieved a significant depletion of their microbiota. Groups of non-treated and antibiotic-treated ducks were infected with an HPAIV. We revealed that antibiotic-treated ducks had significantly higher viral excretion in the intestine, which correlated with an impaired intestinal antiviral immune response. Secondly, to model the intra-host competition between a newly formed HPAIV and its parental LPAIV, we co-infected embryonated eggs, chickens and ducks with a H5N8 HPAIV as a minority variant and a LPAIV that differed from the HPAIV only at the level of the HA cleavage site, as a majority variant. Our results demonstrate that chickens and ducks have opposite effects on the interaction between the H5N8 HPAIV and LPAIV and that HPAIV has a stronger selective advantage in chickens than in ducks. This work provides new insights on HPAIV emergence, which has a major impact on animal health, economy, as well as on public health.