

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

Rapport intermédiaire :

« Evaluation expérimentale de la transmission d'un virus IAHP A(H5N1) de clade 2.3.4.4b au sein d'une population de canards mulards vaccinés et éprouvés à 7 semaines d'âge »

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

14 mai 2023

Table des matières

1. INTRODUCTION	3
2. MATERIELS ET METHODES	6
2.1. Règlementation et éthique	6
2.2. Protocole des essais de vaccination en condition terrain	6
2.2.1. Mise en place en élevage	6
2.2.2. Vaccins	6
2.2.3. Mise en œuvre de la vaccination	7
2.2.4. Suivi technique et sanitaire	7
2.2.5. Suivi vétérinaire -analyses sérologiques et moléculaires	7
2.3. Protocole expérimental en animalerie	8
2.3.1. Transfert et hébergement des animaux	8
2.3.2. Virus d'épreuve	8
2.3.3. Répartition des animaux	8
2.3.4. Evaluation de la clinique	9
2.3.5. Sérologie	10
2.3.6. Quantification des charges génomiques virales	10
2.3.7. Estimation des paramètres de transmission	11
3. RESULTATS	12
3.1. DONNES CLINIQUES	12
3.2. EXCRETION VIRALE	13
3.2.1. Groupe Témoin non-vacciné	13
3.2.2. Groupe Vac A	14
3.2.3. Groupe Vac B	16
3.3. SEROCONVERSION	18
3.3.1. Groupe Témoin non-vacciné	18
3.3.2. Groupe VacA	19
3.3.3. Groupe VacB	20
3.4. PARAMETRES DE TRANSMISSION	21
4. CONCLUSION	22
5. REMERCIEMENTS	23
6. REFERENCES	23

1. INTRODUCTION

La France a connu, depuis novembre 2016, quatre épizooties d'influenza aviaire hautement pathogène A(H5) dues à des virus appartenant à la lignée A/goose/Guangdong/1/1996. Pendant la saison hivernale 2016-2017, l'épizootie a été provoquée par des virus de sous-type H5N8 du clade 2.3.4.4b (Briand et al., 2021). D'autres virus appartenant à ce même clade provoquent depuis la fin 2020 de nouvelles vagues d'épizooties d'IAHP successives chaque hiver en Europe, et la France est particulièrement touchée (Briand et al., 2022). Ces crises sanitaires ont généré des coûts considérables pour l'Etat et les professionnels. Par exemple, pour l'hiver 2021-2022, au 10 juin 2022, la France a déclaré 1378 foyers d'IAHP en élevage de volailles, 51 cas chez des oiseaux sauvages (libres ou captifs) et 35 cas en basse-cour suite à des infections par des virus IAHP A (H5N1), et plus particulièrement dans l'ouest (sud-ouest et grand-ouest) de la France, avec une majorité des élevages qui hébergeaient des palmipèdes. Les coûts de cette épizootie 2021-2022 ont été estimés à plus d'un milliard d'euros (Le Boulch and Bouzidi, 2022) avec l'abattage de 21 millions de volailles en France représentant 37% du total au niveau européen.

Le caractère épizootique de l'IAHP, notamment liée aux virus A(H5) du clade 2.3.4.4.b, s'est manifesté dans plusieurs pays d'Europe, conduisant le Conseil de l'Union européenne, au cours de la Présidence française, à envisager des nouveaux leviers d'action pour prévenir et contrôler l'IAHP en élevage. La publication du règlement délégué 2023/361 (annexe XIII) en février 2023 rend possible le recours à la vaccination contre l'IAHP au sein de l'Union européenne. La vaccination contre l'IAHP est donc envisagée comme un moyen supplémentaire pour contrôler la diffusion de cette maladie.

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

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

Afin de pallier cette insuffisance et d'évaluer si le déploiement de la vaccination à plus large échelle en élevage de palmipèdes est réalisable, une étude expérimentale avec un volet « expérimentation terrain » et un volet « expérimentations en animaleries de biosécurité de niveau 3 » a été élaborée sous la gouvernance du ministère de l'Agriculture et de la souveraineté alimentaire, en partenariat avec l'Anses, l'ENVT, le CIFOG, des collectivités territoriales et des laboratoires pharmaceutiques.

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

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

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

L'étude s'est déroulée en 2 phases :

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

2. Pour chacun des deux vaccins retenus, un lot de canards mulards a été sélectionné pour transférer des canards (vaccinés ou témoins non vaccinés) vers les installations expérimentales de niveau de confinement A3 du LNR influenza aviaire du laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané-Niort afin d'y conduire à 7 et 11 semaines d'âge des épreuves expérimentales réalisées avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) de clade 2.3.4.4b.

Ces études en conditions expérimentales en animaleries de biosécurité de niveau 3 réalisées par le laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané-Niort avaient pour objectifs de produire des informations chez le canard mulard portant :

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

Les premiers résultats produits dans le cadre de la présente expérimentation ont été présentés dans un premier document qui rapporte, de manière synthétique, le volet terrain et, de manière plus détaillée, les essais consacrés à l'étude de la réduction de l'excrétion.

Ce deuxième document rapporte les résultats de l'évaluation de la réduction de la transmission virale par des canards mulards vaccinés en élevage puis éprouvés à l'âge de 7 semaines en animalerie de niveau de confinement A3.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Règlements et éthique

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

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

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

2.2. Protocole des essais de vaccination en condition terrain

2.2.1. Mise en place en élevage

Pour les deux solutions vaccinales, un lot de canetons mulards mâles a été mis en place le 21/11/2022 à la station expérimentale INRAE d'Artiguères comprenant 100 canetons vaccinés avec le vaccin A, 100 avec le vaccin B et 100 témoins non vaccinés, pour un effectif total de 300 canetons, répartis dans trois locaux d'hébergements distincts.

2.2.2. Vaccins

Deux candidats vaccins ont été testés :

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

2.2.3. Mise en œuvre de la vaccination

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

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

L'administration par injection a été effectuée par un opérateur expérimenté et spécifiquement formé et encadré par chacun des 2 laboratoires producteurs de vaccins.

2.2.4. Suivi technique et sanitaire

Le lot de canards mulards a fait l'objet d'un suivi technique renforcé, avec relevé quotidien des paramètres techniques des bâtiments d'élevage et d'éventuelles mortalités, et relevé hebdomadaire du poids d'un échantillon d'animaux. Les lots vacciné et témoin ont été conduits, séparément mais à l'identique, par le responsable du site d'élevage selon ses pratiques techniques et son programme alimentaire habituels. Les animaux n'ont pas eu accès à un parcours extérieur, conformément au cadre réglementaire en vigueur au moment de la réalisation des essais.

De même, le plan de vaccination habituel de l'élevage a été mis en œuvre. Comme pour les lots précédemment suivis, le lot inclus dans cet essai et en application de la réglementation, les animaux vaccinés ont été euthanasiés à l'issue du protocole et les carcasses traitées en équarrissage sous contrôle des services de la DD(ec)PP compétente. Ils n'ont ainsi pas été introduits dans la chaîne alimentaire.

2.2.5. Suivi vétérinaire -analyses sérologiques et moléculaires

Le lot a été suivi par le vétérinaire sanitaire de l'élevage, spécialisé en médecine avicole. Une visite vétérinaire a été effectuée à l'âge de 2, 4, et 6 semaines. A chaque visite réalisée par le vétérinaire sanitaire, un examen clinique du lot a été effectué et des prélèvements ont été réalisés par le vétérinaire sur 20 sujets de chaque lot vacciné et 20 sujets du lot témoin (prise de sang, écouvillon trachéal et écouvillon cloacal) afin de réaliser le suivi sérologique et virologique des animaux jusqu'à l'âge de 6 semaines. Avant leur transfert, des écouvillons oro-pharyngés et cloacaux ont été réalisés sur 20 animaux pour l'ensemble du lot mis en place, le 03 janvier 2023 et se sont révélés négatifs pour la détection de génome de virus influenza aviaire.

2.3. Protocole expérimental en animalerie

2.3.1. Transfert et hébergement des animaux

A l'âge de 6 semaines, 21 animaux témoins non-vaccinés et 42 animaux vaccinés (21 par vaccin) ont été transférés en camion bâché vers les animaleries A3 de l'Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort puis ont été hébergés dans des parcs, sur caillebotis, en conditions confinées (atmosphère filtrée et contrôlée, sous pression négative). Lors de la mise en place des lots dans les animaleries, les animaux ont été identifiés par une bague alaire numérotée permettant d'identifier les animaux vaccinés et non-vaccinés. Les animaux ont reçu une alimentation et un abreuvement à volonté. Un animal par groupe a été mis à mort pour évaluer leur état sanitaire et pour la recherche de Salmonelle à leur arrivée.

2.3.2. Virus d'épreuve

La souche d'épreuve A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) a été isolée à partir d'écouvillons prélevés sur poulet lors de l'épizootie de 2021-2022 et appartient au clade 2.3.4.4b, génotype AC A/duck/Saratov/29-02/2021-like, génotype majoritaire circulant en Europe et en France dans les élevages depuis 2022 (European Food Safety Authority et al., 2023).

La souche a été multipliée dans des œufs embryonnés de poule exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) et le liquide allantoïque a été récolté. La pureté du stock de virus a été vérifiée conformément aux modes opératoires internes, en utilisant des méthodes de contrôle directes et indirectes, et le stock de virus a été titré sur des œufs embryonnés EOPS. L'inoculum utilisé dans cette étude a été préparé en diluant le stock viral dans du PBS jusqu'à une concentration finale attendue de 10^7 doses infectieuses dans l'œuf (EID₅₀)/ml.

2.3.3. Répartition des animaux

Les animaux ont été répartis dans trois animaleries avec dans chacune d'entre elles 2 parcs conduits de manière indépendante (séparation en polyéthylène entre les parcs pour éviter les projections) selon la figure 1. Dans l'un des parcs de chaque animalerie, 2 canards (vaccinés ou non, selon l'animalerie) ont été inoculés puis, 24 heures après l'inoculation virale, ont été mis en contact direct dans le même parc avec 9 canards de même statut vaccinal que les inoculés (vaccinés ou non) et avec 9 canards en contact indirect dans le second parc. Les animaux en contact indirect étaient dans un parc séparé par une bâche plastique allant du sol au plafond de l'animalerie mais permettant de circuler autour des parcs.

Les trois groupes étaient donc composés de :

- Groupe Témoin : 2 canards mulards témoins naïfs non-vaccinés et éprouvés mis en contact 24 heures après l'inoculation avec 9 canards témoins naïfs non-vaccinés en contact direct et 9 canards de même statut en contact indirect.

- Groupe VacA: 2 canards mulards vaccinés avec le vaccin A et éprouvés mis en contact 24 heures après l'inoculation avec 9 canards vaccinés A en contact direct et 9 canards de même statut en contact indirect.
- Groupe VacB: 2 canards mulards naïfs vaccinés avec le vaccin B et éprouvés mis en contact 24 heures après l'inoculation avec 9 canards vaccinés B en contact direct et 9 canards de même statut en contact indirect.

Dans les trois groupes, les animaux inoculés (2 dans chaque groupe) ont reçu par voie oculaire 10^6 EID₅₀ (50µL dans chaque œil) de virus d'épreuve à 7 semaines d'âge.

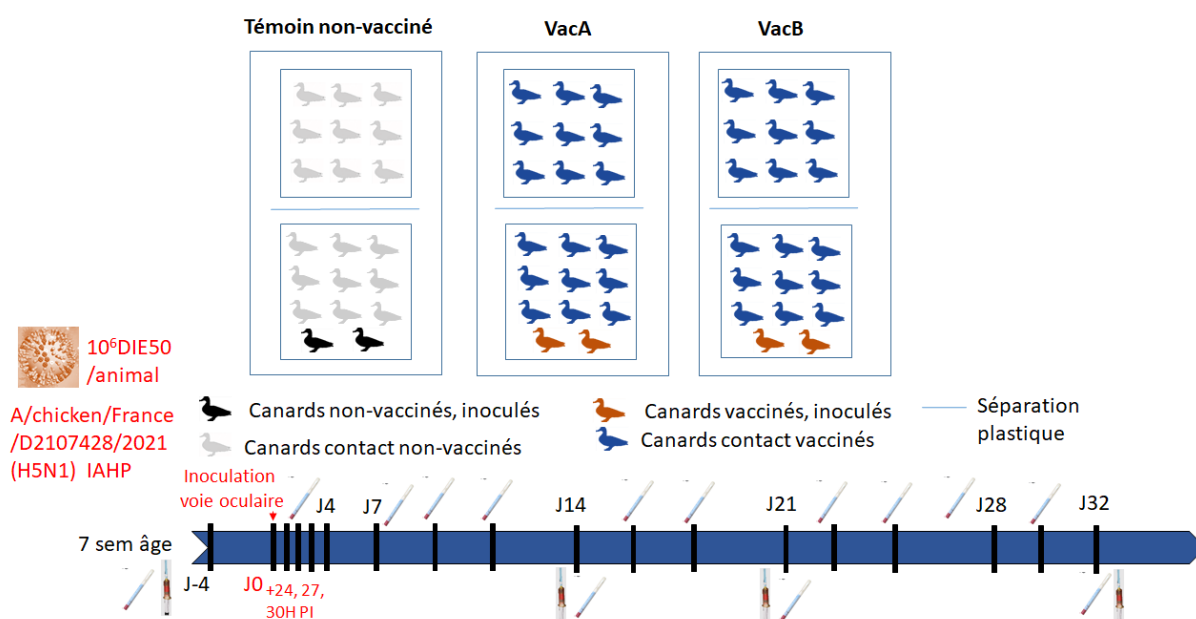


Figure 1 : Schéma de représentation du protocole expérimental d'évaluation de la transmission avec 3 groupes de canards mulards conventionnels non-vaccinés ou vaccinés (Vaccin A ou Vaccin B).

2.3.4. Evaluation de la clinique

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

2.3.5. Sérologie

Des prises de sang individuelles ont été effectuées sur tous les animaux 4 jours avant l'épreuve puis à 14, 21 et 32 jours après épreuve.

Les réponses en anticorps dirigées contre la nucléoprotéine des virus influenza (anticorps anti-NP) ont été étudiées en ce qu'elles reflètent seulement l'infection par les virus influenza A (aucun des deux vaccins étudiés ne contient la protéine NP des virus influenza A), alors que les réponses en anticorps dirigés contre la protéine H5 ont été étudiées comme reflétant à la fois la vaccination (les deux vaccins contiennent un antigène H5) et, le cas échéant, l'exposition à un virus influenza A(H5) circulant (phase terrain) ou inoculé (virus d'épreuve). La présence d'anticorps contre la protéine NP et contre la protéine H5 de virus influenza aviaire a été recherchée à l'aide des kits ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect ELISA et ID Screen® Influenza H5 Indirect ELISA (ID Vet) selon les recommandations du fournisseur.

Des tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ont également été réalisés sur tous les sérums contre plusieurs antigènes inactivés : l'un à partir du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) et l'autre à partir du virus d'épreuve IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1), permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par les virus du clade H5 2.3.4.4b (deux antigènes H5 dérivés de virus influenza porteurs de neuraminidases différentes sont en effet utilisés pour garantir la spécificité des réactions sérologiques anti-H5 détectées). Les sérums collectés sur les animaux vaccinés avec le vaccin B ont également été testés par IHA contre un antigène inactivé (protéine recombinante) dérivé du virus IAHP A/duck/China/E319-2/2003 (H5N1) permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps dirigés contre la protéine H5 du vaccin B utilisé. Chaque antigène a été ajusté à quatre unités hémagglutinantes conformément aux normes internationales. Les résultats ont été transformés en log₂ et les titres IHA individuels supérieurs ou égaux à 4 log₂ ont été considérés comme positifs.

2.3.6. Quantification des charges génomiques virales

Des écouvillons oro-pharyngés et cloacaux ont été réalisés sur tous les animaux inoculés dans chaque groupe 4 jours avant l'épreuve, puis à 6 et 24 heures (J0 H+6, H+24) après inoculation et, suite à la mise en contact des animaux dans les trois groupes, sur tous les animaux du lot, à 27 et 30 heures post-inoculation, puis trois fois par semaine jusqu'à 32 jours post-inoculation (soit à 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 30 et 32 jours) afin de déterminer la charge génomique virale excrétée.

Chaque écouvillon a été repris dans 1mL de milieu MEM avec 0,1% d'une solution de pénicilline/streptomycine (Pénicilline, 100 000 unités; Streptomycine, 100 mg /mL) puis vortexé. Les ARN ont été extraits à partir de 100µL de surnageant sur un automate KingFisher Flex à l'aide du kit d'extraction NucleoMagVET (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fournisseur avec un volume final d'élution de 100µL. L'excrétion virale a été évaluée en détectant le gène M de virus influenza aviaire par RT-PCR temps réel en utilisant le kit commercial ADIAVET AIV REAL TIME (BIO-X) à l'aide du thermocycleur Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR. Le kit commercial utilisé est

également fourni avec un témoin non-cible endogène interne, dans l'objectif de confirmer l'absence d'inhibiteurs d'amplification. Afin d'avoir une estimation de la charge infectieuse virale présente dans chaque écouvillon, chaque série de RT-PCR en temps réel comprenait une gamme d'un ARN transcrit synthétique dilué de façon sériée de dixième en dixième. Cet ARN standard, permettant de quantifier le nombre de copies de génome viral dans les échantillons testés, a été étalonné par rapport au stock du virus d'épreuve, démontrant une équivalence linéaire directe entre la charge génomique virale estimée en base log10 et le titre infectieux exprimé en log10 EID50. Les résultats de chaque écouvillon ont ensuite été quantifiés et exprimés en log EID50/réaction PCR (Niqueux et al., 2023).

2.3.7. Estimation des paramètres de transmission

Les paramètres de transmission ont été estimés chez les canards témoins non-vaccinés et vaccinés. Le statut infectieux des animaux a été déterminé à chaque date de prélèvement à l'aide des résultats de RT-PCR. Pour quantifier la transmission du virus parmi les groupes contacts direct et indirect, les données ont été extraites à partir des résultats virologiques à chaque pas de temps et pour chaque modalité de contact :

- le nombre total d'individus excréteurs (IO : Infectieux inoculés, ID : Infectieux contacts directs ; II : Infectieux contacts indirects).
- le nombre de nouveaux cas, soit premiers prélèvements positifs (NCD : Nouveaux cas Contacts Directs ; NCI : Nouveaux cas Contacts Indirects)
- Le nombre d'individus sensibles à chaque pas de temps (NSD : Nombre de Sensibles Contacts Directs ; NSI : Nombre de Sensibles Contacts Indirects).

Dans chaque groupe, les données sont considérées jusqu'à épuisement du pool d'individus sensibles. Le nombre de nouveaux cas suit une loi binomiale de la forme :

$$Bin(NC_i, NS_i, P_{i-1}),$$

Où P_{i-1} désigne la probabilité d'infection définie sur un intervalle de temps $[t_{i-1}, t_i]$ par

$$P_{i-1} = 1 - \exp(-\lambda_{i-1}\Delta t).$$

λ_{i-1} correspond à la force d'infection exercée sur l'intervalle de temps $[t_{i-1}, t_i]$, prenant en compte les individus excréteurs sur cet intervalle de temps dans les groupes contacts directs et indirects, dont l'expression a été définie par :

- Pour la transmission dans le groupe contact direct

$$\lambda_{i-1}^{(dir)} = \beta_1 * \frac{(ID_{i-1} + IO_{i-1})}{ID_{i-1} + IO_{i-1} + NSD_{i-1}} + \beta_2 * \frac{(ID_{i-1} + IO_{i-1} + II_{i-1})}{N_{i-1}}$$

- Pour la transmission dans le groupe contact indirect

$$\lambda_{i-1}^{(ind)} = \beta_1 * \frac{II_{i-1}}{II_{i-1} + NSI_{i-1}} + \beta_2 * \frac{(ID_{i-1} + IO_{i-1} + II_{i-1})}{N_{i-1}}$$

β_1 et β_2 sont ainsi définis comme les taux de transmission intra- et inter-groupes, représentant le nombre moyen d'individus infectés par un individu infectieux par unité de temps.

La vraisemblance s'écrit comme le produit des probabilités de réalisation de variables aléatoires décrivant le nombre de nouveaux cas dans les groupes contacts directs et contacts indirects, à chaque pas de temps déterminé par le protocole expérimental de J2 à J32, distribués selon deux lois binomiales représentant respectivement la transmission dans chacun des groupes contacts direct et indirect :

$$L = \prod_{i=2}^n Bin(NCD_i, NSD_i, P_{i-1}^{(dir)}) * \prod_{i=2}^n Bin(NCI_i, NSD_i, P_{i-1}^{(ind)}),$$

Les estimations du nombre de reproduction de base R_0 ont été effectuées en associant le taux de transmission à la durée de la période infectieuse (estimée à partir des données des canards infectés soit les inoculés et les contacts directs pour le groupe témoin non-vacciné ou les inoculés uniquement dans les deux groupes vaccinés) et en faisant l'hypothèse que les animaux sont infectieux si la charge virale dans les écouvillons oro-pharyngés est supérieure à $1 \log_{10}(\text{DIE50/PCR})$. Cette hypothèse se fonde sur le fait qu'aucune transmission n'a été observée dans cet essai en l'absence d'une excrétion supérieure à ce seuil (Cador *et al.*, 2016).

3. RESULTATS

3.1. DONNES CLINIQUES

A leur arrivée dans les animaleries, le statut sanitaire des canards a été évalué et la recherche de *Salmonella* a été effectuée pour chaque groupe d'animaux. *Salmonella* sérotype Infantis a été mise en évidence dans les trois groupes. Quelques animaux du groupe témoin non-vacciné, quel que soit leur statut (inoculé, contact direct ou contact indirect) ont montré plusieurs jours après épreuve des troubles nerveux (torticolis). Des euthanasies compassionnelles ont été réalisées sur un contact direct et un contact indirect dans ce groupe à 7 et 6 jours respectivement après leurs premiers résultats positifs en excrétion. Aucun signe clinique nerveux n'a été observé chez les animaux vaccinés. Des signes cliniques respiratoires ont été observés dans les trois groupes. Des investigations sont en cours pour déterminer si des agents co-pathogènes étaient présents dans les trois groupes mais la détection de *Salmonella* sérotype Infantis n'a pas d'incidence sur les paramètres de transmission déterminés dans cet essai.

3.2. EXCRETION VIRALE

3.2.1. Groupe Témoin non-vacciné

Le début de l'excrétion est rapide chez les animaux témoins non-vaccinés et inoculés, avec des écouvillons oro-pharyngés et cloacaux positifs en génome viral dès 1 jour post-inoculation (jpi). L'excrétion augmente jusqu'à 3 jpi puis diminue ensuite progressivement au cours du temps, l'excrétion oro-pharyngée étant toujours présente 32jpi chez ces animaux (Fig. 2.1). Le niveau d'excrétion cloacale est plus faible que l'excrétion oro-pharyngée et les niveaux d'excrétion sont équivalents à ceux obtenus dans les essais d'évaluation de l'excrétion précédemment conduits.

Les animaux inoculés étaient bien excréteurs par voies oro-pharyngée (symbole T) et cloacale (symbole C) 24h après inoculation.

Figure 2.1

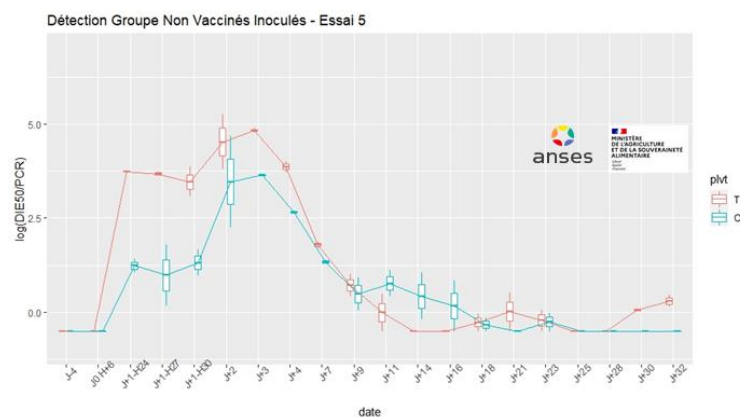


Figure 2.2

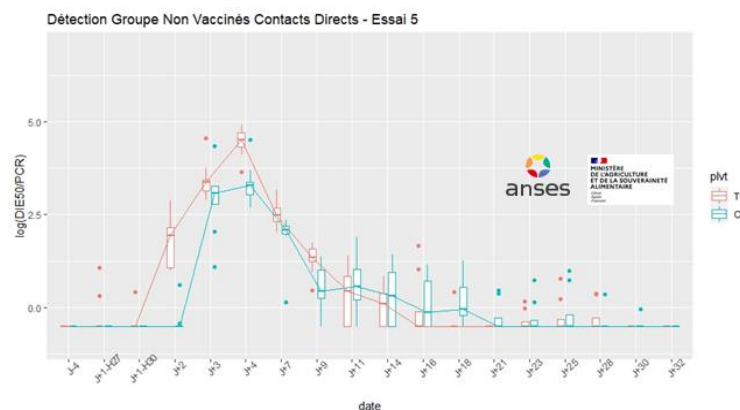


Figure 2.3

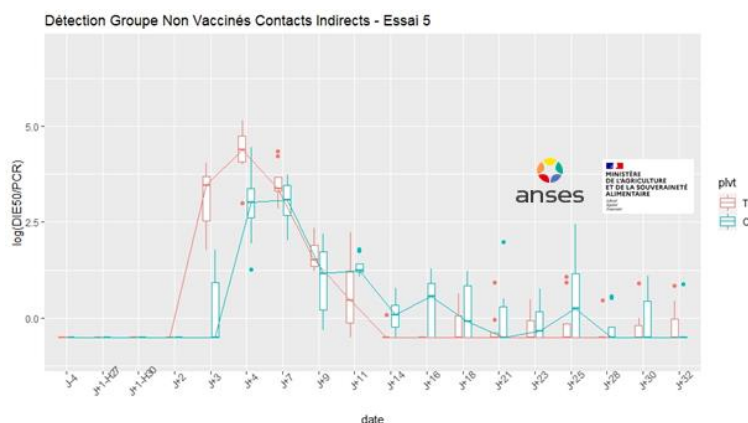


Figure 2: Excrétion virale oro-pharyngée (T) et cloacale (C) chez les canards mulards non-vaccinés inoculés (Fig. 2.1), en contact direct (Fig. 2.2) et en contact indirect (Fig. 2.3) avec les animaux inoculés à 7 semaines d’âge avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1). L’excrétion virale est exprimée en titre infectieux estimé (\log_{10} DIE₅₀/PCR).

Deux animaux témoins non-vaccinés sur 9 mis en contact direct ont excrété au niveau oro-pharyngé dès 3 heures après la mise en contact (Fig. 2.2) et dès 24h au niveau cloacal. La transmission du virus aux contacts directs non-vaccinés est rapide et précoce avec l’ensemble des animaux positifs au niveau oro-pharyngé dès 2 jpi soit 1 jour après la mise en contact. Les profils d’excrétions des canards témoins non-vaccinés en contact direct sont similaires à ceux observés pour les animaux témoins non-vaccinés inoculés, avec une augmentation rapide de l’excrétion jusqu’à 4jpi soit 3j après mise en contact et diminution de l’excrétion progressive ensuite mais avec toujours un animal excréteur à 30jpi.

Les animaux témoins non-vaccinés en contact indirect ont présenté une excrétion dès 3 jpi, soit 2 jours après la mise en contact avec les animaux témoins non-vaccinés inoculés, au niveau oro-pharyngé (9/9 animaux) et cloacal (3/9 animaux) (Fig. 2.3). La transmission aérienne par contact indirect est également très rapide chez des animaux témoins non-vaccinés. Les profils d’excrétion sont également similaires aux inoculés et contacts directs, avec cependant un décalage de deux jours pour le début d’excrétion : augmentation rapide de l’excrétion sur les 3 premiers jours post-infection et diminution de l’excrétion progressive ensuite avec 2 animaux restant excréteurs à 32jpi.

3.2.2. Groupe Vac A

Chez les animaux ayant reçu le vaccin A, un seul animal inoculé sur deux a été excréteur (Fig 3.1). Il était positif pour la détection de génome viral au niveau oro-pharyngé dès 6h post-inoculation et jusqu’à 4 jpi. Il était donc bien excréteur lors de la mise en contact direct et indirect avec les animaux vaccinés avec le vaccin A. Aucune excrétion cloacale n’a par contre été détectée chez cet animal excréteur au niveau oro-pharyngé. Le niveau de l’excrétion est plus faible que les niveaux détectés lors des essais précédents pour les animaux vaccinés avec le vaccin A et inoculés et un seul animal est détecté positif dans cet essai. La diminution de l’excrétion oro-pharyngée chez les animaux vaccinés

avec le vaccin A est confirmée (diminution du titre maximum de 2 log₁₀, par rapport au titre médian maximal observé chez les canards non vaccinés inoculés) et l'excrétion cloacale est même abolie ici.

Chez les animaux vaccinés avec le vaccin A et placés en contact direct avec l'animal inoculé excréteur, seul un animal sur les 9 placés en contact direct, est détecté positif pour l'excrétion oro-pharyngée à 3jpi, soit 2 jours après la mise en contact avec l'animal inoculé excréteur (Fig. 3.2). Aucune excrétion cloacale n'est détectée. La transmission par contact direct chez les animaux vaccinés avec le vaccin A est très faible.

Chez les animaux vaccinés avec le vaccin A en contact indirect avec l'animal inoculé excréteur, aucun animal n'est détecté positif après la mise en contact avec l'animal inoculé excréteur (Fig. 3.3), quelle que soit la voie d'excrétion étudiée. Aucune transmission aérienne par contact indirect chez les animaux vaccinés avec le vaccin A n'est observée.

Figure 3.1

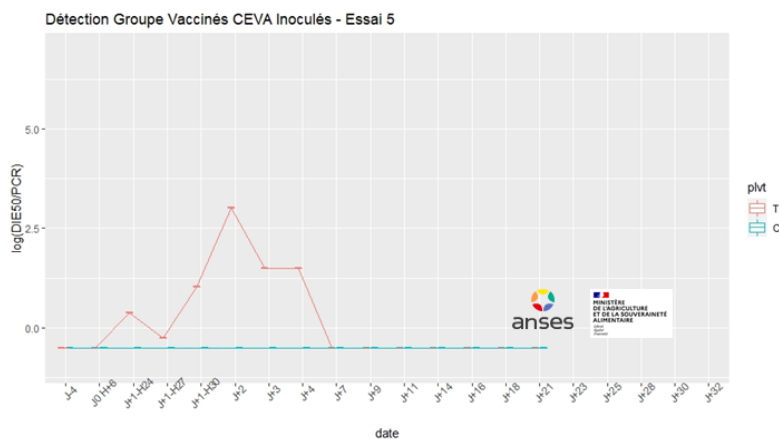


Figure 3.2

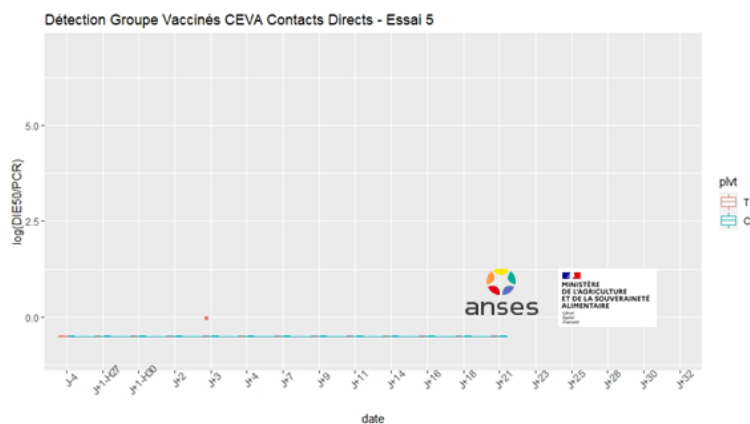


Figure 3.3

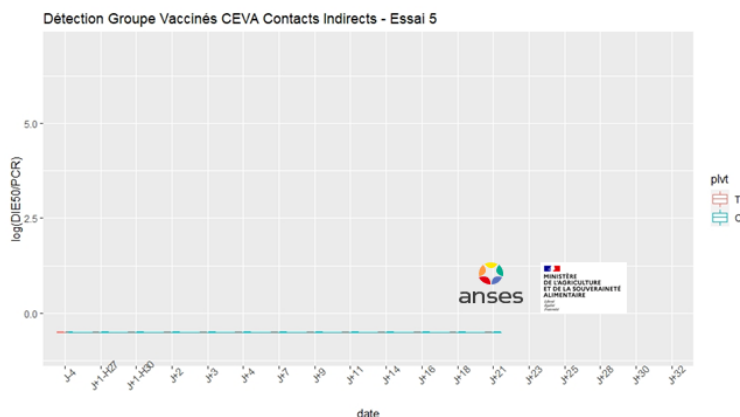


Figure 3: Excrétion virale oro-pharyngée (T) et cloacale (C) chez les canards mulards vaccinés avec le vaccin A, inoculés (les données du seul animal excréteur par voie oro-pharyngée présentées ici) (Fig. 3.1), en contact direct (Fig. 3.2) et en contact indirect (Fig. 3.3) avec les animaux inoculés à 7 semaines d'âge avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1). L'excrétion virale est exprimée en titre infectieux estimé (\log_{10} DIE₅₀/PCR).

3.2.3. Groupe Vac B

Chez les animaux ayant reçu le vaccin B, Les deux canards inoculés ont été excréteurs par voie oro-pharyngée dès 6h post-inoculation et jusqu'à 4 jpi (Fig. 4.1). Ils étaient donc bien excréteurs à la mise en contact direct et indirect avec les animaux vaccinés avec le vaccin B. Aucune excrétion cloacale n'a été détectée chez ces animaux. Le niveau de l'excrétion est plus faible que les niveaux détectés lors des essais précédents pour les animaux vaccinés avec le vaccin B et inoculés. La diminution de l'excrétion oro-pharyngée chez les animaux vaccinés avec le vaccin B est confirmée (diminution du titre médian maximum de 2,5 \log_{10} , par rapport au titre médian maximal observé chez les canards non vaccinés inoculés) et l'excrétion cloacale est abolie.

Chez les animaux vaccinés avec le vaccin B en contact direct avec les animaux inoculés, seul un animal sur 9 en contact direct, est détecté positif pour l'excrétion oro-pharyngée à 2 jpi soit 3 jours après la mise en contact (Fig. 4.2). Aucune excrétion cloacale n'est détectée. La transmission par contact direct chez les animaux vaccinés avec le vaccin B est très faible.

Chez les animaux vaccinés avec le vaccin B en contact indirect avec les animaux inoculés, aucun animal n'est détecté positif après la mise en contact avec les animaux inoculés excréteurs (Fig. 4.3), quelle que soit la voie d'excrétion étudiée. Aucune transmission aérienne par contact indirect chez les animaux vaccinés avec le vaccin B n'est observée.

Figure 4.1

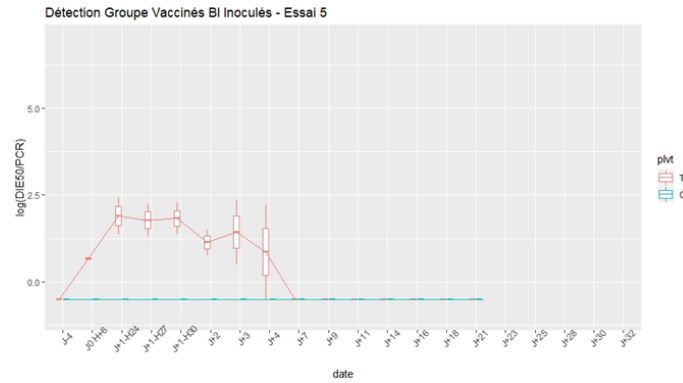


Figure 4.2

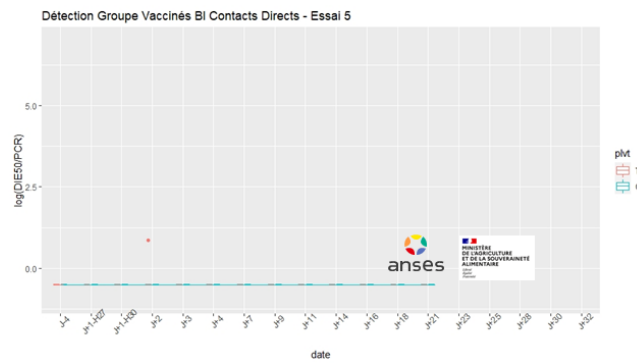


Figure 4.3

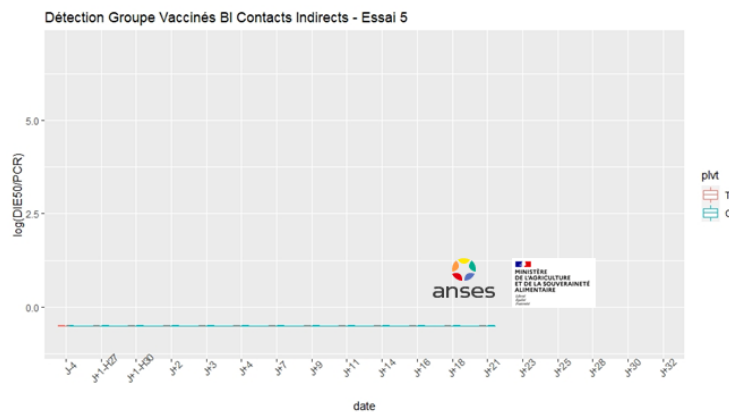


Figure 4: Excrétion virale oro-pharyngée (T) et cloacale (C) chez les canards mulards vaccinés avec le vaccin B, inoculés (Fig. 4.1), en contact direct (Fig. 4.2) et en contact indirect (Fig. 4.3) avec les animaux inoculés à 7 semaines d'âge avec le virus IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1). L'excrétion virale est exprimée en titre infectieux estimé (\log_{10} DIE₅₀/PCR).

3.3. SEROCONVERSION

3.3.1. Groupe Témoin non-vacciné

Dans le groupe témoin non-vacciné, les animaux étaient séronégatifs vis-à-vis des protéines NP (ELISA) et H5 (ELISA et IHA) avant l'inoculation à 7 semaines d'âge (Fig. 5) démontrant l'absence d'infection par un virus influenza aviaire avant épreuve, en élevage ou au cours du transport.

Les animaux témoins non-vaccinés étaient séropositifs 14jpi pour les animaux inoculés, ceux en contact direct et ceux en contact indirect, avec l'ensemble des méthodes (ELISA NP, ELISA H5, IHA H5N8 IAHP et IHA H5N1 IAHP), et ce jusqu'à 32jpi. La réponse humorale est mise en évidence suite à l'infection pendant au moins un mois après l'infection. Les profils de séroconversion des animaux inoculés, en contact direct et indirect sont similaires quelle que soit la méthode sérologique utilisée.

Fig 5.1

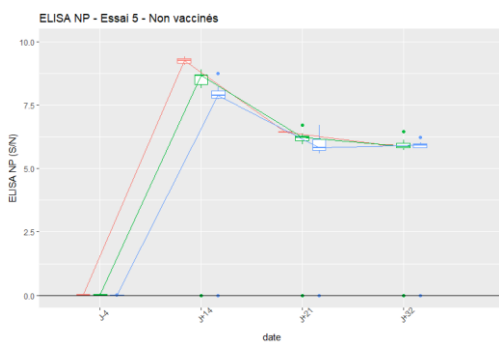


Fig 5.2

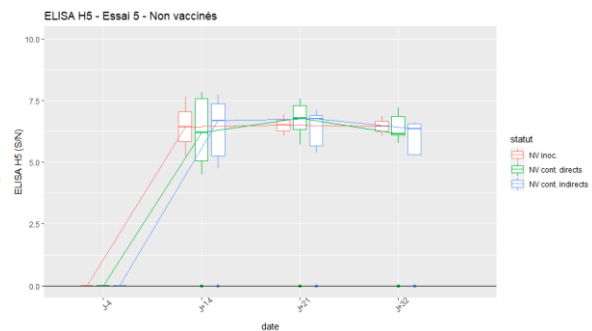


Fig 5.3

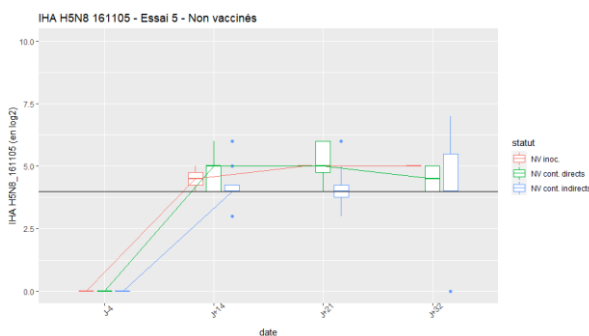


Fig 5.4

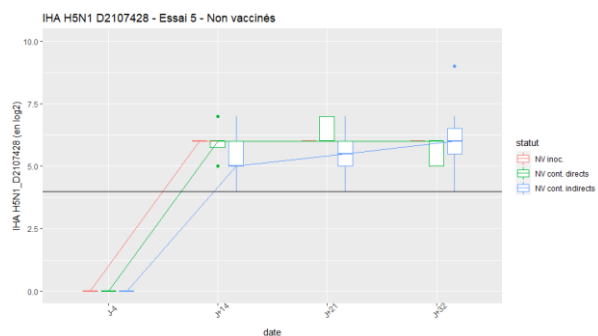


Figure 5 : Titres en anticorps sériques déterminés chez les canards mulards de 7 semaines d'âge non vaccinés : inoculés et en contact direct et indirect. Titres en anticorps mesurés par des tests ELISA indirects dirigés contre les protéines NP (Fig 5.1) et H5 (Fig. 5.2) ou par un test IHA avec l'antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) (Fig 5.3) et l'antigène inactivé dérivé du virus d'épreuve IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) (Fig 5.4), ces deux derniers tests permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par les virus A(H5) de clade

2.3.4.4b. Les titres sont exprimés en log₂ du titre IHA. L'inoculation a été réalisée sur deux animaux avec un virus IAHP A(H5N1) de clade 2.3.4.4b à J0 dans l'échelle de temps du graphique.

3.3.2. Groupe VacA

Dans le groupe des animaux ayant reçu le vaccin A, les animaux étaient séronégatifs vis-à-vis de la protéine NP avant l'inoculation à 7 semaines d'âge mais positifs vis-à-vis de la protéine H5 et négatifs en IHA (Fig. 6). Ces résultats montrent l'absence d'infection par un virus influenza aviaire avant épreuve, en élevage ou au cours du transport, mais que les animaux étaient bien vaccinés (détection par la méthode ELISA H5 uniquement). Chez les deux animaux vaccinés avec le vaccin A et inoculés, une séroconversion vis-à-vis de NP et H5 est observée en ELISA, après épreuve pour l'animal inoculé excréteur uniquement.

Le titre ELISA H5 diminue chez les contacts direct et indirect au cours de l'essai (3 animaux séronégatifs chez les contacts directs et 5 chez les contacts indirects à 32jpi). Une séroconversion vis-à-vis de la protéine NP chez un contact indirect est observée, malgré l'absence d'excrétion observée chez ces animaux vaccinés.

Fig 6.1

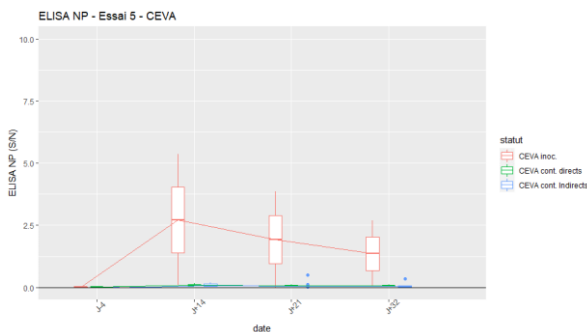


Fig 6.2

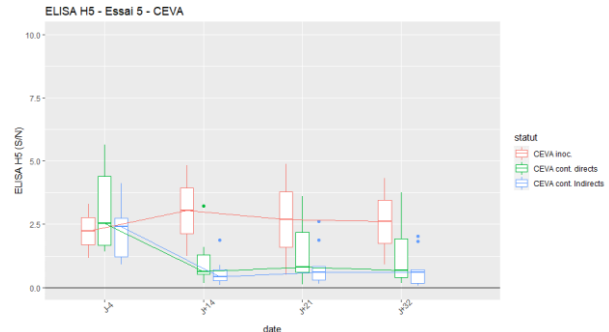


Fig 6.3

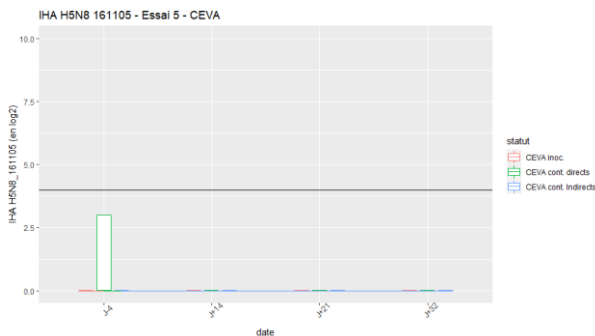


Fig 6.4

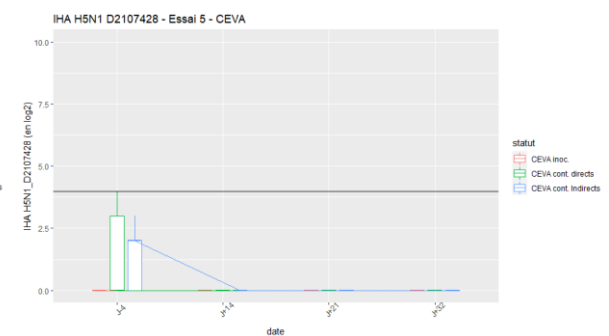


Figure 6 : Titres en anticorps sériques déterminés chez les canards mulards de 7 semaines d'âge vaccinés avec le vaccin A : inoculés et contact direct et indirect. Titres en anticorps mesurés par des

tests ELISA indirects dirigés contre les protéines NP (Fig 6.1) et H5 (Fig. 6.2) ou par un test IHA avec l'antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) (Fig 6.3) et l'antigène inactivé dérivé du virus d'épreuve IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) (Fig 6.4), ces deux derniers tests permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par les virus A(H5) du clade 2.3.4.4b. Les titres sont exprimés en log2 du titre IHA. L'inoculation a été réalisée sur deux animaux avec un virus IAHP A(H5N1) de clade 2.3.4.4b à J0 dans l'échelle de temps du graphique.

3.3.3. Groupe VacB

Dans le groupe des animaux ayant reçu le vaccin B, les animaux étaient séronégatifs vis-à-vis de la protéine NP avant l'inoculation à 7 semaines d'âge mais positifs vis-à-vis de la protéine H5 (12/20 en ELISA H5 et 20/20 en IHA avec l'antigène vaccinal uniquement) (Fig 7). Ces résultats révèlent qu'il n'y a pas eu d'infection par un virus influenza aviaire avant épreuve, en élevage ou au cours du transport, et que les animaux étaient bien vaccinés. Une séroconversion vis-à-vis des protéines NP et H5 après épreuve pour les animaux inoculés est observée avec les méthodes ELISA. Le titre IHA avec l'antigène vaccinal diminue chez les contacts directs et indirects au cours de l'essai ainsi qu'en ELISA H5 (6 animaux séronégatifs parmi les contacts directs et 5 parmi les contacts indirects à 32jpi). Une séroconversion est identifiée vis-à-vis de la protéine NP chez un contact direct malgré l'absence de détection d'excrétion chez cet animal.

Fig 7.1

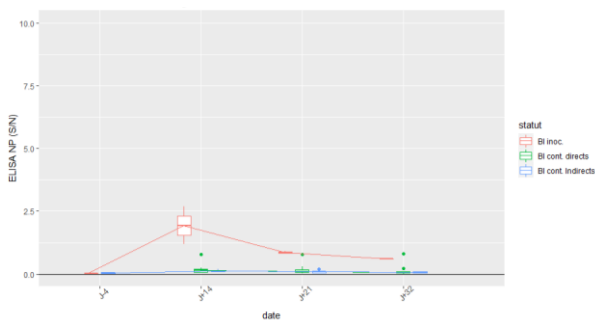


Fig 7.2

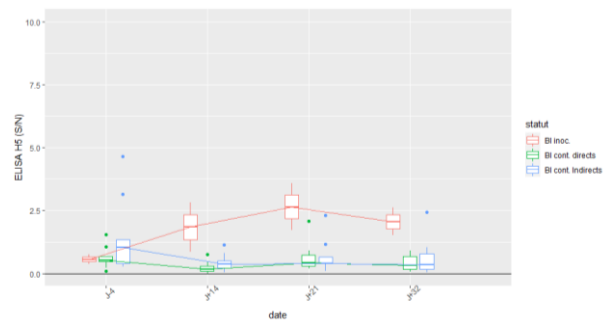


Fig 7.3

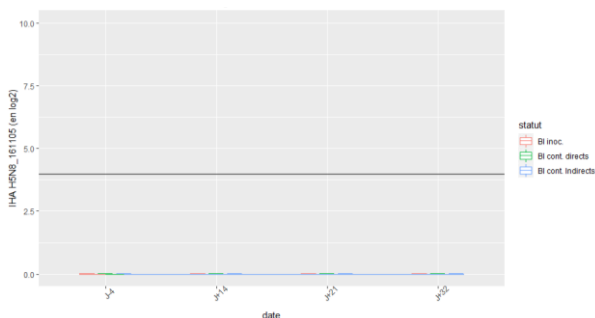


Fig 7.4

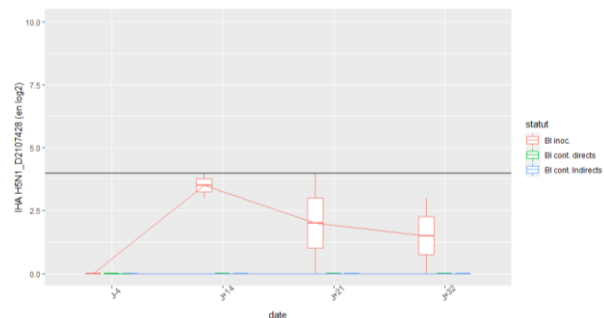


Fig 7.5

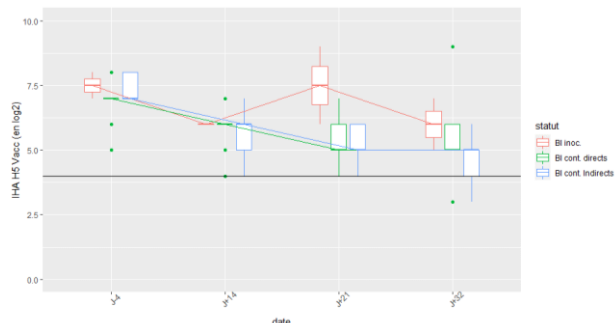


Figure 7 : Titres en anticorps sériques déterminés chez les canards mulards de 7 semaines d'âge vaccinés avec le vaccin A : inoculés et contact direct et indirect. Titres en anticorps mesurés par des tests ELISA indirects dirigés contre les protéines NP (Fig 7.1) et H5 (Fig. 7.2) ou par un test IHA avec l'antigène inactivé du virus IAHP A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) (Fig 7.3), l'antigène inactivé dérivé du virus d'épreuve IAHP A/chicken/France/D2107428/2021 (H5N1) (Fig 7.4), les deux tests précédents permettant de détecter plus spécifiquement les anticorps induits par les virus A(H5) du clade 2.3.4.4b, ou par un test IHA avec l'antigène vaccinal (Fig 7.5). Les titres sont exprimés en log₂ du titre IHA. L'inoculation a été réalisée sur deux animaux avec un virus IAHP A(H5N1) de clade 2.3.4.4b à J0 dans l'échelle de temps du graphique.

3.4. PARAMETRES DE TRANSMISSION

Les paramètres de transmission par contact direct et indirect chez les animaux non-vaccinés, vaccinés avec le vaccin A ou le vaccin B ont été estimés en utilisant l'hypothèse que les animaux étaient infectieux si la charge virale dans les écouillons oro-pharyngés est supérieure à 1 log₁₀(DIE50)/PCR pour déterminer la période infectieuse (déterminée à partir des données des animaux infectés soit les animaux inoculés et en contact pour le groupe témoin non-vacciné et les animaux inoculés pour les deux groupes vaccinés) (Fig 8).

	$\beta_1 (h^{-1})$	$\beta_2 (h^{-1})$	Période infectieuse (j)	R_{01}	R_{02}
Non vacciné	0.45 (0.15,0.96)	0.15 (0.07,0.3)	8.1	88 (29.7, 186)	29.7 (13.5, 59.2)
Vaccin A CEVA	0.009 (5e-4, 0.042)	-	2.7 *	0.62 (0.03, 2.7)	-
Vaccin B BI	0.008 (4e-4, 0.035)	-	1.5**	0.28 (0.02, 1.26)	-

- * Un seul individu infectieux parmi les inoculés.
- ** Deux individus inoculés infectieux

Figure 8: Paramètres de transmission par contact direct (β_1 et R_{01}) et indirect (β_2 et R_{02}) estimés chez les animaux non-vaccinés, vaccinés avec le vaccin A ou vaccinés avec le vaccin B. Les intervalles de confiance sont indiqués pour chaque paramètre entre parenthèses.

Les taux de transmission β_1 et β_2 exprimés en nombre d'animaux infectés par heure sont similaires à ceux obtenus pour des canards mulards de 3 semaines d'âge inoculés avec virus IAHP A(H5N8) de 2016. Les transmissions directe ($R_{01} = 88$) et par voie aéroportée ($R_{02} = 29$) sont très élevées chez les animaux non-vaccinés.

La vaccination, quel que soit le vaccin utilisé dans cet essai, a été très efficace pour maîtriser la transmission par contact direct avec une estimation ponctuelle $R_{01} < 1$ pour les animaux vaccinés (vaccin A et B) et pour abolir la transmission aéroportée, les intervalles de confiance calculés rendant statistiquement non significatives les différences de R_0 observées entre les deux solutions vaccinales testées. Le seuil fixé 1 log₁₀(DIE50)/PCR en charge virale dans les écouvillons oro-pharyngés pour poser l'hypothèse que les animaux sont infectieux, influe sur la durée de la période infectieuse pour les animaux inoculés et vaccinés (vaccin A ou vaccin B) car peu d'animaux sont excréteurs dans ces deux groupes.

4. CONCLUSION

Les résultats obtenus avec les deux vaccins testés, précédemment lors de la phase 1, ont fait la preuve de la capacité des vaccins à réduire significativement les niveaux et durées d'excrétion du virus d'épreuve, par voie respiratoire et digestive, chez les sujets vaccinés. Cet essai de transmission à 7 semaines d'âge était important pour évaluer la capacité des deux candidats vaccins à limiter la transmission directe et indirecte du virus d'épreuve chez des animaux vaccinés. Les résultats de cet essai de transmission ont confirmé la diminution de l'excrétion chez les animaux vaccinés et éprouvés à 7 semaines d'âge. Ils ont également permis de démontrer la maîtrise de la transmission directe de l'IAHP chez les animaux vaccinés ($R_0 < 1$) pour les deux vaccins testés et l'absence de transmission par contact indirect (transmission aérienne) dans les conditions expérimentales utilisées.

Néanmoins la réduction d'excrétion virale observée lors des essais précédemment réalisés était plus importante après épreuve virulente à 7 semaines d'âge qu'à 11 semaines d'âge, même si elle restait significative (cf rapport précédent sur l'évaluation de l'excrétion).

En complément des résultats de transmission rapportés ici, qui démontrent une bonne maîtrise de la transmission virale chez des sujets vaccinés, il importe maintenant d'évaluer la capacité des deux candidats vaccins à limiter la transmission directe et indirecte du virus d'épreuve chez des animaux vaccinés dans le cadre d'un essai de transmission à 11 semaines d'âge, un âge auquel les animaux sont déplacés pour aller en gavage. Cet essai de transmission à 11 semaines d'âge sera réalisé en animalerie protégée à l'automne 2023, les canards nécessaires à sa réalisation devant pour cela être mis en place et vaccinés en début d'été 2023 (sous réserve de la non dégradation de la situation sanitaire).

5. REMERCIEMENTS

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

6. REFERENCES

- Briand FX, Niqueux E, Schmitz A, Martenot C, Cherbonnel M, Massin P, Kerbrat F, Chatel M, Guillemoto C, Guillou-Cloarec C, Ogor K, Le Prioux A, Allée C, Beven V, Hirchaud E, Blanchard Y, Scoizec A, Le Bouquin S, Eterradosi N, Grasland B, 2021. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Spread by Short- and Long-Range Transmission, France, 2016-17. *Emerg Infect Dis.* 27(2):508-516. doi: 10.3201/eid2702.202920
- Briand, F.X., Niqueux, E., Schmitz, A., Martenot, C., Cherbonnel, M., Massin, P., Busson, R., Guillemoto, C., Pierre, I., Louboutin, K., Souchaud, F., Allee, C., Quenault, H., Lucas, P., de Wiele, A.V., Blanchard, Y., Eterradosi, N., Scoizec, A., Bouquin-Leneveu, S.L., Rautureau, S., Lambert, Y., Grasland, B., 2022. Multiple independent introductions of highly pathogenic avian influenza H5 viruses during the 2020-2021 epizootic in France. *Transbound Emerg Dis* 69, 4028-4033. doi:10.1111/tbed.14711
- European Food Safety Authority, E.C.f.D.P., Control, E.U.R.L.f.A.I., Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J.L., Kuiken, T., Marangon, S., Niqueux, E., Staubach, C., Terregino, C., Aznar, I., Guajardo, I.M., Baldinelli, F., 2023. Avian influenza overview September - December 2022. *EFSA J* 21, e07786. doi:10.2903/j.efsa.2023.7786

- Guinat C, Artois J, Bronner A, Guerin JL Gilbert M, Paul MC, 2019. Duck production systems and highly pathogenic avian influenza H5N8 in France, 2016-2017. *Sci Rep.* 16;9(1):6177.
- Le Boulch, M., Bouzidi, M., 2022. Impacts économiques des crises(| Ukraine inflation) sur les marchés avicoles. SPACE Rennes, 14 septembre 2022.
- Niqueux, E., Flodrops, M., Allee, C., Lebras, M.O., Pierre, I., Louboutin, K., Guillemoto, C., Le Prioux, A., Le Bouquin-Leneveu, S., Keita, A., Amelot, M., Martenot, C., Massin, P., Cherbonnel-Pansart, M., Briand, F.X., Schmitz, A., Cazaban, C., Dauphin, G., Delquigny, T., Lemiere, S., Watier, J.M., Mogler, M., Tarpey, I., Grasland, B., Eterradossi, N., 2023. Evaluation of three hemagglutinin-based vaccines for the experimental control of a panzootic clade 2.3.4.4b A(H5N8) high pathogenicity avian influenza virus in mule ducks. *Vaccine* 41, 145-158.doi:10.1016/j.vaccine.2022.11.012
- Cador, C., Hervé, S., Andraud, M., Gorin, S., Paboeuf, F., Barbier, N., Quéguiner, S., Deblanc, C., Simon, G., Rose, N., 2016, Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. *Veterinary Research*, 47 (1), art. no. 86, DOI: 10.1186/s13567-016-0365-6