

Virus influenza pandémique H1N1 2009 chez le porc : problématique, développement de nouveaux outils de diagnostic et résultats de la surveillance menée en France en 2009-2010

*Gaëlle SIMON (1), Séverine HERVE (1), Aure SAULNIER (1), Stéphane QUEGUINER (1), Stéphane GORIN (1),
Nicolas BARBIER (1), Céline DEBLANC (1), Françoise POL (1), Eric EVENO (2), Nicolas ROSE (2), François MADEC (2)*

*(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie Immunologie Porcines, LNR Virus Influenza Porcins,
BP 53, F-22440 Ploufragan*

*(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Epidémiologie et Bien-Etre du Porc, BP 53, F-22440 Ploufragan
gaelle.simon@anses.fr*

Virus influenza pandémique H1N1 2009 chez le porc : problématique, développement de nouveaux outils de diagnostic et résultats de la surveillance menée en France en 2009-2010

Les cas rapportés d'infections naturelles et les résultats d'inoculations expérimentales ont montré que le porc est susceptible au virus Influenza pandémique H1N1 2009 (pH1N1/09). On peut donc craindre qu'il ne s'adapte à l'espèce porcine et devienne un nouveau virus influenza porcin (SIV) enzootique. Le porc pourrait alors constituer un réservoir pour cette souche humaine, voire devenir un hôte chez lequel le pH1N1/09 pourrait subir des réassortiments avec d'autres virus Influenza A, conduisant à l'émergence de nouveaux agents à potentiel épizootique et/ou zoonotique. De nouveaux outils de diagnostic ont été développés par le Laboratoire National de Référence aux fins de renforcement de l'épidémiosurveillance de la grippe chez le porc. Des kits commerciaux de RT-PCR en temps réel ont été validés pour la détection des virus Influenza A chez les suidés et la différenciation du pH1N1/09 dans cette espèce. Bien que le test IHA pH1N1/09 ne présente pas de défaut de spécificité pour l'analyse d'élevages indemnes de SIV enzootique, il existe des réactions croisées entre antigènes et anticorps de lignages différents, notamment parmi les virus H1N1. Il s'avère donc de plus en plus difficile d'identifier les sous-types viraux en circulation par tests IHA multivalences. En 2010, le pH1N1/09 a été détecté et isolé chez des porcs de régions françaises d'outre-mer préalablement indemnes de grippe chez le porc. Les investigations sérologiques ont confirmé la circulation du pH1N1/09 dans ces régions. En octobre 2010, ce virus a également été isolé dans un élevage de porcs de métropole.

Pandemic influenza virus H1N1 2009 in pigs: main issues, development of novel diagnostic tools and results of the monitoring conducted in France in 2009-2010

Reported cases of natural infections and results from experimental inoculations have shown that the pig is susceptible to the pandemic influenza virus H1N1 2009 (pH1N1/09). Possibly, it adapts itself to the porcine species and becomes a novel enzootic swine influenza virus (SIV). The pig could then, conceivably, be a reservoir for this human strain and even become a host; pH1N1/09 could then undergo genetic reassortment with other Influenza A viruses leading to the emergence of new viruses with epizootic and/or zoonotic potential. New diagnostic tools were developed by the National Reference Laboratory with the aim of increasing swine flu monitoring. Real-time RT-PCR commercial kits were validated for the detection of the Influenza A viruses in pigs and the differentiation of pH1N1/09 in this species. Although HI test for pH1N1/09 does not present defect of specificity for the analysis of herds free of enzootic SIV, it proved increasingly difficult to identify circulating viral subtypes using multivalent HI tests owing to cross reactions between antigens and antibodies from different lineages. In 2010, pH1N1/09 was detected and isolated on overseas pig farms in regions previously free of swine flu. Serological investigations confirmed the circulation of pH1N1/09 in these regions. In October 2010, this virus was also isolated in a pig farm in mainland France.

INTRODUCTION

Les virus influenza porcins (SIV), seuls ou en association avec d'autres pathogènes à tropisme respiratoire, circulent dans près de 50% des élevages de porcs en France métropolitaine (Hervé *et al.*, 2011). Ils sont impliqués dans le développement des syndromes respiratoires complexes, constituant un risque pour la santé animale et pouvant entraîner des pertes économiques du fait de la baisse des performances zootechniques (Olsen *et al.*, 2006).

Quelques cas graves d'infections humaines par des SIV ont en outre conféré à la grippe porcine un caractère zoonotique (Myers *et al.*, 2007). Même si ce nombre de cas graves reste un événement très rare au vu du nombre de personnes travaillant quotidiennement au contact des porcs dans le monde, on ne connaît pas la fréquence réelle de transmission des SIV à l'Homme. Il est probable que de nombreuses infections humaines à SIV ne soient pas identifiées, car asymptomatiques ou apparentées à une grippe saisonnière. De même, on ne connaît pas la fréquence de transmission des virus influenza humains, voire aviaires, au porc.

Vues la diversité et la complexité phylogénique des SIV identifiés aujourd'hui dans les différentes populations porcines du monde, il apparaît que le porc est un hôte chez qui des réassortiments (*i.e.* des échanges de gènes) peuvent s'opérer entre SIV, virus influenza humains et virus influenza aviaires (Kuntz-Simon, 2009 ; Simon, 2010). Ce phénomène de réassortiment s'est accentué au cours des dernières années, notamment en Amérique du Nord suite à l'apparition des SIV à cassette TRIG (*triple reassortant internal genes*). Sans que l'on sache encore pourquoi, cette constellation particulière de six gènes internes issus de virus porcin, humain et aviaire, a favorisé la génération, chez le porc, d'une grande variété de virus se distinguant par la nature de leurs deux glycoprotéines de surface, HA et NA (Vincent *et al.*, 2009b).

En France, comme dans d'autres pays européens, les caractérisations approfondies des souches isolées au cours des dernières années ont également permis d'identifier ponctuellement de nouveaux virus réassortants résultant principalement d'échanges génomiques entre SIV issus des lignages H1N1, H3N2 et H1N2 européens (Kyriakis *et al.*, 2009; Kuntz-Simon and Madec, 2009).

Les réassortiments viraux peuvent conduire à l'émergence d'agents de virulence et/ou de potentiel de transmission intra-espèce et/ou inter-espèce accru.

Ce fut le cas du virus H1N1 ayant émergé chez l'Homme fin avril 2009 (Smith *et al.*, 2009). Ce virus réassortant, que l'on dénommera pH1N1/09, présente une constellation inédite de gènes provenant de SIV, *i.e.* de virus influenza en circulation dans l'espèce porcine, et a acquis un potentiel de transmission inter-humaine très efficace qui lui a valu d'être responsable de la première pandémie du XXI^{ème} siècle (Kuntz-Simon, 2009). Les date, espèce et lieu du réassortiment génétique ayant été à l'origine de cette émergence virale restent pour l'instant non élucidés. En effet, aucun virus similaire n'a jamais été isolé à partir de prélèvements porcins avant d'avoir été détecté chez l'Homme. On ne peut donc affirmer que le réassortiment ait eu lieu chez l'animal, même si c'est l'hypothèse qui semble la plus probable.

D'après les études rétrospectives menées sur les précédents virus pandémiques, il est possible que le pH1N1/09 ait circulé de manière asymptomatique pendant une longue période de temps, chez l'Homme ou chez le porc, avant d'être identifié au

travers de cas humains pathologiques (Smith *et al.*, 2009).

Puisque tous les gènes du pH1N1/09 proviennent de SIV, il a été craint, dès l'annonce de son émergence, qu'il n'ait la capacité de transgresser facilement la barrière d'espèce entre l'Homme et le porc. Début mai 2009, un premier élevage porcin était d'ailleurs déclaré infecté au Canada (Weingartl *et al.*, 2010). Au Mexique, d'où l'épidémie a pris de l'ampleur en avril 2009, un élevage aurait été touché à cette époque là (www.oie.com). Depuis, ce sont près de 20 pays qui ont déclaré des élevages infectés.

Dans la plupart des cas, les porcs touchés ont développé un syndrome grippal commun n'entraînant pas de mortalité. Le virus a également été détecté aux USA et en Corée chez des porcs ne présentant aucun syndrome grippal, suggérant la possibilité d'infections asymptomatiques.

Des études expérimentales d'infection ont démontré et confirmé la susceptibilité de l'espèce porcine au pH1N1/09 (Brookes *et al.*, 2009, 2010 ; Lange *et al.*, 2009 ; Vincent *et al.*, 2010). Les porcs inoculés ont présenté de l'hyperthermie, de l'apathie, des difficultés respiratoires et des lésions pulmonaires caractéristiques de la plupart des infections monovalentes à virus influenza A chez le porc. Du virus a été retrouvé dans les sécrétions nasales jusqu'à 10 jours post-infection et a été transmis à des porcs contact, sur les 3 cycles testés (Brookes *et al.*, 2010). Aucun porc, inoculé ou contact, n'a présenté de virémie et le virus n'a pas été retrouvé dans le muscle ou les organes internes (Vincent *et al.*, 2009a). Un variant du pH1N1/09 isolé chez le porc est apparu moins virulent que le virus humain parental, ce qui pourrait signifier une atténuation au fur et à mesure des passages chez le porc (Weingartl *et al.*, 2010).

L'adaptation des virus influenza humains à l'espèce porcine est probablement favorisée lorsque la pression d'infection est très forte. En effet, les virus pandémiques de 1918 et de 1968 ont été transmis au porc, donnant naissance à des lignages de SIV. De même, le virus responsable de la grande épidémie russe de 1977 a probablement circulé à bas bruit chez le porc avant de fournir son gène HA au SIV H3N2 européen, permettant alors la génération du SIV H1N2 européen (Kuntz-Simon and Madec, 2009 ; Kuntz-Simon, 2009 ; Simon, 2010). Le risque de transmission du pH1N1/09 au porc a donc augmenté au fur et à mesure de l'extension de l'épidémie humaine.

Afin de pouvoir répondre aux nouveaux objectifs de surveillance des SIV, le Laboratoire National de Référence (LNR) pour les Virus Influenza Porcins a proposé le développement d'outils de diagnostic moléculaire rapide (i) pour la détection des virus Influenza de type A (y compris le pH1N1/09) chez le porc, (ii) pour la distinction, parmi les SIV enzootiques européens, du pH1N1/09 dans cette espèce. Nous avons également mis au point et évalué un test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) pour le diagnostic sérologique de l'infection à pH1N1/09.

Ces nouveaux outils ont été exploités dans le cadre de la surveillance virologique et sérologique des infections grippales dans les élevages de porcs français. Sont ici rapportés les résultats de la surveillance menée en France en 2009 et 2010.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Prélèvements biologiques

1.1.1. Pour le diagnostic moléculaire

Les virus influenza ont été recherchés, à l'occasion de syndromes grippaux, dans des surnageants d'écouvillons

nasaux (EN, Virocult®) prélevés sur 10 porcs ayant une température corporelle >40,5°C. Des prélèvements testés positifs en diagnostic moléculaire ont également été fournis par d'autres laboratoires. En outre, des EN ont été réalisés au cours de l'été 2010 sur des porcs *a priori* asymptomatiques, issus de 22 élevages sentinelles situés en Bretagne (10 porcs/élevage).

1.1.2. Pour le diagnostic sérologique

Lors des visites en élevages symptomatiques, deux prises de sang sur tube sec sont effectuées à 3 semaines d'intervalle sur les 10 porcs écuvillonnés, afin d'apprécier la séroconversion après infection. En février 2010, 9 élevages de porcs situés dans un rayon de 2,5 km autour d'un élevage de dindes infecté par le pH1N1/09 ont été prélevés, à raison de 15 porcs en post-sevrage et 15 porcs en engraissement. Des prélèvements sanguins ont également été réalisés en été 2010 dans les 22 élevages sentinelles (10 porcs/élevage).

1.2. Diagnostic virologique

1.2.1. Evaluation de RT-PCR en temps réel pour la détection des virus Influenza A chez le porc et la différenciation du pH1N1/09 dans cette espèce

Des producteurs de kits commerciaux ont été sollicités pour la mise au point de RT-PCR en temps réel prêtes à l'emploi permettant (i) de détecter les virus Influenza A, y compris le pH1N1/09, chez le porc, (ii) de distinguer, parmi les SIV européens enzootiques, le pH1N1/09 dans cette espèce. Il était demandé que les méthodes incluent un contrôle interne positif (IPC) permettant l'amplification d'un gène cellulaire approprié pour valider les étapes d'extraction des ARN viraux à partir d'échantillons biologiques de porc. Le processus de validation a été mené selon les recommandations de l'OIE (OIE, 2008a). Les analyses ont été réalisées conformément aux notices fournies par les fabricants. Un panel constitué de 14 souches virales a permis d'évaluer la spécificité des RT-PCR dédiées à l'amplification des gènes viraux. Un deuxième panel, constitué de 30 échantillons biologiques prélevés sur des porcs EOPS sains ou inoculés expérimentalement par du SIV, a été élaboré afin de vérifier la fonctionnalité des kits sur des matrices biologiques porcines, notamment en terme de performance des IPC. Il a également permis de vérifier la spécificité des méthodes. La sensibilité analytique a été estimée à partir des résultats de trois répétitions d'analyses menées sur une série de dilutions d'un pas de raison 10 d'un extrait d'ARN de la souche pH1N1/09 de référence A/California/4/09. Elle a également été évaluée à partir des résultats de trois répétitions d'analyses menées sur des prélèvements biologiques (surnageant d'écuvillon nasal ou broyat de poumon) de porcs EOPS, plus ou moins chargés en pH1N1/09 inactivé par traitement à la β -propiolactone. La reproductibilité inter-laboratoires a été évaluée à l'occasion d'un essai inter-laboratoires d'aptitude auquel ont participé 12 laboratoires d'analyses vétérinaires candidats à l'agrément pour la détection des virus Influenza A chez le porc, les deux fabricants et le LNR. Un troisième panel composé de 25 surnageants d'EN ou de broyats de poumons de porcs EOPS, chargés ou non de SIV et de pH1N1/09 inactivés, a été constitué à cette occasion.

1.2.2. Isolement viral

Les virus détectés sont multipliés en culture de cellules MDCK aux fins de caractérisations moléculaires (OIE, 2008b). Ils sont amplifiés sur œufs embryonnés de poule en vue de leur sous-typage antigénique, pour utilisation comme antigènes de référence dans les tests IHA ou pour inoculations expérimentales de porcs EOPS.

1.3. Identification et caractérisation des isolats

1.3.1. Sous-typage moléculaire

Les sous-types des virus n'ayant pas été identifiés comme étant des dérivés du pH1N1/09 sont déterminés à l'aide de 2 RT-PCR duplex spécifiques des SIV européens (H1/H3 et N1/N2) (Kuntz-Simon *et al.*, 2005).

1.3.2. Sous-typage antigénique

Le pouvoir hémagglutinant des isolats a été éprouvé par test IHA après incubation en présence de sérums post-infectieux (SPI) ou hyperimmuns (SHI) produits sur porcs EOPS. Les SPI sont récoltés 3 semaines après infection. Les SHI sont récoltés 2 semaines après un rappel d'immunisation en présence d'adjuvant.

Des sérums post-vaccinaux (SPV-1 et SPV-2) anti-pH1N1/09 ont été obtenus après deux injections, à 3 semaines d'intervalle, de la souche A/California/04/09 inactivée en présence d'adjuvant.

1.3.3. Caractérisations génétiques

Les segments génomiques des isolats ont été séquencés partiellement ou dans leur intégralité afin de confirmer les résultats des sous-typages moléculaires et antigéniques et d'étudier l'évolution des virus.

1.3.4. Diagnostic sérologique

Les anticorps sériques sont détectés par tests IHA (OIE, 2008b). Les antigènes de référence utilisés ont été A/Sw/Morbihan/0070/05 ou A/Sw/Cotes d'Armor/0388/09 (H1N1), A/Sw/Scotland/410440/94 (H1N2), A/Sw/Flandres/1/98 (H3N2) pour la détection des anticorps anti-SIV européens et A/California/04/09 pour la détection des anticorps anti-pH1N1/09. La spécificité de cette valence antigénique a été éprouvée sur des panels de sérums récoltés dans des élevages français avant l'émergence du pH1N1/09 et préalablement analysés vis-à-vis des 3 sous-types de SIV enzootiques. Pour chaque valence analysée, des SHI ont été introduits comme témoins positifs. Les règles d'interprétation au niveau des élevages ont été décrites par ailleurs (Hervé *et al.*, 2011).

2. RESULTATS

2.1. Outils de diagnostic

2.1.1. Validation de kits commerciaux pour le diagnostic moléculaire

Cinq trousses commerciales ont répondu favorablement aux critères de validation (Tableau 1). Deux permettent l'amplification d'une région conservée du gène M des virus Influenza A, deux l'amplification d'une séquence spécifique du gène HA du pH1N1/09, et un l'amplification d'une région spécifique du gène NA du pH1N1/09 (Tableau 2).

Tableau 1 - Kits de RT-PCR en temps réel validés pour des détections dans des échantillons biologiques de porc

Gène viral ciblé	Fabricant	Kit (nom et référence)
M des virus Influenza A	LSI	TaqVet™ Swine Influenza A, A/H1N1/2009 included INFAP-Swine
	ADIAGENE	ADIAVET® SIV REALTIME ADI282
H1 du pH1N1/09	LSI	TaqVet™ Swine Influenza A/H1N1 2009 – H1 detection SIH1-2009
	ADIAGENE	ADIAVET® A/H1N1(2009) ADI441
N1 du pH1N1/09	LSI	TaqVet™ Swine Influenza A/H1N1 2009 – N1 detection SIN1-2009

Tableau 2 - Evaluation de la spécificité des kits de RT-PCR en temps réel sur un panel d'ARN extraits de souches virales (valeurs des Ct ; N/A : absence de Ct ; ADIA : AdiaGène)

Sous-type	Souches virales		gène M Influenza A		gène H1 pH1N1/09		gène N1 pH1N1/09
	Lignage	Nom	LSI	ADIA	LSI	ADIA	LSI
SIV H1N1 européen	Avian-like swine H1N1	A/Sw/Finistere/2899/82	14.7	13.5	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Morbihan/0070/05	14.6	12.8	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0231/06	14.2	14.9	N/A	N/A	N/A
	Reassortant swine H1N1	A/Sw/Cotes d'Armor/0190/06	14.6	13.5	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0046/08	15.9	15.6	N/A	N/A	N/A
SIV H1N2 européen	Human-like reassortant swine H1N2	A/Sw/Scotland/410440/94	14.0	13.9	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0113/06	14.4	13.9	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Cotes d'Armor/0214/06	14.6	14.9	N/A	N/A	N/A
	Reassortant swine H1N2	A/Sw/Cotes d'Armor/0102/08	14.7	14.6	N/A	N/A	N/A
SIV H3N2 européen	Human-like reassortant swine H3N2	A/Sw/Flandres/1/98	14.0	12.1	N/A	N/A	N/A
		A/Sw/Gent/1/84	14.9	11.8	N/A	N/A	N/A
SIV H1N1 américain	Classical swine H1N1	A/Sw/England/117316/86	15.2	12.9	N/A	N/A	N/A
H1N1 humain d'origine porcine	Swine-like human H1N1	A/New Jersey/76	13.9	10.4	N/A	N/A	N/A
		A/California/04/2009	13.0	12.1	16.1	13.0	15.0

Les mélanges réactionnels permettent la mise en œuvre de RT-PCR duplex (gène cible + IPC) en une seule étape et en temps réel (technologie TaqMan®).

2.1.2. Evaluation de la spécificité du test IHA pH1N1/09

Les relations antigéniques entre A/California/04/09 et les SIV européens ont été appréciées par tests IHA, après

incubation des virus en présence de SPI et SHI (Tableau 3). Ces analyses ont révélé des réactions croisées avec des sérums anti-SIV, notamment ceux renfermant de grandes quantités d'anticorps anti-H1N1 du lignage européen « avian-like ».

A noter que le pH1N1/09 réagit également avec un SHI anti-H1N1 « classical swine », lignage ne circulant plus en Europe mais présent dans d'autres régions mondiales et ayant fourni son gène HA au pH1N1/09. L'analyse de sérums prélevés en France en 2008-2009, avant le pic épidémique à pH1N1/09 chez l'Homme, a montré que le test IHA pH1N1/09 ne présente quasiment pas de défaut de spécificité quand il est

appliqué sur des prélèvements issus d'élevages indemnes de grippe enzootique (Tableau 4). Par contre, les réactions croisées existant entre A/California/04/09 et les sérums contenant des anticorps anti-SIV laissent présager des difficultés d'interprétation des tests IHA 4 valences lorsque appliqués sur des prélèvements issus d'élevages où circulent des SIV enzootiques, notamment de sous-type H1N1.

Tableau 3 - Evaluation des relations antigéniques entre A/California/04/09 (pH1N1/09) et les SIV européens dans des tests IHA croisés. SPI : sérum post-infectieux ; SHI : sérum hyperimmun ; SPV-1 : sérum post-vaccinal après 1 injection ; SPV-2 : sérum post-vaccinal après 2 injections.

Sérum de porc			Antigène	
Sous-type viral	Souche virale	Type	Homologue	A/California/04/09
Avian-like sw H1N1	A/Sw/Finistère/2889/82	SPI	40	<10
		SHI	1280	40
	A/Sw/Morbihan/0070/05	SPI	20	<10
		SHI	640	80
	A/Sw/Cotes d'Armor/0388/09	SPI	80	<10
		SHI	2560	80
Human-like sw H1N2	A/Sw/Scotland/410422/94	SPI	320	<10
		SHI	2560	20
	A/Sw/Côtes d'Armor/0113/06	SPI	640	<10
		SHI	2560	<10
	A/Sw/Côtes d'Armor/0214/06	SPI	160	<10
		SHI	1280	<10
Human-like sw-H3N2	A/Sw/Flandres/1/98	SPI	160	<10
		SHI	2560	<10
Classical sw H1N1	A/Sw/England/117316/86	SPI	20	<10
		SHI	1280	160
pH1N1/09	A/California/04/09	SPV-1	320	
		SPV-2	2560	
<i>néant</i>	<i>néant</i>	EOPS	<i>sans objet</i>	<10

Tableau 4 - Evaluation de la spécificité du test IHA pH1N1/09 par analyse de sérums prélevés avant l'émergence du pH1N1/09 ou avant le pic épidémique chez l'Homme en France.

Enquêtes 2008-2009		Tests IHA SIV H1N1, H3N2, H1N2		Test IHA pH1N1/09	
« Surveillance élevages sentinelles »	22 élevages (10 sérums/élevage)	Négatifs	6	Négatifs	6
				Positifs ou douteux	0
		Positifs	16	Négatifs	8
				Négatifs, avec réactions croisées faibles	8
« Prévalence à l'abattoir »	184 élevages (10 sérums/élevage)	Négatifs	99	Négatifs	92
				Positifs	7
		Positifs	85	Négatifs	30
				Négatifs, avec réactions croisées faibles	16
				Douteux	13
				Positifs	26

2.2. Surveillance virologique et sérologique

2.2.1. Surveillance virologique

27 élevages ont été prélevés à l'occasion de syndromes grippaux (Tableau 5). Dix-huit d'entre eux ont été détectés positifs et des prélèvements issus de 21 autres élevages

positifs ont été reçus d'autres laboratoires. Ont ainsi été isolés et identifiés 13 SIV H1N1, 4 SIV H1N2, 2 H1N1 réassortants (SIV H1N1 ayant acquis le gène HA d'un SIV H1N2), 2 H1N2 réassortants (SIV H1N2 ayant acquis le gène HA d'un SIV H1N1) et 4 virus dérivés du pH1N1/09. Parmi ceux-ci, 2 ont été isolés en juin-juillet 2010 dans des

élevages d'outre-mer et 2 en octobre-novembre 2010 dans un élevage de métropole.

Le diagnostic moléculaire réalisé dans les élevages sentinelles n'a pas mis en évidence la présence de virus

influenza dans les EN prélevés sur porcs asymptomatiques. Des virus, n'appartenant pas au lignage pH1N1/09, ont été détectés dans 2 élevages prélevés au moment où les porcs présentaient un syndrome grippal.

Tableau 5 - Résultats de la surveillance virologique et des caractérisations (moléculaires et antigéniques) des souches de virus influenza A isolées chez le porc en 2009-2010. N = nombre. * dont 2 dans des régions d'outre-mer.

Période	Elevages Positifs/N Visites	Elevages positifs signalés par d'autres laboratoires	Total élevages positifs	Nombre de souches isolées	Lignage des souches isolées				
					Avian-like sw H1N1	Human-like sw H1N2	Reass. sw H1N1	Reass. sw H1N2	pH1N1-like sw H1N1
Janv-Avril 2009	3/4	1	4	4	3	1	0		0
Mai-Déc 2009	4/8	5	9	6	5	1	0		0
2010	11/15	15	26	15	5	2	2	2	4*
Totaux	18/27	21	39	25	13	4	2	2	4

2.2.2. Surveillance sérologique

L'analyse des paires de sérums prélevées lors des visites en élevages symptomatiques n'a pas mis en évidence d'anticorps anti-pH1N1/09 dans les élevages non atteints de grippe enzootique.

Les résultats des investigations réalisées en février 2010 dans 9 élevages de porcs situés autour d'un élevage avicole infecté par le pH1N1/09 sont présentés dans le tableau 6. Un seul élevage s'est montré négatif vis-à-vis des 4 valences testées. Un élevage, indemne de SIV enzootiques, a été trouvé nettement positif vis-à-vis du pH1N1/09.

L'enquête épidémiologique menée dans cet élevage a révélé des syndromes grippaux fin décembre 2009 chez le personnel, puis chez les porcins en engraissement.

Les animaux trouvés séropositifs en février n'étant *a priori* pas ceux ayant montré des signes cliniques en décembre, on peut supposer que le pH1N1/09 a diffusé au sein de l'élevage, des porcs ayant probablement été infectés de manière asymptomatique. 2 élevages ont été trouvés doublement positifs, vis-à-vis du SIV H1N1 et du pH1N1/09. Les 5 autres élevages ont été trouvés séropositifs en grippe, mais l'identification précise des virus incriminés, parmi les SIV H1N1, SIV H1N2 et pH1N1/09, n'a pas été possible du fait des probables réactions croisées. Par ailleurs, 3 élevages sentinelles, séronégatifs en grippe enzootique, ont été trouvés positifs vis-à-vis du pH1N1/09, mais les fréquences d'animaux touchés et les titres IHA sont dans tous les cas restés très faibles (10% ; titres IHA de 20-40).

Tableau 6 - Nombre d'animaux séropositifs (sur 15 analysés à chaque stade physiologique) dans des élevages prélevés en février 2010 autour d'un élevage de dindes infecté pH1N1/09. [n] = titre IHA moyen. s.o. : sans objet

Elevage	Post-sevrage				Engraissement			
	H1N1	H1N2	H3N2	pH1N1	H1N1	H1N2	H3N2	pH1N1
A	0	0	0	0	1 [20]	0	0	0
B	0	2 [20]	0	1 [20]	0	0	0	11 [40]
C	0	0	0	0	3 [27]	1 [20]	0	8 [40]
D	s.o.	s.o.	s.o.	s.o.	7 [43]	0	0	5 [64]
E	0	1 [20]	0	0	3 [20]	4 [50]	0	6 [30]
F	0	1 [20]	0	0	1 [80]	0	0	2 [20]
G	2 [20]	4 [30]	0	2 [60]	1 [20]	13 [65]	0	6 [43]
H	0	10 [60]	0	0	4 [20]	11 [34]	0	3 [67]
I	0	1 [40]	0	0	2 [30]	5 [20]	0	2 [50]

CONCLUSION

Les kits de RT-PCR en temps réel validés, d'une part pour la détection des virus Influenza A chez le porc et d'autre part pour la différenciation du pH1N1/09 dans cette espèce, sont des outils de diagnostic moléculaire pouvant être aisément utilisés aux fins d'épidémiologie de la grippe chez le porc (Pol *et al.*, 2010, 2011). Ils sont d'autant plus pertinents

que le diagnostic sérologique différentiel par tests IHA comportant 4 valences antigéniques s'avère difficile à interpréter en raison de la multiplication des réactions croisées entre antigènes et anticorps de lignages différents (Kyriakis *et al.*, 2010 ; Vincent *et al.*, 2010).

Plus d'un an après son émergence chez l'Homme, le pH1N1/09 a été isolé chez le porc en France métropolitaine, comme il l'a été dans de nombreux autres pays européens, *i.e.* en Grande-Bretagne, Irlande, Islande, Norvège, Allemagne, Italie,

Danemark, Russie (www.oie.com). Il a également été détecté dans des régions d'outre-mer. Au vu des données actuellement disponibles, on ne peut pas dire aujourd'hui si le virus transmis a diffusé ou non dans la population porcine de métropole. Des investigations sérologiques ont révélé que cela a été le cas dans les populations de porcs des régions d'outre-mer investiguées, régions indemnes de grippe chez le porc avant la pandémie de 2009 (données non montrées). L'absence totale d'immunité anti-influenza dans les troupeaux serait un facteur pouvant favoriser la transmission du pH1N1/09 aux porcs. Ainsi, la Norvège également préalablement indemne de grippe porcine a-t-elle été particulièrement touchée en 2009, avec 23 foyers déclarés en 3 semaines (Hofshagen *et al.*, 2009).

Les actions de surveillance des SIV, et dans l'hexagone, et dans les régions d'outre-mer, doivent se poursuivre afin de savoir si

le pH1N1/09 s'est adapté et circule chez le porc. Si tel est le cas, quel nouveau rôle jouera le porc dans l'écologie des virus influenza A ? On peut en effet craindre que le porc, chez qui la dérive antigénique est plus modérée que chez l'Homme, ne serve de réservoir à cette souche humaine et que celle-ci puisse être un jour retransmise à une population devenue naïve. Quels seraient les risques de réassortiments, chez le porc, du pH1N1/09 avec les SIV enzootiques, avec des virus influenza humains saisonniers, voire avec des virus influenza aviaires, dont les virus hautement pathogènes ? Un réassortant entre pH1N1/09 et SIV a ainsi été isolé en Asie début 2010 (Vijaykrishna *et al.*, 2010). En fonction des réassortiments, quels caractères de virulence, de résistance aux antiviraux, ou encore de transmission inter-espèces puis intra-espèces pourraient acquérir les virus néoformés ?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brookes S.M., Irvine R.M., Nunez A., Clifford D., Essen S., Brown I.H., Van Reeth K., Kuntz-Simon G., Loeffen W., Foni E., Larsen L., Matrosovich M., Bublot M., Maldonado J., Beer M., Cattoli G., 2009. Influenza A (H1N1) infection in pigs. *Vet Rec.*, 164, 760-761.
- Brookes S.M., Nunez A., Choudhury B., Matrosovich M., Essen S.C., Clifford D., Slomka M.J., Kuntz-Simon G., Garcon F., Nash B., Hanna A., Heegaard P.M., Queguiner S., Chiapponi C., Bublot M., Garcia J.M., Gardner R., Foni E., Loeffen W., Larsen L., Van Reeth K., Banks J., Irvine R.M., Brown I.H., 2010. Replication, pathogenesis and transmission of pandemic (H1N1) 2009 virus in non-immune pigs. *PLoS One*, 5, e9068.
- Hervé S., Gorin S., Quéguiner S., Barbier N., Eveno E., Dorenlor V., Eonon F., Madec F., Rose N., Simon G., 2011. Estimation de la séroprévalence des virus influenza chez le porc charcutier en France en 2008-2009. *Journées Rech. Porcine*, 41, sous presse.
- Kuntz-Simon G., Madec F., 2009. Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses Public Health*, 56, 310-325.
- Kuntz-Simon G., 2009. Grippe porcine et virus influenza porcins. *Bulletin épidémiologique AFSSA*, 33, 1-6.
- Kuntz-Simon G., Franck N., 2007. Virus influenza porcins : implications en santé animale et en santé publique. *Journées Rech. Porcine*, 39, 383-394.
- Kuntz-Simon G., Quéguiner S., Baudouard M.-A., Fablet C., Buffereau J.-P., Madec F., Le Potier M.-F., 2005. Evaluation of multiplex reverse transcriptase PCR assays for detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in French clinical samples. *Proceedings of IABS International Congress « New Diagnostic Technology: Applications in Animal Health & Biologics Controls »*, Saint-Malo, France, p 97.
- Kyriakis C.S., Brown I.H., Foni E., Kuntz-Simon G., Maldonado J., Madec F., Essen S.C., Chiapponi C., Van Reeth K., 2009. Virological Surveillance and Preliminary Antigenic Characterization of Influenza Viruses in Pigs in Five European Countries from 2006 to 2008. *Zoonoses Public Health*, in press. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01301.x
- Kyriakis C.S., Olsen C.W., Carman S., Brown I.H., Brookes S.M., Doorsselaere J.V., van Reeth K., 2010. Serologic cross-reactivity with pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, Europe. *Emerg Infect Dis*, 16, 96-99.
- Lange E., Kalthoff D., Blohm U., Teifke J.P., Breithaupt A., Maresch C., Starick E., Fereidouni S., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Beer M., Vahlenkamp T.W., 2009. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. *J Gen Virol*, 90, 2119-2123.
- Myers K.P., Olsen C.W., Gray G.C., 2007. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis.*, 44, 1084-1088.
- OIE, 2008a. *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 1.1.5, 50-60.
- OIE, 2008b. *Manual of Diagnostic Tests & Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 2.8.8, 1128-1138.
- Olsen C.W., Brown I.H., Easterday B.C., van Reeth K., 2006. Swine Influenza, In *Diseases of Swine*, edited by B.E. Straw, J.J. Zimmerman, S. D'Allaire, D.J. Taylor. Chapter 28, 469-482.
- Pol F., Gorin S., Quéguiner S., Deblanc C., Simon G., 2010. Validation de kits commerciaux de RT-PCR en temps réel pour la détection des virus Influenza A chez le porc et la différenciation du virus pandémique (H1N1) 2009 dans cette espèce. *EuroReference*, N°4, ER04-10M01.
- Pol F., Quéguiner S., Gorin S., Deblanc C., Simon G., 2011. Validation of commercial real-time RT-PCR kits for the detection of Influenza A viruses in porcine samples and differentiation of pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs. *J Virol Methods*, 171, 241-247.
- Simon G., 2010. Le porc, hôte intermédiaire pour l'apparition de virus réassortants à potentiel zoonotique. *Virologie*, 14, 407-422.
- Smith G. J., Vijaykrishna D., Bahl J., Lycett S.J., Worobey M., Pybus O.G., Ma S.K., Cheung C.L., Raghvani J., Bhatt S., Peiris J.S., Guan Y., Rambaut A., 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459, 1122-1125.
- Vijaykrishna D., Poon LL, Zhu HC, Ma SK, Li OT, Cheung CL, Smith GJ, Peiris J.S., Guan Y., 2010. Reassortment of pandemic H1N1/2009 influenza A virus in swine. *Science*, 328, 1529.
- Vincent A.L., Lager K.M., Faaberg K.S., Harland M., Zanella E.L., Ciacci-Zanella J.R., Janke B.H., Klimov A., 2010. Experimental inoculation of pigs with pandemic H1N1 2009 virus and HI cross-reactivity with contemporary swine influenza virus antisera. *Influenza Other Resp Viruses*, 4, 53-60.
- Vincent A.L., Lager K.M., Harland M., Lorusso A., Zanella E., Ciacci-Zanella J.R., Kehrli M.E., Klimov A., 2009a. Absence of 2009 pandemic H1N1 influenza A virus in fresh pork. *PLoS One*, 4, e8367.
- Vincent A.L., Ma W., Lager K.M., Gramer M.R., Richt J.A., Janke B.H., 2009b. Characterization of a newly emerged genetic cluster of H1N1 and H1N2 swine influenza virus in the United States. *Virus Genes*, 39, 176-185.
- Hofshagen M., Gjerset B., Er C., Tarpai A., Brun E., Dannevig B., Bruheim T., Fostad I.G., Iversen B., Hungnes O., Lium B., 2009. Pandemic influenza A(H1N1)v: human to pig transmission in Norway? *Euro Surveill.*, 14, pii: 19406.
- Weingartl H.M., Berhane Y., Hisanaga T., Neufeld J., Kehler H., Embury-Hyatt C., Hooper-McGreevy K., Kasloff S., Dalman B., Bystrom J., Alexandersen S., Li Y., Pasick J., 2010. Genetic and pathobiologic characterization of pandemic H1N1 2009 Influenza viruses from a naturally infected swine herd. *J Virol*, 84, 2245-2256.

