

L'excrétion et la transmission du virus de l'hépatite E (VHE) sont augmentées lors d'une co-infection par le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDRP)

Morgane SALINES (1), Mathieu ANDRAUD (1), Elodie BARNAUD (2), Florent EONO (1), Patricia RENSON (1), Olivier BOURRY (1), Nicole PAVIO (2), Nicolas ROSE (1)

(1) Anses, BP 53, 22440 Ploufragan, France

(2) UMR Virologie 1161 Anses-INRA-ENVA, Laboratoire de Santé Animale, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France

morgane.salines@gmail.com

Avec la collaboration de Frédéric PABOEUF et Yann BAILLY

L'excrétion et la transmission du virus de l'hépatite E (VHE) sont augmentées lors d'une co-infection par le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDRP)

La probabilité d'abattre des porcs dont le foie contient du virus de l'hépatite E (VHE) est conditionnée par le moment où les animaux sont infectés avant l'abattage et par la durée d'excrétion du virus. Le virus du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDRP), virus immunosuppresseur très prévalent, pourrait influencer l'infection par le VHE. L'impact du virus du SDRP sur les caractéristiques de l'infection par le VHE a été étudié chez des porcs Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) par l'intermédiaire d'une co-infection expérimentale par le VHE et le virus du SDRP, comparée à une infection par le VHE seul.

Le suivi des animaux a montré que l'excrétion virale et la réponse immunitaire humorale sont retardées chez les porcs co-infectés (d'un facteur 1,9 et 1,6 respectivement). L'excrétion du VHE est significativement plus importante et considérablement prolongée (48,6 jours contre 9,7 jours pour le VHE seul). L'allongement de la durée d'excrétion est significativement lié au défaut de réponse humorale chez les porcs co-infectés. Le taux de transmission directe du VHE est 4,7 fois plus élevé (0,70 par jour contre 0,15 pour le VHE seul). La sensibilité à l'infection par le VHE est augmentée d'un facteur 3,3 ($1,41 \cdot 10^5$ GE/g nécessaires pour infecter un porc co-infecté, $5,00 \cdot 10^5$ GE/g en cas d'infection par le VHE seul). Ces résultats montrent un impact important du virus du SDRP sur la dynamique d'infection du VHE et une potentielle chronicité chez des porcs co-infectés, augmentant considérablement le risque de présence du virus dans le foie des porcs abattus.

Hepatitis E virus (HEV) shedding and transmission are increased in the case of co-infection with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)

The probability of slaughtering pigs whose liver contains hepatitis E virus (HEV) is related to the date of infection before slaughter and to the duration of viral shedding. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) is a highly prevalent immunosuppressive virus and it is suspected of influencing HEV infection dynamics. The impact of PRRSV on the features of HEV infection was studied through an experimental HEV/PRRSV co-infection of Specific-Pathogen-Free (SPF) pigs compared to an infection with HEV alone.

The follow-up of the animals showed that shedding and humoral immune response were delayed in co-infected pigs (by a factor of 1.9 and 1.6 respectively). HEV shedding was significantly increased in the case of co-infection and dramatically extended (48.6 days as against 9.7 days for HEV only). The increase in duration of the infectious period was significantly correlated with the impaired humoral response in co-infected pigs. HEV direct transmission rate was estimated to be 4.7 times higher in the case of co-infection than in HEV-only infected pigs (0.70 per day versus 0.15 for HEV only). HEV infection susceptibility was also increased by a factor of 3.3 ($1.41 \cdot 10^5$ GE/g being required to infect a co-infected pig, $5.00 \cdot 10^5$ GE/g for a pig infected with HEV alone). These results show that PRRSV has a major impact on HEV infection and transmission and that HEV/PRRSV co-infection could lead to chronic HEV infection. This chronicity would dramatically increase the risk of having pig livers containing HEV at slaughter time.

INTRODUCTION

Le virus de l'hépatite E est un virus à ARN simple brin de polarité positive, non enveloppé, agent étiologique d'une hépatite aiguë chez l'homme. Transmis principalement par voie oro-fécale, il est responsable de signes cliniques similaires à ceux de l'hépatite A mais en moyenne plus sévères (Emerson et Purcell, 2003). Des formes chroniques peuvent être observées, notamment chez des individus immunodéficients (Gerolami *et al.*, 2008; Kamar *et al.*, 2008). Dans les pays développés, l'hépatite E est reconnue aujourd'hui comme une zoonose alimentaire potentiellement grave, dont le nombre de cas apparents est en constante augmentation, et pour laquelle les porcs domestiques sont considérés comme le principal réservoir (Pavio *et al.*, 2008). La prévalence du VHE en élevage porcin est élevée; différentes dynamiques d'infection sont observées et sont en lien direct avec la probabilité de contamination des foies des porcs abattus (Rose et Pavio, 2014). Ces variations inter-élevages de la dynamique d'infection du VHE ne sont pas entièrement expliquées à ce jour. L'influence de certaines maladies intercurrentes, et notamment du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin (SDRP), due à un virus immunodépresseur fortement prévalent dans les régions de production porcine en France, est ainsi suspectée (de Deus *et al.*, 2007; Martelli *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2013). La présente étude vise à objectiver et quantifier l'impact d'une co-infection par le virus du SDRP sur l'infection par le VHE chez le porc (excrétion, transmission, réponse immunitaire humorale) grâce à une co-infection expérimentale VHE/SDRP de porcs Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) comparée à une infection par le VHE seul (Andraud *et al.*, 2013).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Collecte des données

1.1.1. Dispositif expérimental

L'expérimentation a été conduite au sein des animaleries protégées du laboratoire de l'Anses de Ploufragan, niveau 3 de biosécurité sous air filtré. Vingt porcs EOPS âgés de 5 semaines ont été utilisés; ils sont exempts du VHE et du virus du SDRP et n'ont aucun anticorps maternel spécifique de ces virus. Dix-huit porcelets ont été répartis aléatoirement (stratification en fonction du sexe, de la portée et du poids) dans trois parcs contenant chacun 6 animaux: 3 porcs inoculés par le VHE et le virus du SDRP, et 3 animaux contacts. Deux porcelets ont été utilisés comme témoins non infectés (figure 1).

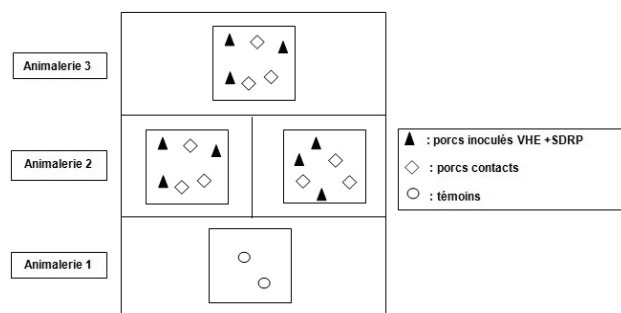


Figure 1 – Schéma du dispositif expérimental de co-infection.

1.1.2. Virus et inoculum

A J0, 3 porcs par parc ont été inoculés: (i) par voie orale (sondage œsophagien) avec un inoculum de VHE génotype 3

titrant à 10^8 génomes équivalents (GE) sous un volume de 10 mL, préparé selon le protocole décrit par Andraud *et al.* (2013) et (ii) par voie intranasale avec un inoculum d'une souche de virus du SDRP de génotype 1, sous-type 1 (PRRS/FR/29/24/1/2005, souche FINISTERE) titrant à 5.10^5 DCP₅₀ (dose cytopathogène 50) pour un volume de 2,5 mL par narine.

1.1.3. Prélèvements et observations

Les matières fécales des animaux ont été prélevées individuellement 3 fois par semaine dès J-3 et jusqu'à 49 jours post-infection (JPI). Une prise de sang a été réalisée avant inoculation puis une fois par semaine. Des observations cliniques ont également été collectées (relevé des symptômes en cas de manifestations cliniques, prise de température quotidienne, *etc.*). Les animaux ont été euthanasiés à la fin de l'essai, soit 49 JPI, par injection intraveineuse de thiopental sodique 1g/50kg (Nesdonal®, Merial, Lyon, France) suivie d'une saignée. A l'autopsie, des prélèvements de foie ont été effectués.

1.1.4. Analyses virologiques et sérologiques

La quantification des ARN du virus de l'hépatite E dans les matières fécales et dans le foie a été réalisée par une RT-PCR quantitative en temps réel (Barnaud *et al.*, 2012). Les résultats sont exprimés en nombre de copies de génome par gramme de fèces ou de foie (GE/g). La détection dans le sérum des anticorps dirigés contre le VHE a été réalisée avec le kit HEV ELISA 4.0v (MP Diagnostics, Illkirch, France) (Barnaud *et al.*, 2012). La détection des ARN du virus du SDRP dans le sérum a été réalisée à l'aide d'une RT-PCR en temps réel (Charpin *et al.*, 2012). Les résultats sont exprimés en Ct (cycle seuil).

1.2. Analyses statistiques et modèles

1.2.1. Dynamique d'infection du VHE

La période de latence, la période infectieuse et le délai nécessaire à la production d'anticorps anti-VHE ont été estimés par l'intermédiaire d'analyses de données de survie. Pour les animaux inoculés, la période de latence correspond au délai entre la date d'inoculation et la date du premier échantillon de matières fécales positif en RT-PCR VHE. La période de latence a été modélisée selon une distribution gamma, dont les paramètres de forme (a) et d'échelle (s) ont été estimés par la méthode du maximum de vraisemblance. L'intervalle de confiance des paramètres estimés a ensuite été calculé par une technique de bootstrap non paramétrique. Des analyses de données de survie ont été effectuées afin d'estimer la durée de la période infectieuse et d'évaluer l'impact de l'infection par le virus du SDRP sur le délai nécessaire à la production d'anticorps spécifiques vis-à-vis du VHE. Deux modèles paramétriques ont été testés pour ces analyses (distribution log-normale ou de type Weibull des temps de survie) et comparés en utilisant le Critère d'Information d'Akaike (AIC). L'influence du délai nécessaire à la production d'anticorps anti-VHE sur la durée de la période infectieuse a été étudiée par l'intermédiaire d'un modèle semi-paramétrique de Cox. La réponse immunitaire humorale a été qualifiée d'absente ou de tardive si le délai infection-séroconversion était supérieur ou égal à 25 JPI et de précoce s'il était strictement inférieur à 25 JPI (Satou et Nishiura, 2007).

1.2.2. Quantification de l'excrétion, de l'accumulation environnementale et de la transmission du VHE

La distribution de l'excrétion virale dans le temps pour les porcs co-infectés et non co-infectés a été représentée par une

série de « boxplot » (boîtes à moustache). Un modèle linéaire mixte prenant en compte des données répétées dans le temps a été construit afin d'objectiver la différence entre les charges virales selon le statut des animaux vis-à-vis du virus du SDRP. La charge virale accumulée dans l'environnement, correspondant à l'accumulation de particules virales excrétées par les porcs infectés, partiellement compensées par le taux de clairance, a également été estimée selon la méthode décrite par Andraud *et al.* (2013). Le taux de clairance, noté δ , prend en compte l'élimination des matières fécales au travers du caillebotis de la case et l'inactivation intrinsèque du VHE dans l'environnement.

Deux voies de transmission du VHE ont été investiguées : (i) la transmission due aux contacts directs entre les porcs infectés et les porcs sensibles et (ii) la transmission indirecte oro-fécale à partir d'un réservoir environnemental au sein d'une même case. Le modèle utilisé est similaire au modèle décrit par Andraud *et al.* (2013). Les paramètres de transmission directe et indirecte, respectivement β_w et $\beta_E^{(w)}$, la durée de la période de latence λ_j de chaque individu contact et le taux de clairance du virus δ ont été estimés par une méthode de Monte-Carlo par Chaînes de Markov, l'algorithme de Metropolis-Hastings, dans le cadre de l'inférence bayésienne.

Les résultats obtenus dans le cadre de cet essai sont comparés aux résultats issus d'un précédent essai d'infection par le VHE seul (Andraud *et al.*, 2013). Bien que les deux essais n'aient pas été conduits concomitamment, ils ont été réalisés dans des conditions expérimentales strictement identiques, ce qui autorise la comparaison des résultats (même lieu d'expérimentation, structure de contact identique, porcs EOPS génétiquement comparables, âges des animaux, souches de VHE inoculée, doses et protocoles identiques).

2. RESULTATS

2.1. Description des données d'infection

Les données d'infection sont présentées en figures 2 et 3. L'ensemble des individus inoculés et contacts sont virémiques pour le virus du SDRP avant la première excrétion du VHE détectée, excepté chez 2 porcs contacts. L'ensemble des individus exposés au VHE, contacts et inoculés, sont excréteurs du VHE jusqu'à la fin de l'essai (49 JPI). A l'autopsie, seuls 4 foies sur 18 sont négatifs en RT-PCR VHE. Seuls 4 individus inoculés sur 9 et 7 individus contacts sur 9 présentent une réponse immunitaire humorale anti-VHE (entre 35 et 49 JPI, et 42 et 49 JPI respectivement, données non montrées).

	JPI	2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	32	35	39	42	44	46	49	Autopsie (foie)	
Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Témoin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Groupe1	Inoculé	0	0	0	1,08.10 ³	0*	2,23.10 ⁴	2,23.10 ³	1,24.10 ⁵	2,62.10 ⁶	1,38.10 ⁷	1,35.10 ⁷	5,96.10 ⁸	8,27.10 ⁸	7,51.10 ⁸	2,95.10 ⁷	4,43.10 ⁷	8,02.10 ⁶	8,76.10 ⁶	1,49.10 ⁷	1,46.10 ⁶	
	Inoculé	0	0	0	0	0	2,23.10 ⁴	1,72.10 ³	1,91.10 ⁶	6,80.10 ⁶	2,24.10 ⁷	3,56.10 ⁷	7,66.10 ⁷	1,32.10 ⁸	9,91.10 ⁷	6,76.10 ⁷	1,51.10 ⁷	1,09.10 ⁸	4,01.10 ⁷	5,85.10 ⁷	1,87.10 ⁶	
	Inoculé	0	0	0	0	0	0	0	1,50.10 ³	1,53.10 ⁶	5,85.10 ⁶	1,14.10 ⁷	1,30.10 ⁷	4,06.10 ⁷	3,99.10 ⁷	9,27.10 ⁷	4,28.10 ⁷	5,02.10 ⁸	7,20.10 ⁷	6,40.10 ⁷	1,02.10 ⁶	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,67.10 ³	1,16.10 ⁶	1,79.10 ⁷	1,54.10 ⁷	3,75.10 ⁷	1,92.10 ⁷	1,42.10 ⁷	5,31.10 ⁷	4,87.10 ⁷	8,72.10 ³	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,91.10 ³	3,68.10 ⁶	3,51.10 ⁶	6,24.10 ³	1,53.10 ³	4,91.10 ³	1,17.10 ⁶	3,49.10 ³	0	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,78.10 ²	8,84.10 ³	1,43.10 ⁶	3,04.10 ⁶	5,43.10 ³	1,20.10 ⁶	4,29.10 ⁶	1,91.10 ⁶	1,20.10 ⁶	0	
Groupe2	Inoculé	0	0	0	0	0	1,56.10 ³	1,09.10 ⁶	1,57.10 ⁶	2,81.10 ⁶	1,67.10 ⁷	2,69.10 ⁷	8,71.10 ⁷	6,33.10 ⁷	4,44.10 ⁶	3,92.10 ⁶	1,64.10 ⁷	9,92.10 ³	1,45.10 ³	1,56.10 ³		
	Inoculé	0	0	0	0	0	0	2,19.10 ³	5,44.10 ³	6,85.10 ⁶	1,86.10 ⁷	1,51.10 ⁷	2,31.10 ⁷	1,55.10 ⁷	1,79.10 ⁷	2,57.10 ⁷	7,88.10 ⁶	1,37.10 ⁶	1,97.10 ⁷	6,80.10 ⁶	2,42.10 ⁶	
	Inoculé	0	0	0	0	0	1,03.10 ³	6,97.10 ³	5,05.10 ⁶	3,85.10 ⁷	4,20.10 ⁷	3,96.10 ⁷	6,72.10 ⁷	1,25.10 ⁸	1,39.10 ⁸	5,93.10 ⁷	8,10.10 ⁷	1,32.10 ⁸	1,13.10 ⁷	4,86.10 ⁶	3,59.10 ³	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,65.10 ⁶	0*	1,45.10 ⁶	4,12.10 ⁶	4,94.10 ⁶	abs	1,18.10 ⁷	2,51.10 ⁷	5,55.10 ⁷	1,12.10 ⁶	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,82.10 ⁶	5,38.10 ⁶	8,40.10 ⁶	4,43.10 ⁶	8,37.10 ⁷	1,43.10 ⁷	5,24.10 ⁶	1,69.10 ⁶	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,47.10 ⁶	7,26.10 ⁶	1,97.10 ⁷	3,03.10 ⁷	4,37.10 ⁷	2,49.10 ⁸	3,07.10 ⁶	3,44.10 ⁶	
Groupe3	Inoculé	0	0	0	0	0	2,37.10 ³	3,12.10 ³	3,88.10 ⁶	6,75.10 ⁶	7,98.10 ⁶	1,05.10 ⁷	4,21.10 ⁷	2,64.10 ⁷	4,26.10 ⁷	1,51.10 ⁷	2,90.10 ⁷	1,60.10 ⁷	2,08.10 ⁸	3,24.10 ⁶		
	Inoculé	0	0	0	0	0	0	6,06.10 ³	9,54.10 ³	4,08.10 ⁶	3,22.10 ⁶	1,55.10 ⁷	3,02.10 ⁷	1,76.10 ⁷	1,80.10 ⁷	1,88.10 ⁷	8,52.10 ⁷	1,85.10 ⁷	5,75.10 ⁷	2,04.10 ⁴		
	Inoculé	0	0	0	0	0	8,04.10 ⁴	4,35.10 ³	2,26.10 ⁶	1,14.10 ⁷	2,25.10 ⁷	1,73.10 ⁷	2,37.10 ⁷	3,66.10 ⁷	3,17.10 ⁷	1,04.10 ⁷	4,39.10 ⁶	4,09.10 ⁷	1,43.10 ⁷	5,61.10 ⁷	9,63.10 ³	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,80.10 ⁴	2,04.10 ³	2,34.10 ⁶	3,40.10 ³	4,04.10 ³	5,02.10 ³	7,39.10 ³	0	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,26.10 ⁶	1,50.10 ⁷	8,47.10 ⁷	0*	1,45.10 ⁷	8,67.10 ⁷	1,03.10 ³	5,87.10 ³	
	Contact	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,31.10 ⁶	8,42.10 ³	1,12.10 ⁶	0*	4,41.10 ⁴	7,78.10 ³	8,29.10 ³	0	

Figure 2 – Résultats de RT-PCR quantitative VHE sur les échantillons individuels de fèces (GE/g de fèces). Les zones grisées correspondent aux périodes d'excrétion du VHE. JPI : jours post-infection, * testé en duplicat, abs : absent, 0 : non détecté

JPI	7	14	21	28	35	42	49
Témoin	nt	nt	N/A	nt	N/A	N/A	nt
Témoin	nt	nt	nt	N/A	N/A	N/A	N/A
Groupe 1	Inoculé	28,94	26,39	35,52	33,43	28,08	N/A
	Inoculé	30,74	29,27	33,43	39,25	N/A	N/A
	Inoculé	32,30	29,88	33,30	38,68	35,92	N/A
	Contact	31,76	29,16	29,64	28,96	37,73	N/A
Contact	N/A	30,19	35,32	29,44	N/A	N/A	N/A
Contact	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	31,39	22,26
Groupe 2	Inoculé	28,26	28,19	31,27	27,42	N/A	N/A
	Inoculé	28,36	30,33	33,20	26,4	29,4	N/A
	Inoculé	28,69	30,37	35,00	26,61	N/A	N/A
	Contact	35,11	28,68	31,97	24,27	31,2	26,03
Contact	N/A	N/A	36,69	25,4	44,63	N/A	N/A
Contact	36,95	N/A	33,13	24,37	29,28	N/A	N/A
Groupe 3	Inoculé	29,12	26,03	32,21	30,89	N/A	N/A
	Inoculé	30,49	26,82	32,39	27,37	N/A	36,54
	Inoculé	29,04	38,31	43,52	N/A	N/A	N/A
	Contact	N/A	32,15	29,99	25,74	N/A	28,43
Contact	N/A	34,22	33,05	36,73	27,66	N/A	N/A
Contact	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Figure 3 – Résultats de RT-PCR SDRP sur les sera individuels (Ct). Les zones grisées correspondent aux résultats positifs en RT-PCR dans le sérum. JPI : jours post-infection, nt : non traité, N/A : non amplifié.

2.2. Dynamique d’infection du VHE

La durée de la période de latence a été estimée par une loi gamma avec les paramètres de forme $a = 25,7$ [11,6 ; 180,4] et d’échelle $s = 0,5$ [0,08 ; 1,1] conduisant à une période de latence moyenne de 12,9 jours [12,8 ; 14,4] (tableau 1). Pour les individus contacts, la durée moyenne de la période de latence est de 13,4 jours [8,6 ; 17,1].

Avec une distribution log-normale présentant un AIC plus faible que celui obtenu avec la distribution Weibull, la durée de la période infectieuse a été estimée à 48,6 jours [27,9 ; 84,6] (tableau 1). La durée moyenne nécessaire à la production d’anticorps spécifiques du VHE, également modélisée selon une distribution log-normale, a été estimée à 43,14 jours [35,66 ; 52,19] lors de co-infection par le virus du SDRP et à 26,33 jours [23,49 ; 29,50] en l’absence de co-infection (tableau 1). La durée de la période infectieuse est significativement associée à la précocité de mise en place de la réponse immunitaire humorale. Une réponse immunitaire humorale tardive ou absente (> 25 JPI) est associée à une augmentation de la durée de la période infectieuse (la fin d’excrétion étant retardée, Hazard Ratio (ou rapport de risques) = 0,35, $P < 0,01$).

2.3. Quantification de l’excrétion, de l’accumulation environnementale et de la transmission du VHE

2.3.1. Excrétion du VHE et accumulation environnementale

La distribution de la charge génomique virale VHE excrétée au cours du temps en présence et en l’absence de co-infection par le virus du SDRP est représentée en figure 4. Chez les individus inoculés, l’infection par le virus du SDRP est significativement associée à une augmentation de la charge génomique virale excrétée ($P = 0,05$). L’interaction entre le temps et l’infection par le virus du SDRP est significative et positive, *i.e.* l’impact du virus du SDRP augmente au cours du temps ($P = 0,04$).

Tableau 1 – Récapitulatif des résultats obtenus et comparaison avec les données d’infection par le VHE seul.

	VHE + virus du SDRP	VHE seul (Andraud <i>et al.</i> (2013))
Période de latence (jours)	12,9 [12,8 ; 14,4]	6,9 [5,8 ; 7,9]
Période infectieuse (jours)	48,6 [27,9 ; 84,6]	9,7 [8,2 ; 11,2]
Transmission directe [β_w] (jour ⁻¹)	0,70 [1,2.10 ⁻³ ; 3,67]	0,15 [0,03 ; 0,31]
Transmission indirecte [$\beta_E^{(w)}$] (g/GE/j)	6,6.10 ⁻⁶ [1,4.10 ⁻¹⁰ ; 1,3.10 ⁻⁴]	2,0.10 ⁻⁶ [1,1.10 ⁻⁷ ; 7,0.10 ⁻⁶]
Délai de séroconversion (jours)	43,1 [35,7 ; 52,2]	26,3 [23,5 ; 29,5]

En revanche, l’effet de l’infection par le virus du SDRP n’est pas statistiquement significatif chez les individus contacts ($P > 0,05$, données non montrées).

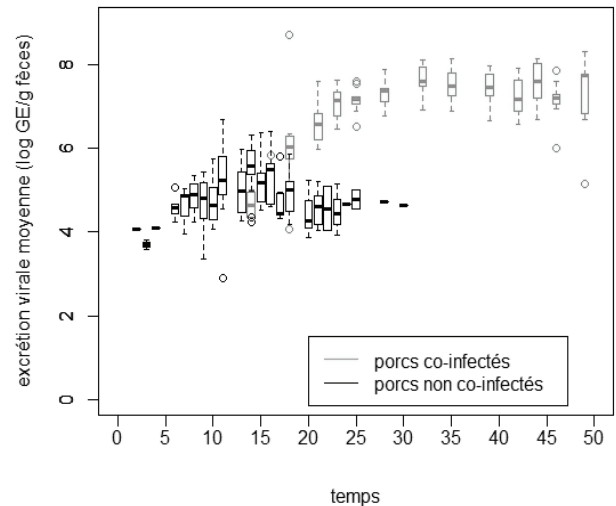


Figure 4 – Distribution des charges génomiques VHE excrétées au cours du temps chez les porcs inoculés par le VHE co-infectés ou non par le virus du SDRP.

La charge virale accumulée dans l’environnement modélisée pour les 3 cas d’expérimentation est représentée en figure 5. La charge environnementale est nulle jusqu’à 15 à 20 jours post-inoculation puis est croissante au cours du temps, atteignant à la fin de l’essai 1,0.10⁸ à 1,5.10⁸ GE/g de fèces, avec un taux de clairance du virus estimé à 30 % par jour [0,15 ; 0,44].

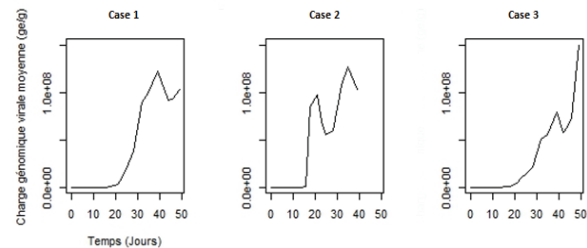


Figure 5 – Accumulation du VHE dans l’environnement lors de co-infection VHE/virus du SDRP. Paramètres de transmission du VHE

Transmission directe. Les résultats montrent que, dans ces conditions expérimentales, un porc infectieux est capable d’infecter 0,70 porc par jour par contact direct ($\beta_w = 0,70$ [1,18.10⁻³ ; 3,67]) (tableau 1).

Transmission indirecte. Le taux de transmission indirecte au sein d’une case peut être considéré comme le nombre moyen d’animaux qui peuvent être infectés par une seule particule virale présente dans l’environnement ($\beta_E^{(w)} = 6,59.10^{-6}$ g/GE/jour [1,43.10⁻¹⁰ ; 1,27.10⁻⁴]). Autrement dit, l’inverse de $\beta_E^{(w)}$ correspond au nombre moyen de particules virales par gramme de fèces dans l’environnement nécessaires pour infecter un animal par jour, soit 1,51.10⁵ GE/g/jour [7,86.10³ ; 7,00.10⁹] (tableau 1).

3. DISCUSSION

Plusieurs publications ont présenté des essais d'infection expérimentale de porcs par le virus de l'hépatite E (Balayan *et al.*, 1990; Kasorndorkbua *et al.*, 2003; Kasorndorkbua *et al.*, 2004; Bouwknecht *et al.*, 2008; Bouwknecht *et al.*, 2009; Casas *et al.*, 2009; Bouwknecht *et al.*, 2011). En particulier, Bouwknecht *et al.* (2008) ont inoculé des porcs par voie intra-veineuse avec le VHE et ont quantifié la transmission du VHE par contact direct avec un porc infecté par ces animaux primo-infectés. Plus récemment, le modèle d'Andraud *et al.* (2013) prend en compte une transmission par contact direct et une transmission indirecte d'origine environnementale à partir de porcs inoculés par le VHE par voie orale, se rapprochant ainsi des conditions naturelles. Cependant, les résultats de ces études diffèrent de la dynamique d'infection observée en élevage, notamment en termes de durées de période de latence et de période infectieuse, notablement plus longues que ce qui est observé au cours de ces infections expérimentales (de Deus *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2011; Backer *et al.*, 2012). Plusieurs études suggèrent une association possible entre l'infection par le VHE et l'infection par le virus du SDRP, virus immunosuppresseur très prévalent dans certaines régions d'élevage, sans pour autant identifier formellement une interaction entre les deux agents (de Deus *et al.*, 2007; Martelli *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2013).

Le suivi des animaux montre que l'excrétion du VHE est retardée en cas de co-infection par le virus du SDRP, avec une période de latence estimée à 12,9 jours dans l'essai de co-infection, contre 6,9 jours lors d'infection par le VHE seul, soit un allongement d'un facteur 1,9. Une activation de la réponse immunitaire innée par le virus du SDRP, retardant ainsi l'excrétion du VHE pourrait expliquer l'allongement de la durée de la période de latence observé. Dans l'essai de Bouwknecht *et al.* (2008), la durée de la période de latence observée n'est que de 3 jours, ce qui conforte le fait que la voie d'inoculation est susceptible de modifier les mécanismes physio-pathogéniques du virus, et notamment la rapidité avec laquelle le virus est en contact avec les cellules cibles. La durée de la période infectieuse est allongée en cas de co-infection par le virus du SDRP : 48,6 *versus* 9,7 jours respectivement, soit un allongement d'un facteur 5. Ces données se rapprochent des données de terrain disponibles (27 jours [20 ; 39] (Backer *et al.*, 2012)). Dans l'essai décrit par Bouwknecht *et al.* (2008), la période infectieuse dure entre 13 et 49 jours. Cependant, l'origine des animaux inclus dans cet essai et leur statut vis-à-vis du virus du SDRP ne sont pas précisés. Les résultats de l'essai réalisé montrent que l'excrétion virale des individus inoculés est quantitativement plus importante lors de co-infection par le virus du SDRP. L'effet de l'infection par le virus du SDRP sur la quantité de VHE excrété n'est pas significatif chez les individus contacts. Ceci peut s'expliquer par le nombre modeste d'animaux inclus dans l'essai, la plus forte variabilité individuelle observée chez les animaux contacts et le fait que deux animaux contacts se sont infectés tardivement par le virus du SDRP.

La charge virale accumulée dans l'environnement est plus importante lors de co-infection par le virus du SDRP que pour l'infection par le VHE seul (respectivement de l'ordre de 10^8 GE/g, et de l'ordre de 10^5 GE/g). L'allongement de la durée d'excrétion chez les individus co-infectés par le virus du SDRP, associé à une augmentation de la quantité de particules virales excrétées, favorise le maintien du virus dans l'environnement,

induisant une pression d'infection accrue et persistante sur les individus sensibles. Le taux de transmission directe est 4,7 fois plus élevé lors de co-infection (0,70 par jour contre 0,15 avec le VHE seul). Ainsi, lors de co-infection par le virus du SDRP, la voie de transmission directe joue un rôle plus important dans la transmission du VHE, ce qui peut être mis en lien avec l'excrétion individuelle quantitativement plus importante. Le taux de transmission environnementale au sein d'une case (*i.e.* le nombre d'animaux qui peuvent être infectés par une seule particule virale présente dans l'environnement) est estimé 3,3 fois plus élevé lors de co-infection : autrement dit, 3,3 fois moins de particules virales sont nécessaires pour infecter un animal par le VHE en présence du virus du SDRP. Les animaux inoculés et contacts (sauf 2) s'infectant par le virus du SDRP avant l'infection par le VHE, ces données suggèrent une plus grande sensibilité des porcs à l'infection par le VHE en cas de co-infection. Dans un modèle construit à partir d'un essai d'infection VHE par voie intra-veineuse, Bouwknecht *et al.* (2011) rapportent que la dose orale de VHE pour laquelle la probabilité d'infection est égale à 50 % serait de $1,4 \cdot 10^6$ GE/g, ce qui est 10 fois supérieur à la dose nécessaire estimée dans notre étude. Ces données confortent l'hypothèse d'une plus grande sensibilité vis-à-vis du VHE chez des porcs co-infectés.

Le délai nécessaire à la mise en place de la réponse immunitaire humorale anti-VHE est 1,6 fois plus long chez des porcs co-infectés que chez les porcs infectés par le VHE seul (43,1 et 26,3 jours respectivement). Ce défaut de réponse sérologique est significativement associé à l'allongement de la durée de la période infectieuse lors de co-infection par le virus du SDRP et pourrait donc expliquer la présence de particules virales dans le foie des porcs abattus. Les mécanismes à l'origine d'une potentielle baisse de l'immunité liée au SDRP et à l'origine d'une infection chronique par le VHE n'ont cependant pas été explorés dans ce travail. Chez l'homme, les mécanismes de la pathogénèse de l'hépatite E chronique sont encore mal connus mais les données décrites dans la littérature suggèrent qu'une réponse immunitaire déficiente (innée et/ou adaptative, cellulaire et/ou humorale) pourrait être à l'origine de la chronicité de l'infection par le VHE (Kamar *et al.*, 2011; Kenfak-Foguena *et al.*, 2011; Lhomme *et al.*, 2012; Suneetha *et al.*, 2012; Moal *et al.*, 2013). Le virus du SDRP est connu pour interférer fortement avec le système immunitaire. En effet, la sécrétion précoce et importante d'IL10 chez des porcs infectés par le virus du SDRP oriente préférentiellement vers une réponse de type Th2, moins efficace que la réponse Th1, et entrave ainsi la production d'interféron γ qui constitue une des principales voies de défense de l'organisme contre l'infection par le virus du SDRP (Diaz *et al.*, 2005; Mateu et Diaz, 2008). Ainsi, le retard de séroconversion anti-VHE observé chez les porcs co-infectés par le virus du SDRP, associé à un allongement de la période infectieuse et à une potentielle chronicité de l'infection par le VHE pourrait s'expliquer par une orientation spécifique de la réponse immunitaire gouvernée en partie par le virus du SDRP. D'autres études sont cependant nécessaires pour identifier ces mécanismes.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude montrent un impact important du virus du SDRP sur la dynamique d'infection du VHE et une potentielle chronicité chez des porcs co-infectés, augmentant le risque de présence du virus dans le foie des porcs abattus. Les mécanismes immunopathogéniques à l'origine d'une infection chronique par le VHE chez le porc

méritent d'être étudiés (exploration de la réponse immunitaire innée et adaptative anti-VHE, investigation des phénomènes biologiques se déroulant au cours de la période de latence, étude du rôle d'autres agents immunodépresseurs). Enfin, cette étude a montré une interaction forte entre un pathogène de santé animale (le virus du SDRP), aux conséquences considérables sur la compétitivité de la filière porcine, et un pathogène zoonotique (le VHE), aux conséquences sanitaires potentiellement graves chez l'homme. Ces données soulignent la nécessité d'une

appréhension globale de la santé animale et de la santé humaine et l'importance des programmes d'assainissement du virus du SDRP en élevage porcin, qui pourraient se révéler être un levier majeur pour la maîtrise du VHE dans la filière.

REMERCIEMENTS

Cette étude a reçu le support financier de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du projet "HEVECODYN" (ANR-2010-CESA-010).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andraud M., Dumarest M., Cariolet R., Aylaj B., Barnaud E., Eono F., Pavio N., Rose N., 2013. Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Vet Res*, 44, 102.
- Backer J.A., Berto A., McCreary C., Martelli F., van der Poel W.H., 2012. Transmission dynamics of hepatitis E virus in pigs: estimation from field data and effect of vaccination. *Epidemics*, 4, 86-92.
- Balayan M.S., Usmanov R.K., Zamyatina N.A., Djumalieva D.I., Karas F.R., 1990. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol*, 32, 58-59.
- Barnaud E., Rogee S., Garry P., Rose N., Pavio N., 2012. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl Environ Microbiol*, 78, 5153-5159.
- Bouwknecht M., Frankena K., Rutjes S.A., Wellenberg G.J., de Roda Husman A.M., van der Poel W.H., de Jong M.C., 2008. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet Res*, 39, 40.
- Bouwknecht M., Rutjes S.A., Reusken C.B., Stockhofe-Zurwieden N., Frankena K., de Jong M.C., de Roda Husman A.M., Poel W.H., 2009. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res*, 5, 7.
- Bouwknecht M., Teunis P.F., Frankena K., de Jong M.C., de Roda Husman A.M., 2011. Estimation of the likelihood of fecal-oral HEV transmission among pigs. *Risk Anal*, 31, 940-950.
- Casas M., Pina S., de Deus N., Peralta B., Martin M., Segales J., 2009. Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels. *Vet Microbiol*, 138, 78-84.
- Casas M., Cortes R., Pina S., Peralta B., Allepuz A., Cortey M., Casal J., Martin M., 2011. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet Microbiol*, 148, 27-34.
- Charpin C., Mahe S., Keranflec'h A., Belloc C., Cariolet R., Le Potier M.F., Rose N., 2012. Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Vet Res*, 43, 69.
- de Deus N., Seminati C., Pina S., Mateu E., Martin M., Segales J., 2007. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet Microbiol*, 119, 105-114.
- de Deus N., Casas M., Peralta B., Nofrarias M., Pina S., Martin M., Segales J., 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet Microbiol*, 132, 19-28.
- Diaz I., Darwich L., Papaterra G., Pujols J., Mateu E., 2005. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 86, 1943-1951.
- Emerson S.U., Purcell R.H., 2003. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*, 13, 145-154.
- Gerolami R., Moal V., Colson P., 2008. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med*, 358, 859-860.
- Kamar N., Selves J., Mansuy J.M., Ouezzani L., Peron J.M., Guitard J., Cointault O., Esposito L., Abravanel F., Danjoux M., Durand D., Vinel J.P., Izopet J., Rostaing L., 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*, 358, 811-817.
- Kamar N., Garrouste C., Haagsma E.B., Garrigue V., Pischke S., Chauvet C., Dumortier J., Cannesson A., Cassuto-Viguiet E., Thervet E., Conti F., Lebray P., Dalton H.R., Santella R., Kanaan N., Essig M., Mousson C., Radenne S., Roque-Afonso A.M., Izopet J., Rostaing L., 2011. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*, 140, 1481-1489.
- Kasorndorkbua C., Thacker B.J., Halbur P.G., Guenette D.K., Buitenwerf R.M., Royer R.L., Meng X.J., 2003. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can J Vet Res*, 67, 303-306.
- Kasorndorkbua C., Guenette D.K., Huang F.F., Thomas P.J., Meng X.J., Halbur P.G., 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol*, 42, 5047-5052.
- Kenfak-Foguena A., Schoni-Affolter F., Burgisser P., Witteck A., Darling K.E., Kovari H., Kaiser L., Evison J.M., Elzi L., Gurter-De La Fuente V., Jost J., Moradpour D., Abravanel F., Izopet J., Cavassini M., 2011. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis*, 17, 1074-1078.
- Lhomme S., Abravanel F., Dubois M., Sandres-Saune K., Rostaing L., Kamar N., Izopet J., 2012. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J Virol*, 86, 10006-10014.
- Mao J., Zhao Y., She R., Xiao P., Tian J., Chen J., 2013. One case of swine hepatitis E virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-infection in weaned pigs. *Virol J*, 10, 341.
- Martelli F., Toma S., Di Bartolo I., Caprioli A., Ruggeri F.M., Lelli D., Bonci M., Ostanello F., 2010. Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Res Vet Sci*, 88, 492-496.
- Mateu E., Diaz I., 2008. The challenge of PRRS immunology. *Vet J*, 177, 345-351.
- Moal V., Textoris J., Ben Amara A., Mehraj V., Berland Y., Colson P., Mege J.L., 2013. Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J Infect Dis*, 207, 125-132.
- Pavio N., Renou C., Di Liberto G., Boutrouille A., Eloit M., 2008. Hepatitis E: a curious zoonosis. *Front Biosci*, 13, 7172-7183.
- Rose N., Pavio N., 2014. Epidémiologie du virus de l'hépatite E chez le porc : comment limiter l'exposition des consommateurs. *Journées Recherche Porcine*, 46, 159-168.
- Satou K., Nishiura H., 2007. Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet Res*, 3, 9.
- Suneetha P.V., Pischke S., Schlaphoff V., Grabowski J., Fytily P., Gronert A., Bremer B., Markova A., Jaroszewicz J., Bara C., Manns M.P., Cornberg M., Wedemeyer H., 2012. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*, 55, 695-708.