

# Infection comparée de porcs EOPS par une souche Française ou une souche Est-Européenne hautement pathogène (souche Léna) de virus du SDRP

Patricia RENSON (1), Nicolas ROSE (1), André KERANFLEC'H (1), Frédéric PABOEUF (1), Catherine BELLOC (2), Marie-Frédérique LE POTIER (1), Olivier BOURRY (1)

(1) Anses, BP53, 22440 Ploufragan, France

(2) UMR BioEpAR, Oniris, INRA, LUNAM, BP40706, 44307 Nantes Cedex 03, France

olivier.bourry@anses.fr

Avec la collaboration technique de Gérald LEDIGUERHER (1), Nadège PRIOUX (1), Mireille LE DIMNA (1), Sophie MAHE (1).

## **Infection comparée de porcs EOPS par une souche Française ou une souche Est-Européenne hautement pathogène (souche Léna) de virus du SDRP**

En 2007, une souche hautement pathogène de virus du SDRP a été isolée en Biélorussie (souche Léna de génotype 1.3). L'objectif de la présente étude est de comparer la pathogénicité de cette souche avec celle d'une souche française de virus du SDRP (souche Finistère de génotype 1.1, représentative des souches circulant couramment en Europe de l'Ouest).

Dix-huit porcs EOPS de 6 semaines ont été placés en animalerie confinée sous double filtration. Huit animaux ont été inoculés par la souche Léna, cinq par la souche Finistère et cinq animaux n'ont pas été inoculés. Chaque groupe a été hébergé dans des animaleries indépendantes. Les animaux ont été suivis pendant 7 semaines après l'inoculation.

Les animaux infectés par la souche Léna ont présenté une hyperthermie et un score clinique élevés de façon prolongée conduisant à la mort de 3 animaux. Ces symptômes ont conduit à une baisse importante de la consommation alimentaire et à une diminution marquée du GMQ. Les animaux infectés par la souche Finistère ont montré une élévation de la température rectale et un score clinique beaucoup plus faibles. Leur consommation alimentaire et leur GMQ n'ont été que peu altérés. Les analyses virologiques montrent que la souche Léna induit une virémie 100 fois plus importante que la souche Finistère.

Cette étude confirme que la souche Léna est une souche particulièrement virulente, comparée à la souche Finistère. On peut s'attendre à ce que les symptômes observés soient encore plus marqués sur des porcs conventionnels issus du terrain en raison de co-infections probables. Il convient donc de réfléchir et de mettre en œuvre des mesures de biosécurité adaptées afin de prévenir l'introduction d'une telle souche sur le territoire français.

## **Compared infection of SPF pigs with a PRRSv French strain or a East-European highly pathogenic PRRSv strain (Lena strain)**

In 2007, a new highly pathogenic PRRSv strain was isolated in Belarus (Lena strain, genotype 1.3). The objective of this study is to compare the pathogenicity of this strain with that of a French PRRSv strain (Finistere strain, genotype 1.1 representative of PRRSv strains currently circulating in Western Europe). Eighteen 6-weeks-old SPF pigs were housed in a biosafety animal facility with double air filtration. Eight animals were inoculated with Lena strain, five with Finistere strain and five animals were not inoculated. Each group of animals was kept in separated rooms. The animals were monitored for 7 weeks post inoculation.

Animals infected with Lena strain exhibited high fever and clinical score for an extended period leading to the death of 3 animals. These symptoms induced a high decrease of food intake and of ADG. Animals infected with Finistere strain displayed very low fever and clinical score. Their food intake and ADG were only slightly altered. Virological analysis showed that Lena strain viremia was 100 fold higher than for Finistere strain.

This study confirms that Lena strain is highly virulent compared to Finistere strain. With non-SPF animals coming from commercial herds, we can even expect more severe symptoms because co-infections are likely. It is therefore necessary to consider and implement appropriate biosecurity measures to prevent the introduction of such a strain into France.

## INTRODUCTION

Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est classé parmi les 3 maladies impactant le plus l'élevage de porc en France (Anses, 2012). Cette infection conduit à des pertes économiques considérables évaluées à plus de 30 millions d'euros par an pour la seule région Bretagne (données UGPVB) ainsi qu'à l'augmentation de l'utilisation d'antibiotiques en élevage (Ministère de l'Agriculture, 2012). Cette maladie est due à un virus à ARN enveloppé de la famille des *Arteriviridae*. Ce virus est apparu de manière quasi simultanée en Europe et en Amérique du Nord à la fin des années 80 et au début des années 90, avec 2 génotypes distincts (génotype 1 en Europe et génotype 2 en Amérique du Nord) qui ne comportent que 60% d'homologie au niveau de leur séquence nucléotidique (Albina, 1997; Allende *et al.*, 1999). Par la suite, les virus de génotype 1 et 2 ont disséminé, de telle sorte qu'aujourd'hui on retrouve ces 2 virus sur quasiment tous les continents. Des études phylogénétiques ultérieures ont permis de mettre en évidence au sein des virus de génotype 1, 4 sous-types : un génotype 1.1 paneuropéen et les génotypes 1.2, 1.3 et 1.4 Est européens (Stadejek *et al.*, 2013). D'un point de vue clinique, le SDRP s'exprime par des troubles de la reproduction chez les femelles gestantes (pour les virus des génotypes 1 et 2) et/ou des troubles respiratoires chez les animaux en croissance (pour les virus de génotype 2 en mono-infection mais les virus de génotype 1 sont aussi très impliqués dans le complexe respiratoire porcin lors de co-infections).

Une des particularités du virus du SDRP est son instabilité génétique. Elle repose à la fois sur des phénomènes de recombinaisons et de mutations (Murtaugh *et al.*, 2010). Du fait de la faible fidélité de son ARN polymérase, le virus du SDRP présente un taux de mutation particulièrement élevé. Cette instabilité génétique a conduit à une diversification des souches virales aussi bien de génotype 1 que de génotype 2, ainsi qu'à l'émergence récente de souches dites hautement pathogènes (HP). Ainsi, en 2006, sont apparues pour la première fois en Asie des souches HP de génotype 2. Ces souches se caractérisent par une fièvre importante et un taux de mortalité élevés (Lewis *et al.*, 2007). Plus récemment, la souche Léna, une souche HP de génotype 1.3, a été isolée en Biélorussie (Karniychuk *et al.*, 2010). Tout dernièrement, une autre souche HP de génotype 1 a également été isolée en Belgique (souche Flanders 2013) appartenant cette fois apparemment au sous-type 1 (Nauwynck *et al.*, 2014).

Du fait des échanges commerciaux et en particulier des transports d'animaux avec les pays de l'Est et du Nord de l'Europe, le risque d'introduction de souches de virus du SDRP HP sur notre territoire est à considérer sérieusement. Dans ce contexte d'émergence potentielle de ces souches en France, nous souhaitons compléter les données relatives à la pathogénicité de la souche HP Léna et les comparer à celles d'une souche faiblement pathogène récemment isolée en France. Ces données permettront d'appréhender quel pourrait être l'impact de l'introduction d'une telle souche sur notre territoire mais également de fournir des données précises (cliniques, zootechniques, ...) permettant un diagnostic rapide de cette éventuelle émergence. Contrairement aux études précédentes (Karniychuk *et al.*, 2010; Weesendorp *et al.*, 2013), nous avons utilisé des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) afin d'étudier la pathogénicité intrinsèque de chaque virus, sans interférence avec d'autres pathogènes respiratoires d'origine bactérienne ou virale.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Dispositif expérimental

Dix-huit porcelets de race Large White de 6 semaines d'âge, exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), nés et élevés dans l'animalerie protégée de l'Anses Ploufragan, ont été utilisés pour cette expérimentation. Les animaux, randomisés sur leur sexe, leur poids et leurs origines maternelle et paternelle, ont été répartis en 3 groupes : 8 animaux infectés par la souche Léna, 5 animaux infectés par la souche Finistère (PRRS-FR-2005-29-24-1) et 5 animaux non-infectés. Chaque groupe d'animaux est hébergé dans une animalerie confinée (double filtration) différente. Des conditions de biosécurité strictes sont mises en place (douche et vêtements spécifiques) de manière à éviter toute transmission croisée des souches de virus SDRP. A J0, les animaux ont été infectés soit par la souche Finistère (isolée dans le Finistère en 2005 dans un élevage présentant des avortements sur des truies), soit par la souche Léna (fournie gracieusement par le Dr Hans Nauwynck, Université de Ghent, Belgique), en administrant 5 ml d'inoculum titrant à  $10^5$  DCP<sub>50</sub>/ml par voie intra-nasale (2,5 ml/narine). Les deux souches utilisées ont été amplifiées et titrées sur macrophages pulmonaires.

Un suivi clinique des animaux a été assuré quotidiennement par un relevé des températures rectales (les animaux sont considérés en hyperthermie à partir de 40,1°C) et une évaluation du score clinique selon une grille adaptée de celle de Weesendorp (Weesendorp *et al.*, 2013). Une pesée hebdomadaire a également été réalisée. A J-3, J2, J4, J8, J11, J15, J22, J30, J36 et J43 post-infection (pi), les animaux ont été soumis à une prise de sang sur tubes sec et EDTA, ainsi qu'à un lavage broncho-alvéolaire (LBA) par 2 infusions de 20 ml de PBS stérile tiède réalisé sous anesthésie générale (5 mg/kg de Kétamine (Clorkétam 1000, Vétoquinol SA, Lure, France) et 1 mg/kg de Xylazine (Rompun 2%, Bayer HealthCare, Leverkusen, Allemagne) administrés par voie intraveineuse). Les animaux ont été euthanasiés entre J44 et J45 pi et ont été soumis à un examen nécropsique détaillé.

Le protocole a été autorisé par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche sous le numéro 00676.01.

### 1.2. Analyses de laboratoire

La numération formule sanguine a été établie à partir du sang prélevé sur EDTA à l'aide d'un automate d'hématologie MS9-5 (Melet Schoesing, La chaux de Fonds, Suisse). Le nombre et la viabilité des cellules collectées dans les liquides de LBA ont été obtenus par numération en bleu trypan sur hématimètre.

Les charges virales spécifiques de chaque souche ont été quantifiées dans le sérum et le liquide de LBA par qRT-PCR à l'aide d'une gamme de virus de titre connu. L'ARN a été extrait avec le kit NucleoSpin RNA 8 virus (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole du fabricant. Le génome du virus du SDRP a ensuite été amplifié avec le mélange réactionnel Superscript III Platinum One step Quantitative RT-PCR (Life Technologie, Carlsbad, CA, États-Unis) supplémenté en sondes et amorces spécifiques du gène cible (ORF5 de la souche Finistère : amorce sens TATGCGAGCTGAATGGGACC, amorce anti-sens AGGATATGAGTGGCAACCGG, sonde 6FAM-TGGGCAGTTGAGACTTTCGTGCT-TAM ou ORF7 de la souche Léna : amorce sens AGAACCAGCGCCAATTCAGA, amorce anti-sens TCTTTTTCGCCTGTCTCC et sonde 6FAM-

AAACACAGCTCCAATGGGGAAATGGC-TAM) et du gène de référence (bêta-actine porcine : amorce sens CTCGATCATGAAGTGCGACGT, amorce anti-sens GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC, sonde TET-ATCAGGAAGGACCTCTACGCCAACACGG-BHQ1). Les réactions de RT-PCR ont été effectuées dans un thermocycleur temps réel de type Chromo4 (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis) selon le programme : 30 min à 50°C et 2 min à 94°C suivies de 45 cycles de 15 sec à 94°C et 30 sec à 60°C. Les résultats sont exprimés en équivalent (eq) DCP<sub>50</sub>/ml de sérum ou liquide de LBA.

Les anticorps dirigés contre le virus du SDRP ont été détectés dans le sérum avec le kit ELISA PRRS X3 (IDEXX, Liebefeld, Switzerland) selon les instructions du fabricant.

**1.3. Analyses statistiques**

Les variations mesurées pour un groupe infecté ont été comparées, soit à celles du groupe Témoin, soit à celles de l'autre groupe infecté (différences significatives représentées respectivement sur les figures par les symboles \* et α), à l'aide du test de Mann-Whitney. Les analyses de corrélations ont été réalisées à l'aide des matrices de Spearman. Toutes ces analyses ont été effectuées par le logiciel Systat 9 (Systat Software Inc., Point Richmond, Etats-Unis) avec une limite de significativité fixée à p < 0,05.

**2. RESULTATS**

**2.1. Paramètres cliniques et zootechniques**

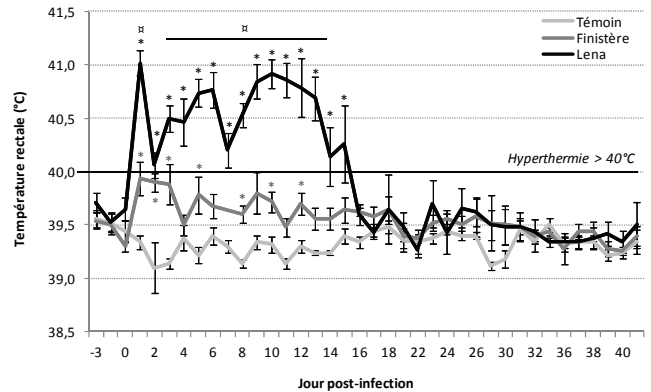
**2.1.1. Survie**

Tous les animaux des groupes Témoin et Finistère ont survécu jusqu'à la fin de l'expérimentation alors que 2 animaux du groupe Léna sont morts à J8 et J16 pi et un troisième a dû être euthanasié à J23 pi en raison d'une forte anémie. Un taux de mortalité de 37,5% (3/8) a donc été obtenu suite à l'infection par la souche Léna. A l'autopsie, les lésions observées sur les 2 premiers animaux étaient assez comparables et consistaient essentiellement en un amaigrissement, une atrophie du thymus, une splénomégalie, des nœuds lymphatiques hypertrophiés et hémorragiques, une pleurésie et péritonite fibrineuse. Les lésions observées sur le dernier animal consistaient surtout en un amaigrissement, une anémie et en la présence de méléna dans le gros intestin. Les autopsies réalisées à J44-J45 pi sur les animaux ayant survécu à l'infection par le virus Léna ont montré un tableau lésionnel équivalent à celui des animaux infectés par la souche Finistère, avec principalement une hypertrophie des nœuds lymphatiques.

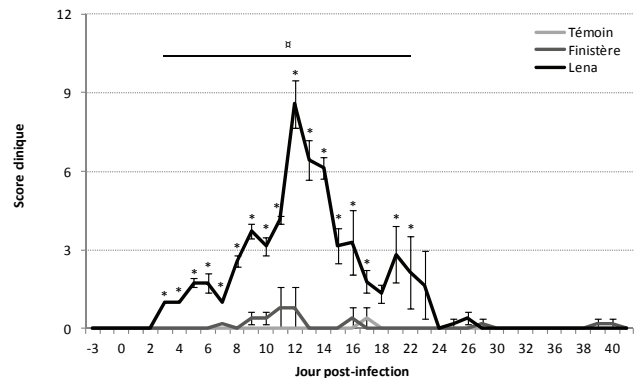
**2.1.2. Température et score clinique**

Aucun animal Témoin n'a présenté d'hyperthermie au cours du suivi (Figure 1). Les animaux infectés par la souche Finistère ont présenté une élévation modérée de la température rectale (entre 39,5 et 40,0°C en moyenne) dès J1 pi et pendant environ 3 jours après l'infection. Le score clinique chez les animaux de ce groupe est resté très faible (en moyenne inférieur à 1 / 28) (Figure 2). Chez les animaux infectés par la souche Léna, une hyperthermie est apparue dès le lendemain de l'infection et a duré 15 jours (Figure 1). Les niveaux d'hyperthermie étaient importants, avec une température moyenne de 40,6°C qui pouvait par moment dépasser les 41°C. De la même manière, le score clinique chez les animaux du groupe Léna était beaucoup plus élevé que pour ceux du

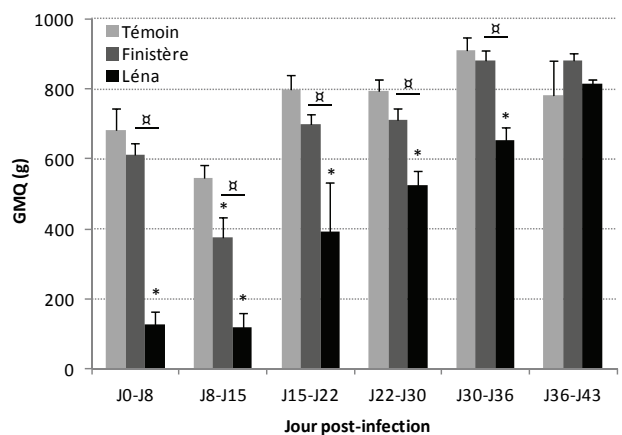
groupe Finistère avec un score moyen de 3 sur les 3 premières semaines pi avec un pic à plus de 8 à J12 pi (Figure 2). Les principaux symptômes observés consistaient en de l'apathie, de l'anorexie, de la dyspnée et de la polypnée. Des lésions cutanées ont été également rencontrées sur les animaux infectés par la souche Léna, avec notamment une xérose et un état squameux la troisième semaine d'infection.



**Figure 1** – Suivi de la température rectale moyenne au cours de l'infection. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. \*: p<0,05 par rapport au groupe Témoin ; α: p<0,05 par rapport au groupe Finistère.



**Figure 2** – Suivi du score clinique moyen au cours de l'infection. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. \*: p<0,05 par rapport au groupe Témoin ; α: p<0,05 par rapport au groupe Finistère.



**Figure 3** – Evolution du Gain Moyen Quotidien (GMQ) moyen au cours de l'infection. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. \*: p<0,05 par rapport au groupe Témoin ; α: p<0,05 par rapport au groupe Finistère.

### 2.1.3. Poids, GMQ et consommation d'aliment

Les données zootechniques sont en rapport direct avec l'hyperthermie et les symptômes présentés ci-dessus. Au début de l'essai, le poids moyen des animaux de chaque groupe était équivalent (12 kg en moyenne). A l'issu du suivi (J43 pi), le poids moyen des animaux était de 45 kg pour le groupe Témoin et 43 kg pour le groupe Finistère alors que celui des survivants du groupe Léna était de seulement 32 kg ( $p=0,09$  à J43 pi) (données non montrées). Du point de vue du Gain Moyen Quotidien (GMQ), les animaux du groupe Finistère montrent uniquement une baisse significative la seconde semaine d'infection ( $p=0,046$  à J8-J15 pi), qui se rétablit ensuite rapidement (Figure 3). Pour les animaux du groupe Léna, la chute de GMQ est brutale (dès J0-J8 ;  $p=0,04$ ) et prolongée (jusqu'à J30-36 pi ;  $p=0,012$ ), certains animaux perdant même du poids (Figure 3). Les niveaux de consommation d'aliment suivant logiquement ceux des GMQ, la consommation alimentaire des animaux du groupe Finistère diminuent ainsi de façon modérée pendant les 4 premières semaines post-infection (diminution de 20% sur les 3 premières semaines pi par rapport aux animaux Témoin) (données non montrées). Les animaux du groupe Léna, quant à eux présentent une diminution marquée, et prolongée à 5 semaines post-infection, de leurs niveaux de consommation (diminution de 60% sur les 3 premières semaines pi).

## 2.2. Paramètres hématologiques et lavages broncho-alvéolaires

### 2.2.1. Cellules sanguines

Les numérations formules sanguines révèlent des modifications post-infection des populations lymphocytaires, monocytaires et érythrocytaires.

**Lymphocytes** : Avant inoculation, la numération lymphocytaire moyenne des animaux des différents groupes est comprise entre 4,8 et 5,3 millions de cellules par ml (Figure 4). Aucune différence significative n'est observée entre les deux souches. Dès J2 pi, on observe une lymphopénie chez les animaux infectés par la souche Léna ou Finistère (3,1 et 3,8 millions/ml en moyenne respectivement ;  $p<0,01$ ). Rapidement se met en place une lymphocytose réactionnelle dont le pic se situe à J11 pi, atteignant des valeurs supérieures à celles du groupe

Témoin à J15 pi pour le groupe Finistère ( $p=0,09$ ). A partir de J22 pi, les animaux des groupes Léna et Finistère présentent des valeurs similaires à celles des Témoins.

**Monocytes** : Des différences apparaissent entre les deux virus de J8 à J15 pi. Les animaux du groupe Finistère montrent une légère monopénie à J2 pi ( $p=0,017$ ). Les animaux du groupe Léna présentent quant à eux une importante monocytose qui culmine à J11 pi.

**Hématies** : Les animaux infectés par la souche Finistère montrent une anémie transitoire à J2 pi qui se normalise rapidement. Chez les animaux du groupe Léna cette anémie se prolonge et ne se normalise qu'en fin d'expérimentation.

### 2.2.2. Cellules des LBA

Le nombre et la concentration de cellules collectées dans le liquide de LBA sont assez variables selon les individus et les jours de prélèvements (données non montrées). En ce qui concerne la viabilité des cellules collectées avec les LBA, les choses sont plus nettes avec une diminution importante de la viabilité des cellules collectées chez les animaux infectés (Figure 4). Cette baisse de viabilité est cependant plus rapide et prononcée chez les animaux inoculés avec la souche Léna (viabilité minimale moyenne de 79,3% à J4 pi contre 84,3% à J8 pi avec la souche Finistère). Cette viabilité augmente ensuite progressivement pour se normaliser à J36 pi.

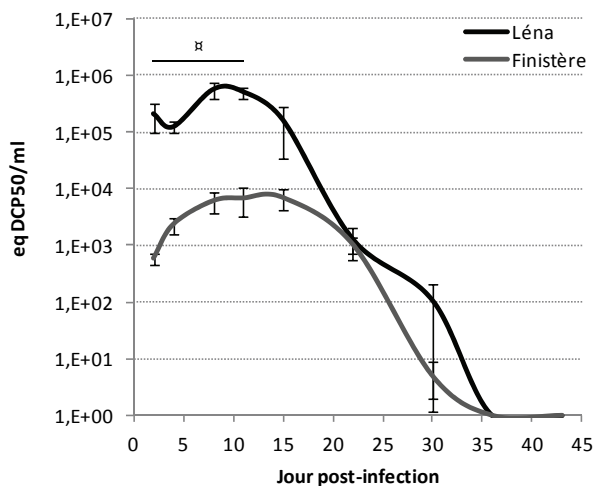
## 2.3. Paramètres virologiques et sérologiques

### 2.3.1. Virologie

Le virus du SDRP est détectable dans le sérum des animaux infectés (Finistère ou Léna) dès J2 pi (Figure 5). A cette date, la charge virale moyenne est nettement supérieure pour les animaux du groupe Léna ( $2 \times 10^5$  eq DCP50/ml) comparativement aux animaux du groupe Finistère ( $6 \times 10^2$  eq DCP50/ml). La charge virale moyenne augmente ensuite légèrement pour atteindre un plateau à  $6 \times 10^3$  eq DCP50/ml pour la souche Finistère entre J8 et J15 pi. Pour la souche Léna, ce plateau est atteint entre J8 et J11 pi avec une valeur de  $5 \times 10^5$  eq DCP50/ml et reste supérieure à celle de la souche Finistère jusqu'à J11 pi ( $p<0,01$ ). Par la suite la charge virale sanguine diminue progressivement et devient négative en fin d'expérimentation.

		Jour post-infection										
		-3	2	4	8	11	15	22	30	36	43	
SANG	Lymphocytes (millions/ml)	Témoin	5,0 +/- 0,9	5,7 +/- 0,2	5,2 +/- 0,7	6,0 +/- 0,3	7,0 +/- 0,5	5,8 +/- 0,3	6,4 +/- 0,3	7,1 +/- 0,4	6,7 +/- 0,3	6,8 +/- 0,4
		Finistère	4,8 +/- 0,3	*3,8 +/- 0,3	4,6 +/- 0,4	6,0 +/- 0,4	8,4 +/- 0,5	*7,4 +/- 0,2	7,8 +/- 0,5	7,2 +/- 0,2	6,8 +/- 0,3	7,0 +/- 0,4
		Léna	5,3 +/- 0,3	*3,1 +/- 0,3	3,9 +/- 0,2	5,1 +/- 0,3	7,9 +/- 0,5	5,7 +/- 0,7	6,9 +/- 1,0	6,6 +/- 0,7	7,2 +/- 0,3	6,5 +/- 0,2
	Monocytes (millions/ml)	Témoin	0,4 +/- 0,1	0,4 +/- 0,0	0,4 +/- 0,0	0,4 +/- 0,0	0,5 +/- 0,0	0,4 +/- 0,0	0,6 +/- 0,1	0,5 +/- 0,0	0,4 +/- 0,0	0,7 +/- 0,1
		Finistère	0,4 +/- 0,0	*0,3 +/- 0,0	0,4 +/- 0,0	0,5 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,5 +/- 0,0	0,6 +/- 0,1	0,5 +/- 0,0	0,5 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1
		Léna	0,5 +/- 0,1	0,3 +/- 0,1	0,4 +/- 0,0	<sup>#</sup> 0,7 +/- 0,0	<sup>#</sup> 1,2 +/- 0,1	<sup>#</sup> 0,8 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	0,6 +/- 0,0	*0,7 +/- 0,0	0,6 +/- 0,0
	Hématies (milliards/ml)	Témoin	5,3 +/- 0,4	5,2 +/- 0,2	4,9 +/- 0,6	5,3 +/- 0,4	5,5 +/- 0,3	5,4 +/- 0,3	5,2 +/- 0,4	5,3 +/- 0,3	5,6 +/- 0,3	4,8 +/- 0,2
		Finistère	5,0 +/- 0,1	*4,4 +/- 0,1	4,8 +/- 0,2	5,0 +/- 0,1	5,2 +/- 0,3	4,8 +/- 0,2	4,9 +/- 0,1	5,1 +/- 0,1	*4,7 +/- 0,2	4,6 +/- 0,2
		Léna	5,0 +/- 0,2	*4,2 +/- 0,1	4,1 +/- 0,4	<sup>#</sup> 4,2 +/- 0,1	<sup>#</sup> 4,5 +/- 0,1	<sup>#</sup> 3,8 +/- 0,1	4,1 +/- 0,7	<sup>#</sup> 4,4 +/- 0,1	*4,4 +/- 0,1	4,4 +/- 0,2
LBA des cellules (%)	Témoin	91,2 +/- 6,1	94,1 +/- 3,7	97,1 +/- 2,3	97,2 +/- 0,6	97,3 +/- 0,7	98,7 +/- 0,3	95,9 +/- 1,3	99,1 +/- 0,4	98,5 +/- 0,7	96,9 +/- 0,9	
	Finistère	96,8 +/- 1,2	94,9 +/- 1,0	95,5 +/- 1,5	*84,3 +/- 4,1	*87,4 +/- 1,9	*92,8 +/- 1,9	96,4 +/- 3,1	*94,9 +/- 1,8	99,5 +/- 0,1	98,3 +/- 0,4	
	Léna	96,5 +/- 1,3	90,4 +/- 2,3	<sup>#</sup> 79,3 +/- 3,3	*82,2 +/- 2,0	*84,0 +/- 3,4	*88,7 +/- 2,6	91,2 +/- 3,3	*92,9 +/- 2,3	98,8 +/- 0,7	99,1 +/- 0,3	

Figure 4 – Numérations cellulaires à partir du sang et des liquides de LBA. Les résultats correspondent aux moyennes +/- l'erreur standard. \*:  $p<0,05$  par rapport au groupe Témoin ; <sup>#</sup>:  $p<0,05$  par rapport au groupe Finistère.



**Figure 5** – Charge virale sanguine moyenne au cours de l'infection. Les barres d'erreurs correspondent à l'erreur standard à la moyenne. \*:  $p < 0,05$  par rapport au groupe Témoin ;  $\alpha$ :  $p < 0,05$  par rapport au groupe Finistère.

La charge virale dans le liquide de LBA présente un profil assez proche de celui du sang (données non présentées). Le virus est également détectable dès J2 pi avec une charge virale moyenne de  $3,4 \times 10^2$  eq DCP50/ml pour le groupe Finistère et de  $6,7 \times 10^3$  eq DCP50/ml pour le groupe Léna. Le groupe Léna montre ensuite un pic de charge virale dès J4 pi ( $2,5 \times 10^6$  eq DCP50/ml) alors que le groupe Finistère montre un profil de charge virale en plateau autour de  $10^5$  eq DCP50/ml entre J8 et J15 pi. Par la suite, la charge virale dans le liquide de LBA diminue rapidement pour le groupe Léna ( $1,9$  eq DCP50/ml à J30 pi). Pour le groupe Finistère, la charge virale diminue plus lentement avec une valeur nettement supérieure au groupe Léna à J30 pi ( $6,8 \times 10^3$  eq DCP50/ml ;  $p = 0,007$ ).

Nous pouvons par ailleurs noter que la charge virale dans le sang et le liquide de LBA sont corrélées pour chacune des souches (Pour la souche Finistère,  $r = 0,673$ ,  $p < 0,05$ ; pour la souche Léna,  $r = 0,792$ ,  $p < 0,05$ ). De façon très intéressante, nous pouvons aussi constater que la viabilité des cellules dans le LBA est inversement corrélée avec la charge virale dans le LBA, que ce soit pour la souche Finistère ( $r = -0,621$ ,  $p < 0,05$ ) ou pour la souche Léna ( $r = -0,687$ ,  $p < 0,05$ ).

### 2.3.2. Sérologie

Les animaux du groupe Léna, comme ceux du groupe Finistère, ont séroconverti à partir de J8 pi (données non présentées). A partir de J15 pi, on observe ensuite un profil typique en plateau des valeurs de E/P avec des valeurs moyennes significativement plus faibles pour le groupe Léna que pour le groupe Finistère à J22 pi (2,1 pour le groupe Finistère versus 1,9 pour le groupe Léna,  $p = 0,044$ ).

## 3. DISCUSSION

Jusqu'ici, seules 2 études se sont intéressées à caractériser la physiopathologie de la souche Léna (Karniychuk *et al.*, 2010; Weesendorp *et al.*, 2013). Notre étude avait pour but de compléter ces données pour certains paramètres qui n'avaient pas été explorés jusqu'ici (poids, GMQ, consommation alimentaire, hématologie, ...), ceci dans un modèle d'infection de porcs EOPS, et de comparer la pathogénicité de la souche Léna à celle d'une souche française récente de virus du SDRP. La souche Finistère est une souche de génotype 1.1, proche de la souche de référence Lelystad (Homologie de 95% sur ORF7 et de 93% sur l'ORF5) et des souches qui circulent

couramment en Europe de l'Ouest. Pour la souche Finistère, nous avons observé de manière attendue des symptômes très limités sur nos animaux EOPS. Ceci confirme que le pouvoir pathogène des souches européennes de sous-type 1 au niveau respiratoire est faible et que la symptomatologie ne s'exprime le plus souvent qu'en présence de co-infections. Concernant la souche Léna, nos données confirment le haut pouvoir pathogène intrinsèque de cette souche avec une mortalité de 37,5% sur nos porcs EOPS correspondant aux 40% décrits par Karniychuk (Karniychuk *et al.*, 2010) lors de l'infection de porcs conventionnels. Ces données suggèrent donc qu'au cours de notre expérience, la souche Léna a été capable d'induire des mortalités seule ou induire une diminution des défenses immunitaires telle que des micro-organismes commensaux sont devenus pathogènes. Cette seconde hypothèse peut être étayée par les lésions localisées au niveau du tube digestif constatées sur les deux animaux morts de l'infection (péritonite fibrineuse), et l'immunodépression observée pendant les deux premières semaines d'infection et caractérisée par une lymphopénie et une atrophie du thymus (lieu de maturation des lymphocytes T). Le taux de mortalité que nous obtenons est par contre, plus élevé que celui décrit par Weesendorp (Weesendorp *et al.*, 2013). Chez des porcs de statut sanitaire élevé (mais non EOPS), ces auteurs n'avaient décrit aucune mortalité. Cette pathogénicité plus élevée qu'attendu de la souche Léna chez des porcs de haut niveau sanitaire, pourrait s'expliquer, entre autres, par des facteurs génétiques. En effet les porcs que nous avons utilisés étaient de race Large White, contrairement à ceux utilisés par Weesendorp (croisement entre Great Yorkshire, Large White et Landrace Allemand). Or, plusieurs études ont montré que la sensibilité à l'infection par le virus du SDRP pouvait varier selon les races (Lewis *et al.*, 2007). Du point de vue des symptômes et des lésions, nos données concordent aussi avec celles précédemment publiées. Par ailleurs, il est important aussi de noter que chez les animaux qui ont survécu à l'infection par la souche Léna, le retard de croissance constaté est considérable avec un poids inférieur de 30% à celui des témoins à la fin du suivi.

Du point de vue hématologique, nos résultats montrent pour la première fois que la souche Léna induit une anémie prolongée contrairement à la souche Finistère. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Halbur *et al.* (Halbur *et al.*, 2002) qui montraient un effet plus marqué en terme d'anémie pour les souches de virus du SDRP de génotype 2 les plus pathogènes. Le mécanisme physiopathologique induisant cette anémie persistante au cours de l'infection Léna reste pour le moment inconnu. Comme suggéré par Halbur (Halbur *et al.*, 2002), l'anémie pourrait être liée à un effet direct du virus du SDRP sur les précurseurs érythroïdes ou bien encore à un effet indirect lié à la sécrétion de cytokines par les macrophages infectés. La longue période d'anémie induite par l'infection Léna pourrait également participer aux difficultés respiratoires observées chez les animaux infectés par cette souche *via* une réduction de l'apport en oxygène.

Les résultats des analyses virologiques montrent que la souche Léna se réplique à un niveau bien plus élevé que la souche Finistère chez les porcs infectés, au niveau systémique mais également au niveau pulmonaire. Comme le propose Nauwynck (Nauwynck *et al.*, 2014), on peut donc considérer que la pathogénicité de la souche Léna est directement en relation avec sa capacité à se répliquer à un haut niveau chez les animaux infectés. Renforçant cette hypothèse, nous avons constaté dans notre étude que les 2 animaux morts de

l'infection par la souche Léna avaient la plus forte charge virale de leur groupe. Au niveau virologique, nos données corroborent celles des précédentes études qui ont montré également une charge virale très élevée chez les animaux infectés par la souche Léna (Karniychuk *et al.*, 2010; Weesendorp *et al.*, 2013). De façon intéressante, il a également été montré que les virus HP de génotype 2 isolés en Asie entraînaient également une virémie très élevée (Guo *et al.*, 2013). D'un point de vue diagnostique, il pourrait être intéressant de tirer parti de la virémie élevée caractérisant les souches HP de virus du SDRP. La quantification de la charge virale sanguine au moyen d'une RT-PCR quantitative pourrait ainsi être utile pour une première orientation vers ce type de souche, ensuite confirmé par typage génétique.

Selon Frydas (Frydas *et al.*, 2013), ce niveau de réplication plus élevé pour la souche Léna serait lié entre autre à sa capacité à infecter une large population cellulaire : non seulement les macrophages exprimant la Sialoadhésine, mais aussi les macrophages n'exprimant pas ce récepteur. Du point de vue physiopathologique, la virulence de la souche Léna pourrait ainsi être liée à 2 principaux facteurs. D'une part, la réplication virale intense induirait une « tempête » cytokinique qui pourrait profondément perturber le système immunitaire comme le suggère Weesendorp (Weesendorp *et al.*, 2013). D'autre part, le virus Léna détruirait de nombreux macrophages qui sont des cellules essentielles pour les défenses de l'hôte. Nous avons d'ailleurs pu observer que la mortalité rapide et marquée des cellules du liquide de LBA était corrélée à la forte réplication de la souche Léna dans le

poumon. Les macrophages représentant la population cellulaire majoritaire au niveau des alvéoles pulmonaires, les symptômes respiratoires associés à l'infection par la souche Léna pourraient être liés à la destruction massive de ces cellules.

## CONCLUSION

Cette étude confirme et complète les données déjà disponibles sur la souche Léna. Elles montrent que cette souche est particulièrement pathogène par rapport à une souche française de virus du SDRP. En cas d'émergence d'un tel virus en élevage, on peut redouter un tableau clinique et une mortalité encore plus marquée du fait d'une pression infectieuse bien supérieure à celle de nos conditions expérimentales. Pour des souches HP d'origine chinoise, il a été décrit en effet une exacerbation des symptômes lors d'une co-infection par le Circovirus de type 2 (Fan *et al.*, 2013) ou par *Haemophilus parasuis* (Yu *et al.*, 2012).

Les données de cette étude apportent un tableau clinique et lésionnel détaillé qui pourra être utile aux vétérinaires praticiens pour diagnostiquer rapidement l'éventuelle émergence de cette souche sur notre territoire. Ces données pourront également permettre de sensibiliser les acteurs de la filière porcine et les inciter à mettre en place toutes les mesures nécessaires pour prévenir l'introduction d'une telle souche en France. Ceci est d'autant plus important que les vaccins disponibles ont montré une efficacité limitée envers la souche Léna (Nauwynck *et al.*, 2014).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albina E., 1997. [Porcine reproductive and respiratory syndrome: ten years of experience (1986-1996) with this undesirable viral infection]. *Vet Res*, 28, 305-352.
- Allende R., Lewis T.L., Lu Z., Rock D.L., Kutish G.F., Ali A., Doster A.R., Osorio F.A., 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol*, 80, 307-315.
- Anses, 2012. Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine. Anses, 324 p.
- Fan P., Wei Y., Guo L., Wu H., Huang L., Liu J., Liu C., 2013. Synergistic effects of sequential infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Virology*, 10, 265.
- Frydas I.S., Verbeeck M., Cao J., Nauwynck H.J., 2013. Replication characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) European subtype 1 (Lelystad) and subtype 3 (Lena) strains in nasal mucosa and cells of the monocytic lineage: indications for the use of new receptors of PRRSV (Lena). *Vet Res*, 44, 73.
- Guo B., Lager K.M., Henningson J.N., Miller L.C., Schlink S.N., Kappes M.A., Kehrl M.E., Jr., Brockmeier S.L., Nicholson T.L., Yang H.C., Faaborg K.S., 2013. Experimental infection of United States swine with a Chinese highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 435, 372-384.
- Halbur R.G., Pallares F.J., Rathje J.A., Evans R., Hagemoser W.A., Paul P.S., Meng X.J., 2002. Effects of different us isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on blood and bone marrow parameters of experimentally infected pigs. *Vet Rec*, 151, 344-348.
- Karniychuk U.U., Geldhof M., Vanhee M., Van Doorselaere J., Saveleva T.A., Nauwynck H.J., 2010. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res*, 6, 30.
- Lewis C.R., Ait-Ali T., Clapperton M., Archibald A.L., Bishop S., 2007. Genetic perspectives on host responses to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol*, 20, 343-358.
- Ministère de l'Agriculture d.I.A.e.d.I.F., 2012. Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire. 32 p.
- Murtaugh M.P., Stadejek T., Abrahante J.E., Lam T.T., Leung F.C., 2010. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 154, 18-30.
- Nauwynck H.J., Frydas I.S., Christiaens I., Van Breedam W., Bonckaert C., Trus C., 2014. Changing receptor use of PRRSV leads to different virological, immunological and clinical outcome - impact on diagnosis and control. 23rd IPVS Congress proceedings, 1, 23-26.
- Stadejek T., Stankevicius A., Murtaugh M.P., Oleksiewicz M.B., 2013. Molecular evolution of PRRSV in Europe: current state of play. *Vet Microbiol*, 165, 21-28.
- Weesendorp E., Morgan S., Stockhofe-Zurwieden N., Popma-De Graaf D.J., Graham S.P., Rebel J.M., 2013. Comparative analysis of immune responses following experimental infection of pigs with European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of differing virulence. *Vet Microbiol*, 163, 1-12.
- Yu J., Wu J., Zhang Y., Guo L., Cong X., Du Y., Li J., Sun W., Shi J., Peng J., Yin F., Wang D., Zhao P., Wang J., 2012. Concurrent highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection accelerates *Haemophilus parasuis* infection in conventional pigs. *Vet Microbiol*, 158, 316-321.