

Etude des réponses du porc à l'infection par un nouveau variant de virus influenza porcin H1N2 et évaluation de la protection vaccinale

Céline DEBLANC (1), Stéphane QUEGUINER (1), Stéphane GORIN (1), Frédéric PABOEUF (2), Gaëlle SIMON (1)

(1) Anses, Unité Virologie Immunologie Porcines, B.P. 53, 22440 Ploufragan, France

(2) Anses, Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation, B.P. 53, 22440 Ploufragan, France

celine.deblanc@anses.fr

*Avec la collaboration de Séverine HERVE (1), Amélie CHASTAGNER (1), Jean-Marie GUIONNET (2), Angélique MORO (2),
Gérald LE DIGUERHER (2), Jean-Philippe MOISAN (2)*

Etude des réponses du porc à l'infection par un nouveau variant de virus influenza porcin H1N2 et évaluation de la protection vaccinale

La caractérisation des virus influenza porcins détectés dans les élevages français a récemment révélé l'émergence d'un variant antigénique H1N2, ayant dérivé du virus H1N2 en circulation depuis les années 90 suite à des modifications dans le gène codant l'hémagglutinine. Une expérimentation a été menée sur espèce cible pour comparer la pathogénicité des deux virus et la protection conférée par le vaccin anti-H1N2 disponible en Europe. Trois lots de cinq porcelets ont été inoculés par le H1N2 parental, le H1N2 variant ou du milieu de culture. Le même dispositif a concerné des animaux préalablement vaccinés. Les réponses immunitaires acquises post-vaccinales et post-infectieuses ont été suivies dans le sang tout au long de l'essai. Les réponses innée et inflammatoire post-infectieuses ont été évaluées au niveau pulmonaire, via des lavages broncho-alvéolaires. L'excrétion virale a été mesurée dans les sécrétions nasales. Dans cette étude, le variant a induit des symptômes plus marqués que le virus parental le lendemain de l'inoculation, en lien avec une production accrue de TNF- α . La réponse cellulaire post-vaccinale est apparue aussi efficace vis-à-vis du variant que du virus parental, mais pas la réponse humorale puisqu'il a été détecté très peu d'anticorps post-vaccinaux capables de neutraliser le variant. En conséquence, la vaccination a cliniquement protégé les animaux quel que soit le virus inoculé, mais elle n'a pas totalement empêché l'excrétion de particules infectieuses chez les animaux inoculés par le variant, contrairement à ce qui a été observé chez les animaux inoculés par le virus parental. Cette étude confirme l'éloignement des deux virus H1N2 sur le plan antigénique et suggère que le variant pourrait davantage échapper à la protection vaccinale que le virus parental en conditions d'élevage.

Study of pig responses to infection with a new variant of H1N2 influenza virus and evaluation of vaccine protection

In the past few years, characterisation of swine influenza viruses circulating in France revealed the emergence of an antigenic variant H1N2, which derived from the H1N2 virus circulating since the 1990s, following modifications in its haemagglutinin encoding gene. An experimental infection study was conducted to compare the pathogenicity of both viruses in pigs and to evaluate the protection conferred by the only vaccine currently available in Europe against H1N2 viruses. Three groups of five pigs were inoculated with the parental H1N2, the variant H1N2 or the culture medium. The same protocol was performed with vaccinated animals. Post-vaccine and post-infectious adaptive immune responses were monitored in the blood collected throughout the study. Innate and inflammatory post-infectious responses were assessed at the pulmonary level via bronchoalveolar lavages. Virus excretion was measured in nasal secretions. In this study, the variant induced more severe symptoms than the parental virus the day after inoculation, in relation to increased TNF- α production. The post-vaccine cellular response appeared as effective against the variant as against the parental virus, but not the humoral response. Indeed, few post-vaccine antibodies able to neutralise the variant were detected. As a result, vaccination protected animals clinically regardless of the virus inoculated, but it did not completely block excretion of infectious particles in animals inoculated with the variant, contrary to what was observed in animals inoculated with the parental virus. This study confirms the antigenic distance of the two H1N2 viruses and suggests that the variant might escape vaccine protection more than the parental virus under farm conditions.

INTRODUCTION

Chez le porc, la grippe est une infection respiratoire aiguë qui se caractérise par des troubles respiratoires, de la fièvre, une perte d'appétit et de la léthargie. Les virus influenza A porcins (swIAV), agents étiologiques de la maladie, sont très répandus à travers le monde. Il en existe trois sous-types : H1N1, H1N2 et H3N2, mais les virus varient en fonction des zones géographiques. Ainsi, en Europe, les virus qui circulent de façon enzootique se classent dans quatre lignages génétiques distincts : « avian-like swine H1N1 » (H1_{av}N1), « pandemic-like swine H1N1 » (H1N1pdm), « human-like reassortant swine H1N2 » (H1_{hu}N2) et « human-like reassortant swine H3N2 » (H3N2) (Simon *et al.*, 2014). Etant donné l'impact sanitaire que peuvent avoir les swIAVs, tant en santé animale qu'en santé publique en raison de leur potentiel zoonotique, la circulation et l'évolution des souches virales sont surveillées dans de nombreux pays. En France, cette surveillance a permis au Laboratoire National de Référence Influenza Porcin (LNR-IP) de mettre en évidence l'émergence en 2012 d'un nouveau virus variant, résultant d'un « glissement antigénique » (ou *drift*) du virus H1_{hu}N2 qui circule depuis les années 90 (Bonin *et al.*, 2018; Garin *et al.*, 2016). Le séquençage de ce variant a montré des différences nucléotidiques inhabituelles avec les souches H1_{hu}N2 enzootiques, notamment dans le gène codant l'hémagglutinine (HA). Les plus notables entraînent deux délétions successives d'acides aminés en positions 146 et 147 dans le site de fixation au récepteur cellulaire, ainsi que des modifications de certains sites antigéniques. Par ailleurs, des analyses de sous-typage antigénique par test d'inhibition de l'hémagglutination ont révélé que les souches variantes ont moins d'affinité pour des anticorps anti-H1_{hu} de référence que les souches parentales (S. Hervé, communication personnelle), indiquant le creusement d'une distance antigénique entre les souches variantes et les parentales. La proportion d'isolats de ce nouveau variant, nommé H1_{hu}N2_{Δ146-147}, comparativement aux isolats du virus parental, a augmenté jusqu'à représenter la moitié des souches H1_{hu}N2 détectées sur le territoire français en 2013-2014 (Garin *et al.*, 2016). Des virus présentant ces délétions en positions 146-147 sur H1_{hu} ont également été décrits en Italie sur un lignage H1_{hu}N2 sans qu'on en connaisse aujourd'hui l'avantage pour le virus (Moreno *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2013). Il peut être supposé que de telles modifications génomiques puissent induire des changements en termes d'affinité aux récepteurs cellulaires, de multiplication virale, de virulence, d'échappement à la pression immunitaire ou encore à la protection vaccinale.

Afin d'obtenir davantage d'informations sur ce nouveau variant, nous avons mené un essai expérimental sur espèce cible visant à (i) comparer sa pathogénicité à celle du virus H1_{hu}N2 parental et (ii) évaluer la protection vaccinale conférée vis-à-vis de ce variant antigénique par le seul vaccin antigrippal actuellement disponible en France.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Vaccin et souches virales

Le vaccin utilisé est le vaccin RespiPorc Flu®3 (IDT Biologika GmbH, Dessau-Rosslau, Allemagne). Ce vaccin inactivé contient des antigènes représentatifs des lignages européens H1_{av}N1, H3N2 et H1_{hu}N2 (Van Reeth and Ma, 2013).

Les souches virales utilisées sont A/Sw/France/Ille et Vilaine-0415/2011 (H1_{hu}N2) et A/Sw/France/22-130212/2013 (H1_{hu}N2_{Δ146-147}), isolées de porcs ayant présenté un syndrome respiratoire aigu et sous-typées par le LNR-IP. Elles ont été amplifiées et titrées sur une lignée de cellules épithéliales de rein de chien (*Madin Darby Canine Kidney* (MDCK)) selon des méthodes décrites (Deblanc *et al.*, 2012).

1.2. Dispositif expérimental

L'essai expérimental, mené dans les animaleries de niveau de biosécurité 3 de l'Anses à Ploufragan, a été approuvé par le comité d'éthique Anses/ENVA/UPEC et autorisé par le ministère de la Recherche (avis n°12/12/17-8).

Trente porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ont été répartis en six lots de cinq animaux. Trois lots ont été vaccinés à 5 et 8 semaines d'âge (lots V+). A 9 semaines d'âge (J0), deux lots (un non vacciné et un vacciné) ont été infectés, soit par le virus H1_{hu}N2 (lots H1N2 et V+H1N2, respectivement), soit par le variant H1_{hu}N2_{Δ146-147} (lots H1N2var et V+H1N2var, respectivement), en administrant 5 ml d'inoculum (10⁵ TCID50/porc) par voie trachéale. Les deux derniers lots d'animaux ont reçu du milieu de culture (lots Témoin et V+Témoin).

Pour chaque animal, les signes cliniques ont été notés (score total sur 9) de la manière suivante : vivacité (normale = 0 ; réduite = 1 ; ne se lève pas = 2), apparence (normale = 0 ; émacié = 1), respiration (normale = 0 ; fréquence augmentée = 1 ; coup de flanc = 2), état des yeux (normal = 0 ; rougis avec sécrétions claires = 1 ; enflammés avec sécrétions troubles = 2), écoulement nasal (absence = 0 ; écoulement clair = 1 ; écoulement purulent = 2). Les températures rectales ont été relevées quotidiennement et des pesées ont été réalisées chaque semaine. A l'échelle du lot, les toux et éternuements ont été comptabilisés pendant 15 min tous les jours.

Un écouvillonnage nasal a été réalisé quotidiennement la première semaine post-inoculation puis tous les deux jours la semaine suivante. Une prise de sang sur tubes sec et hépariné a été réalisée au niveau de la veine jugulaire avant chaque vaccination (J-28 et J-7) puis une fois par semaine jusqu'à la fin de l'essai. Une prise de sang supplémentaire sur tube sec a été faite à J1 et J2. A J-5, J1 et J7, des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été effectués par deux infusions de 20 ml de PBS stérile tiède réalisées sous anesthésie générale (10 mg/kg de poids vif de Zolétil 100 (Virbac, Carros, France) administrés par voie intramusculaire). Les animaux ont été euthanasiés et autopsiés à J21.

1.3. Analyses de laboratoire

Le génome viral a été détecté et quantifié dans les surnageants d'écouvillons nasaux par RT-PCR temps réel (RT-qPCR) ciblant le gène M (Cador *et al.*, 2016). Pour les animaux vaccinés, un isolement viral a été entrepris à partir des surnageants d'écouvillons dans lesquels la quantité de génome viral était suffisamment importante pour être mesurée (OIE, 2015).

Dans les LBA, l'interféron (IFN)-α a été dosé par ELISA (Jamin *et al.*, 2006) ; le facteur nécrosant des tumeurs (TNF)-α a été dosé à l'aide d'un kit commercial (Quantikine kit, Bio-Techne – R&D System, Mineapolis, USA). Les quantités d'haptoglobine et d'interleukine (IL)-6 ont été mesurées dans les sérums à J0, J1, J2 et J7 avec les kits Tridelta PHASE Haptoglobin Assay (Eurobio, Courtaboeuf, France) et Quantikine (Bio-Techne – R&D System, Mineapolis, USA), respectivement.

La réponse immunitaire cellulaire, spécifique du virus inoculé, a été évaluée par ELISPOT IFN- γ à partir des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) d'après un protocole déjà décrit (Renson *et al.*, 2017) et adapté aux swIAVs. Pour cela, 4×10^5 PBMC ont été stimulées pendant 18 h avec 0,5 MOI (*multiplicity of infection*; ratio nombre de virus/nombre de cellules) du même virus que celui inoculé aux animaux. Les cellules sécrétrices d'IFN- γ (CS-IFN γ) sont visualisées par des spots colorés, dénombrés et rapportés à un million de PBMC. Des analyses similaires ont été répétées en stimulant par le virus parental les PBMC des animaux inoculés par le variant, et inversement.

Les quantités d'anticorps sériques capables de neutraliser les virus H1_{hu}N2 et H1_{hu}N2 $_{\Delta 146-147}$ ont été mesurées par des tests de neutralisation virale sur cellules MDCK (Deblanc *et al.*, 2018). Le titre en anticorps neutralisants est déterminé par l'inverse de la dernière dilution du sérum qui empêche l'infection des cellules (absence d'effet cytopathogène) et transformé en log².

1.4. Analyses statistiques

Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis avec la correction de Holm pour les comparaisons deux à deux post-hoc. Un test de Fisher a été effectué pour comparer le nombre de résultats positifs en RT-qPCR sur la période J1-J7 des deux lots vaccinés infectés. Les corrélations ont été établies avec le test de Spearman. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.1.3). Les différences ont été considérées comme significatives lorsque $P \leq 0,05$.

2. RESULTATS

2.1. Données cliniques

A 1 jour post-inoculation (jpi), les animaux du lot H1N2var avaient un score clinique significativement plus élevé que ceux du lot H1N2 (scores moyens de 1,6 et 0,4, respectivement ; $P = 0,05$). Sur les cinq porcelets du lot H1N2var, quatre ont montré des signes cliniques tels qu'une augmentation de la fréquence respiratoire, une vivacité réduite, des yeux rougis ou encore de l'écoulement nasal. Comparativement, un seul porc du lot H1N2 avait une fréquence respiratoire augmentée et une vivacité réduite. Tous les animaux de ces deux lots ont montré de l'hyperthermie (température rectale > 40°C) à J1 (41,1°C et 40,5°C en moyenne pour les lots H1N2var et H1N2, respectivement) et une baisse de la consommation alimentaire, laquelle s'est traduite par un retard de croissance au cours de la semaine post-inoculation, comparativement aux animaux témoins (données non montrées, $P = 0,01$).

Des toux quinteuses ont été entendues à J2, J5 et J6 dans le lot H1N2var mais pas dans le lot H1N2. A l'autopsie (J21), tous les animaux du lot H1N2var présentaient encore des lésions pulmonaires contre un seul individu dans le lot H1N2.

Comme attendu, la vaccination a protégé cliniquement les animaux de l'infection par le virus H1_{hu}N2 parental. Considérant l'ensemble du lot V+H1N2var, la vaccination a également empêché les animaux de développer des signes cliniques suite à l'inoculation de la souche variante ($P > 0,05$). A noter toutefois que dans ce lot un animal a présenté une légère hyperthermie (40,2°C) à J1. Les deux lots vaccinés ont montré des croissances pondérales similaires à celles des lots témoins. Aucune lésion pulmonaire n'a été observée à l'autopsie chez les animaux vaccinés (données non montrées).

2.2. Excrétion virale

Quelle que soit la souche inoculée, tous les animaux non vaccinés ont excrété du virus entre J1 et J7 (Figure 1), en quantités similaires (données non montrées, $P = 0,7$).

La vaccination a bloqué l'excrétion virale chez les animaux inoculés par le H1_{hu}N2 parental. Du génome viral a transitoirement été détecté à J3 chez un animal du lot V+H1N2, mais à un niveau trop faible pour être quantifié (Figure 1). Dans le lot V+H1N2var, la vaccination a moins bien empêché l'excrétion virale puisque du génome a été détecté chez trois animaux entre J1 et J4 (Figure 1). Ainsi, le nombre de prélèvements dans lesquels du génome viral a été détecté est significativement plus important dans ce lot que dans le lot V+H1N2 ($P = 0,03$). Pour deux de ces animaux excréteurs, la quantité de génome viral a pu être mesurée et des particules virales infectieuses ont été multipliées en culture cellulaire à partir de ces échantillons (données non montrées).

2.3. Réponses immunitaires

2.3.1 Réponse immunitaire innée

Tous les animaux infectés mais non vaccinés ont montré, de façon similaire, une augmentation de la concentration en haptoglobine sérique à J2, signe d'une inflammation (données non montrées, $P = 0,05$ (lot H1N2) et $P = 0,03$ (lot H1N2var)). Malgré de fortes variations individuelles, les concentrations moyennes en IL-6 et IFN- α ont augmenté de manière similaire dans le sang et les LBA des animaux des deux lots infectés, les niveaux atteints étant significativement différents de ceux observés chez les témoins ($P \leq 0,05$). Les animaux du lot H1N2var ont en outre montré des niveaux plus importants en TNF- α que les témoins (données non montrées, $P = 0,05$).

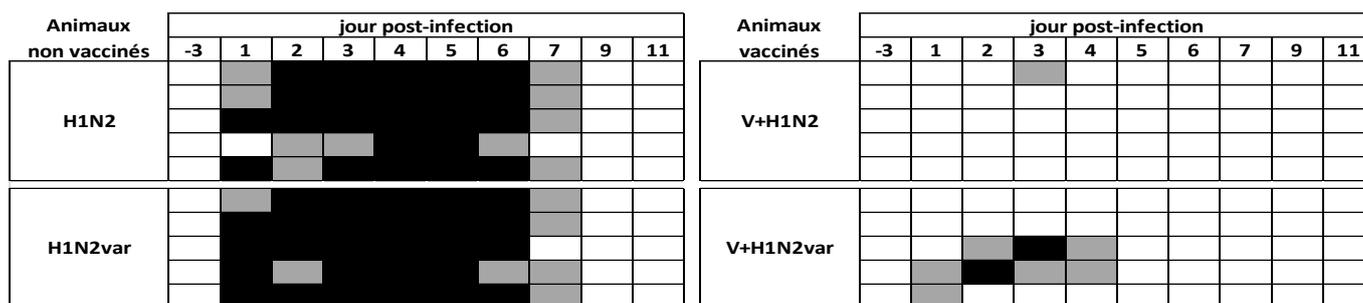


Figure 1 – Données individuelles d'excrétion virale des animaux inoculés, non vaccinés (panels de gauche) et vaccinés (panels de droite), au cours du temps. Cases noires : génome viral détecté et quantifié dans le surnageant d'écouvillon nasal prélevé ; cases grises : génome viral détecté mais non quantifiable ; cases blanches : génome viral non détecté.

La stabilité des concentrations en haptoglobine et en cytokines pro-inflammatoires chez les animaux du lot V+H1N2 indique une absence de réaction inflammatoire chez ces animaux suite à l'infection. Ceux-ci n'ont pas non plus développé de réponse antivirale. Dans le lot V+H1N2var, les réponses à l'inoculation sont apparues plus hétérogènes puisqu'un animal a présenté un pic d'haptoglobine à J2 et des pics d'IL-6, d'IFN- α et de TNF- α à J1 (données non montrées).

2.3.2 Réponse cellulaire

Chez les animaux non vaccinés, des CS-IFN γ ont été mises en évidence dans les lots H1N2 et H1N2var à J7 ($P \leq 0,01$) et leur nombre a atteint un plateau à J14 (Figure 2A). Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux lots ($P > 0,05$). Les mêmes résultats ont été obtenus après

stimulation des PBMC par l'autre virus que celui inoculé aux animaux (données non montrées, $P > 0,05$).

Dans les trois lots vaccinés (V+Témoin, V+H1N2 et V+H1N2var), une réponse immunitaire à médiation cellulaire s'est mise en place suite au rappel vaccinal ($P < 0,01$). Ces CS-IFN γ post-vaccinales ont été capables de s'activer aussi bien après une stimulation par le virus H1_{hu}N2 $\Delta_{146-147}$ que par le virus H1_{hu}N2 (Figure 2B). Après les inoculations virales, il a été observé un *boost* de la réponse IFN- γ à J7, plus important dans le lot V+H1N2var que dans le lot V+H1N2 ($P = 0,02$), puis une diminution du nombre de CS-IFN γ dans ces deux lots (Figure 2B). Les mêmes réponses IFN- γ ont été mesurées chez ces animaux après stimulation des PBMC par l'autre virus que celui qui leur a été inoculé (données non montrées, $P > 0,05$).

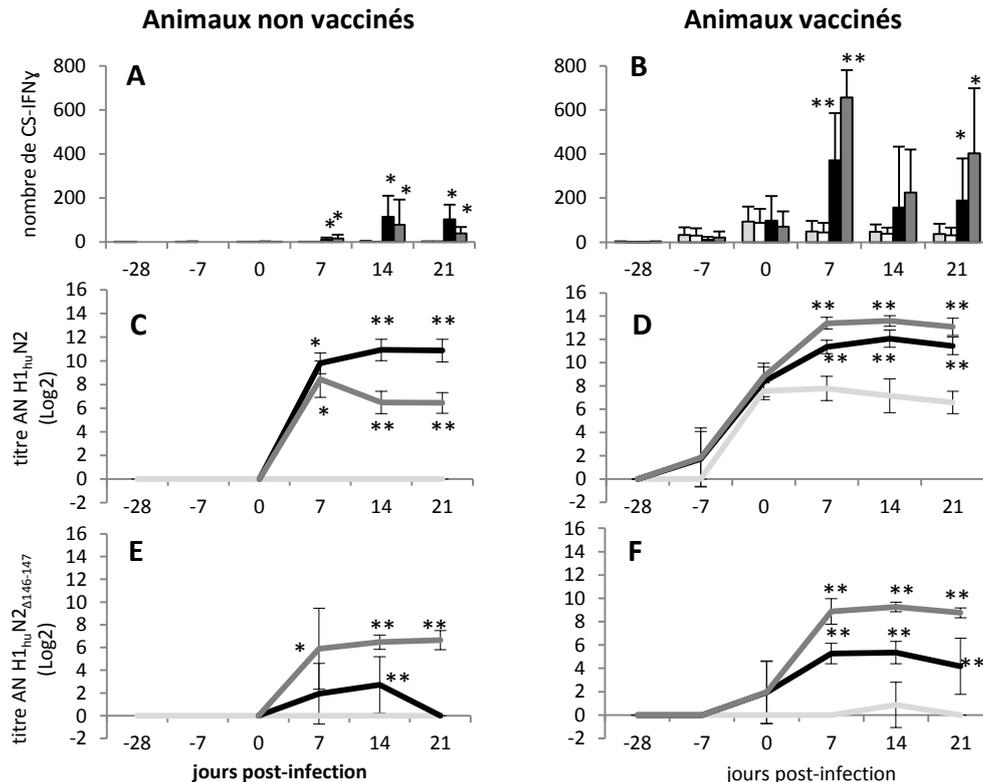


Figure 2 – Evolution des réponses immunitaires acquises post-vaccinales et/ou post-infectieuses au cours du temps.

Dénombrement des cellules sécrétrices d'interféron (CS-IFN γ) chez les animaux non vaccinés (A) et vaccinés (B) : les résultats obtenus après stimulation des PBMC des animaux témoins par la souche H1_{hu}N2 sont indiqués en barres gris clair et ceux obtenus après stimulation par la souche H1_{hu}N2 $\Delta_{146-147}$ sont indiqués en barres blanches ; les résultats concernant les animaux inoculés par le virus H1_{hu}N2 (barres noires) et H1_{hu}N2 $\Delta_{146-147}$ (barres gris foncé) sont ceux qui ont été obtenus après stimulation des PBMC par le virus inoculé. Mesure des titres en anticorps neutralisants vis-à-vis du virus H1_{hu}N2 chez les animaux non vaccinés (C) et vaccinés (D) et vis-à-vis du virus H1_{hu}N2 $\Delta_{146-147}$ chez les animaux non vaccinés (E) et vaccinés (F), ceci chez les groupes témoins (courbes gris clair), ceux inoculés par la souche H1_{hu}N2 (courbes noires) et ceux inoculés par la souche H1_{hu}N2 $\Delta_{146-147}$ (courbes gris foncé).

* indique que le lot est différent du lot témoin uniquement. ** indique que le lot est différent du lot témoin et du lot inoculé par l'autre souche virale.

2.3.3. Réponse humorale

Suite à l'infection grippale, une séroconversion a été observée dès J7 chez tous les animaux des lots H1N2 et H1N2var (Figure 2). Dans le lot H1N2, les anticorps produits sont capables de neutraliser efficacement le virus H1_{hu}N2 (Figure 2C, $P < 0,01$) mais beaucoup moins le variant (Figure 2E, $P = 0,05$ à J14). Au contraire, les anticorps produits dans le lot H1N2var neutralisent de la même manière les deux virus H1_{hu}N2 et H1_{hu}N2 $\Delta_{146-147}$ (Figures 2C et 2E, $P < 0,01$). Les anticorps post-vaccinaux présents dans les sérums des animaux vaccinés prélevés à J0 ont montré leur capacité à neutraliser le virus H1_{hu}N2 parental, qui est proche de l'antigène contenu dans le vaccin (Figure 2D, $P < 0,01$).

Ils apparaissent en revanche beaucoup moins neutralisants vis-à-vis du virus variant (Figure 2F, $P > 0,05$). Les inoculations des animaux vaccinés ont induit une nouvelle production d'anticorps neutralisants anti-H1_{hu}N2 et anti-H1_{hu}N2 $\Delta_{146-147}$ puisque les titres en anticorps neutralisants des deux lots V+H1N2 et V+H1N2var sont significativement différents de ceux mesurés dans le lot V+Témoin à J7, J14 et J21 (Figures 2D et 2F, $P < 0,05$).

Ce *boost* de la réponse humorale est apparu plus important dans le lot V+H1N2var que dans le lot V+H1N2 ($P < 0,05$).

2.4. Analyses de corrélation

Chez les animaux du lot H1N2, l'excrétion virale est corrélée positivement aux concentrations d'haptoglobine ($P = 0,00$), d'IL-6 ($P = 0,02$) et d'IFN- α ($P = 0,01$), ainsi qu'aux quantités de CS-IFN γ ($P = 0,00$) et d'anticorps neutralisants vis-à-vis du virus H1_{hu}N2 à J21 ($P = 0,00$) (Figure 3). Ces mêmes paramètres sont également corrélés dans le cas de l'infection H1_{hu}N2 Δ 146-147, avec de plus, une corrélation positive entre l'excrétion et le score clinique ($P = 0,01$), la quantité de TNF- α ($P = 0,00$) et la quantité d'anticorps neutralisants anti-variant ($P = 0,00$). Le score clinique des animaux infectés par le variant est également lié aux niveaux de TNF- α ($P = 0,02$) et d'IFN- α ($P = 0,04$) et à la réaction immunitaire adaptative mise en place à J21 ($P < 0,05$).

Chez les animaux vaccinés puis infectés H1_{hu}N2, l'excrétion virale et les réponses inflammatoire (haptoglobine, IL-6) et antivirale

(IFN- α) sont corrélées négativement à la quantité d'anticorps post-vaccinaux présents à J0 ($P \leq 0,05$). Une corrélation positive est par contre observée entre la quantité d'anticorps post-vaccinaux et la capacité à neutraliser le virus variant à J21 ($P = 0,02$). En revanche, aucun lien n'est observé entre les niveaux d'anticorps post-vaccinaux et les réponses immunitaires mesurées à J21, que ce soit la réponse cellulaire ($P = 0,12$) ou les taux d'anticorps neutralisants anti-H1_{hu}N2 ($P = 0,53$).

Chez les animaux vaccinés puis infectés H1_{hu}N2 Δ 146-147, une corrélation négative apparaît également entre le niveau d'anticorps post-vaccinaux à J0 et l'excrétion virale ($P = 0,00$), la concentration en IL-6 ($P = 0,01$), et le score clinique ($P = 0,02$). Une corrélation positive est obtenue entre les taux d'anticorps post-vaccinaux et les réponses immunitaires adaptatives à J21 ($P = 0,00$). Il n'est pas observé de lien entre les anticorps post-vaccinaux et les niveaux d'haptoglobine ($P = 0,06$), de TNF- α ($P = 0,43$) et d'IFN- α ($P = 0,63$).

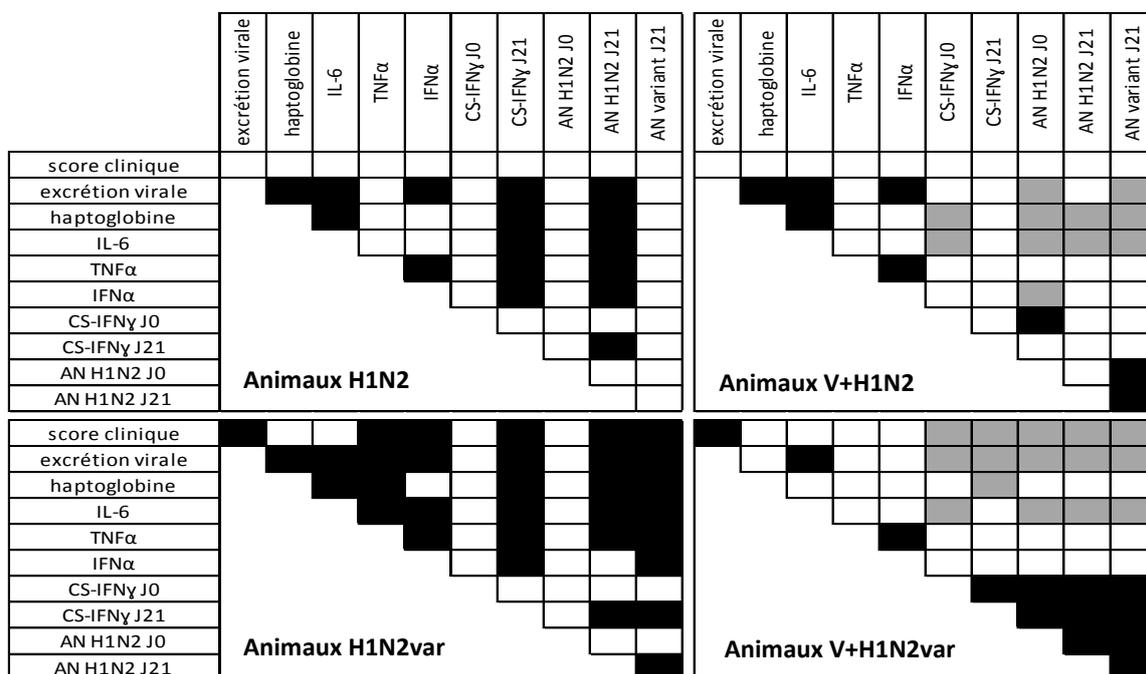


Figure 3 – Corrélations deux à deux entre les paramètres mesurés : score clinique à J1, durée de l'excrétion virale, concentration en haptoglobine à J2, concentrations en IL-6, TNF- α et IFN- α à J1, nombres de CS-IFN γ à J0 et J21, titres en anticorps neutralisants (AN) à J0 et J21. Pour les animaux des lots H1N2 et H1N2var, le lot Témoin a été intégré dans l'analyse. Pour les animaux V+H1N2 et V+H1N2var, les lots non vaccinés ont été intégrés dans l'analyse. Les cases noires indiquent une corrélation positive entre les deux paramètres, les cases grises indiquent une corrélation négative et les cases blanches une absence de corrélation.

3. DISCUSSION

Le premier objectif de ces travaux était d'étudier les réponses cliniques, virologiques et immunologiques du porc infecté par le virus H1_{hu}N2 variant, en comparaison à celles observées chez le porc infecté par le virus H1_{hu}N2 parental. Le virus variant est apparu sensiblement plus pathogène que le virus parental. En effet, les animaux du lot H1N2var ont globalement présenté plus de signes cliniques que ceux du lot H1N2, en lien avec une réponse pro-inflammatoire plus importante, via notamment la production de TNF- α . Ce lien entre la production de TNF- α et la sévérité de l'infection est en accord avec nos précédents travaux (Deblanc *et al.*, 2016). Bien qu'aucune différence n'ait été observée entre les lots expérimentaux du point de vue de l'excrétion du virus au niveau nasal, il ne peut être exclu que l'augmentation des manifestations cliniques (plus de toux, d'écoulements

nasaux...) chez des animaux infectés par le variant ne facilite la diffusion des particules virales dans l'air et donc la propagation du virus à l'échelle d'un groupe. Concernant les réponses adaptatives, il est apparu que les modifications génétiques introduites dans le virus variant n'impactent pas la réponse cellulaire mais influencent grandement la réponse humorale. En effet, le fait que les mêmes quantités de cellules sécrétrices d'IFN- γ aient été obtenues quelle que soit la souche utilisée pour stimuler les PBMC indique que les lymphocytes T reconnaissent des épitopes communs aux deux virus. Par contre, les anticorps neutralisants produits suite à l'infection H1_{hu}N2 ne sont pas capables de neutraliser le virus variant, ce qui confirme les distances antigéniques relevées entre les deux virus lors des sous-typages comparatifs.

Le deuxième objectif de cette étude était d'évaluer la protection conférée par le seul vaccin anti-H1N2 actuellement disponible en Europe vis-à-vis du variant H1_{hu}N2 Δ 146-147, comparativement à celle conférée vis-à-vis du virus parental.

Dans nos conditions expérimentales, les porcelets vaccinés ont été protégés cliniquement contre le virus parental mais aussi contre le variant. Cependant, même si l'excrétion virale a été diminuée chez les animaux du lot V+H1N2var, celle-ci n'a pas été totalement inhibée comme observé pour le lot V+H1N2, et certains animaux sont restés potentiellement infectieux puisque du virus a pu être isolé dans les sécrétions nasales. L'animal du lot V+H1N2var ayant excrété le plus de virus était d'ailleurs celui qui a présenté quelques signes d'inflammation (pics d'haptoglobine et de cytokines pro-inflammatoires). De plus, si la vaccination a permis la mise en place à J0, d'une réponse cellulaire efficace contre les deux virus, nous avons montré que les anticorps post-vaccinaux sont capables de neutraliser le virus H1_{hu}N2 mais pas H1_{hu}N2 Δ 146-147. En somme, au moment de l'infection grippale, les animaux du lot V+H1N2var n'étaient protégés contre le virus H1_{hu}N2 Δ 146-147 que par leur immunité cellulaire. Celle-ci a certainement contribué à éliminer des cellules infectées et empêcher le développement de signes cliniques chez ces animaux. Cependant, l'absence d'anticorps post-vaccinaux capables de neutraliser rapidement et efficacement le variant dès son entrée dans l'organisme permet à celui-ci de se multiplier et d'être excrété sous forme de particules viables, en quantités non négligeables, par certains animaux. Enfin, il est à noter que l'inoculation des animaux vaccinés a induit un *boost* des réponses adaptatives plus important dans le cas du variant que du virus parental. Sachant que des *boost* de réponses

cellulaires et humorales primaires sont surtout observés à l'occasion de réinfections par un virus de sous-type différent du premier virus impliqué (Van Reeth *et al.*, 2003), cette observation confirme une plus grande homologie entre l'antigène vaccinal et le virus parental qu'entre l'antigène vaccinal et le variant.

CONCLUSION

Les modifications génomiques introduites dans le virus H1_{hu}N2 augmentent légèrement la virulence du variant H1_{hu}N2 Δ 146-147 et permettent à celui-ci d'échapper partiellement à la protection conférée par le seul vaccin anti-H1N2 actuellement disponible en Europe. En dépit d'une réponse cellulaire post-vaccinale efficace vis-à-vis de ce variant, la vaccination ne permet pas une production suffisante d'anticorps capables de le neutraliser. De ce fait, même si la vaccination protège cliniquement les animaux de l'infection, elle n'empêche pas la multiplication et l'excrétion du variant. Des particules infectieuses H1_{hu}N2 Δ 146-147 ayant été sécrétées par des animaux vaccinés, le variant pourrait se transmettre au sein d'une population vaccinée. Une prochaine étude expérimentale impliquant des animaux naïfs placés au contact indirect d'animaux infectés (vaccinés ou non) permettrait d'objectiver cette hypothèse et de compléter les connaissances quant à la dynamique et l'impact de ce variant en élevage porcin.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bonin, E., Queguiner, S., Woudstra, C., Gorin, S., Barbier, N., Harder, T.C., Fach, P., Herve, S., Simon, G., 2018, Molecular subtyping of European swine influenza viruses and scaling to high-throughput analysis. *Virology* 15, 7.
- Cador, C., Herve, S., Andraud, M., Gorin, S., Paboeuf, F., Barbier, N., Queguiner, S., Deblanc, C., Simon, G., Rose, N., 2016, Maternally-derived antibodies do not prevent transmission of swine influenza A virus between pigs. *Vet Res* 47, 86.
- Deblanc, C., Delgado-Ortega, M., Gorin, S., Berri, M., Paboeuf, F., Berthon, P., Herrler, G., Meurens, F., Simon, G., 2016, Mycoplasma hyopneumoniae does not affect the interferon-related anti-viral response but predisposes the pig to a higher inflammation following swine influenza virus infection. *J Gen Virol* 97, 2501-2515.
- Deblanc, C., Gorin, S., Queguiner, S., Gautier-Bouchardon, A.V., Ferre, S., Amenna, N., Cariolet, R., Simon, G., 2012, Pre-infection of pigs with Mycoplasma hyopneumoniae modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. *Vet Microbiol* 157, 96-105.
- Deblanc, C., Herve, S., Gorin, S., Cador, C., Andraud, M., Queguiner, S., Barbier, N., Paboeuf, F., Rose, N., Simon, G., 2018, Maternally-derived antibodies do not inhibit swine influenza virus replication in piglets but decrease excreted virus infectivity and impair post-infectious immune responses. *Vet Microbiol* 216, 142-152.
- Garin, E., Hervé, S., Rose, N., Locatelli, C., Ngwa-Mbot, D., Wendling, S., Bournez, L., Calavas, D., Simon, G., 2016, Réseau national de surveillance des virus influenza A chez le Porc (Résavip) – Bilan de la surveillance menée en 2015. *Bull Epid Santé Anim Alim* 75, 16-19.
- Jamin, A., Gorin, S., Le Potier, M.F., Kuntz-Simon, G., 2006, Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Vet Immunol Immunop* 114, 224-237.
- Moreno, A., Chiapponi, C., Boniotti, M.B., Sozzi, E., Foni, E., Barbieri, I., Zanoni, M.G., Faccini, S., Lelli, D., Cordioli, P., 2012, Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. *Vet Microbiol* 156, 265-276.
- Moreno, A., Gabanelli, E., Sozzi, E., Lelli, D., Chiapponi, C., Ciccozzi, M., Zehender, G., Cordioli, P., 2013, Different evolutionary trends of swine H1N2 influenza viruses in Italy compared to European viruses. *Vet Res* 44, 112.
- OIE, 2015, Influenza A virus of swine, In: Health, W.O.f.A. (Ed.) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017*. <http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>, pp. 1-14.
- Renson, P., Fablet, C., Le Dimna, M., Mahe, S., Touzain, F., Blanchard, Y., Paboeuf, F., Rose, N., Bourry, O., 2017, Preparation for emergence of an Eastern European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain in Western Europe: Immunization with modified live virus vaccines or a field strain confers partial protection. *Vet Microbiol* 204, 133-140.
- Simon, G., Larsen, L.E., Durrwald, R., Foni, E., Harder, T., Van Reeth, K., Markowska-Daniel, I., Reid, S.M., Dan, A., Maldonado, J., Huovilainen, A., Billinis, C., Davidson, I., Agüero, M., Vila, T., Herve, S., Breum, S.O., Chiapponi, C., Urbaniak, K., Kyriakis, C.S., Brown, I.H., Loeffen, W., 2014, European surveillance network for influenza in pigs: surveillance programs, diagnostic tools and Swine influenza virus subtypes identified in 14 European countries from 2010 to 2013. *PloS one* 9, e115815.
- Van Reeth, K., Gregory, V., Hay, A., Pensaert, M., 2003, Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. *Vaccine* 21, 1375-1381.
- Van Reeth, K., Ma, W., 2013, Swine influenza virus vaccines: to change or not to change-that's the question. *Curr Top Microbiol* 370, 173-200.