

UN MODELE EXPERIMENTAL D'EPREUVE AVEC UNE SOUCHE DE VIRUS INFLUENZA AVIAIRE DE SOUS-TYPE H7N1 «FAIBLEMENT» PATHOGENE POUR EVALUER LA PROTECTION CONTRE L'INFECTION PAR CES VIRUS

Cherbonnel Martine¹, Rousset Johan¹, Le Bras Marie-Odile¹, Morin Yannick², Jestin Véronique¹

AFSSA-Site de Ploufragan, ¹ Unité Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles, ² Service d'Elevage et d'Expérimentation en Pathologie Aviaire, BP 53, 22440 Ploufragan, France

Résumé

Un modèle expérimental d'épreuve sur poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), prenant comme critère l'excrétion maximale par voies respiratoire et digestive de la souche de virus influenza aviaire (AIV) faiblement pathogène (LP) H7N1 (A/Chicken/Italy/1067/99), a été mis au point. La pré-infection avec *Salmonella Enteritidis* et la co-infection avec *Mycoplasma gallisepticum* exacerbent (significativement $p < 0.05$) l'excrétion par voie cloacale des AIV H7N1. Ces conditions ont été retenues pour évaluer la protection contre l'infection H7N1 conférée par des préparations vaccinales consistant en des associations d'ADN plasmidiques codant l'hémagglutinine HA H7, la protéine de matrice M1 et la nucléoprotéine NP de la souche H7N1 précitée. Ainsi après infection d'épreuve selon les modalités précitées, des poulets vaccinés avec HAH7/M1 ont présenté une suppression totale de l'excrétion du virus influenza alors que les poulets vaccinés avec HAH7/NP présentaient seulement une suppression de l'excrétion par voie cloacale.

Introduction

Les oiseaux sauvages aquatiques constituent un réservoir de virus influenza aviaires (AIV) de type A de sous-types d'hémagglutinines (HA) : H1 à H15 et de neuraminidases (NA) : N1 à N9, associés selon de multiples combinaisons HxNy. De façon plus exceptionnelle, les volailles peuvent être infectées par certains d'entre eux. L'infection peut être asymptomatique ou s'exprimer cliniquement de manière faible à sévère, selon les virus en cause, l'espèce concernée, les infections intercurrentes... (Alexander, 2000). Jusqu'à présent seuls des virus de sous-types H5 et H7 ont été responsables de l'influenza aviaire (AI) hautement pathogène (HP) réglementé au plan international. Toutefois, les virus de sous-types H5/H7 ne sont pas d'emblée HP mais il est à présent admis que tous les virus initialement faiblement pathogènes (LP) appartenant à ces sous-types ont la propriété de muter (après un temps variable de circulation sur les volailles) et de générer des virus HP. Tous les virus H5/H7 sont donc potentiellement pathogènes. Cette conclusion est tirée des observations effectuées suite aux épizooties d'AI HP en Pennsylvanie (1984-1985), au Mexique (1994-1995) et récemment en Italie (1999-2000).

Des vaccins à virus inactivé ou recombinants ciblant des AIV de sous-types H5 ont été développés et utilisés aux USA (Swayne et al, 2000b, 2001). Par contre, les travaux publiés relatifs à la mise au point et à l'évaluation de vaccins ciblant les AIV de sous-types H7 sont très réduits et seuls des vaccins AIV H7 à virus inactivé sont disponibles en cas d'urgence. De

plus l'efficacité de tous ces vaccins H5/H7 a été surtout mesurée par la protection clinique vis-à-vis d'une épreuve létale avec un AIV HP. Or, ce critère est tout à fait insuffisant car des volailles vaccinées n'exprimant pas de signes cliniques après infection, peuvent néanmoins excréter du virus et constituer une source de contamination pour d'autres volailles sensibles. De plus, la vaccination d'urgence est plus recommandée pour éviter la diffusion des souches LP alors que le contrôle des souches HP se fait par la mise en œuvre stricte des mesures sanitaires dont l'abattage. Pour mieux évaluer l'efficacité de ces vaccins H5/H7 vis-à-vis des souches AIV LP, il est donc nécessaire de disposer des modèles expérimentaux d'infection correspondants. Aucune description de ce type de modèles n'existant, nous avons commencé, compte tenu du contexte épidémiologique en Italie, par développer un modèle d'infection expérimentale avec une souche de sous-types H7. De plus, la distinction entre volailles vaccinées AIV H7 et infectées par un AIV H7 est délicate et requiert la surveillance sérologique de volailles sentinelles non vaccinées. Il est donc nécessaire de développer un vaccin AIV H7 marqueur n'incorporant que les constituants viraux strictement indispensables à la protection.

Alors que HA est un immunogène majeur elle induit cependant une protection trop restreinte et parfois insuffisante pour prévenir l'infection (Swayne et al., 2000b). Les protéines virales internes : la nucléoprotéine et la protéine de matrice (NP et M1 respectivement) contribuent à diminuer le portage chez la souris (Bot et al., 1998) et confère une protection élargie vis-à-vis d'infection hétérologue

chez le furet (Donnelly et al., 1997). De plus, il a été observé que la pré-infection naturelle par des virus H9N2 conférerait à des poulets une protection partielle vis-à-vis d'une surinfection par des virus H5N1 HP ; ces données suggèrent ainsi le rôle immunogène pour le poulet d'autres protéines virales que les glycoprotéines d'enveloppe HA et NA (Séo et al., 2001).

Les objectifs de notre étude sont donc :

- La mise au point d'un modèle d'épreuve utilisant un AIV H7 LP et la détermination des pics d'excrétion par voies respiratoire et digestive dans les 3 à 6 jours consécutifs à l'infection.
- La mesure de l'efficacité de la vaccination avec de l'ADN plasmidique codant HAH7, NP et/ou M1, dans la prévention de l'excrétion après infection de poulets EOPS dans les conditions du modèle précédemment optimisé.

1. Matériels et méthodes

1.1. Souches de microorganismes

- Virus Influenza aviaire H7N1 : A/Chicken/Italy/1067/99, faiblement pathogène, fourni par Dr I. Capua (Istituto Zooprofilattico sperimentale delle venezie, Legnaro-Padova, Italy) multiplié en liquide allantoïque d'œufs embryonnés de poule et titrant 10^9 DIE50/ml.
- *Salmonella enteritidis*, référence 7629 (AFSSA-Site de Ploufragan) titrant $4,1 \cdot 10^7$ UFC/ml.
- *Mycoplasma gallisepticum*, référence 41-91 (AFSSA-Site de Ploufragan) titrant $3 \cdot 10^5$ UFC/ml.

1.2. Clonage dans un vecteur d'expression

Les gènes codant les protéines d'intérêt HA, NP, M1 ont été, après amplification, clonés dans un plasmide d'expression sous contrôle du promoteur du gène précoce du cytomégalovirus humain (CMV) (Invitrogen).

Les produits issus du clonage, après vérification par séquençage et par transfection transitoire de cellules de lignée continue de caille QT35, ont été amplifiés à l'aide de kits "Endofree Plasmid Giga" (Qiagen). Ceux-ci assurent un faible niveau de contamination d'endotoxines.

1.3. Test d'inhibition de l'hémagglutination

Le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) a été réalisé selon le principe de la norme NFU 47-011, Juin 2000, "Recherche d'anticorps contre la maladie de Newcastle par la technique de l'inhibition de

l'hémagglutination" mais en utilisant comme antigène un AIV H7N3.

1.4. Test ELISA NP par compétition

Il s'agit d'une technique par compétition. Brièvement sur des plaques sensibilisées soit avec un AIV inactivé soit avec le placebo correspondant, a été déposé un mélange constitué volume à volume du sérum à tester et d'un anticorps monoclonal de souris anti-NP, dérivé de l'hybridome HB65 (ATCC). La fixation de ce dernier a été révélée par un conjugué anti-immunoglobuline de souris marqué à la phosphatase alcaline et l'utilisation d'un substrat spécifique dont la dégradation était inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le sérum.

1.5. Dosage des écouvillons

Chaque écouvillon trachéal ou cloacal, après reprise respectivement par 1 ml de milieu MEM-h ou par 1 ml d'une solution tamponnée au phosphate, pH 7,2, a été titré par dilution logarithmique de raison 10, sur œufs embryonnés de 9 jours issus de poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiques EOPS (AFSSA-Site de Ploufragan), selon la technique de référence VA10, révision 00 du programme 112 du Cofrac "Myxovirose à virus hémagglutinant : isolement par ovoculture et recherche de l'activité hémagglutinante". Le calcul du titre a été réalisé à partir de tous les œufs dont le liquide allantoïque était hémagglutinant, selon la méthode de Reed et Muench.

1.6. Calcul statistique

Pour comparer les nombres de poulets excréteurs et les moyennes des titres de virus excrétés, un test de χ^2 et un test t de Student ont été utilisés respectivement.

1.7. Expérimentation animale

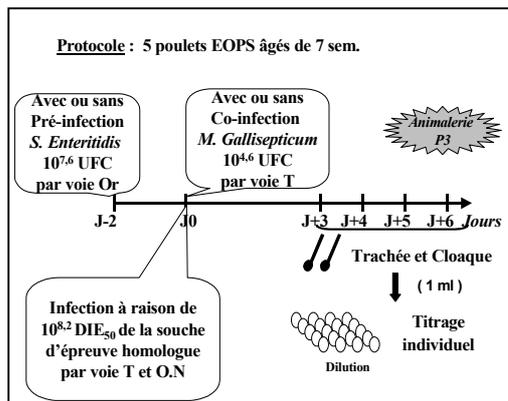
Essai 1 : Choix du modèle d'épreuve

Des poulets EOPS (AFSSA-site de Ploufragan), âgés de 7 semaines au moment de l'épreuve ont été éprouvés selon deux modalités (Figure 1).

- Soit ils n'ont reçu que la souche H7N1 ($10^{8,2}$ DIE50 par voie oro-nasale et trachéale).
- Soit ils ont reçu $10^{7,6}$ UFC de *Salmonella Enteritidis* par voie orale 2 jours avant l'administration de la souche H7N1 (selon les mêmes modalités que précédemment) et en même temps que H7N1, $10^{4,6}$ UFC de *Mycoplasma gallisepticum* par voie trachéale.

L'excrétion virale par voie respiratoire et cloacale est mesurée en titrant la quantité de virus présente dans des écouvillons trachéaux et cloacaux respectivement collectés 3 à 6 jours post infection.

FIGURE 1 : Evaluation du modèle d'épreuve faiblement pathogène

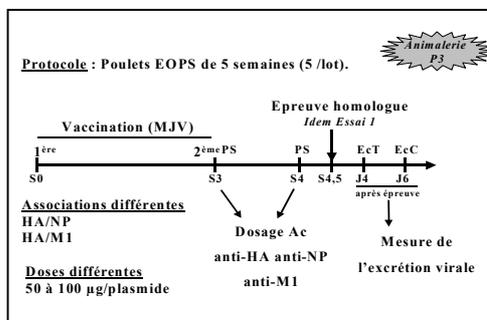


Voie Or : voie orale
Voie T : voie trachéale
Voie ON : voie oculo-nasale

Essai 2 : Effet de la co-administration de plasmides sur l'excrétion virale (Figure 2)

Pour chaque association de plasmides, 4 combinaisons de doses ont été testées recourant à 50 ou 100 µg d'un des 2 plasmides par injection. En parallèle 5 sujets du même âge et de la même origine non vaccinés ont été éprouvés de la même façon et ont constitué le lot témoin.

FIGURE 2 : Effet de la co-administration de plasmides sur l'excrétion virale



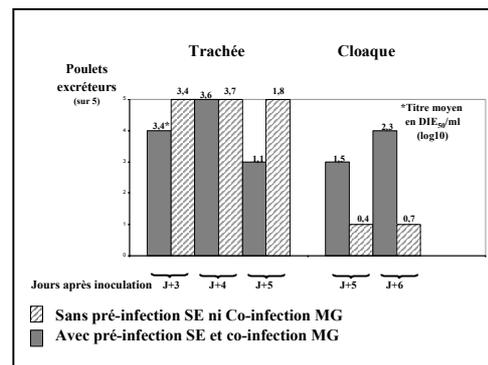
MJV : système Medi-Ject Vision
PS : prise de sang
EcT : écouvillons trachéaux
EcC : écouvillons cloacaux
So, Sx... : semaines après la primovaccination

2. Résultats

Essai 1

L'objectif de cet essai était de déterminer le modèle permettant d'induire une excrétion maximale de virus influenza de manière à pouvoir mesurer ensuite l'efficacité de la vaccination à réduire l'excrétion. Les résultats de l'excrétion virale par voies trachéale et cloacale sont représentés en titre moyen (DIE_{50}/ml) dans la Figure 3.

FIGURE 3 : Résultats de l'essai 1



L'excrétion virale par voie trachéale sur la période considérée n'a pas présenté de différence significative quelles que soient les modalités d'épreuve.

En revanche, par voie cloacale, les poulets ayant été pré-infectés avec *Salmonella Enteritidis* et co-infectés avec *Mycoplasma gallisepticum*, ont présenté une excrétion virale significativement supérieure (moyenne des titres supérieure au seuil 5 % sur la période d'observation) par rapport aux poulets ayant reçu la souche d'épreuve AI seule.

C'est pourquoi dans l'essai 2 mesurant l'effet de la co-administration de plasmides sur l'excrétion virale, la pré-infection avec *Salmonella Enteritidis* et la co-infection avec *Mycoplasma gallisepticum* ont été maintenues et l'excrétion par voies trachéale et cloacale a été mesurée respectivement 4 et 6 jours après infection AIV.

Essai 2

La vaccination à ADN plasmidique a permis de démontrer :

- une forte séroconversion en anticorps anti-HA (titre moyen de 7,5 en \log_2 , 4 semaines après la première vaccination) significativement supérieure ($p=0,00$) pour les lots HAH7/M1 par rapport aux lots HAH7/NP
- une séroconversion en anticorps anti-NP uniquement dans les lots vaccinés avec le plasmide codant NP
- au niveau cloacal, une suppression totale de l'excrétion virale chez tous les animaux vaccinés, significativement différente ($p<0,05$) par rapport aux animaux du lot témoin.
- une diminution après infection de l'excrétion virale par voie trachéale pour les sujets de tous les lots vaccinés HAH7/NP et HAH7/M1 (de $-2,4 \log_{10}$ à $-3,5 \log_{10} DIE_{50}/ml$) voire pour les poulets des lots HAH7/M1 une suppression totale (différence significative $p<0,05$) par rapport aux poulets du lot témoin.

Discussion-Conclusion

La présente étude a pour objectifs ultimes la prévention de la diffusion des AIV H7 LP, en recourant à la vaccination d'urgence à l'aide d'un vaccin marqueur.

Au préalable la mise au point d'un modèle expérimental a été nécessaire. Des données de la littérature montrent qu'une exacerbation de maladies aviaires est possible en réalisant des co-infections (Ex pneumovirose de la dinde exacerbée par une co-infection avec *E. coli* ou le virus de la maladie de Newcastle, Turpin et al., 2002). Aucune donnée équivalente n'existant pour l'influenza aviaire, nous avons donc cherché à savoir si la pré-infection ou la co-infection par des agents ayant le même tropisme respiratoire et digestif que les AIV ne permettrait pas d'aggraver l'infection et de conduire à une excrétion supérieure d'AIV. C'est pourquoi nous avons comparé l'excrétion d'AIV après infection de poulets par l'AIV seul ou après pré-infection par *Salmonella Enteritidis* et co-infection avec *Mycoplasma gallisepticum*. Nous avons pu observer que l'excrétion virale par voie trachéale n'a pas présenté de différence significative quelles que soient les modalités d'épreuve. En revanche, par voie cloacale, les poulets ayant été pré-infectés avec *Salmonella Enteritidis* et co-infectés avec *Mycoplasma gallisepticum*, ont présenté une excrétion virale significativement supérieure (seuil 5 %) par rapport aux poulets ayant reçu la souche d'épreuve AI seule. C'est pourquoi dans l'essai 2 mesurant l'effet de la co-administration de plasmides sur l'excrétion virale, la pré-infection avec *Salmonella Enteritidis* et la co-infection avec *Mycoplasma gallisepticum* ont été maintenues.

A des fins d'investigations expérimentales des propriétés protectrices de différentes protéines virales, nous avons recouru à la vaccination ADN car nous maîtrisons bien ce procédé chez les volailles (Cherbonnel et al, 2001, Cherbonnel et al. sous presse) lequel nous permet d'évaluer *in vivo* de nombreuses constructions génétiques administrées avec le système d'injection (à insuline) Medi-Ject Vision. De plus, ce procédé permet de transférer en toute innocuité à l'organisme receveur (ici le poulet) l'information génétique lui permettant de fabriquer une (des) protéine(s) virale(s) exactement similaires à la (aux) protéine(s) virale(s) normale(s), sans administrer d'organismes génétiquement modifiés (type recombinant pox aviaire sans efficacité chez des poulets présentant une immunité antivariolique Swayne et al, 2000a).

La mise en évidence de réponses humorales vis-à-vis des protéines virales ainsi produites (résultats non présentés pour M1) permet de valider les constructions génétiques en même temps qu'elle fournit des outils de diagnostic permettant à terme la distinction entre volailles vaccinées et infectées. Cependant il reste à explorer les réponses

immunitaires à médiation cellulaire, de manière à déterminer lesquelles sont importantes dans la protection contre l'infection.

L'essai présenté se place dans une approche de criblage de manière à sélectionner les conditions (combinaisons de doses et d'associations de constructions) susceptibles d'intérêt. Ainsi s'explique le faible nombre de sujets par lot. Cependant à des fins d'étude statistique des regroupement ont permis de mettre en évidence l'intérêt de la co-administration à des poulets de plasmides codant M1 et l'hémagglutinine H7 pour supprimer l'excrétion de virus H7N1 après infection expérimentale. Bien que ce résultat soit aussi tout à fait inédit chez les volailles, il conviendra bien sûr de le vérifier sur un plus grand nombre de sujets en conditions d'épreuve homologue (comme ici) mais aussi hétérologue (avec des souches AIV H7 plus ou moins éloignées phylogénétiquement). Il reste aussi à valider ce résultat dans d'autres espèces la dinde notamment qui est la plus sensible à l'infection par les AIV.

Bien que la vaccination ADN ne soit pas utilisée sur le terrain, nous pensons que pour des indications bien ciblées où la manipulation individuelle des volailles est déjà pratiquée (vaccins administrés par voie parentérale, vaccination d'urgence avec des vaccins à virus inactivé), elle peut avoir sa place à condition par exemple qu'un industriel adapte le système Medi-Ject Vision et nous travaillons à la rendre transférable. Néanmoins, à partir de ces travaux, nous nous employons aussi à initier d'autres approches vaccinales.

Remerciements

Les auteurs remercient le personnel SEEPA pour leur excellente collaboration technique.

Références bibliographiques

- Alexander D.J., 2000. Vet. Microbiol. 74, 3-13.
- Bot A., Bot S., Bona C., 1998. Vaccine, 16, p 1675-1682.
- Cherbonnel, M. and Jestin V., 2001, abstracts of Journées Francophones de virologie, p45, A118.
- Cherbonnel, M., Rousset, J., and Jestin, V. Avian Diseases (sous presse)
- Donnelly J.J., Friedman A., Ulmer J.B. and Liu M.A., 1997. Vaccine, 15, p 865-868.
- Seo S.H., Webster R.G., 2001. J. Virol., 75, 2516-2525.
- Swayne, D.E., Beck, J.R. and Kinney, N. 2000a, Avian Diseases, 44, 132-137.
- Swayne D.E., Garcia M., Beck J.R., Kinney N., Suarez D.L., 2000b. Vaccine, 18, 1088-1095.
- Swayne D.E., Beck J.R., Perdue M.L., Beard C.W., 2001. Avian Diseases, 45, 355-365.
- Turpin, E.A., Perkins, L.E., and Swayne D.E., 2002. Avian Diseases, 46, 412-422.