

**MISE EN EVIDENCE DE VARIATIONS DES ANTIGENES
DE SURFACE DU VIRUS GRIPPAL H₃ N₂ CHEZ LE PORC
EN FRANCE A L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX***

C. KAISER ⁽¹⁾, M. VALETTE ⁽²⁾, J. MILLION-JOLLY ⁽²⁾, S. LAMBERT ⁽²⁾,
J. LABIE ⁽¹⁾, F. MADEC ⁽³⁾, J.M. GOURREAU ⁽¹⁾, M. AYMARD ⁽²⁾.

RESUME : La caractérisation antigénique des virus Influenza A H₃ N₂ isolés du porc en France depuis 1984 a révélé l'existence de variations portant sur les deux antigènes de surface, l'hémagglutinine et la neuraminidase. Ces variations montrent que ces virus ont subi, à l'instar de ce que l'on observe chez l'homme, des mutations et une pression immunologique aboutissant à la modification de leurs antigènes d'enveloppe.

SUMMARY : The antigenic identification of A H₃ N₂ influenza virus isolated from swine, in France, since 1984, showed the existence of variations on both surface antigens : the hemagglutinin and the neuraminidase. The variations show that these viruses, like in human beings went under mutations and an immunological pression leading to a modification of their envelop antigens.

*
* *

INTRODUCTION

En 1974, le Laboratoire central de recherches vétérinaires d'Alfort, la Station de pathologie porcine de Ploufragan et les Centres nationaux de référence de la grippe de Paris et de Lyon, instaurent conjointement un système épidémiologique de surveillance de la grippe chez le porc en France. Le dispositif fait appel à deux techniques : d'une part, l'isolement de virus dans le cadre d'enquêtes systématiques à partir de prélèvements suspects ou encore d'animaux sains et, d'autre part, des suivis sérologiques, de manière verticale dans quelques élevages bretons, de manière horizontale dans divers départements à densité porcine élevée.

* Article reçu le 28.12.90, accepté le 25.07.91.

(1) Ministère de l'Agriculture, CNEVA-LCRV, 22 rue Pierre Curie, BP 67, 94703 Maisons-Alfort Cedex France

(2) Centre National de Référence de la Grippe, Université Claude Bernard, Lyon I, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08 France

(3) Ministère de l'Agriculture, CNEVA-LCRAP, BP 9, 22440 Ploufragan France

Ce réseau a permis l'isolement en 1981 pour la première fois en France du virus H₁ N₁ (sw H₁ N₁) dans une exploitation des environs de Marseille dans laquelle sévissaient diverses autres affections [13].

Une enquête séro-épidémiologique instaurée l'année suivante, montrait la diffusion de ce virus à l'ensemble du territoire français [12]. Depuis lors, ce virus, bien implanté dans le réservoir porcin, est régulièrement isolé tout au long de l'année.

C'est également au cours de l'année 1981 que le premier virus grippal H₃ N₂ apparenté à la souche humaine A/PC/1/73 est isolé chez le porc en France et ce, en dehors de tout contexte pathologique [5] ; jusqu'en 1984, des traces sérologiques prouvant la circulation de ce virus sont détectées, mais il faut attendre le mois de juin de cette même année pour le mettre en évidence dans un élevage porcin de Bretagne au sein duquel était apparu un syndrome grippal [17]. La circulation de cet agent fut à l'origine d'une première vague épizootique suivie de deux autres, en 1987 et en 1989/1990.

La figure 1, qui récapitule les isolements de virus grippaux réalisés au Laboratoire central de recherches vétérinaires d'Alfort de 1984 à 1990, montre que ces trois vagues de grippe à virus H₃ N₂ de type A/PC/1/73 ont été séparées par une éclipse de 2 ans pour la première, de 1 an pour la seconde, alors que le virus H₁ N₁ a été régulièrement isolé pendant ces mêmes périodes [11].

Nous rapportons ici les résultats de l'analyse antigénique comparée des souches H₃ N₂ porcines isolées lors des épisodes de 1984, 1987 et 1989/1990 à l'aide d'anticorps monoclonaux.

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL

a. Virus

La souche de référence A/Port-Chalmers/1/73 (H₃ N₂) est d'origine humaine. Les autres souches H₃ N₂ faisant l'objet de l'étude sont issues de porc et ont été isolées au Laboratoire central de recherches vétérinaires.

Tous ces virus ont été multipliés dans la cavité allantoïdienne d'oeufs de poule embryonnés de 9 jours.

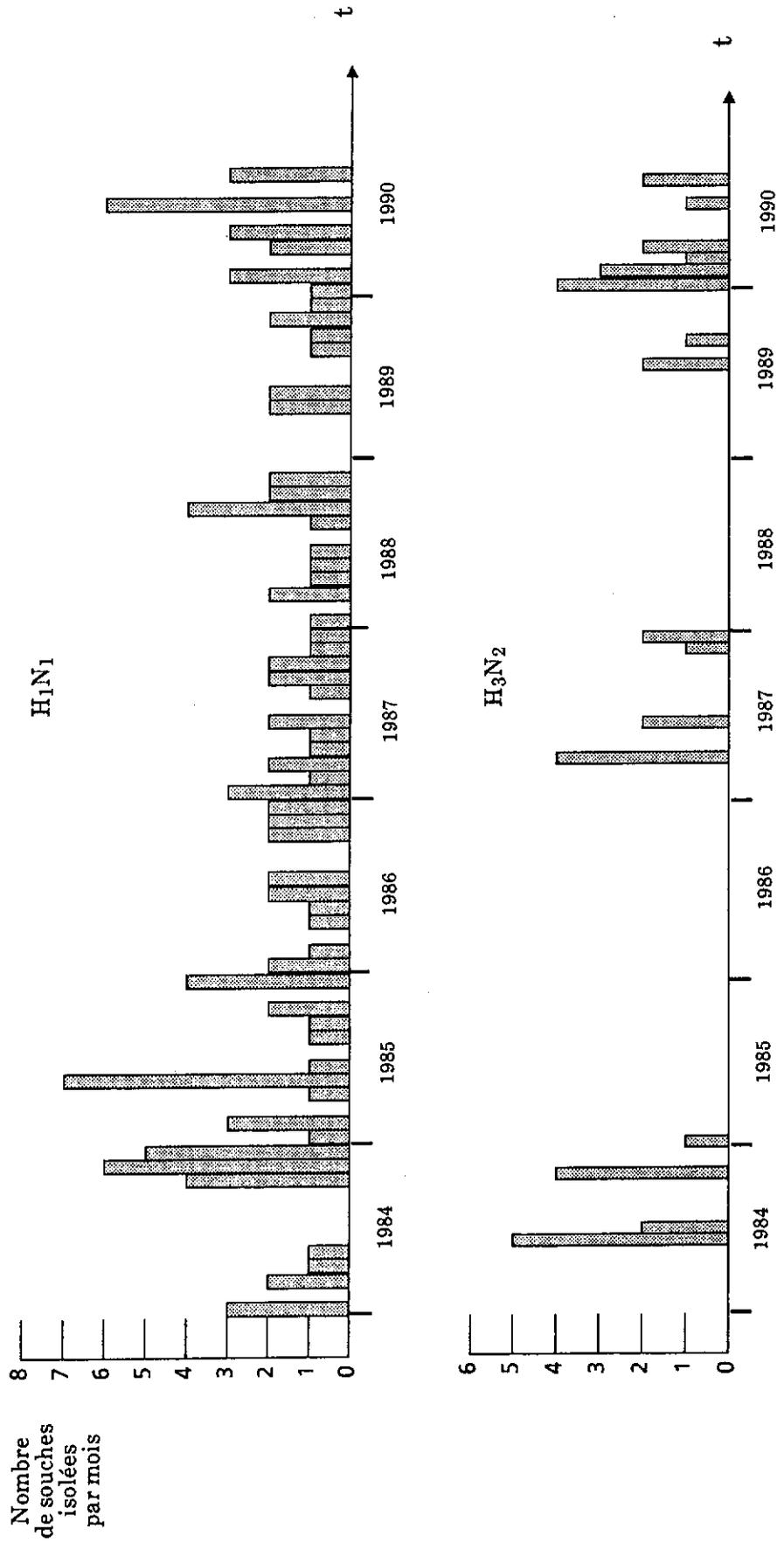
b. Anti sérums

Les anticorps monoclonaux anti-hémagglutinine et anti-neuraminidase, préparés à l'égard des virus H₃ N₂ A/PC/1/73 et H₃ N₂ Sw/3633/84 proviennent pour la plupart du W.I.C. de Londres. Certains d'entre eux ont été produits et caractérisés au Centre de référence de la grippe de Lyon [2].

2. METHODES

Les tests d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination ont été réalisés conformément aux procédures standardisées [18].

Figure 1 : Isolements de virus grippaux H₁ N₁ et H₃ N₂ chez le porc en France de 1984 à 1990.



Le titrage de la neuraminidase et les tests d'inhibition de la neuraminidase ont été effectués selon la technique décrite par Aymard-Henry et coll. [3].

RESULTATS

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux I (hémagglutinine) et II (neuraminidase).

En ce qui concerne l'hémagglutinine, on constate que les souches isolées en 1987 se différencient de la souche prototype de 1984 par la disparition quasi totale de réaction à l'égard de 3 des 6 anticorps monoclonaux utilisés : H₂₅ H₃₀ et H₆₄. Pour les souches mises en évidence en 1989/1990, la dérive s'accroît encore (sauf pour la souche sw/6607/89 identique à sw/3633/84) : comme ceux de 1987, les virus ne réagissent pas avec les 3 anticorps monoclonaux précédents mais, en outre, ils ne sont plus reconnus par l'anticorps monoclonal H₅₉, voire par l'anticorps H₂₆ (pour le virus A/sw/523/90).

L'évolution de la neuraminidase paraît comparable à celle de l'hémagglutinine. Les souches de 1987 présentent une faible variation antigénique par rapport aux souches de 1984, évolution révélée par une baisse de réactivité avec 2 monoclonales sur 5 : les anticorps NC₁ et NC₁₇. Cette différence s'accroît encore avec les souches de 1989/1990 qui, non seulement ne réagissent plus avec les deux anticorps précédents, mais aussi avec un autre monoclonal, l'anticorps NC₄₂.

En outre, deux des souches isolées se différencient des précédentes : la souche A/sw/6607/89 possède une hémagglutinine apparentée à celle de la souche de 1984 et une neuraminidase à celle des souches de 1989/1990 ; la souche A/sw/5091/87 possède une hémagglutinine voisine de celle des souches de 1987, et une neuraminidase proche de celle des souches de 1989/1990.

DISCUSSION

Les virus Influenza A isolés des porcs ont subi de 1984 à 1990 une dérive antigénique importante qui a porté à la fois sur l'hémagglutinine et sur la neuraminidase. Ce processus, aboutissant à la sélection de variants antigéniques, a été bien étudié pour les virus grippaux isolés de l'Homme [6, 19] ; il s'explique par la pression exercée sur le virus par les anticorps d'une population immune (infection antérieure, vaccination) [15, 22]. Au niveau moléculaire, il se produit une série de mutations ponctuelles sur le génome dont un certain nombre se traduisent par la modification des épitopes [7, 9, 10, 21].

Pourtant, chez le porc, un tel mécanisme paraît discutable pour deux raisons :

- La première est liée à la durée de vie économique des animaux, 6 mois en moyenne, et à la proximité des élevages dans les zones à forte densité porcine : les épisodes grippaux à virus H₃ N₂ sont fréquents et les virus transmis de façon quasi continue aux porcelets non immuns. La pression des anticorps devrait donc être faible et la sélection de variants peu favorisée.

Tableau I : Identification de l'hémagglutinine des souches de grippe porcine sw/H₃ N₂ à l'aide d'anticorps monoclonaux.

a = les chiffres représentent les titres en inhibition de l'hémagglutinine

> = > 51 200 ; < = < 100

souches	date de l'isolement	anticorps monoclonaux anti sw/3633/84					
		H ₇₇	H ₂₆	H ₅₉	H ₆₄	H ₃₀	H ₂₅
A/PC/1/73		12 800 ^a	<	<	<	<	<
sw/3633/84	05/06/84	25 600	12 800	6 400	12 800	12 800	3 200
sw/4928/87	25/03/87	>	12 800	12 800	200	400	100
sw/4929/87	25/03/87	51 200	12 800	12 800	200	400	100
sw/4955/87	31/03/87	51 200	12 800	12 800	100	100	<
sw/5024/87	31/03/87	25 600	12 800	12 800	100	100	100
sw/5025/87	27/06/87	25 600	12 800	12 800	<	<	<
sw/5026/87	27/06/87	25 600	12 800	12 800	100	100	<
sw/5091/87	24/11/87	25 600	12 800	12 800	<	<	<
sw/5120/87	03/12/87	25 600	12 800	12 800	100	100	<
sw/5356/87	16/12/87	51 200	12 800	12 800	<	<	<
sw/6606/89	18/08/89	51 200	12 800	100	800	800	100
sw/6607/89	25/08/89	51 200	12 800	6 400	12 800	12 800	1 600
sw/457/89	31/10/89	25 600	12 800	100	400	400	100
sw/458/90	03/01/90	25 600	12 800	100	200	200	<
sw/459/90	10/01/90	25 600	12 800	100	400	200	100
sw/460/90	30/01/90	51 200	12 800	100	200	200	100
sw/523/90	08/02/90	25 600	400	200	200	<	<
sw/524/90	08/02/90	>	12 800	800	800	800	200
sw/793/90	14/03/90	51 200	25 600	<	200	200	<
sw/794/90	03/04/90	51 200	25 600	<	200	200	<
sw/795/90	25/04/90	51 200	25 600	<	200	200	<

Tableau II : Identification de la neuraminidase des souches de grippe porcine sw/H₃N₂ à l'aide d'anticorps monoclonaux.

a = les chiffres représentent les titres en inhibition de la neuraminidase.

< = < 100 ; > = > 10⁴ ; p = réaction partielle

souches	Date de l'isolement	Anticorps monoclonal anti A/PC/1/73 NC1	Anticorps monoclonaux anti SW/3633/84			
			NC17	NC22	NC84	NC42
A/PC/1/73		10 ⁻⁴	<	800	10 ⁴	2 000
sw/3633/84	05/06/84	500	2 000 ^a	>	1 600	1 600
sw/3649/84	19/06/84	500	4 000	>	10 ⁴	10 ⁴
sw/3650/84	20/06/84	400	4 000	10 ⁴	>	10 ⁴
sw/3655/84	19/06/84	500	1 000	>	10 ⁴	4 000
sw/3656/84	26/06/84	500	2 000	>	>	4 000
sw/3657/84	26/06/84	500	2 000	>	10 ⁴	2 000
sw/3764/84	09/11/84	500 ^p	1 000	10 ⁴	4 000	4 000
sw/3802/84	09/11/84	500 ^p	2 000	>	>	4 000
sw/3803/84	14/11/84	500 ^p	2 000	>	10 ⁴	4 000
sw/3937/84	26/11/84	500 ^p	1 000	>	10 ⁴	4 000
sw/4928/87	25/03/87	400	800	>	>	1 600
sw/4929/87	25/03/87	400	1 600	>	10 ⁴	1 600
sw/4955/87	31/03/87	<	600	10 ⁴	1 600	1 600
sw/5024/87	31/03/87	<	800	>	6 400	1 600
sw/5025/87	27/06/87	400	800	>	6 400	3 200
sw/5026/87	27/06/87	<	400	>	3 200	1 600
sw/5091/87	24/11/87	<	<	3 200	400	<
sw/5120/87	03/02/87	<	1 600	>	6 400	800
sw/5356/87	16/12/87	<	1 600	>	3 200	800
sw/6606/89	18/08/89	<	<	10 ⁴	1 600	<
sw/6607/89	25/08/89	<	<	>	1 600	<
sw/457/89	31/10/89	<	<	>	1 600	<
sw/458/90	03/01/90	<	<	>	2 400	<
sw/459/90	10/01/90	<	<	>	1 000	<
sw/460/90	30/01/90	<	<	>	1 600	<
sw/523/90	08/02/90	<	<	6 400	1 600	<
sw/524/90	08/02/90	<	<	>	1 600	<
sw/793/90	14/03/90	<	<	3 200	1 600	<
sw/794/90	03/04/90	<	<	6 400	1 200	<
sw/795/90	25/04/90	<	<	3 200	1 600	<

Mais la multiplication très importante des virus grippaux sur une vaste population réceptive entraîne l'apparition de nombreux mutants.

- La seconde a trait à la pratique de la vaccination. Si celle-ci est appliquée depuis 1986 dans les régions où les élevages porcins sont nombreux, elle n'est pas toujours correctement effectuée. En effet, si l'on prend le cas de la Bretagne où se trouvent réunis 85 à 90 % de la population porcine, 50 % des reproducteurs (soit 500.000 têtes environ) et 20 % des charcutiers (soit 2 millions d'animaux approximativement) sont vaccinés chaque année depuis 1985-1986. Mais, si les truies le sont correctement, recevant bien les 2 injections vaccinales annuelles à 3 semaines d'intervalle comme le recommande le fabricant [8], les charcutiers en revanche ne reçoivent qu'une injection, induisant une protection insuffisante pour limiter valablement la circulation du virus. Celui-ci pourrait donc aisément circuler et les éventuels mutants produits ne devraient pas être efficacement sélectionnés. En fait, une immunité incomplète doit avoir chez l'animal un effet sélectif, tout comme des doses subneutralisantes d'anticorps permettent *in vitro* la sélection de variants monoclonaux.

Les résultats de l'analyse antigénique de la souche A sw/6607/89 pourraient en outre suggérer que des phénomènes de recombinaison sont vraisemblablement également intervenus durant cette même période : cette souche, mise en évidence en 1989, possède en effet une hémagglutinine analogue à celle des virus de 1984 et une neuraminidase proche de celle des virus circulant en 1989. Or, elle a été isolée dans un élevage de Saône-et-Loire alors que les autres souches de la même période provenaient de Bretagne. On pourrait imaginer que dans les zones où les élevages de porcs sont peu nombreux, de petite taille et non vaccinés, des virus H₃ N₂ persistent sans subir de modification pendant plusieurs années et que l'un d'eux se soit recombiné avec un virus issu d'une région où la pression des anticorps s'est exercée. Pour confirmer une telle hypothèse, il eut fallu vérifier le maintien de virus non modifiés et, pour cela, disposer d'autres souches ayant été isolées dans des régions à faible densité porcine, ce que nous n'avons pu obtenir. Cependant, pour étayer l'hypothèse d'une recombinaison chez le porc, signalons que nous avons isolé par deux fois à un an d'intervalle, un virus H₁ N₂ chez cet animal en Bretagne [publication en cours].

Par ailleurs, il est bien connu que des échanges de virus grippaux entre le porc et les oiseaux sont possibles [1, 4, 14] et que ces derniers sont capables d'héberger et de multiplier les virus H₃ N₂ sans les modifier profondément [16, 20]. Le rôle des oiseaux pourrait donc être envisagé ; mais l'absence de données concernant ce sous-type de virus en France, tant chez les oiseaux domestiques que sauvages, ne permet pas d'étayer cette hypothèse.

En revanche, les données dont on dispose chez l'homme semblent exclure son implication dans l'évolution des gènes de l'hémagglutinine et de la neuraminidase des souches H₃ N₂ porcines. En effet, durant la période 1984-1990, les virus H₃ N₂ qui ont été isolés chez l'homme n'avaient qu'une faible parenté antigénique avec les virus H₃ N₂ qui ont circulé chez le porc. En outre, sérologiquement, aucune preuve du passage chez le porc de ces souches humaines récentes n'a pu être apportée.

Dans le cas de la souche A/sw/5091/87 qui possède une hémagglutinine du type de celle des souches circulant en 1987 mais une neuraminidase du type de celles qui seront isolées trois ans plus tard, on peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'un virus précurseur de la vague épidémique de 1989-1990.

Les deux souches A/sw/6607/87 et A/sw/5091/87 peuvent aussi être des virus illustrant le caractère hétérogène des mutations que l'on commence à bien connaître dans les souches humaines : seules les comparaisons de séquences nucléotidiques du gène de l'hémagglutinine permettront de trancher.

Le virus H₃ N₂ a circulé depuis 1984 par vagues épzootiques, subissant à deux reprises une éclipse pendant laquelle il se modifiait. Si ce phénomène ne peut à l'heure actuelle être expliqué, il n'est vraisemblablement pas dû à un relâchement de la surveillance épidémiologique car le virus H₁ N₁ a été isolé pendant ces mêmes périodes avec une fréquence similaire à celle des autres années.

En conclusion, les virus grippaux H₃ N₂ isolés du porc ont donc subi de 1984 à 1990 des modifications antigénique qui ont porté à la fois sur l'hémagglutinine et la neuraminidase, mettant en cause des mutations et, peut-être, des recombinaisons, processus analogues à ceux décrits pour les virus humains.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ANDRAL B., TOQUIN D., MADEC F., AYMARD M., GOURREAU J.M., KAISER C., FONTAINE M. and METZ M.H.- Diseases in Turkeys associated with H1 N1 influenza virus following an outbreak of the diseases in pigs. *Vet. Record*, 1985, **116**, 617-618.
- 2 AYMARD M., CHOMEL J.J., THOUVENOT D., GOURREAU J.M. et KAISER C.- Le diagnostic rapide de la grippe porcine grâce aux anticorps monoclonaux : Vième Colloque Franco-Soviétique sur la Grippe, Lyon, 19-20 juin 1986.
- 3 AYMARD-HENRY M., COLEMAN M.T., DOWDLE W.R., LAVER W.G., SCHILD G.C. and WEBSTER R.G.- Influenza neuraminidase and neuraminidase inhibition test procedures. *Bull. WHO*, 1973, **48**, 199-202.
- 4 AYMARD M., DOUGLAS A.R., FONTAINE M., GOURREAU J.M., KAISER C., MILLION J. and SKEHEL J.J.- Antigenic characterization of influenza A (H1 N1) viruses recently isolated from pigs and turkeys in France. *Bull. WHO*, 1985, **63**, 537-542.
- 5 AYMARD M., GOURREAU J.M., JAISER C., FONTAINE M., MADEC F. et TILLON J.P. - Les marqueurs immunovirologiques du risque d'influenza A H₃ N₂ chez les porcs. *Rev. Epidém. et santé publ.*, 1985, **33**, 283-291.
- 6 AYMARD-HENRY M. et SCHILD G.C.- Antigenic variation in the neuraminidase of human Influenza A strains : evidence of antigenic drift in neuraminidase predating changes in hemagglutinine. *Symp. series. Immunobiol. stand.*, 1973, **20**, 28-38.
- 7 BOTH G.W., SLEIGH M.J., COX N.J. and KENDAL A.P.- Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980 : multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J. Virol.*, 1983, **48** (1), 52-60.

- 8 BRUN A., VANDEPUTTE J. et CHEZE P.- Nouvelles données en matière de vaccination contre la grippe porcine. *Porc Magazine*, 1989, **221**, 102-104.
- 9 COX N.J., BLACK R.A. and KENDAL A.P.- Pathways of evolution of influenza A (H1 N1) viruses from 1977 to 1986 as determined by oligonucleotide mapping and sequencing studies. *J. Gen. Virol.*, 1989, **70**, 299-313.
- 10 DANIELS R.S., DOUGLAS A.R., SKEHEL J.J. and WILEY D.C.- Analyses of the antigenicity of influenza haemagglutinins at the pH optimum for virus-mediated membrane fusions. *J. Gen. Virol.*, 1983, **64**, 1657-1662.
- 11 GOURREAU J.M.- Grippe : épidémiologie, diagnostic et vaccination chez le porc. Séminaire ITP sur l'immunité de l'appareil respiratoire du porc. 8-9 novembre 1989, 120-135.
- 12 GOURREAU J.M., AYMARD M., KAISER C., FONTAINE M., VIGOUROUX A., SALINGARDES F., MADEC F., LABIE J. et TILLON J.P.- Utilisation de la technique de l'hémolyse radiale dans une enquête épidémiologique sur la grippe porcine en France. Proc. of the 3rd Intern. Symposium of the World Ass. of Vet. Laboratory Diagnosticians, 13-15/06/83, Ames (Iowa), 429-437.
- 13 GOURREAU J.M., KAISER C., HANNOUN C., VAISSAIRE J. et GAYOT G.- Premier isolement en France du virus de l'influenza du porc (HsWIN1) dans un environnement pathologique plurimicrobien. *Bull. Acad. Vét. de France*, 1980, **53**, 181-188.
- 14 HINSHAW W.S., WEBSTER R.G., BEAN W.J., DOWNIE J. and SENNE D.A.- Swine influenza like viruses in turkeys : potential source of viruses for humans ? *Science*, 1983, **220**, 206-208.
- 15 KENDAL A.P.- Epidemiologic implications of changes in the influenza virus genome. *Am. J. of Medicine*, 1987, **82** (suppl. 6A), 4-10.
- 16 KIDA H., KAWAOKA Y., NAEVE C.N. and WEBSTER R.G.- Antigenic and genetic conservation of H3 influenza virus in wild ducks. *Virology*, 1987, **159**, 109-119.
- 17 MADEC F., GOURREAU J.M., KAISER C. et AYMARD M.- Apparition de manifestations grippales chez les porcs en association avec un virus A H₃ N₂. *Bull. Acad. Vét. de France*, 1984, **57**, 513-522.
- 18 PALMER D.F., COLEMAN M.T., DOWDLE W.R. and SCHILD G.C.- Advanced Laboratory Techniques for Influenza diagnosis. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control Atlanta. *Immunology Series*, 1975, n° 6, 25-62 et 107-129.
- 19 SCHILD G.C., AYMARD-HENRY M., PEREIRA M.S., CHARRAVERTY P., DOWDLE W., COLEMAN M. and CHANG W.K.- Antigenic variation in current human type A Influenza viruses : antigenic characteristics of the variants and their geographic distribution. *WHO. Bull.*, 1973, **48**, 269-278.
- 20 SHORTRIDGE K.F., UNDERWOOD P.A. and KING A.P.- Antigenic stability of H3 influenza viruses in the domestic duck population of southern China. *Arch. Virol.*, 1990, **114**, 121-136.

- 21 SKEHEL J.J., STEVENS D.J., DANIELS R.S., DOUGLAS A.R., KNOSSOW M., WILSON I.A. and WILEY D.C.- A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong-Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, **81**, 1779-1783.
- 22 WEBSTER R.G. and LAVER W.G.- Antigenic variation of influenza viruses. In "The Influenza Viruses and Influenza". E.D. Kilbourne ed., Academic Press, New-York, 1975, 269-314.

Les auteurs remercient J.J. Skehel et A.R. Douglas (W.I.C., Londres) pour la fourniture des anticorps monoclonaux, et les laboratoires vétérinaires départementaux pour l'envoi des prélèvements.