

ETUDE DE L'INTERET DE PSEUDO-PARTICULES VIRALES H5N3 D'INFLUENZA AVIAIRE A DES FINS VACCINALES CHEZ LE CANARD

Prel Anne¹, Le Gall-Reculé Ghislaine¹, Nignol Anne-Cécile², Niqueux Eric¹,
Amelot Michel³, Jestin Véronique¹

AFSSA Site de Ploufragan-Brest – Zoopôle, BP 53 – 22440 PLOUFRAGAN

¹Unité de Virologie, Immunologie, Parasitologie Aviaires et Cunicoles ; ²Unité de Génétique virale et Biosécurité ; ³Service d'Elevage et d'Expérimentation en Pathologie Aviaire

RÉSUMÉ

Les virus d'influenza aviaire (AIV) de sous-type H5 faiblement pathogènes (FP) constituent une menace économique pour la filière avicole. Les canards domestiques peuvent jouer un rôle crucial dans leur transmission aux autres volailles. Bien qu'il ait été montré que la primo-vaccination avec un vaccin recombinant suivie d'un rappel avec un vaccin inactivé protégeait des canards domestiques vis-à-vis d'un AIV H5N1 hautement pathogène, leur vaccination vis-à-vis des infections FP est peu documentée. Toutefois, la substitution d'un vaccin inactivé par un vaccin sous-unitaire tel que des pseudo-particules virales (VLPs) constituées principalement des protéines immunogènes virales (hémagglutinine et neuraminidase) pourrait être plus avantageuse. De plus, l'association de la protéine de matrice M2 pourrait être intéressante, d'autant que cette dernière confère une protection croisée plus large chez la souris. Nous avons généré, en recourant au système d'expression baculovirus, des VLPs morphologiquement identiques à un virus influenza sauvage et exprimant à leur surface les protéines H5 et N3 antigéniques et biologiquement actives d'une souche française d'AIV FP. Un premier essai d'immunisation par voie sous-cutanée chez le canard de Barbarie EOPS (avec 2 et 20 µg de protéines totales) induit des taux d'anticorps inhibant l'hémagglutination H5 (antigène homologue) considérés protecteurs sur la base de données publiées. Selon le même procédé d'expression, des VLPs exprimant, en plus des précédentes, une protéine M2 antigénique ont été également obtenues. Une étude comparée des différentes VLPs et des réponses immunitaires induites lors de leur inoculation chez des canards a été réalisée. Les perspectives de prolongation de ces travaux sont discutées.

ABSTRACT

Low-pathogenic (LP) avian influenza viruses (AIV) of the H5 subtype remain an economic threat to commercial poultry. Domestic ducks can play crucial roles in their transmission to other poultry. Although prime boost vaccination using, respectively, a recombinant vaccine and an inactivated vaccine was shown to be protective in ducks against H5N1 highly pathogenic AIV, their vaccination against H5 LPAIV is poorly documented. However, substituting inactivated vaccine with subunit vaccine such as virus-like-particles (VLPs) mainly composed of viral immunogenic proteins (haemagglutinin and neuraminidase) might be more advantageous. In addition, association of the immunogenic matrix protein M2 could be interesting since this protein induces a broader cross-protection in mice. By using the baculovirus expression system, we generated VLPs that were morphologically identical to the wild-type influenza virus and that expressed the H5 and N3 proteins of a French LPAIV on their surface. These proteins were shown to be antigenic and biologically active. A first experimental assay of immunisation by subcutaneous inoculation in specific pathogen free Muscovy ducks (with 2 and 20 µg of proteins) induce haemagglutination-inhibiting H5 antibody rates (homologous antigen) that were shown to be protective according to published data. By using the same expression system, we generated VLPs composed of the antigenic M2 protein in addition to the previous ones. A comparative study of the different VLPs and the immune responses induced by their inoculation in ducks was realised. The prospects for extension of this work are discussed.

INTRODUCTION

Les influenza virus aviaire (AIV) constituent une menace économique pour la filière avicole. Désormais, les infections à AIV faiblement pathogènes (FP) de sous-type H5/H7 sont à déclaration obligatoire car ces virus peuvent muter en une forme hautement pathogène (HP) pouvant conduire à de sérieux problèmes pour la santé animale et de graves conséquences pour la santé humaine. Les canards domestiques peuvent jouer un rôle crucial dans la transmission des AIV notamment H5 FP aux autres volailles (Cherbonnel *et al.*, 2007) et il est nécessaire de prévenir leur introduction.

La vaccination est officiellement reconnue comme un outil supplémentaire possible de contrôle de l'influenza aviaire. Cependant, bien qu'il ait été montré que la primo-vaccination avec un vaccin recombinant suivie d'un rappel avec un vaccin inactivé améliorerait la protection induite par les seuls vaccins inactivés et protégeait des canards domestiques notamment vis-à-vis d'un AIV H5N1 HP (van den Berg, 2008), peu de données existent sur la vaccination des canards vis-à-vis des infections H5 FP. Afin de contribuer à l'acquisition de nouvelles données, il est paru intéressant d'entreprendre des recherches pour tester, notamment en vaccination de rappel, un vaccin sous-unitaire correspondant à des protéines virales, principalement des protéines immunogènes (hémagglutinine HA et neuraminidase NA), reconstituées sous la forme de pseudo-particules virales (VLPs) et dénuées d'acide nucléique. Les VLPs se sont montrées très immunogènes pour divers modèles viraux (Noad et Roy, 2003). Par ailleurs, leur utilisation permet de différencier les animaux infectés des animaux vaccinés en recherchant les anticorps dirigés contre les protéines non incluses dans le vaccin sous-unitaire (stratégie DIVA). Enfin, le procédé permettant d'obtenir des VLPs d'influenza est devenu accessible depuis les travaux de Latham et Galarza (2001) en recourant au système d'expression en baculovirus.

En nous basant sur les différentes stratégies utilisant ce système d'expression disponibles depuis 2001 dans la littérature mais parfois contradictoires, nous avons entrepris de développer des VLPs d'AIV H5N3 FP immunogènes composées des 2 protéines structurales HA et NA et de la protéine de matrice M1 (Prel *et al.*, 2008). Un premier essai d'immunisation chez le canard a été réalisé pour vérifier leur intérêt vaccinal. Selon le même procédé d'expression, nous avons produit plus récemment des VLPs contenant en plus la protéine M2 antigénique. En effet, cette protéine, outre le rôle qu'elle jouerait dans l'assemblage du virus, est très conservée parmi les différents sous-types d'influenza virus et peut être considérée comme une protéine immunogène à spécificité large. Sa présence avec les protéines HA et NA dans la

composition d'un vaccin pourrait permettre d'induire une protection croisée plus importante vis-à-vis d'une épreuve virale hétérologue.

La présente communication décrit l'obtention et la caractérisation de 2 types de VLPs d'influenza virus aviaire H5N3 FP et compare les différentes données acquises, notamment en terme d'immunisation de canards.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Génération de baculovirus triple et quadruple recombinants

Le système d'expression en baculovirus ("Bac to Bac baculovirus expression system", Invitrogen) a été utilisé pour produire des baculovirus recombinants exprimant les protéines d'intérêt. Les gènes HA et NA de la souche A/duck/France/02166/2002 (H5N3) ainsi que le gène de matrice M de la souche A/chicken/Italy/1067/99 (H7N1) (Dr I. Capua, IZS, Legnaro-Padova, Italie) (n° d'accèsion dans Genbank : AJ632268, AJ849934 et AJ416630, respectivement) ont été clonés dans un plasmide baculovirus comme décrit dans Prel *et al.* (2008). Des bactéries compétentes ont été transformées par le plasmide recombinant obtenu (pMH5N3-2) afin de générer un bacmide triple recombinant permettant, après transfection de cellules d'insectes Sf9, d'obtenir un baculovirus triple recombinant. L'expression des protéines HA, NA et M1 dans les cellules Sf9 infectées par le baculovirus triple recombinant a été recherchée par immunofluorescence à l'aide de 2 sérums monovalents H5 et N3 de la souche H5N3/02166 (Prel *et al.*, 2007a) et d'un anticorps monoclonal anti-M1 (ATCC HB 64).

Pour générer le baculovirus quadruple recombinant exprimant en plus la protéine M2, le gène M2 de la souche A/chicken/Italy/1067/99 (H7N1) a été cloné dans le plasmide triple recombinant pMH5N3-2 comme décrit dans Prel *et al.* (2007b). L'étude de l'expression des protéines dans les cellules Sf9 infectées a été aussi réalisée par immunofluorescence avec, pour M2, l'utilisation d'un sérum monovalent produit sur poulets à l'aide d'un peptide issu d'un virus de sous-type H5.

1.2. Purification des VLPs

Les surnageants de culture des cellules Sf9 infectées soit par le baculovirus triple recombinant, soit par le baculovirus quadruple recombinant ont été récoltés 3 jours post-infection, concentrés puis purifiés par ultracentrifugation sur un gradient de coussins de saccharose 20%-30%-50%. L'interface 30%-50% a été prélevée puis les VLPs ont été mises au culot par ultracentrifugation et reprises en PBS.

1.3. Microscopie électronique

Un aliquote de chaque type de VLPs purifiées a été incubé avec du sérum de poulet immunisé avec la souche H5N3/02166 (dilué au 1/10), adsorbé sur une grille destinée à la microscopie électronique à transmission, puis observé au microscope (JEOL).

Afin d'analyser la composition des spicules, des grilles adsorbées avec des VLPs obtenues avec le baculovirus triple recombinant et préalablement incubées avec un sérum spécifique soit de H5 soit de N3, ont été mises en contact avec un anticorps anti-IgG de poulet marqué avec des billes d'or (Sigma Aldrich), puis observées en microscopie électronique.

1.4. Caractérisation des protéines composant les VLPs

Pour caractériser les protéines présentes dans chaque type de VLPs, un aliquote de 10 µl de VLPs purifiées a été sujet à électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) coloré au bleu de Coomassie. Un second aliquote a été analysé en western blot vis-à-vis d'un sérum de poulet hyperimmun H5N1/02166 permettant de caractériser la protéine H5 et d'un anticorps monoclonal anti-M1.

La présence et l'activité de la protéine N3 ont été recherchées à l'aide d'un test d'inhibition de la neuraminidase utilisant la fétuine comme substrat.

L'activité hémagglutinante des VLPs a été testée par un test d'hémagglutination réalisé selon la technique décrite dans la norme française AFNOR NFU 47.011.

1.5. Immunisation de canards EOPS et test IHA

Deux essais expérimentaux ont été menés sur des canards de Barbarie EOPS en animalerie protégée afin d'estimer les réponses immunitaires induites par les 2 types de VLPs. Pour chaque essai, 500 ml de culture de cellules Sf9 ont été infectés avec soit du baculovirus triple recombinant, soit du baculovirus quadruple recombinant. Les surnageants cellulaires ont été purifiés comme décrit précédemment. La concentration en protéine a été estimée à l'aide d'un test colorimétrique utilisant la méthode du BCA (MicroBC Assay, Uptima).

Quinze canards âgés de 3,5 semaines ont été séparés en 3 lots. Le premier lot a été utilisé comme témoin et les canards n'ont reçu aucune injection. Les canards du second et du troisième lot ont été inoculés en sous-cutané deux fois à 3 semaines d'intervalle avec respectivement environ 20 et 2 µg de VLPs adjuvées dans une émulsion eau dans l'huile fournie par Merial (protéine totale par dose). Des échantillons de sang ont été prélevés sur 5 animaux avant la primo-immunisation, puis sur tous avant le rappel puis à l'abattage, 3 semaines après le rappel.

Pour estimer le taux d'anticorps anti-H5, chaque sérum a été analysé à l'aide d'un test d'inhibition de

l'hémagglutination (IHA) réalisé selon la technique décrite dans la norme française AFNOR NFU 47.011 en utilisant 4 unités hémagglutinantes d'antigène A/duck/France/02166/2002 inactivé.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Evaluation de l'expression des protéines recombinantes et de la formation de VLPs influenza H5N3

Les analyses menées en immunofluorescence sur les cellules infectées par le baculovirus triple recombinant ou quadruple recombinant ont confirmé l'expression des protéines HA et NA et à un plus faible degré de la protéine M1. Cependant, pour les cellules infectées par le baculovirus quadruple recombinant, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'expression de la protéine M2.

Les observations en microscopie électronique des surnageants de culture de cellules Sf9 infectées purifiés sur un gradient de saccharose ont révélé dans les 2 cas la présence de nombreuses VLPs ressemblant en forme et en taille à des particules virales d'influenza (Figure 1). Ce résultat montre que les protéines exprimées s'assemblent et bourgeonnent des cellules d'insecte infectées pour être libérées sous forme de VLP dans le surnageant cellulaire. Toutefois, comparées aux VLPs obtenues avec le baculovirus triple recombinant, celles obtenues avec le baculovirus quadruple recombinant semblent mieux structurées, suggérant que la protéine M2 améliore leur assemblage. Ces résultats devront être confirmés par d'autres observations.

Les images en microscopie électronique après immunomarquage des VLPs obtenues avec le baculovirus triple recombinant ont confirmé que les spicules présents à leur surface correspondaient bien à des protéines H5 et N3. Par ailleurs, grâce aux résultats positifs obtenus après les tests d'hémagglutination et d'inhibition de la neuraminidase, nous avons montré que ces 2 protéines, comme celles des VLPs obtenues avec le baculovirus quadruple recombinant, étaient biologiquement actives.

Les analyses menées parallèlement en SDS-PAGE pour détecter les protéines présentes dans les VLPs ont montré la présence des protéines HA, NA et plus faiblement de M1 (Figure 2). Pour les protéines obtenues avec le baculovirus quadruple recombinant, seule la protéine M2 n'a pas été visualisée. Cependant cette technique de détection au bleu de Coomassie n'est pas très sensible. Par ailleurs, l'étude en Western-blot des 2 types de VLPs vis-à-vis des protéines H5, M1 et M2, confirment clairement la présence de HA et de M1. Par contre, la présence de M2 n'a pas pu être mise en évidence ni dans les VLPs

issues du baculovirus quadruple recombinant, ni au niveau de l'antigène témoin H5N3. Bien que cette protéine soit peu abondante à la surface des particules virales et pourrait être aussi peu abondante dans les VLPs, ce résultat, comme celui obtenu en immunofluorescence sur les cellules infectées, pourrait s'expliquer par l'utilisation d'un sérum peu riche en anticorps ou peu adapté au sous-type H7, plutôt qu'à l'absence d'expression et de présence dans les VLPs de la protéine M2. L'obtention récente d'un sérum monovalent M2 spécifique du sous-type H7 produit sur poulet devrait permettre de vérifier ces données.

2.2. Etude de la réponse immune anti-HA chez les canards inoculés avec des VLPs

L'immunité anti-HA chez des canards de Barbarie EOPS induite par les VLPs obtenues dans un premier temps avec le baculovirus triple recombinant a été recherchée en IHA vis-à-vis de l'antigène H5N3 homologue (Prel *et al.*, 2008). Comme attendu, aucun anticorps anti-H5 n'a été détecté chez l'ensemble des canards avant la première inoculation et chez les canards du lot témoin par la suite. Après la primo-inoculation, tous les animaux ont développé des taux d'anticorps qui ont augmenté après l'inoculation de rappel. A l'abattage et quelle que soit la dose de protéine inoculée, tous les canards présentaient des taux d'anticorps positifs en IHA ($\geq 4 \log_2$). Par ailleurs, les moyennes géométriques des titres IHA à l'abattage des 2 lots de canards inoculés étaient très proches (5,2 et 5,4 \log_2 pour 2 et 20 μg de protéines inoculées, respectivement), montrant qu'une quantité de protéine 10 fois plus importante n'a pas augmenté de façon significative la réponse immune. De plus, l'écart-type au niveau de chaque moyenne est resté faible, soulignant l'absence de variation individuelle de la réponse immune.

L'essai expérimental préliminaire réalisé dans un second temps avec les VLPs obtenues du baculovirus quadruple recombinant a révélé dès la primo-vaccination la présence d'anticorps anti-HA chez les canards inoculés quelle que soit la dose de protéine et ce, à des valeurs similaires à celles obtenues lors de l'essai précédent. Cependant, malgré une montée d'anticorps après l'inoculation de rappel, les moyennes géométriques obtenues ont été inférieures à celles précédemment observées même si la majorité des animaux présentaient des taux d'anticorps positifs en IHA ($\geq 4 \log_2$). Ce résultat peut s'expliquer par un sous-dosage du taux de protéine inoculé lors du rappel. Il n'a donc pas été possible de mettre en évidence une augmentation significative de la réponse immune des animaux inoculés avec des VLPs possédant en plus la protéine M2.

Ces résultats, même préliminaires, confirment l'activité biologique et l'immunogénicité chez le canard de la protéine HA présente au niveau des 2

types de VLPs. Les taux d'anticorps induits par les 2 doses en protéines testées suggèrent qu'une vaccination avec seulement 2 μg de protéine soit suffisante pour immuniser significativement des canards. Par ailleurs, l'inoculation des VLPs obtenues avec le baculovirus triple recombinant a permis d'induire des titres IHA similaires à ceux montrés comme étant protecteurs chez le canard. En effet, lors d'une précédente étude, nous avons immunisé des canards de Barbarie avec des lysats de cellules Sf9 infectées avec un autre type de baculovirus triple recombinant exprimant les mêmes protéines H5, N3 et M1 que celles de la présente étude. Cet essai avait pour but d'estimer la protection apportée suite à une épreuve virale avec la souche A/duck/France/02166/2002 (Prel *et al.*, 2007). Les animaux vaccinés possédaient des titres IHA en moyenne de 5,9 \log_2 . Après épreuve, ces animaux ont présenté une diminution significative de l'excrétion virale cloacale et un retard dans le pic d'excrétion trachéale.

Des essais expérimentaux de protection homologue et hétérologue faisant intervenir un plus grand nombre d'animaux devraient être prochainement programmés pour confirmer l'intérêt vaccinal des VLPs chez les canards et vérifier si l'ajout de la protéine M2 peut induire une protection croisée plus large et améliorer ainsi la protection croisée.

CONCLUSION

L'obtention pour la première fois de VLPs d'influenzavirus aviaire de sous-type H5 FP immunogènes chez le canard devrait permettre le développement de vaccins sous-unitaires non infectieux et efficaces pour contrôler la diffusion de ces virus chez cette espèce. Par ailleurs dans ce modèle, il est possible de produire de nouvelles VLPs en remplaçant les gènes H5 et/ou N3 des constructions plasmidiques par des gènes de sous-types adaptés au contexte épidémiologique.

L'utilisation de VLPs permet aussi d'envisager une immunisation des animaux par voie mucosale. En effet, les influenza virus sont des virus à tropisme respiratoire et les réponses immunes au niveau de ces muqueuses constituent une ligne de défense précoce et importante vis-à-vis d'un tel agent pathogène. Il serait donc intéressant d'étudier la réponse immune induite chez des canards inoculés par voie intranasale avec les VLPs produites dans cette étude.

De même, nos résultats rendent possible l'utilisation chez le canard de VLPs comme vaccination de rappel par voie parentérale ou mucosale suite à une primo-vaccination avec un vaccin recombinant. Dans le cadre du projet européen NOVADUCK portant sur l'étude de nouveaux vaccins recombinants chez le canard vis-à-vis des influenza virus aviaires de sous-

type H5 faiblement ou hautement pathogènes et auquel notre équipe participe, un essai expérimental sera mené quand le vaccin recombinant destiné à cette

espèce et actuellement en préparation sera disponible. Ces travaux permettront d'évaluer l'efficacité d'un tel schéma vaccinal.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Merial pour la fourniture de l'adjuvant huileux ayant servi à immuniser les canards.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cherbonnel, M., Lamandé, J., Allée, C., Schmitz, A., Ogor, K., Le Gall-Reculé, G., Le Bras, M.O., Guillemoto, C., Pierre, I., Picault, J-P., Jestin, V., 2007. Avian Dis., 51:408-413.
Latham, T., Galarza, J.M., 2001. J Virol 75:6154-6165.
Le Gall-Reculé, G., Cherbonnel, M., Pelotte, N., Blanchard, P., Morin, Y., Jestin, V. 2007. Avian Dis., 51:490-494.
Noad, R, Roy, P., 2001. Trends in Microbiol., 11:438-444.
Prel, A., Le Gall-Reculé, G., Cherbonnel, M., Grasland, B., Amelot, M., Jestin, V., 2007a. Avian Dis., 51:484-489.
Prel, A., Le Gall-Reculé, G., Jestin, V., 2007b. *1st annual meeting of EPIZONE, 29 May-1st June, Lublin-Pullawy, Poland.*
Prel, A., Le Gall-Reculé, G., Jestin, V., 2008. Avian Pathol 37 (5), 513-520.
van den Berg, T., Lambrecht, B., Marche, S., Steensels, M., van Borm, S., Bublot, M., 2008. Comp. Immunol. Microbiol. and Infectious Dis., 31:121-165.

Figure 1. Immuno-microscopie électronique de VLPs d'influenza aviaire H5N3 purifiées produites par l'auto-assemblage des protéines A) HA, NA et M1, B) HA, NA, M1 et M2. Echelle = 100 nm

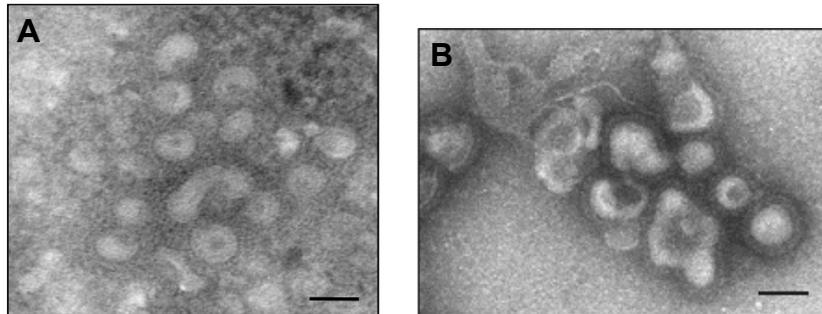


Figure 2. Gel d'électrophorèse de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) coloré au bleu de Coomassie réalisé avec 10 µl de VLPs composées des protéines HA, NA et M1, purifiées (colonne 1). Marqueur de poids moléculaire en kDa (colonne 2).

