



42^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 17 mars 2016

Impact de l'âge et des anticorps maternels sur la réponse immunitaire humorale induite par la vaccination contre la grippe équine chez des poulains Pur-Sang

S. Fougerolle^{1,2,3,4}, L. Legrand^{1,2,3,4}, D. Garrett⁵, M. Foursin⁶, X. D'Ablon⁷, P. Bayssat⁸, R. Newton⁵, S. Pronost^{1,2,3,4}, R. Paillot^{2, 3, 4, 5}

¹ Laboratoire LABEO Frank Duncombe, 1 route de Rosel, 14053 Caen Cedex 4, France

² Université de Caen Basse-Normandie, 14000 Caen, France

³ Unité de Recherche des Risques Microbiens (U2RM), EA 4655, 14032 Caen, France

⁴ Fondation Hippolia, La Maison du cheval, 6 avenue du Maréchal Montgomery, 14000 Caen, France

⁵ Animal Health Trust, Centre for Preventive Medicine, Lanwades Park, CB8 7UU, Kentford Newmarket, United Kingdom

⁶ Clinique Equine de la Boisrie, La Boisrie, 61500 Chailloué, France

⁷ Clinique Vétérinaire de la Côte Fleurie, Route de Paris – Bonneville sur Touques, 14800 Deauville, France

⁸ Clinique Vétérinaire de Bayeux, Route de la Cambette, 14400 Bayeux, France

Stephanie.fougerolle@calvados.fr

Résumé

Chaque année, plusieurs épizooties de grippe équine (ou virus influenza équin) sont rapportées à travers le monde. La vaccination contre la grippe équine reste à ce jour un des moyens de prévention les plus efficaces. Cependant, tous les chevaux ne développent pas une réponse immunitaire optimale après immunisation, augmentant ainsi le risque d'infection. Les objectifs de cette recherche sont de mieux comprendre la notion de faible répondeur au cours de la vaccination contre le virus influenza équin. La réponse immunitaire en anticorps a été mesurée sur 117 poulains pur-sang répartis dans 3 haras au cours de la primo-vaccination (correspond aux trois premières injections) contre le virus influenza équin. Cette étude a permis de mettre en avant que l'âge des poulains au moment de la première immunisation avec le vaccin (vecteur recombinant canarypox influenza équin) joue un rôle important dans l'établissement de la réponse anticorps. Une immunisation trop précoce semble induire une réponse anticorps sous optimale, en deçà des taux décrits comme étant protecteurs.

Mots clés : influenza équin, vaccination, âge, vaccin vecteur recombinant canarypox

Summary

Every year, several equine Influenza epidemics are reported worldwide. Equine influenza vaccination is the most efficient method of prevention. However, not all horses develop sufficient immunity after equine influenza immunization, increasing the risk of infection, infectious virus excretion and the spread of the disease. This study aimed to better understand poor vaccine response mechanisms during the primary equine influenza vaccination. The equine influenza humoral immune response was measured in 117 Thoroughbred foals set in 3 different stud farms after the primary course of equine influenza vaccination. This study has highlighted that the age of foals at first immunization plays an important role in the establishment of an adequate antibody levels. Too early immunization seems to induce a humoral response suboptimal, below the levels considered as protectors.

Key-words: equine influenza, vaccination, age, canarypox-based vaccine



Introduction

Le virus influenza équin, plus communément appelé virus de la grippe équine, est le pathogène respiratoire le plus important des équidés notamment en raison des pertes économiques considérables que ces épizooties peuvent entraîner (Cullinane *et al.* 2013).

Chez le cheval l'infection par le virus grippal se traduit par une forte contagiosité et entraîne divers symptômes tels que de la toux, de la température, du jetage etc... De rares cas de mortalité sont décrits, le plus souvent dus à une infection secondaire par des bactéries. Bien qu'il existe des vaccins depuis les années soixante, des épidémies sont enregistrées dans de nombreux pays tels que la Suède, le Japon, l'Australie et la France. La vaccination reste pour autant l'une des méthodes de prévention les plus efficaces à ce jour.

Toutefois, tous les chevaux ne développent pas une immunité protectrice après immunisation contre le virus influenza équin (Paillot 2014). En effet, une réponse sous-optimale suite à la vaccination est un phénomène bien connu. Ces chevaux, appelés faibles répondeurs à la vaccination, sont partiellement protégés et peuvent développer une forme sub-clinique de la maladie. Ces chevaux peuvent également excréter de grandes quantités de virus infectieux sur une période de temps significative, et ainsi contribuer à la propagation de la maladie. Une protection partielle, du fait d'une faible réponse à la vaccination, n'aura pas comme seuls impacts de réduire l'immunité globale de l'effectif et de conduire à la maladie, mais pourra également favoriser la dérive antigénique du virus influenza conduisant ainsi à une rupture de la réponse vaccinale à moyen et à long terme. En effet, l'émergence de nouveaux variants est due à une pression de sélection induite par les défenses immunitaires de l'hôte aboutissant à l'accumulation de mutations au niveau des glycoprotéines de surface (cibles des anticorps). Ces modifications sont à l'origine de la dérive antigénique qui permet d'expliquer pourquoi les virus isolés chaque année n'ont pas les mêmes propriétés antigéniques et qu'il y a nécessité de réaliser régulièrement des mises à jour des souches entrant dans la composition des vaccins.

Cette étude a pour but de mieux comprendre les mécanismes de faibles réponses vaccinales au cours de la primo-vaccination à travers 2 objectifs : l'évaluation de la fréquence des faibles répondeurs chez les poulains Pur-Sang en France et l'identification des facteurs influençant les réponses en anticorps protecteurs.

Cette problématique a été classée comme une priorité pour la filière lors du dernier congrès mondial d'infectiologie à Lexington (9th International Conference on Equine Infectious Diseases, Lexington, USA October 2012).

1 Matériels et méthodes

L'étude s'est déroulée sur deux années. Trois haras ont participé à la première année d'étude et deux d'entre eux ont poursuivi la deuxième année (Haras 1 et Haras 2). Sur cette dernière année, seuls les résultats du Haras 1 ont été analysés et ceux du Haras 2 sont actuellement en cours d'exploitation.

1.1 Animaux

Année 1 (juillet 2013 – octobre 2014) : l'étude a été effectuée sur une population de 117 poulains Pur-Sang non vaccinés situés dans 3 haras privés différents (H#1 à H#3) en Basse-Normandie. L'âge au moment de la première injection vaccinale (V1) est compris entre 119 et 259 jours ($159,3 \pm 27,6$ jours ; 17 à 37 semaines) (tableau 1).

Année 2 (août 2014 – mars 2015) : l'étude a été effectuée sur une population de 78 poulains Pur-Sang non vaccinés dans le H#1 et dans le H#2. L'âge à V1 est compris entre 142 et 249 jours ($189,8 \pm 22,4$ jours ; 20,3 à 35,6 semaines) (tableau 1). Le nombre de poulains enrôlés dans l'étude était dépendant de la disponibilité des individus sur le terrain.

Tableau 1 : Age à V1 et nombre de poulains par haras
Table 1: Age at V1 and number of foals per stud farm

	Haras 1	Haras 2	Haras 3
Age en jours à V1 (moyenne \pm écart-type)	143,9 \pm 16,3	197,1 \pm 37,7	157,2 \pm 11,7
Nombre de poulains (année 1)	45	21	51
Nombre de poulains (année 2)	54	24*	0

(*) les résultats pour ce haras étant en cours d'analyse, ils ne seront pas présentés dans cet exposé.

1.2 Vaccin et calendrier d'immunisation

Sur les 2 années d'études, un vaccin vecteur recombinant canarypox influenza équin (Proteqflu-TE ; Merial) a été utilisé dans les 3 haras (année 1) et dans le H#1 (année 2).

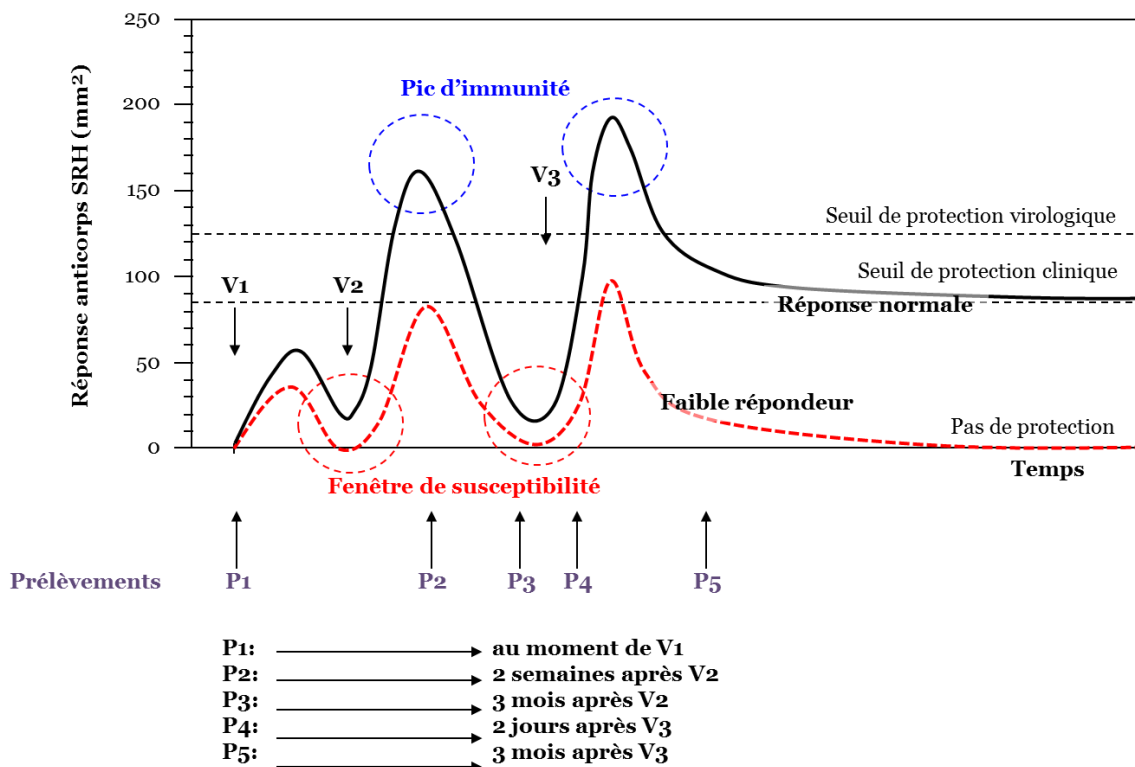
Les vaccins ont été administrés par injection intramusculaire profonde en accord avec les recommandations des industriels. Les poulains reçoivent deux immunisations (V1 et V2), à 4 à 6 semaines d'intervalle ($30,96 \pm 3,71$ jours pour l'année 1 et $38,03 \pm 5,21$ jours pour l'année 2) et une troisième dose (V3), 6 mois après V2 ($177,65 \pm 11,35$ jours pour l'année 1 et $179,68 \pm 1,71$ jours pour l'année 2). Suite à l'analyse des résultats, les poulains du H#1 recevront une immunisation de rappel (V4) à $164,96 \pm 31,01$ jours. Le choix du vaccin et du calendrier d'immunisation associé a été défini par les praticiens vétérinaires participant à cette étude.

1.3 Échantillons de sérums et sérologie

Le calendrier de prélèvement a été défini en collaboration avec les vétérinaires praticiens afin de minimiser l'impact des procédures sur les animaux. Les échantillons de sérums sont prélevés au moment de la première vaccination (V1) pour évaluer la présence d'anticorps maternels (P1) ; deux semaines après la deuxième immunisation (V2) pour mesurer la réponse en anticorps au pic d'immunité (P2) ; trois mois après V2 (P3) et deux jours après la troisième immunisation (V3 ; P4) pour évaluer la fenêtre de susceptibilité entre V2 et V3. Trois mois après V3 (P5) pour identifier les individus qui n'arrivent pas à maintenir leur titre en anticorps SRH au niveau de protection (ces animaux sont potentiellement des faibles répondeurs à la vaccination contre le virus influenza équin) (Figure I).

Figure I : Schéma classique de la réponse anticorps au cours de la primo-vaccination contre la grippe équine

Figure I: Classic pattern of antibody response during the primary vaccination against equine influenza



Les anticorps contre la souche du virus influenza équin A/eq/Jouars/4/06 (H3N8 ; Floride Clade 2) ont été mesurés par test SRH (Single Radial Haemolysis). Un antisérum de contrôle de l'European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM) a été inclus sur chacune des plaques. Les titres en anticorps SRH sont exprimés en mm² (surface d'hémolyse mesurée). Une augmentation d'au moins 25 mm² ou de 50% dans l'aire de la zone d'hémolyse a été considérée comme significative. Une faible réponse à la vaccination correspond à toute valeur de réponse en anticorps SRH inférieure à 85 mm² (seuil de protection clinique).



1.4 Analyses statistiques

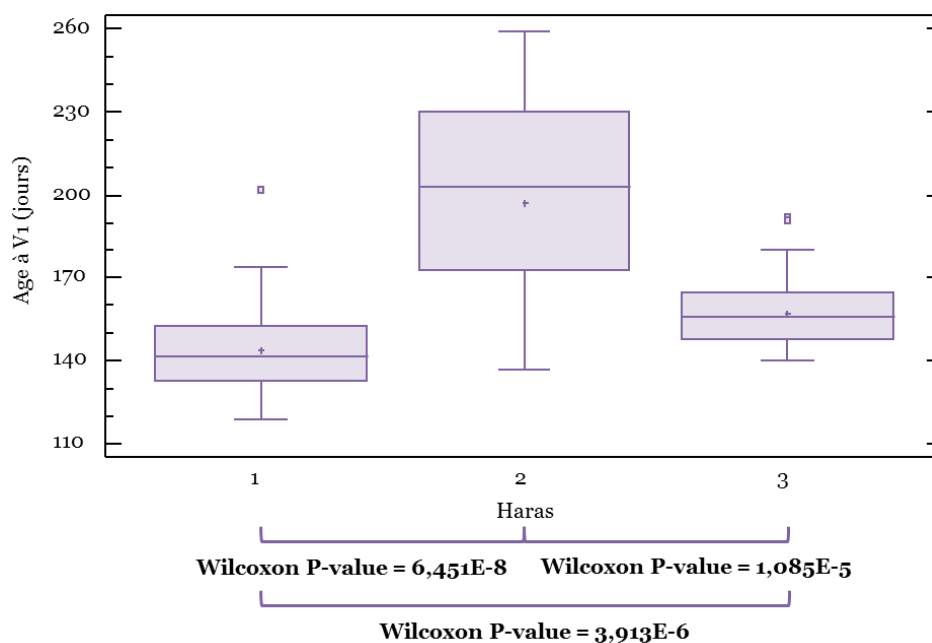
Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Centurion XVI, version 16.1.12 (StatPoint Technologies, Inc). Sur la base du test de normalité de la distribution du groupe, le test t de Student ou le test des rangs signés de Wilcoxon ont été utilisés pour comparer les groupes aux points de prélèvements spécifiques. Le niveau de significativité a été fixé à $p\text{-value} < 0,05$.

2 Résultats

2.1 Réponse en anticorps SRH dans les haras de l'étude

Différentes stratégies de vaccination ont été appliquées dans les différents haras. Les Haras 1 et 3 ont vacciné leurs effectifs en les regroupant par mois de naissance. Les poulains ont en moyenne reçu leur première vaccination à environ 4,5 mois d'âge pour le Haras 1 et à environ 5 mois d'âge pour le Haras 3 (Figure II). Tandis que le Haras 2 a fait le choix de vacciner l'ensemble des poulains, 6 mois après la dernière naissance de l'année. Ces différentes stratégies de vaccination, nous ont conduit à observer des différences significatives entre les âges à la première vaccination entre les haras, comme indiqué dans la Figure I.

Figure II : Age à la première vaccination
Figure II: Age at first immunization

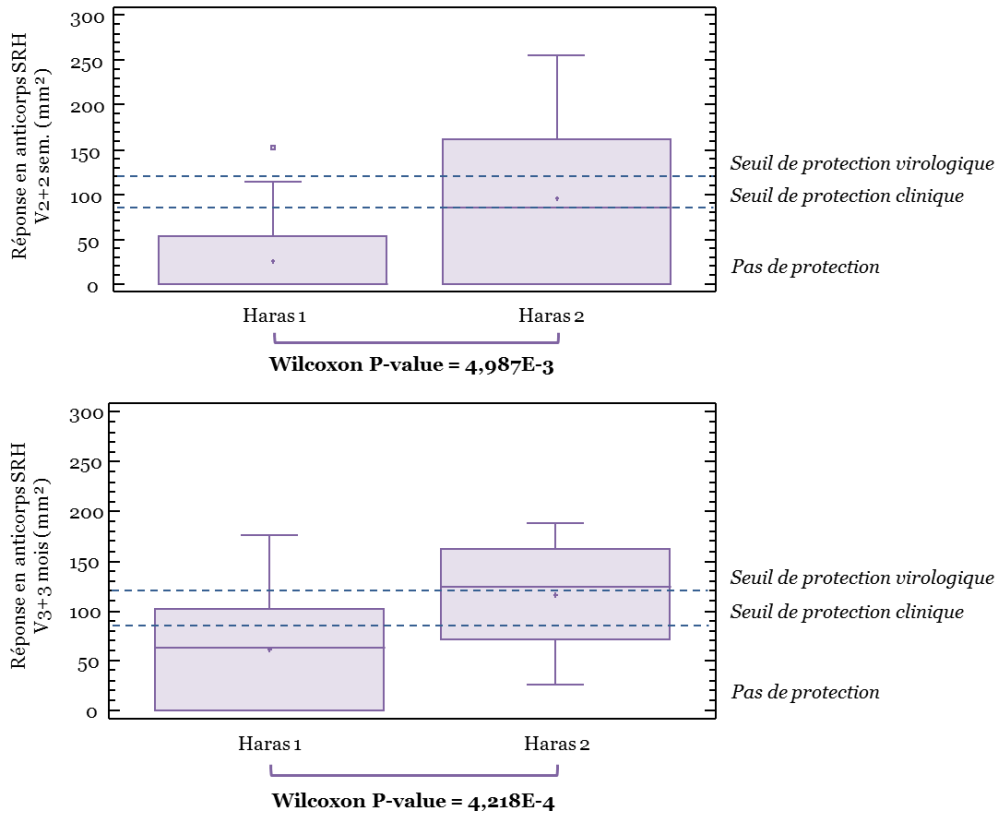


Les différences statistiques significatives sont indiquées en gras.

Les réponses en anticorps SRH mesurées au cours de la primo-vaccination contre la grippe équine sont différentes entre les haras. L'analyse individuelle des haras a montré que les titres en anticorps SRH mesurés dans le Haras 1 étaient significativement différents de ceux mesurés dans le Haras 2 (Figure III), avec une grande proportion de poulains (65,9% de l'effectif) ne présentant aucun titre en anticorps SRH à V2 + 2 semaines dans le Haras 1 à la différence du Haras 2 où cette proportion est nettement moins importante (34,8% de l'effectif). Seul le Haras 2 (Figure III) a montré une moyenne des réponses en anticorps SRH atteignant le seuil de protection clinique aussi bien à court-terme (V2 + 2 semaines) qu'à moyen-terme (V3 + 3 semaines).



Figure III : Réponse en anticorps SRH
Figure III: SRH antibody response

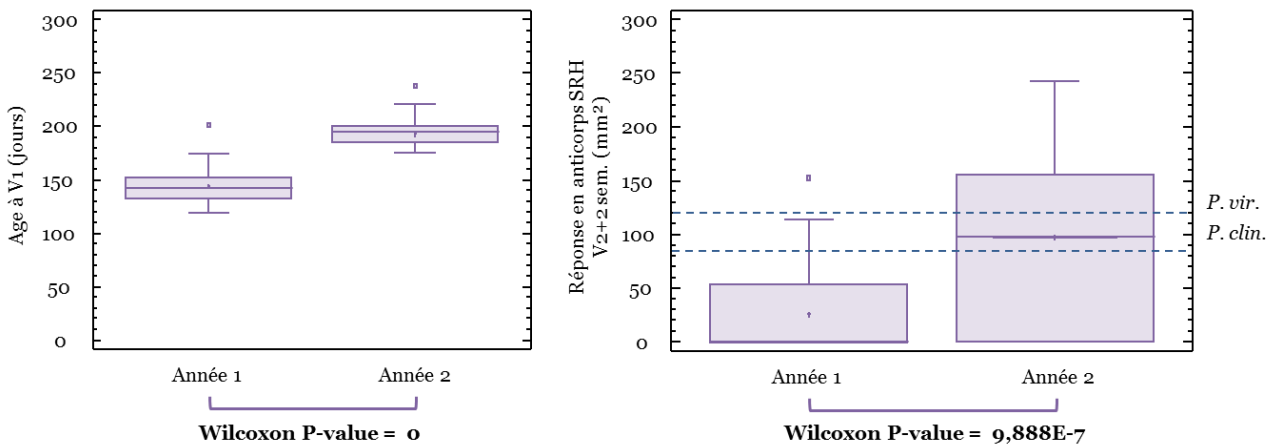


Les différences statistiques significatives sont indiquées en gras, avec W = test des rangs signés Wilcoxon. Les lignes en pointillées représentent les seuils de protection contre les signes cliniques induits par la maladie (>85 mm²).

2.2 Modification du calendrier vaccinal dans le Haras 1

Au vu des résultats obtenus dans le Haras 1, le calendrier vaccinal a été modifié sur décision du praticien vétérinaire pour l'ensemble des poulains de l'année 2. L'âge à la première vaccination a été augmenté. Les poulains de l'année 2 ont été vaccinés à approximativement 6 mois au lieu de 4,5 mois pour les poulains de l'année 1 (Figure IV). La réponse en anticorps SRH mesurée à V2 + 2 semaines mesurée durant l'année 2 est significativement différente de celle mesurée l'année 1 (Figure IV).

Figure IV : Modification du calendrier vaccinal dans le Haras 1
Figure IV: Modification of vaccination schedule in Stud Farm 1



Les différences statistiques significatives sont indiquées en gras, avec W = test des rangs signés Wilcoxon. Les lignes en pointillées représentent les seuils de protection contre les signes cliniques induits par la maladie (>85 mm²).



3 Discussion

Le but de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes de faibles réponses vaccinales au cours de la primo-vaccination chez des poulains Pur-Sang.

Les résultats ont montré que l'âge au moment de la première vaccination est un facteur déterminant dans l'établissement d'une réponse humorale durable au cours de la primo-vaccination. Ces résultats concordent avec ceux montrés par Cullinane *et al.* dans une étude terrain sur les différents régimes de vaccination contre la grippe équine réalisés chez des poulains et yearlings Pur-Sang. Cette différence de réponses, en fonction de l'âge auquel le poulain a reçu sa première vaccination, est probablement en lien avec le niveau de maturité du système immunitaire. En effet, plusieurs études ont montré une évolution dans la maturation du système immunitaire du poulain durant les premiers mois de sa vie (Breathnach *et al.* 2006 ; Ryan *et al.* 2010). Ceci peut expliquer qu'une immunisation à 4 mois d'âge chez un poulain peut conduire à une réponse vaccinale sous-optimale comme observée dans le Haras 1 durant l'année 1.

La stratégie vaccinale appliquée dans le Haras 1 était d'administrer aux poulains la première dose de vaccin à l'âge minimum recommandé par le fournisseur du vaccin afin de diminuer la fenêtre de susceptibilité, c'est-à-dire la période durant laquelle les animaux sont susceptibles de contracter la maladie en raison d'une décroissance dans le temps des titres en anticorps protecteurs. A la différence du Haras 2 dont la stratégie de vaccination appliquée est plus flexible. Elle se base sur une facilité des pratiques de management des poulains (l'ensemble des poulains ayant reçu leur première vaccination au même moment, c'est-à-dire 6 mois après la dernière naissance). Cette différence entre les stratégies de vaccination explique en partie la différence de réponse mesurée en anticorps SRH observée entre ces 2 haras.

Suite aux résultats observés durant l'année 1, le vétérinaire du Haras 1 a choisi de différer la première immunisation pour les poulains de l'année 2 afin d'augmenter l'âge à la première immunisation. Ce changement dans le calendrier vaccinal a probablement joué un rôle important dans l'augmentation des titres en anticorps SRH mesurés chez les poulains de l'année 2 comparativement à l'année 1 dans le haras 1. Cependant, d'autres facteurs déterminants potentiels comme le taux d'anticorps maternels résiduels sont en cours d'exploration.

Les résultats apportés dans cette étude amènent des précisions sur le protocole de vaccination à adopter afin d'augmenter la qualité de la réponse vaccinale au cours de la primo-vaccination qui permettront d'assurer une meilleure protection des effectifs dans les élevages et les centres d'entraînements.

Remerciements

Cette étude a été menée dans le cadre de la Chaire d'Excellence « Immunologie équine » de l'Université de Caen Basse-Normandie. Cette étude est soutenue par le Conseil Régional de Basse-Normandie et le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER). La thèse de Stéphanie Fougerolle est co-financée par l'IFCE et le Conseil Régional de Basse-Normandie.

Références

- Breathnach C.C., Sturgill-Wright T., Stiltner J.L., Adams A.A., Lunn D.P., Horohov D.W. 2006. Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112:199-209.
- Cullinane A., Weld J., Osborne M., Nelly M., McBride C., Walsh C. 2001. Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings. *The Veterinary Journal*, 161:174-85.
- Cullinane A., Newton J.R. 2013. Equine influenza--a global perspective. *Veterinary Microbiology*, 167:205-14.
- Paillot R. 2014. A systematic review of recent advances in equine influenza vaccination. *Vaccines*, 2:797-831.
- Ryan C, Giguère S., Hagen J., Hartnett C., Kalyuzhny A.E. 2010. Effect of age and mitogen on the frequency of interleukin-4 and interferon gamma secreting cells in foals and adult horses as assessed by an equine-specific ELISPOT assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 15;133(1):66-71.