

Immunité préexistante contre le virus de la pandémie de grippe 2009. Ce que nous apprend la cohorte FLUREC-ANR SEST.

Magali Lemaitre (Docteur)^{1,2}, Marianne Leruez-Ville (Docteur)³, Xavier Nicolas De Lamballerie (Docteur)⁴, Nicolas Salez (Doctorant)⁴, Pierre Garrone (Docteur)⁵, Anne-Catherine Fluckiger (Docteur)⁵, David Klatzmann (Professeur Universitaire– Praticien Hospitalier)^{6,7} and Fabrice Carrat (Professeur Universitaire – Praticien Hospitalier)^{1,2,7}.

¹ UPMC – Université Paris 6, UMR-S 707, Paris, F-75012, France

² Inserm, UMR-S 707, Paris, F-75012, France

³ Laboratoire de Virologie, Université René Descartes, EA 36-20, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, F-75015, France

⁴ EPV, UMR-D 190, Université de la Méditerranée, faculté de médecine, 27 bd J Moulin 13005 Marseille

⁵ EPIXIS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, F-69307, France

⁶ Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7087, Biologie et Thérapeutique des Pathologies Immunitaires, Paris, France

⁷ Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint Antoine, Paris, F-75012, France

Magali Lemaitre : lemaitre@u707.jussieu.fr

Marianne Leruez-Ville : marianne.leruez@nck.ap-hop-paris.fr

Xavier Nicolas De Lamballerie : Xavier.De-Lamballerie@univmed.fr

Pierre Garrone : pierre.garrone@epixis.com

Anne-Catherine Fluckiger : anne-catherine.fluckiger@epixis.com

David Klatzmann : david.klatzmann@upmc.fr

Fabrice Carrat : carrat@u707.jussieu.fr

CONTEXTE ET OBJECTIFS

La grippe est responsable d'une épidémie d'ampleur variable chaque année. En France, entre novembre et avril, de 500 000 à 4 millions de personnes (1, 2) sont amenées à consulter leur médecin traitant pour un syndrome grippal. Il s'agit d'une maladie en apparence bénigne mais qui peut se révéler redoutable, à titre individuel, chez les sujets fragiles et plus rarement, à l'échelon communautaire, voir mondial à l'occasion de l'émergence d'un nouveau virus.

Dans les années 1968-80, des études de « cohortes » ont été conduites en population aux Etats-Unis (3-5). Elles ont apporté de précieux renseignements sur l'épidémiologie de la grippe, mais aucun résultat en matière de récurrence d'infections au niveau individuel ou de connaissances sur les interactions hôtes-virus-environnement. Les modalités de la constitution du répertoire immunitaire contre les virus grippaux et leurs déterminants sont peu connus. Ces éléments conditionnent pourtant la susceptibilité aux infections récurrentes à un niveau individuel et, potentiellement, participent à sélectionner les virus grippaux responsables d'épidémies à un niveau collectif (6-8). Il n'existe pas ou peu de données longitudinales chez l'homme permettant l'acquisition de telles connaissances immunologiques.

C'est dans ce cadre que le projet FLUREC a été développé, il vise à identifier les déterminants épidémiologiques, immunologiques et virologiques du risque d'infection grippale saisonnière récurrent, d'étudier les déterminants collectifs et environnementaux de l'infection grippale et de caractériser l'immunité grégaire de population. Il s'agit d'une cohorte prospective sur les infections grippales qui comprend 523 sujets, suivis 3 ans avec des collections biologiques et un suivi actif des événements cliniques. Elle a débuté lors de la saison grippale 2007-08 et devrait s'achever en octobre 2011.

Les résultats principaux de ce projet seront disponibles début 2011, nous présentons ici la cohorte FLUREC ainsi qu'un travail préliminaire conduit sur l'immunité au virus pandémique H1N1 de 2009.

La cohorte FLUREC a été mobilisée lors de la crise pandémique liée au virus H1N1 en 2009. Au moment de l'arrivée de cette pandémie, en avril 2009, FLUREC était la seule étude en cours en France dédiée à la grippe avec des collections biologiques. Les données collectées dans cette cohorte ont été utilisées pour répondre à des questions importantes de santé publique : quel était le niveau d'immunité contre le virus H1N1 de 2009 préexistant à l'émergence de ce virus ? et quels étaient les facteurs associés à cette immunité préexistante ? Plusieurs études ont montré une immunité préexistante chez les personnes de plus de 60 ans contre le virus H1N1 2009, suggérant que les individus nés avant 1957 et

ayant été au contact de virus de type H1N1 qui circulait de manière exclusive jusqu'en 1957, ont été exposés dans leur enfance à ce sous type de virus et ont développé une réponse immunitaire qui les protège contre le H1N1 de 2009 (9-11). Néanmoins, les facteurs autres que l'âge associés à une protection immunitaire restent inconnus, par exemple, nous ne savons pas s'il existe une réactivité croisée des anticorps entre un virus H1N1 saisonnier et le virus H1N1 2009.

MATERIEL ET METHODES

La cohorte FLUREC

Plan expérimental

L'objectif était d'inclure 600 personnes. Le recrutement des participants a été stratifié sur l'âge (par tranche d'âge de 10 ans à partir de 20 ans et jusque 80 ans) et sur les motifs de consultation d'inclusion : le groupe « grippe » comprenant les patients inclus à l'occasion d'une consultation en médecine générale pour syndrome grippal au cours de l'épidémie saisonnière, le groupe « non grippe » comprenant les patients inclus à l'occasion d'une consultation en médecine générale pour un motif autre que la grippe, mais de nature aiguë (par exemple, épisode diarrhéique infectieux, petite traumatologie).

Cinquante personnes étaient attendues dans chaque groupe d'inclusion et chaque tranche d'âge. Le recrutement a été réalisé par un sous-ensemble des médecins du réseau Sentinelles, localisé au sein de l'UMR-S 707.

Le suivi clinique

Le suivi de l'étude Flurec consiste en une visite systématique de suivi annuel chez le médecin traitant, réalisée entre mai et octobre de chaque année de suivi (2008, 2009, 2010 et 2011) avec une mise à jour des données cliniques, un recueil sur les infections respiratoires survenues au cours de l'hiver précédant la visite de suivi annuel et une sérologie annuelle.

En cas de syndrome grippal, il est demandé au patient de consulter son médecin traitant. Celui-ci déclare la visite, recueille des données sur les symptômes et traitements, puis réalise un prélèvement virologique et sérologique.

Variables recueillies

Les données recueillies sont :

- Sociodémographiques

Age, sexe, composition du foyer, profession, tabagisme ont été collectés au moment de l'inclusion et sont mises à jour lors des visites de suivi annuel.

- Cliniques

Présence de maladie chronique, traitements, statut vaccinal contre la grippe (saison 2007-08, 2008-09, 2009-10, 2010-11), infections respiratoires survenues au cours de l'hiver 2007-08, 2008-09, 2009-10, 2010-11.

- Biologiques :

Virologie

Des écouvillonnages nasaux sont collectés lors de chaque consultation pour syndrome grippal.

Le diagnostic de l'infection grippale est fait en utilisant un premier test de PCR en temps réel qui permet la détection de l'ARN des virus grippaux A et un test deuxième test de PCR en temps réel qui permet la détection de l'ARN des virus grippaux B (12).

Sérologie

Une sérothèque est constituée à partir des prélèvements sérologiques des visites de suivi annuel réalisés chez l'ensemble des patients entre mai et octobre de chaque année de suivi (2008, 2009, 2010 et 2011), et des prélèvements sérologiques réalisés lors des consultations pour syndrome grippal (hiver 2007-08, 2008-09, 2009-10 et 2010-11).

Analyses sérologiques

Les tests sérologiques reposent sur la technique de l'inhibition de l'hémagglutination (IHA) et utilisent les antigènes viraux spécifiques de ou des variants ayant circulés pendant la saison grippale et lors des pandémies de 1957 et 1968 (13).

Les analyses de l'immunité aux différents virus grippaux seront finalisées en Janvier 2011.

Nous avons réalisé un travail préliminaire sur l'immunité au virus pandémique H1N1 de 2009. Ce travail a été réalisé à partir d'un échantillon de sérums de participants collectés au cours des visites de suivi annuel de 2008.

Outre la mesure classique du titre d'anticorps par la méthode IHA, une mesure de titrage de la capacité de neutralisation des sérums utilisant un système de pseudo-particules (PN) a été développée pour ce travail pour caractériser l'immunité humorale de ces participants.

Analyses statistiques

Les modèles à intervalles censurés sont utilisés afin d'analyser les résultats donnés par la méthode IHA et tenir compte de leur indétermination. Plus précisément, la méthode IHA permet d'identifier un titre d'anticorps par patient. Ce titre correspond à la dernière dilution inhibant l'hémagglutinine (13). Or, la valeur exacte de ce titre ne peut être déterminée puisqu'elle se situe entre cette dilution et la dilution suivante. Le titre identifié est donc sous-estimé et si l'on considère seulement cette mesure, les résultats des analyses statistiques sont biaisés. Considérer les résultats IHA comme des données censurées par intervalle permet de s'affranchir de ce biais (14, 15).

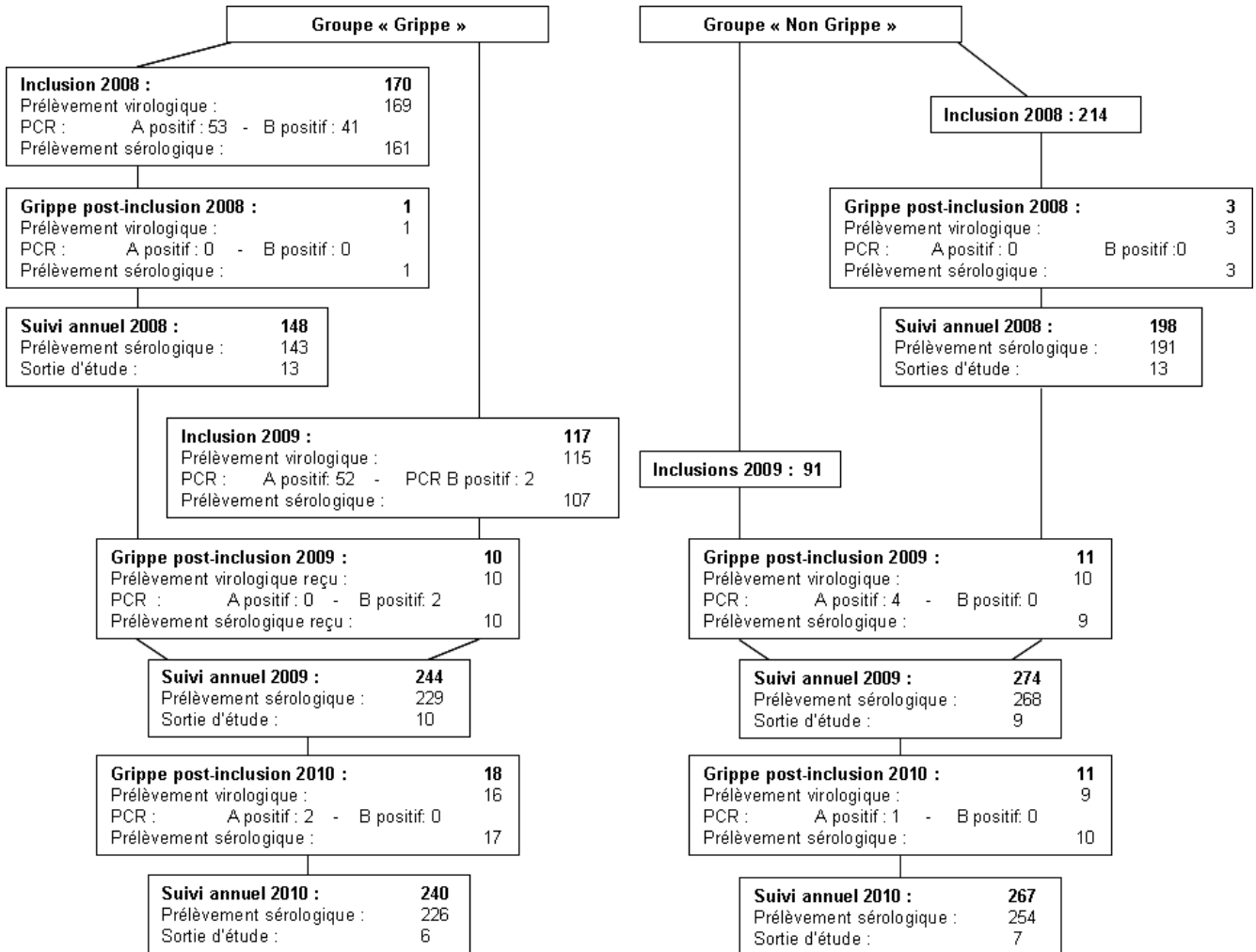
Pour le travail préliminaire sur l'immunité au virus pandémique H1N1 de 2009, outre les modèles à intervalles censurés pour l'analyse des résultats IHA, les modèles linéaires à effet-mixte ont été utilisés pour l'étude des résultats obtenus par la technique de neutralisation des anticorps par pseudo-particules. Cette technique permet de mesurer des proportions d'anticorps pour chaque dilution de sérum. Dans cette étude, 3 proportions ont été mesurées par dilution et 8 dilutions par patient ont été effectuées. Les modèles linéaires à effet mixte ont permis de prendre en compte la structure hiérarchique des résultats donnés par cette technique sérologique (16).

RESULTATS SCIENTIFIQUES

La cohorte Flurec

Trente huit médecins répartis sur la France entière participent activement à la cohorte FLUREC et ont inclus 384 personnes lors de la saison grippale de 2007-2008 et 208 personnes lors de la saison grippale de 2008-09. Parmi les patients ayant présenté un syndrome grippal, 157 (46%) étaient réellement infectés par un virus grippal dont 56 (40%) par le virus de type A/H1N1, 45 (40%) par A/H3N2 et 38 (20%) par un virus de type B. Pour chaque année de suivi, plus de 90% des visites de suivis annuels et des sérologies ont été réalisées :

Diagramme de flux des participants :



Au total, nous avons 3 sérologies annuelles pour 276 sujets, 2 pour 191 sujets et une seule pour 67 participants. En incluant les sérologies collectées lors de syndromes grippaux, nous avons 5 sérologies pour 13 participants, 4 pour 130, 3 pour 234, 2 pour 126 et 1 pour 65 sujets. Cinquante huit sujets sont sortis d'étude.

L'analyse des sérologies est prévue en fin d'étude, plus précisément d'octobre 2010 à février 2011 ; les résultats principaux de ce projet restent à venir.

Résultats préliminaires

Nous présentons ici les résultats du travail préliminaire dont l'objectif était d'identifier les facteurs associés à une immunité préexistante contre le H1N1 de 2009.

Ce travail a été mené sur 100 sérums de participants parmi les 523 sujets enrôlés dans la cohorte FLUREC.

L'âge moyen des participants était de 51 ans (et=16), 47 participants avaient moins de 50 ans, 53 étaient des femmes et 40 étaient vaccinés par un vaccin saisonnier. Cinquante et un participants ont été inclus dans le groupe Grippe, 35 étaient positifs pour le H1N1 saisonnier qui circulait pendant l'épidémie de grippe de 2007-2008, 7 étaient positifs pour le virus B qui circulait aussi lors de cette saison et 9 étaient négatifs pour les deux virus. Parmi les 35 participants positifs pour le virus H1N1, 25 avaient moins de 50 ans.

Les analyses multivariées nous ont permis d'identifier l'infection grippale par le virus H1N1 saisonnier comme un facteur associé à une protection immunitaire contre le H1N1 de 2009 quelle que soit la méthode considérée (PN: $P = 0.008$ et IHA : $P = 0.019$). L'âge a seulement été identifié par la méthode PN ($P = 0.0003$) (17).

TABLE I. Factors associated with the percentage of viro-neutralization and with hemagglutination antibody titers against the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus

	Viro-neutralization assay ^a			Hemagglutination assay ^b		
	Coefficient	Standard error	p-value	Coefficient	Standard error	p-value
Sex (male vs. female)	-0.052	0.19	0.79	0.093	0.096	0.33
Age group (50-79 vs. 20-49)	0.82	0.22	0.0003	0.013	0.11	0.91
Influenza vaccination 2007 (yes vs. no)	0.21	0.23	0.37	0.16	0.12	0.16
2007 H1N1 status (positive vs. negative)	0.63	0.23	0.0080	0.26	0.11	0.019
2007 B status (positive vs. negative)	0.34	0.38	0.37	-0.038	0.18	0.98
Respiratory illness, winter 2007-2008 (yes vs. no)	0.11	0.32	0.74	-0.071	0.15	0.64

^aEstimates from a multivariate linear mixed-effects model (see manuscript and Supporting Information for details) A positive (or negative) significant coefficient indicates a positive (or negative) association between the tested factors and the percentage of neutralization, adjusted for all other factors presented in the table.

^bEstimates from a multivariate regression model for interval-censored data. A positive (or negative) significant coefficient indicates a positive (or negative) association between the tested factors and the HI titer adjusted for all other factors presented in the table.

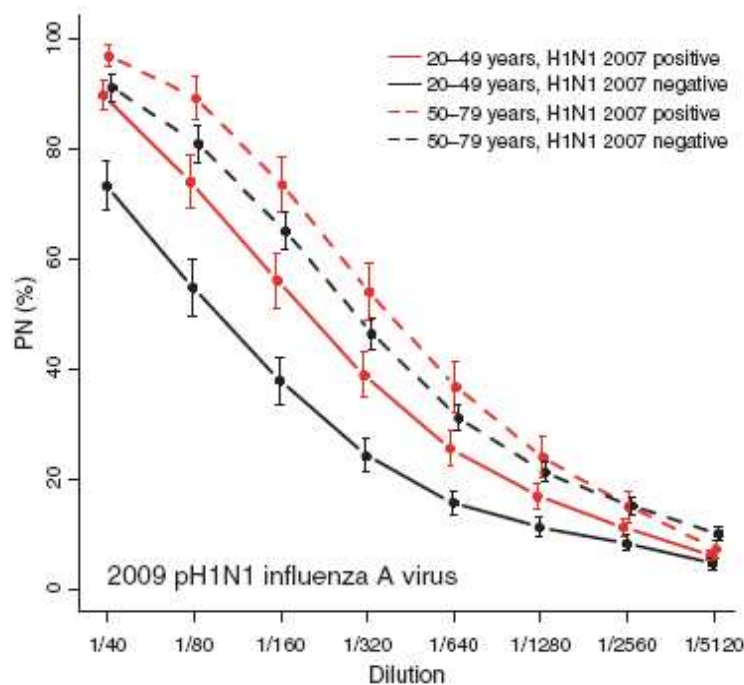


FIG. 1. Percentage of viro-neutralization (PN) against the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus according to age and 2007 H1N1 status. The PN differed across the curves at each dilution ($p < 0.0001$).

RETOMBÉES SCIENTIFIQUES

Ce résultat a permis de comprendre *a posteriori* l'impact extrêmement modeste de la pandémie de 2009 chez les personnes âgées.

Nous avons pu mettre en évidence une forte réactivité croisée entre le virus de la pandémie H1N1 2009, et le virus saisonnier H1N1 de 2007, et confirmer le rôle majeur de l'âge comme facteur associé à une immunité préexistante, reflet probable de l'infection par des virus grippaux plus "anciens" ayant circulé avant 1960. Globalement, sur l'échantillon sélectionné, 30% des sujets avaient un titre d'anticorps considéré comme protecteur, et on peut conclure qu'une part substantielle de la population n'était pas "naïve" immunologiquement vis-à-vis de ce virus pandémique.

Ce travail a reçu un soutien financier complémentaire de l'ITMO microbiologie et maladies infectieuses.

ORIGINALITE TECHNOLOGIQUE

Sur le plan technologique, ce travail a permis la mise au point de la méthode de neutralisation par pseudo-particules. Cette technique consiste à fabriquer des pseudo-particules virales porteuses des protéines de surface du virus et à rechercher leur neutralisation par les anticorps ciblant ces protéines de surface dans les sérums.

Cette technique présente un avantage indéniable par rapport aux autres techniques de neutralisation telle que la microneutralisation, puisqu'elle ne nécessite pas la manipulation du virus infectieux. Enfin, contrairement à la technique d'IHA qui ne permet essentiellement que la détection d'anticorps spécifiques anti-HA, la neutralisation est un test fonctionnel qui permet de détecter tous les anticorps capables de neutraliser l'infectivité virale et est moins soumise à des variations expérimentales que l'IHA.

ORIGINALITE METHODOLOGIQUE

Nous avons développé des méthodes statistiques originales pour l'analyse des résultats des techniques sérologiques.

Nous avons d'une part utilisé les modèles à intervalles censurés afin de tenir compte de l'imprécision des résultats donnés par la technique de l'inhibition d'hémagglutination, d'autre part, nous avons utilisé les modèles linéaires à effet mixte afin d'analyser les résultats donnés par la technique de neutralisation par pseudo-particules et d'éviter toute perte d'information.

Les études réalisées qui visent à évaluer l'immunité humorale contre le H1N1 de 2009 présentent des techniques de neutralisation des anticorps (10, 11) et la technique d'IHA. Ces études suivent la même méthodologie qui consiste à élaborer le seuil de séroprotection pour la technique de neutralisation à partir de la corrélation entre les résultats obtenus par neutralisation et ceux par IHA, technique pour laquelle le seuil de séroprotection est connu. La séroprotection est le titre d'anticorps associé à une protection clinique définie comme une diminution du risque d'infection grippale d'au moins 50% en cas d'exposition au virus grippal. Le seuil de séroprotection a été estimé en 1972 pour la technique de IHA (18) à partir d'une analyse portant sur les données d'une seule étude. La robustesse de ce seuil n'a pas été testée ; toutes les études immunologiques s'y réfèrent mais très peu ont étudié la protection clinique réelle qui lui est associée. Cette méthode est discutable, et pour ce travail, nous avons préféré utiliser les résultats bruts de chacune des techniques et les avons analysés indépendamment pour chacune des techniques sérologiques.

PERSPECTIVES

Les résultats principaux de ce projet restent à venir.

L'ensemble des sérums recueillis dans le cadre de l'étude FLUREC est en cours d'analyse. Ces résultats permettront d'étudier les déterminants individuels, collectifs et environnementaux de l'infection grippale, de caractériser l'immunité grégaire de population ainsi que la diversité virale et les mécanismes évolutifs des virus grippaux, et leur relation avec le statut immunitaire de population.

Plus précisément, les sérums collectés jusqu'à ce jour (saison grippale 2007-08, 2008-09, 2009-10, suivi annuel 2008, 2009, 2010) sont analysés par la technique IHA afin d'étudier l'immunité humorale contre les virus suivants :

- A/H1N1 (A/California/07/2009(H1N1)) (virus pandémique 2009)
- A/H1N1 (A/Brisbane/59/2007(H1N1)) (virus responsable de l'épidémie saisonnière de 2007-08)
- A/H1N1 de 1977
- A/H3N2 (A/Brisbane/10/2007(H3N2)) (variant circulant pendant l'épidémie 2008-09).

Le titre d'anticorps contre chacun de ces variants sera mesuré pour chaque sérum ce qui permettra d'étudier l'évolution de l'immunité au cours du temps ainsi que l'évolution de l'immunité croisée entre différents variants. Par exemple, il serait intéressant de connaître la durée de l'immunité acquise contre le virus A/H1N1 de 1977 à la suite d'une infection grippale par le virus A/H1N1 saisonnier de 2007-08.

Nous étudierons l'impact de l'évolution antigénique des virus grippaux sur la durée de l'immunité humorale contre la grippe. A cette fin, les données antigéniques et de génétiques virales seront intégrées aux résultats sérologiques et virologiques disponibles dans cette cohorte.

Afin d'étudier la réponse immunitaire après une infection grippale, les titres d'anticorps seront mis en relation avec la charge virale obtenue après analyses des prélèvements virologiques par PCR, le type de symptômes, le variant identifié. Les données de cette cohorte permettra aussi de renseigner le seuil de séroprotection pour la technique IHA et si nécessaire, de l'ajuster.

Compte tenu de la base de données déjà constituée de la cohorte et de la participation active des médecins et des sujets, nous avons proposé de prolonger le suivi d'une année, - jusqu'en décembre 2011

afin d'encadrer la probable seconde saison pandémique au virus H1N1 2009. La prolongation de cette étude vient de recevoir l'accord de l'Agence Nationale de la Recherche, de l'université Pierre et Marie Curie (Promoteur de l'étude) et du Comité de Protection des Personnes.

En apportant des connaissances sur le risque de grippe, l'immunité humorale de population, l'étude FLUREC constitue un outil important d'aide en matière de stratégies vaccinales à adopter.

Le projet FLUTEC

Au cours de l'étude FLUREC, nous avons été confrontés à la difficulté de la mesure de l'immunité contre l'infection grippale, il existe un réel manque de connaissance sur la séroprotection, précisément la mise en relation entre les résultats immunologiques et la survenue d'une infection grippale a très peu été explorée surtout pour les techniques de neutralisation. Sur les plans technologique et méthodologique, l'étude FLUREC a inspiré l'écriture du projet FLUTEC. Ses objectifs sont d'explorer l'immunité de population par 3 méthodes sérologiques différentes, contre 7 virus grippaux saisonniers récents et pandémiques anciens et de documenter le seuil de séroprotection qui peut être considéré comme le titre d'anticorps protecteur d'une infection grippale pour chacune des techniques sérologiques. Les techniques sérologiques utilisées sont la méthode d'inhibition de l'hémagglutination, de microneutralisation et de neutralisation par pseudo-particules. Cette étude portera sur les données collectées dans le cadre de la cohorte de FLUREC.

REFERENCES

1. Carrat F, Flahault A, Boussard E, Farran N, Dangoumau L, Valleron AJ. Surveillance of influenza-like illness in France. The example of the 1995/1996 epidemic. *J Epidemiol Community Health*. 1998 Apr;52 Suppl 1:32S-8S.
2. Costagliola D, Flahault A, Galinec D, Garnerin P, Menares J, Valleron AJ. A routine tool for detection and assessment of epidemics of influenza-like syndromes in France. *Am J Public Health*. 1991 Jan;81(1):97-9.
3. Fox JP, Hall CE, Cooney MK, Foy HM. Influenza virus infection in Seattle families, 1975-1979; 1. Study design, methods and the occurrence of infections by time and age. *American Journal of Epidemiology*. 1982;116:212-27.
4. Glezen WP, Decker M, Joseph SW, Mercready RG. Acute respiratory disease associated with influenza epidemics in Houston, 1981-1983. *Journal of Infectious Diseases*. 1987;155:1119-26.
5. Monto AS, Koopman JS, Longini IM. Tecumseh study of illness. XIII. Influenza infection and disease, 1976-1981. *American Journal of Epidemiology*. 1985;121:811-22.
6. Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature*. 2003 Mar 27;422(6930):428-33.
7. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, Wood JL, Daly JM, Mumford JA, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science*. 2004 Jan 16;303(5656):327-32.
8. Lavenu A, Valleron AJ, Carrat F. Exploring cross-protection between influenza strains by an epidemiological model. *Virus Res*. 2004 Jul;103(1-2):101-5.
9. Chowell G, Bertozzi SM, Colchero MA, Lopez-Gatell H, Alpuche-Aranda C, Hernandez M, et al. Severe Respiratory Disease Concurrent with the Circulation of H1N1 Influenza. *N Engl J Med*. 2009 Jun 29.
10. Hancock K, Veguilla V, Lu X, Zhong W, Butler EN, Sun H, et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N Engl J Med*. 2009 Sep 10.
11. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009 May 22;58(19):521-4.
12. Carrat F, Sahler C, Rogez S, Leruez-Ville M, Freymuth F, Le Gales C, et al. Influenza burden of illness: estimates from a national prospective survey of household contacts in France. *Arch Intern Med*. 2002 Sep 9;162(16):1842-8.
13. Wood JM, Gaines-Das RE, Taylor J, Chakraverty P. Comparison of influenza serological techniques by international collaborative study. *Vaccine*. 1994 Feb;12(2):167-74.
14. Cox DR. Regression models and life-tables. *J Roy Stat Soc Ser B (Methodological)*. 1972;187-220.
15. Siev D. Reply to "Nauta JJP, Eliminating bias in the estimation of the geometric mean of HI titers" [*Biologicals* 2006;34(3):183-6]. *Biologicals*. 2007 Apr;35(2):149-51; author reply 53.
16. McCulloch CE, Searle SR. *Generalized, Linear, and Mixed models*. Wiley-Interscience, New York; 2001.
17. Lemaitre M, Leruez-Ville M, De Lamballerie XN, Salez N, Garrone P, Fluckiger AC, et al. Seasonal H1N1 2007 influenza virus infection is associated with elevated pre-exposure antibody titers to the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin Microbiol Infect*. Aug 20.

18. Hobson D, Curry RL, Beare AS, Ward-Gardner A. The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *The Journal of Hygiene*. 1972;70(4):767-77.