

Intérêt des outils moléculaires pour l'identification et de typage des orbivirus

ZIENTARA S., SAILLEAU C., BRÉARD E., VIAROUGE C., GORNA K., RELMY A., DESPRAT A.

UMR Virologie Afssa/INRA/ENVA, Maisons-Alfort

RESUME - Cette communication décrit l'intérêt des outils moléculaires récemment développés pour l'identification et le typage des orbivirus en France et dans les îles de la Martinique et de la Réunion. Le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) et le virus de la maladie hémorragique des cervidés (EHDV) sont deux orbivirus qui constituent des menaces pour le cheptel européen. Entre 1998 et 2006, 5 différents sérotypes du virus (FCO ou Bluetongue – BTV-) ont émergé dans le bassin méditerranéen (BTV-1, 2, 4, 9, 16). En 2006, le sérotype 8, sérotype encore inconnu en Europe fut le responsable de nombreux foyers épizootiques dans le nord de l'Europe. Le virus EHDV est, quant à lui, présent dans le Maghreb et constitue une menace pour l'Europe. Cet exposé se propose de présenter les outils d'identification et de typage moléculaires développés dans notre laboratoire. Des trousse de RT-PCR en temps réel pour la détection du génome des virus de la FCO et/ou de l'EHD ont été développées ainsi que pour le typage des sérotypes 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 et 16 de la FCO. D'autres exemples de détection et de typage d'orbivirus présents dans les Départements d'Outre-Mer seront présentés. Les résultats préliminaires d'une enquête virologique menée en France sur le Toggenburg virus seront présentés.

Interest of molecular tools for identification and typing of orbiviruses.

ZIENTARA S., SAILLEAU C., BRÉARD E., VIAROUGE C., GORNA K., RELMY A., DESPRAT A.

UMR Virologie Afssa/INRA/ENVA, Maisons-Alfort

SUMMARY - This paper presents the interest of recently developed molecular tools for the identification and the typing of orbiviruses in France and in the French islands of Martinique and Reunion. Bluetongue virus (BTV) and epizootic hemorrhagic disease virus of deer (EHDV) are two orbiviruses that constitute a real threat for the European domestic animal population. Between 1998 and 2006, 5 BTV serotypes emerged in the Mediterranean Basin (BTV-1, 2, 4, 9, 16). In 2006, BTV serotype 8 was isolated in the north of Europe. EHDV is present in north Africa and constitutes a threat for Europe. This talk will describe the molecular tools for identification and typing which are developed in our laboratory. Kits of rt-RT-PCR for detection of BTV or EHDV genome RNA and BTV serotypes 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 and 16 typing were developed. Other examples of detection and typing of orbiviruses present in French Islands will be described. The preliminary results of a virology study performed in France on the Toggenburg virus will be presented.

INTRODUCTION

Le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) ou Bluetongue virus (BTV) et le virus de la maladie hémorragique des cervidés (ou epizootic hemorrhagic disease virus of deer ou EHDV) sont deux orbivirus, transmis par des moucheron, qui constituent des menaces pour le cheptel européen (Zientara *et al*, 2002).

Entre 1998 et 2006, 5 sérotypes différents du virus FCO ont émergé dans le bassin méditerranéen (BTV-1, 2, 4, 9, 16).. En 2006, le sérotype 8 du virus FCO, sérotype exotique pour l'Europe fut responsable de nombreux foyers épizootiques dans le nord de l'Europe. Au cours des cinq derniers mois de l'année 2006, le BTV-8 s'est étendu en Belgique, en Allemagne, aux Pays Bas et en France. L'année 2007 s'est accompagnée d'une extension continue du BTV-8 en Europe ainsi que sur le territoire français. Fin 2007, 14 264 foyers étaient répertoriés en France. Dans le même temps, le sérotype 1 a présenté une extension, depuis l'Afrique du Nord, sur le territoire espagnol. A la fin de l'année 2007, les premiers cas de FCO associés au sérotype 1 sont apparus dans le Sud-Ouest de la France. L'année 2008 a été marquée par une poursuite de l'extension de la FCO à BTV-1 et à BTV-8 : le sérotype 1 présentait une extension vers le Nord et vers l'Est des foyers initiaux, alors que le sérotype 8 continuait de se répandre vers le Sud du pays, et dans le reste de l'Europe en direction des pays de l'Est. En France, plus de 30 000 cas furent rapportés en 2008. En 2009, après une campagne de vaccination obligatoire contre les deux sérotypes 1 et 8, moins de 90 cas furent officiellement rapportés.

Le virus EHDV, quant à lui est présent dans le Maghreb et constitue une menace réelle pour l'Europe (les conséquences économiques de l'infection des bovins par ce virus sont très similaires à celles provoquées par le virus de la FCO). Un seul sérotype a été identifié (le sérotype 6).

Dans ce contexte, de co-circulations de plusieurs sérotypes dans un même territoire ou de menaces d'infections par, d'autres sérotypes, il est indispensable de disposer d'outils d'identification et de typage des orbivirus.

Le virus responsable de la fièvre catarrhale ovine (ou Bluetongue) est un virus non enveloppé à ARN double brin segmenté appartenant à la famille des *Reoviridae*, genre *Orbivirus*. Cette famille est actuellement composée de douze genres : *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Seadornavirus* et *Idnoreovirus* et *Mycoreovirus* (Roy, 1992). Les virus de la famille des *Reoviridae* sont dépourvus d'enveloppe virale et possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique dont la taille varie entre 60 à 80 nm. Cette dernière est constituée d'une capsidie externe et d'une capsidie interne (ou core).

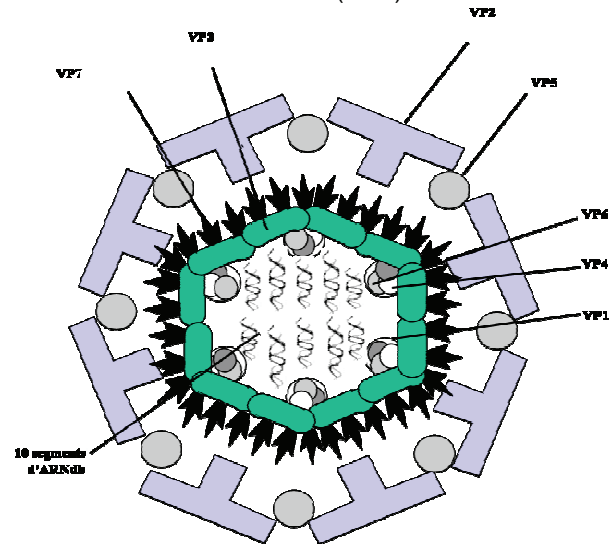
Parmi les *Orbivirus*, les virus de la fièvre catarrhale ovine, de la maladie épizootique hémorragique des cervidés (ou EHD) et de la peste équine constituent des risques sanitaires majeurs. Les *Orbivirus* possèdent des caractères morphologiques, structuraux et biologiques communs.

Le virus de la fièvre catarrhale ovine possède sept protéines structurales différentes (VP1 à VP7) réparties en deux capsides (Roy, 2005). La capsidie externe est composée de VP2 et VP5. La protéine VP2, constituant majeur de la capsidie externe, exposée à la surface de la particule virale, est l'antigène spécifique de type. Cet antigène a permis d'identifier 25 sérotypes différents du virus de la FCO. Ces antigènes spécifiques de chaque sérotype sont associés à la

capsidie externe (VP2) et induisent la production d'anticorps neutralisants qui ne neutralisent donc pas les autres sérotypes. Le segment 2, qui code pour la protéine VP2, constitue la région génomique privilégiée pour effectuer des études de variabilité génétique entre différents sérotypes (figure 1).

En Suisse en 2008, un nouvel orbivirus (le virus Toggenburg) a été identifié et pourrait constituer un 25ème sérotype viral (Hofmann *et al*, 2008).

Figure 1 : Représentation schématique de la structure des virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO).



Ce travail a permis de développer des outils moléculaires qui permettent de rapidement déterminer le génotype d'un orbivirus.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 ORIGINE DES SOUCHES

Les souches de virus de la FCO de sérotypes 1, 2, 4, 8, 9, 11, 16 ainsi que la souche de virus EHD isolée sur l'île de la Réunion ont été isolées au laboratoire national de référence de l'Afssa conformément aux méthodes décrites dans le manuel de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE, 2009). Très schématiquement, à partir du sang total (ou d'organe de rate), des embryons de poulet de 9 à 11 jours sont inoculés par voie intra-veineuse. Après une incubation de 9 jours à 37°C, le virus se réplique dans l'embryon qui présente des lésions hémorragiques. Les tissus embryonnaires sont alors inoculés à des cultures de cellules BHK21 (cellules de hamster nouveau-né en lignée). Si le virus est présent, il se réplique et détruit le tapis cellulaire provoquant un effet cytopathique caractéristique (ECP).

1.2 ORIGINE DES ECHANTILLONS SANGUINS

Les échantillons de sang provenaient :

- d'animaux suspects d'être infectés par le virus de la FCO en France continentale en 2007, 2008 ou 2009,
- d'animaux (ovins) importés de France vers la Martinique en 2006 et prélevés tous les 10 jours après leur arrivée en Martinique,
- de bovins malades, présentant des signes évocateurs de FCO sur l'île de la Réunion en 2009,
- de caprins situés dans le département des Deux-Sèvres ou de bovins dans les Alpes à la frontière suisse pour ce qui concerne l'enquête Toggenburg en 2010.

1.3 TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET AMPLIFICATION GENIQUE

A partir des échantillons de sang prélevés sur EDTA, les acides nucléiques ont été extraits. L'amplification génomique spécifique (après rétro-transcription) des ADN complémentaires des segments d'ARN génomiques d'intérêt (segments 1 et segments 2 notamment) des orbivirus de la FCO, de l'EHDV ou du virus Toggenburg ont été effectués (Toussaint *et al*, 2007 ; Bréard *et al* 2005)

Les produits d'amplification ainsi obtenus ont ensuite été séquencés. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été analysées à l'aide de différents logiciels tels que BLAST, CLUSTAL W, ...

2. RESULTATS

2.1. DEVELOPPEMENT DE METHODES DE TYAGE PAR PCR EN TEMPS REEL

Par comparaison des séquences nucléotidiques des segments 2 des différents virus FCO des sérotypes suivants : 1, 2, 4, 8, 9, 11, 16, il fut possible de sélectionner des couples d'amorces spécifiques de chaque sérotype. Ensuite, en collaboration avec des sociétés privées spécialisées dans le développement de trousse de diagnostic moléculaires prêtes-à-l'emploi (notamment les sociétés LSI et AES-Adiagène), des kits furent développés et validés (la spécificité et la sensibilité de chaque trousse furent déterminées).

Sont désormais disponibles sur le marché, des trousse de diagnostic de PCR en temps réel automatisables (permettant une détection rapide d'une très faible quantité de génome viral dans des échantillons sanguins)- et des génomes des virus de la FCO, de l'EHDV et de typage du virus FCO des sérotypes suivants : 1, 2, 4, 8, 9, 11 et 16.

Un réseau de 64 laboratoires vétérinaires départementaux a été constitué. Chacun des laboratoires a été évalué par la mise en œuvre d'essais inter-laboratoires organisés par notre laboratoire.

Les performances du réseau sont très satisfaisantes et permettent de garantir la qualité des résultats obtenus par chacun des laboratoires.

2.2 DETECTION DE SEROTYPES PRESENTS EN MARTINIQUE

Une étude sérologique menée en 2002 dans notre laboratoire avait montré que 70 à 80 % des bovins martiniquais étaient séropositifs vis-à-vis du virus de la FCO (données personnelles).

A partir d'échantillons de bovins (non infectés par le virus de la FCO) importés du continent en Martinique et prélevés tous les 10 jours pendant un mois, il fut possible d'isoler 12 souches du virus de la FCO. L'amplification des segments 2, l'analyse et la comparaison des séquences amplifiées avec celles disponibles dans les banques de données internationales, a permis de confirmer que différents sérotypes étaient présents : les sérotypes BTV-2, 9, 10, 17, 18, 22, 24.

Ainsi, cette étude a permis d'identifier que ces sérotypes circulaient de façon régulière dans cette île.

2.3 DETECTION DE VIRUS FCO ET EHDV SUR L'ILE DE LA REUNION EN 2009

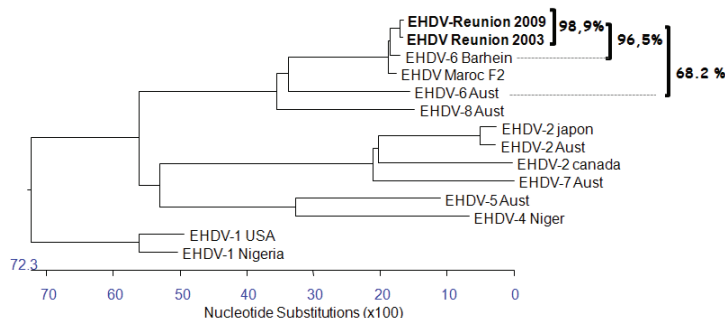
En 2009, des bovins situés sur la commune du Tampon notamment ont présenté des signes cliniques évocateurs de FCO.

A partir d'échantillons de sang prélevés sur ces animaux, deux types de virus furent isolés : un sérotype du virus FCO et un sérotype du virus EHD. Ce sérotype du virus EHD est présent sur de nombreux continents. et a été régulièrement isolés aux Etats-Unis à partir de cervidés qui présentent des signes cliniques similaires à ceux de la FCO. Les sérotypes 2, 6 et 7 sont responsables de signes cliniques chez les bovins, identiques à ceux induits par le virus de la FCO.

En utilisant des amorces d'amplification présentes dans les séquences communes à tous les virus EHD, une région génomique a pu être amplifiée.

La détermination de la séquence nucléotidique et sa comparaison avec les séquences déjà connues nous a permis de conclure que le virus EHDV isolé était de sérotype 6 alors que le virus de FCO était de sérotype 2 (en 2003 le sérotype 3 avait été isolé sur cette île (Bréard *et al*, 2004, 2005)(figure 2). En ce qui concerne le virus EHDV isolé en 2009, il s'est avéré identique à celui isolé sur l'île de la Réunion dans notre laboratoire en 2003. Ce virus n'avait pu être typé à cette époque, par manque d'outils moléculaires et de séquences génomiques.

Figure 2 : Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre la séquence VP2 de 2 souches EHDV isolées à la Réunion et des séquences homologues EHDV de différents sérotypes publiées sur GenBank.



2.4 DETECTION DU VIRUS TOGGENBURG EN FRANCE

Des échantillons de sang provenant de 250 animaux (bovins et ovins), prélevés à la frontière suisse ou dans le département des Deux-Sèvres, furent analysés par RT-PCR en temps réel selon le protocole décrit dans Hofmann *et al*, 2008. Tous les échantillons se sont révélés négatifs. Cependant, l'effectif de la population testée était faible ce qui ne permet en aucun cas de tirer des conclusions définitives quant à l'absence ou la présence du virus Toggenburg en France.

3. DISCUSSION

Alors qu'il y a quelques années, très peu d'outils de détection et d'identification moléculaires des orbivirus étaient disponibles, ceux-ci ont récemment été développés notamment suite à l'introduction de différents sérotypes du virus de la FCO en Europe.

Des réseaux de laboratoires ont été constitués. Ces laboratoires disposent maintenant de trousse de diagnostic sensibles, spécifiques et automatisables.

Que ce soit pour la détection d'un nouveau virus dans une région géographique non infectée ou pour le typage d'un virus nouvellement isolé, les différents kits produits par des sociétés commerciales en collaboration avec les laboratoires de recherche publique, ont considérablement modifié les conditions de gestion et de contrôle de ces infections.

Ainsi, en France continentale, il est désormais possible de détecter et typer les virus de FCO suivants : sérotypes 1, 2, 4, 8, 9, 11 et 16). En Martinique, de nouveaux sérotypes ont pu être identifiés grâce à ces méthodes moléculaires.

CONCLUSION

Le développement des méthodes de diagnostic moléculaire a pu être possible grâce à des séquences génomiques publiées dans les banques de données internationales (GenBank, EMBL, ...).

La sélection d'amorces pour l'amplification génique ainsi que leur validation nécessitent l'accès aux séquences nucléotidiques de virus de différents sérotypes et de nombreuses souches d'un même sérotype.

Depuis l'émergence du virus de sérotype 8 en Europe, les laboratoires ont compris la nécessité de partager et de rendre public ces informations génétiques pour le plus grand profit des structures impliquées dans le développement de méthodes modernes de diagnostic.

- Bréard, E., Sailleau, C., Hamblin, C., Graham, S.D., Gourreau, J.M., Zientara, S., 2004.** Vet. Rec., 155(14):422-3.
- Bréard, E., Sailleau, C., Hamblin, C., Zientara, S., 2005.** Vet. Microbiol., 106, 157-165.
- Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worva G., Thuer B. 2008.** Emerg Infect. Dis., 2008, 14(12), 1855-1861
- OIE, 2009. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 6th Edition, 1 & 2. Chapter 2.1.3**
- Roy P. 1992.** Vet. Microbiol. 33(1-4), 155-168(1992).
- Roy P. 2005** Adv. Virus Res., 64, 69-123.
- Toussaint J.F., Sailleau C., Bréard E., Zientara S., De Clercq K. 2007.** J. Virol. Meth., 140(1-2), 115-23.
- Zientara S, Bréard E, P. Hendrickx, Hammoumi S, Gourreau J.M. et Sailleau C. 2002..** Le Point Vétérinaire, Pathologie ovine et caprine, 33, 70-74.