

Ré-émergence du virus de la fièvre catarrhale en France

ZIENTARA S. (1), VIAROUGE C. (1), FABLET A. (1), VITOUR D. (1), BELBIS G. (1), BREARD E. (1), BOURNEZ L. (2), SAILLEAU C. (1)

(1) UPE, ANSES, ENVA, INRA, UMR 1161, Laboratoire de santé animale d'Alfort, France

(2) ANSES, Unité de coordination et d'appui à la surveillance, Maisons-Alfort

RESUME

La France continentale a été déclarée indemne de la fièvre catarrhale ovine (FCO) le 12 décembre 2012 après plusieurs campagnes de vaccination soit six ans après l'introduction de cette maladie sur notre territoire. Près de 3 ans plus tard, en août 2015, le virus a fait sa réapparition dans le centre de la France (Allier). Un bélier présentant des signes cliniques évocateurs de la maladie a fait l'objet de prélèvements qui ont permis de diagnostiquer une infection par le virus de la FCO. Les différentes analyses réalisées sur le virus ont permis de montrer qu'il s'agissait d'une souche de sérotype 8 génétiquement très proche de celle qui avait circulé lors de l'épizootie majeure en Europe du nord dès 2006. Sur l'ensemble du cheptel, seul cet animal présentait des signes cliniques. Suite à l'identification de ce cas, des enquêtes ont été menées au niveau local dans un premier temps, puis au niveau national, afin de préciser l'étendue de la zone infectée par le virus. Nous présentons ici l'ensemble des outils moléculaire et sérologique utilisés lors de cet épisode ainsi que les résultats de la surveillance mise en place en 2015.

Re-emergence of Bluetongue virus serotype 8 in France

ZIENTARA S. (1), VIAROUGE C. (1), FABLET A. (1), VITOUR D. (1), BELBIS G. (1), BREARD E. (1), BOURNEZ L. (2), SAILLEAU C. (1)

(1) UPE, ANSES, ENVA, INRA, UMR 1161, Laboratoire de santé animale d'Alfort, France

(2) ANSES, Unité de coordination et d'appui à la surveillance, Maisons-Alfort

SUMMARY

Six years after the introduction of BTV-8 and after two compulsory vaccination campaigns, France was officially declared "free from BT" in December 2012. Almost 3 years later, the disease made its comeback. At the end of August 2015, a ram located in central France (department of Allier) showed clinical signs suggestive of BTV (Bluetongue virus) infection. However, none of the other animals located in the herd showed any signs of the Bluetongue disease. Laboratory analyses identified the virus as BTV serotype 8. Phylogenetic studies showed that the sequences of this strain are closely related to another BTV-8 strain that has circulated in France in 2006-2008. After the detection of BTV-8 virus in this ram, regional and national surveys were launched in order to evaluate the spread of the infection in France. This paper describes the diagnostic tools used for the detection of this BTV case and the results of the survey carried out in 2015.

INTRODUCTION

La fièvre catarrhale ovine (FCO) est une maladie infectieuse non contagieuse des ruminants domestiques et sauvages (Verwoerd et Erasmus, 2004). Elle se transmet par l'intermédiaire d'un moucheron appartenant au genre *Culicoides*. Cette maladie est classée dans la liste des maladies du Code sanitaire pour les animaux terrestres de l'Organisation Mondiale de la Santé animale (OIE). Le virus de la fièvre catarrhale ovine est un *Orbivirus* de la famille des *Reoviridae*. Vingt-sept sérotypes du virus de la FCO ont été identifiés (Maan *et al.*, 2011 ; Zientara *et al.*, 2014). Le 27^{ème} sérotype a été isolé à partir de prélèvements issus de chèvres corses. Ce nouveau sérotype a la particularité de ne provoquer aucun signe clinique chez les ruminants (Bernelin-Cottet *et al.*, 2015). Plus récemment, le laboratoire communautaire de référence de Pirbright a fait mention de deux nouveaux sérotypes : l'un détecté dans un vaccin capripox au moyen orient et l'autre sur des alpagas en Afrique du Sud (Maan *et al.*, 2015), ce qui porterait à 29 le nombre de sérotypes.

La France continentale a connu son premier cas de FCO en 2006 avec l'émergence du sérotype 8 d'abord apparu en Belgique, aux Pays-Bas et en Allemagne. Après la déclaration de 6 foyers cette même année, le virus se répand très rapidement les deux années suivantes. Quatorze mille foyers sont déclarés en 2007, année au cours de laquelle un nouveau sérotype, le sérotype 1 est introduit dans le sud de la France. On comptera plus de 30 000 foyers en 2008, avant

que l'épizootie ne régresse en 2009 (83 foyers) et 2010 (1 foyer) grâce notamment à deux campagnes de vaccination obligatoire. En décembre 2012, la France est déclarée indemne. Au premier semestre 2015, seuls les sérotypes 1 et 4 circulaient encore en Europe du sud (Espagne, Italie) et dans les Balkans.

A partir de 2013, la France opte pour une surveillance programmée reposant sur l'analyse sérologique (ELISA) de bovins âgés de moins de 24 mois et non vaccinés. Ce dispositif de surveillance de la FCO en zone indemne a été défini de manière à respecter les caractéristiques minimales exigées par la réglementation européenne (CE/1266/2007). Ainsi, 15 bovins jeunes (répartis dans 3 élevages) par département et par an sont testés en 2013 et 2014. Les résultats ont montré un taux d'animaux séropositifs de 9% et 7% en 2013 et 2014 respectivement (Perrin *et al.*, 2013, 2014). Les analyses (RT-PCR réalisées en complément sur ces animaux n'ont pas permis de conclure à une circulation virale. De plus, parmi ces animaux, certains ne rentraient pas dans les critères définis dans le protocole (bovins de moins de deux ans non vaccinés). Fin août 2015, un bélier de 5 ans localisé dans un élevage mixte de l'Allier fait l'objet de prélèvements sanguins suite à des signes cliniques évocateurs de la Fièvre catarrhale ovine (jetage, œdème de la face et troubles pulmonaires) (Sailleau *et al.*, 2015). Nous décrivons dans cet article les outils de diagnostic utilisés pour l'identification et la caractérisation du virus ainsi que les mesures mises en place dès la confirmation de la réémergence de la FCO dans le centre de la France.

1. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

1-1 RT-PCR

Le prélèvement issu du bélier malade a, dans un premier temps, été analysé au laboratoire départemental Eurofins Coeur de France (03) à l'aide d'une RT-PCR en temps-réel spécifique du groupe FCO (ADI-352, AES). Le prélèvement a ensuite été acheminé au laboratoire de référence FCO de l'ANSES (Maisons Alfort) pour confirmation et analyses complémentaires.

Des RT-PCR de génotypage (LSI VetMAX™ European BTV Typing-LifeTechnologies, Lissieu, France) ont permis d'identifier le sérotype incriminé (le sérotype 8) et d'infirmar la présence d'un autre sérotype.

1-2 ISOLEMENT VIRAL

L'isolement viral a été réalisé par inoculation du sang positif en RT-PCR FCO sur :

des cellules KC (cellules de *Culicoides variipennis*) ; des cellules BSR (cellules de rein de Hamster) ; des souris IFNAR -/- (souris déficientes pour le récepteur de l'interféron et très sensibles à l'infection par le virus de la FCO) par voie sous cutanée et intra-péritonéale.

Les cellules BSR ont présenté un effet cytopathique dès le 3^{ème} jour après l'inoculation. La présence de virus dans le surnageant ainsi que dans celui des cellules KC (qui ne présentent pas d'effet cytopathique suite à une infection virale) a été confirmée par RT-PCR de groupe FCO. Deux souris IFNAR sur les trois utilisées sont mortes 4 jours après l'inoculation et les prélèvements réalisés ont été analysés par RT-PCR (groupe FCO et génotypage).

Les trois méthodes utilisées ont permis d'isoler le virus et de le produire en quantité suffisante pour d'autres analyses et notamment les analyses moléculaires.

Parallèlement, le sérotype du virus isolé a été confirmé par séroneutralisation à l'aide d'antisérums de référence.

1-3 ANALYSES DES SEQUENCES GENOMIQUES

1-3-1 Séquençage des produits de PCR

Différents couples d'amorces spécifiques de l'ARN viral de la FCO ont été utilisées sur l'extrait d'ARN issus des cultures de cellules infectées pour amplification de différents gènes. Ainsi les produits PCR obtenus ont pu être séquencés. Les séquences nucléotidiques des segments génomiques codant les protéines VP2, NS2, VP6 et NS3 (S2, S8, S9 et S10) ont été déterminées par séquençage (MWG Eurofins) et comparées à celles présentes dans les banques de données (BLASTN 2.2.28 – NCBI).

Ainsi, les segments codant les protéines VP2, NS2, VP6 (S2, S8 et S9) et NS3 (S10) ont montré respectivement 99 % et 100 % de similitude avec les gènes homologues de la souche BTV-8 qui a circulé lors de l'épizootie majeure en Europe du nord dès 2006.

1-3-2 Séquençage NGS

La souche virale isolée a été expédiée à l'ANSES-Ploufragan (unité de Génétique virale et biosécurité) pour séquençage de l'ensemble du génome. Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide de Vector NTI et DNASTAR Lasergene 8 et comparées à celles présentes dans les banques de données (Bréard *et al.*, 2016).

Sur l'ensemble du génome (19186 nucléotides répartis sur 10 segments d'ARN double brins), seuls 19 nucléotides diffèrent de la séquence de la souche BTV-8 2007 et 2008. On constate la substitution de 4 acides aminés au total sur les segments 1, 3, 8 et 9 (Tableau 1). Ces résultats ont confirmé les premières données de séquences et ont permis de conclure qu'il s'agissait bien de la même souche que celle qui avait circulé à partir de 2006 en Europe du nord, confortant ainsi l'hypothèse de l'absence d'introduction d'une nouvelle souche.

Tableau 1 : Nombre de substitutions en nucléotides et en acides aminés par segment génomique entre la souche de FCO isolée en 2015 et celle isolée en 2008 (Bréard *et al.*, 2016)

BTV-8 2008		
	Nucléotides	Acides Aminés
BTV-8 2015	codants	Non codants
Segment 1	3	0
Segment 2	3	0
Segment 3	4	0
Segment 4	1	0
Segment 5	3	0
Segment 6	0	0
Segment 7	1	0
Segment 8	1	0
Segment 9	2	0
Segment 10	1	0
Nombre total de substitutions	19	0

2- MESURES MISES EN PLACE

2.1 AU NIVEAU LOCAL

Dans l'élevage

Dès la confirmation du cas par le laboratoire de référence, l'ensemble des animaux de l'élevage a fait l'objet d'analyses sérologiques (ELISA) et PCR : 18% des bovins et 4 % des ovins se sont révélés positifs en PCR, le taux de séropositifs étant respectivement de 42,9 et de 8.6%. Aucun de ces animaux ne présentait de signes cliniques

Dans un périmètre de 2 kms autour du foyer

Douze élevages présents dans un rayon de 2 km autour du foyer ont fait l'objet de prélèvements pour une analyse par RT-PCR. Ainsi, le génome viral a été détecté dans 11 élevages sur les 12 analysés. La prévalence animale, calculée en tenant compte de l'échantillonnage à deux degrés (sélection des élevages puis des animaux) avec le package survey du logiciel R (Lumley, 2014 ; R Core Team, 2015), était de 10,3% (IC 95% [6,2% - 14,3%]) chez les bovins et de 3,9 % (IC95% [1,8% - 7,2%]) chez les ovins. La médiane de la prévalence intra-troupeau était de 8 % chez les bovins avec une variation de 3 à 26 %, et de 4,8 % chez les ovins variant entre 3,4 et 7,7 %.

2.2 AU NIVEAU NATIONAL

Surveillance programmée

Afin d'estimer l'étendue géographique de l'infection, une enquête nationale a été réalisée entre le 16 septembre et le 20 octobre sur la base de prélèvements pour dépistage par RT-PCR. Ainsi 60 élevages bovins par région ont été tirés au sort et 30 animaux y ont été prélevés. Cette taille d'échantillonnage a été choisie afin de détecter avec une probabilité de 95% la présence du virus (i) dans un troupeau si la prévalence intra-troupeau était d'au moins de 10% ; et (ii) dans la région administrative si la prévalence troupeau était supérieure à 5% (en supposant une répartition géographique du virus homogène sur le territoire).

Surveillance événementielle

Suite à ce premier foyer, les acteurs de terrain (éleveurs et vétérinaires) ont été sensibilisés à la surveillance événementielle, via les services vétérinaires régionaux (Instruction Technique DGAL/SDSPA/2015-785). Ainsi, tout animal présentant des signes cliniques suspects de FCO faisait l'objet de prélèvement de sang pour une recherche du génome par RT-PCR dans les laboratoires départementaux agréés pour le dépistage de la FCO ou directement au LNR. Entre le 1er septembre et le 31 décembre 2015, 421 élevages ont fait l'objet d'analyse pour suspicions cliniques. Seuls 3 ovins et 9 bovins issus de 12 élevages ont été

confirmés infectés par le virus. Ces élevages étaient situés dans l'Allier, le Puy de Dôme, la Creuse et le Cher.

Sortie de zones réglementées

Des zones réglementées (ZR) ont été définies, en application du Règlement CE 1266/2007, suite à la découverte des foyers afin d'empêcher la diffusion du virus par les mouvements d'animaux infectés hors de la zone infectée. Du 2 septembre au 15 octobre, elles étaient constituées de périmètres d'interdiction de 20 km de rayon autour des foyers, d'une zone de protection coalescente de 100 km de rayon autour des foyers, prolongée d'une zone de surveillance de 50 km de large. A compter du 15 octobre, il a été décidé de fusionner les différentes zones en une seule zone de 150 km de rayon autour des foyers, au sein de laquelle les mouvements de ruminants ont été autorisés. La ZR s'est ensuite étendue à la faveur de la détection de foyers dans de nouveaux territoires. La sortie de ZR vers des zones indemnes en France continentale, aux échanges vers un autre Etat membre ou à l'export vers un pays tiers était soumise à certaines conditions de vaccination ou de tests des animaux par RT-PCR. Ainsi, la majorité des foyers déclarés ont été découverts suite à ces contrôles.

Au total, 273 foyers ont été recensés entre août 2015 et mai 2016 (figure 1).

3. DISCUSSION

Ce nouvel épisode de FCO à sérotype 8 a eu un très faible impact clinique en 2015. En effet, seules 12 suspicions sur 421 (soit moins de 3 %) ont pu être confirmées par les analyses de laboratoire. Dans tous les cas, seul un animal par élevage semblait présenter des signes cliniques. La majorité des foyers détectés sont concentrés dans les quatre départements suivants : Puy de dôme, Allier, Creuse et Loire. Le nombre de foyers identifiés, quel que soit la modalité de détection, reste très faible, et la prévalence animale apparaît également faible en comparaison de l'épizootie de 2007-2008. Ces données pourraient indiquer un début d'épizootie à l'image de ce qui s'est passé en 2006 dans les départements du nord de la France. Le statut immunologique des bovins français, qui seraient immunisés en partie contre le virus (infection naturelle ou vaccination lors de la précédente épizootie) pourrait expliquer aussi cette faible circulation virale.

La question sur l'origine de la réémergence du virus s'est posée et plusieurs hypothèses ont été proposées :

Le rôle de la faune sauvage, qui ne semble pas la plus probable. Une étude pilotée par l'ONCFS a montré que les cerfs étaient particulièrement sensibles au virus FCO : plus de 40 % des cerfs prélevés entre 2008 et 2010 présentaient des sérologies positives vis-à-vis du virus et chez la plupart, le génome viral a été détecté par RT-PCR (Rossi et al, 2014). Cependant, le même type d'étude réalisée sur des animaux prélevés entre 2011 et 2013 (période au cours de laquelle le virus ne circulait plus chez les ruminants domestiques) a montré que le taux de séropositifs était descendu à 9 % et que le virus n'avait été détecté par RT-PCR chez aucun de ces animaux. Ces résultats semblent indiquer un rôle limité du cerf dans la persistance de la circulation virale ;

La circulation du virus à bas bruit dans la population de ruminants domestiques depuis la dernière épizootie. Cette circulation virale a pu passer inaperçue du fait, d'une part de l'absence de signes cliniques chez les animaux : une grande partie de la population bovine et ovine était immunisée (par une infection naturelle ou par la vaccination), et d'autre part, de l'impossibilité de détecter une très faible circulation virale par le dispositif de surveillance mis en place. Les conditions actuelles, liées à la proportion grandissante de ruminants naifs vis-à-vis du BTV-8 (renouvellement de la population) et éventuellement aux conditions météorologiques favorables

aux populations de culicoïdes, ont probablement permis une amplification de la circulation virale en 2015.

L'évolution de l'épizootie en 2016 est difficile à prévoir mais on peut supposer qu'en l'absence de vaccination massive, de nouveaux foyers soient identifiés en dehors de la zone actuelle d'infection. Un nouveau dispositif de surveillance programmée basé sur des analyses sérologiques a été mis en place durant l'hiver 2015-2016, afin d'actualiser la distribution spatiale du virus, d'estimer la séroprévalence du cheptel, et d'identifier des zones saisonnièrement indemnes dans la zone réglementée. Par ailleurs, un projet de recherche LABEX (pilote par l'ANSES) permettra d'estimer la prévalence dans la faune sauvage, de faire une étude sérologique rétrospective dans la faune domestique, de caractériser les isolats viraux à l'aide du séquençage NGS et de développer, en collaboration avec la société IDvet, un nouvel outil sérologique de détection d'infection récente (ELISA IgM).

L'ensemble de ces travaux devrait permettre une meilleure compréhension de l'origine de cette réémergence ainsi que l'obtention d'informations cruciales permettant d'optimiser la surveillance de cette maladie dans les années à venir.

Nous remercions l'ensemble des partenaires et acteurs impliqués dans la surveillance de la FCO : le bureau de la santé animale de la DGAL ; les membres du groupe de suivi de la FCO de la Plateforme ESA ; les services vétérinaires départementaux ainsi que les laboratoires départementaux agréés pour le diagnostic de la FCO. Nous remercions aussi l'équipe de Yannick Blanchard (ANSES-Ploufragan) pour le séquençage de l'ensemble du génome viral.

Bernelin-Cottet, C., Garnier, A., Sailleau, C., Viarouge, C., Romey, A., Fablet, A., Vitour, D., Bréard, E., Zientara, S. 2015. *Epidémiologie et santé animale*, 67, 119-124

Breard, E., Sailleau, C., Quenault, H., Lucas, P., Viarouge, C., Touzain, F., Fablet, A., Vitour, D., Attoui, H., Zientara, S., Blanchard, Y. 2016. *Genome Announc.* 2016 Apr 14, 4(2). pii: e00163-16. doi: 10.1128/genomeA.00163-16

Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Batten, C., Antony, F., Belaganahalli, M.N., Samy, A.M., Reda, A.A., Al-Rashid, S.A., El Batel, M., Oura C.A.L., Mertens P.P.C. 2011 *Emerg Infect Dis*, 17, 886-889.

Maan, S., Maan, N.S., Belaganahalli, M.N., Rao, P.P., Singh, K.P., Hemadri, D., Putty, K., Kumar, A., Batra, K., Krishnajoithi, Y., Chandel, B.S., Reddy, G.H., Nomikou, K., Reddy, Y.N., Attoui, H., Hegde, N.R., Mertens, P.P., 2015. *PLoS One* 10, e0131257

Perrin, J. B., Sailleau, C., Bréard, E., Viarouge, C., Dominguez, M., Zientara, S., 2013. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 64, 38-40

Perrin, J. B., Desvaux, S., Sailleau, C., Bréard, E., Viarouge, C., Bournez, L., Zientara, S., 2014. *Fièvre catarrhale ovine en 2014 : maintien du statut indemne en France continentale, maîtrise de l'épizootie de sérotype 1 en Corse.* *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 71, 41-44.

Rossi, S., Pioz, M., Beard, E., Durand, B., Gibert, P., Gauthier, D., Klein, F., Maillard, D., Saint-Andrieux, C., Saubusse, T., Hars, J., 2014. *Transbound Emerg Dis* 61, e12-24

Sailleau, C., Bréard, E., Viarouge, C., Vitour, D., Romey, A., Garnier, A., Fablet, A., Lowensky, S., Gorna, K., Caignard, C., Pagneux, C., Zientara, S. 2015. *TransBoundary Emerg diseases*, doi: 10.1111/tbed.12453. [Epub ahead of print]

Verwoerd, D., Erasmus, B.J. 2004. In : *Infectious diseases of livestock.* Coetzer J.A.W. and Tustin R.C. (Ed.), Cape Town (South Africa): Oxford University Press, 2004, 1201-1220.

Zientara, S., Sailleau, C., Viarouge C., Höper, D., Beer, M., Jenckel, M., Hoffmann, B., Romey, A., Bakkali-Kassimi, L., Fablet, A., Vitour, D., Bréard, E. *Emerg Infect Dis.*, 2014, 20, 2123-2125.

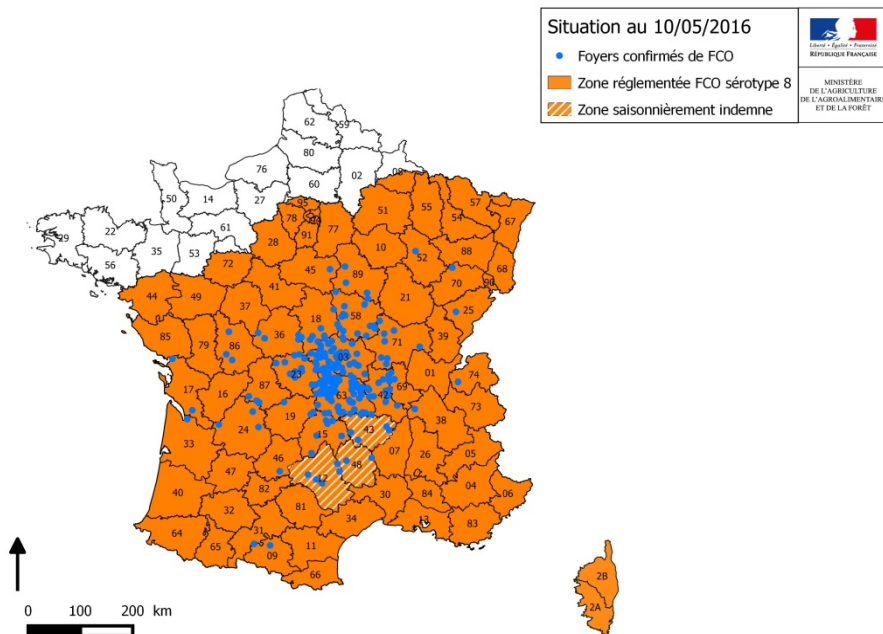


Figure 1 : Zones réglementées au 10/05/2016 et foyers de FCO à sérotype 8 détectés au 10 mai 2016 (<http://plateforme-esa.fr/>)