

EPIDEMIOLOGIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE. UN EXEMPLE : LA PESTE EQUINE*

S. Zientara¹

RESUME : L'apport des techniques de biologie moléculaire à certaines branches de l'épidémiologie s'avère particulièrement précieux. L'intérêt de l'association de ces disciplines sera illustré dans les domaines de l'épidémiologie moléculaire et de l'épidémiologie analytique (et/ou théorique) en prenant comme exemple le virus de la peste équine.

Epidémiologie moléculaire

Nous avons déterminé les séquences nucléotidiques des segments S10 de différents sérotypes (2, 4, 5, 6, 7 et 9) du virus équine. La variabilité de ces séquences et celle des séquences en acides aminés correspondantes permet de séparer les sérotypes en groupes génétiques distincts. Ainsi, lors des épizooties de peste équine en Espagne (1987-1990) et au Maroc (1989-1991), l'hypothèse de deux épizooties indépendantes fut évoquée alors que l'identité des deux virus semblait fortement probable. Les séquences des souches espagnoles et marocaines n'ont présenté que 0,7 % de divergence. Ce haut degré de similitude constitue un argument indubitable de l'identité de ces deux virus.

Epidémiologie analytique

Dans le domaine de l'épidémiologie analytique, les outils moléculaires peuvent permettre d'apporter une aide certaine que les méthodes virologiques et/ou sérologiques classiques n'autorisent pas.

Ainsi, dans les contextes ibériques et marocains, le modèle du cycle épidémiologique de la peste équine ne permet pas d'expliquer la persistance du virus pendant les périodes inter-épizootiques. Le génome viral a pu, par RT-PCR, être détecté dans le sang d'ânes et de mulets jusqu'au 55ème jour après infection. La «virémie» prolongée qui suivrait, chez les ânes et les mulets, l'infection par le virus équine, serait due à la fixation du virus aux hématies par l'insecte vecteur. La capacité de survie des moucheron adultes (*C. imicola*) pendant la saison froide en région méditerranéenne ainsi qu'une longue durée de la virémie chez les ânes et les mulets sont des facteurs qui seraient susceptibles d'expliquer le maintien du virus de la peste équine pendant la période hivernale.

SUMMARY : Molecular biology technics applied to some epidemiological branches are really of importance. The usefulness of the combination of these technics will be shown in the fields of molecular epidemiology and analytical (and/or theoretical) epidemiology with the example of African horse sickness (AHS).

Molecular epidemiology

We have determined the nucleotidical sequences of S10 segments of different serotypes (2, 4, 5, 6, 7 and 9) of AHS virus. The variability of these sequences and of corresponding amino acids makes possible the separation of the serotypes into different genetical groups. For instance, during two AHS epizootics, in Spain (1987-1990) and in Morocco (1989-1991), the hypothesis of two independant epizootics was suggested, when identity of the two virus strains looked highly probable. The sequences of the Spanish and Moroccan strains showed only 0.7% of divergence.

Analytical epidemiology

In the field of analytical epidemiology, molecular tools can bring an help that virological and/or serological may not allow.

* Texte de la communication présentée le 7 mai 1999

¹ AFSSA-Alfort, 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort, France

Within Spanish and Moroccan contexts, epidemiological cycle model does not allow to explain virus persistence between epizootics periods. It had been possible to detect viral genome in donkeys and mules blood up to 55 days after infection. Long lasting viraemia following infection by AHS virus in donkeys and mules, could be explained by the fixation of virus on red cells by the vector insect. The survival capacity of adult midges (Culicoides imicola) during Winter in Mediterranean regions, as well as a long lasting viraemia in donkeys and mules are factors that may explain the persistence of AHS virus during Winter time.



I - INTRODUCTION

L'apport des techniques de biologie moléculaire à certaines branches de l'épidémiologie s'avère particulièrement précieux. L'intérêt de l'association de ces disciplines sera illustré dans les domaines de l'épidémiologie moléculaire et de l'épidémiologie analytique (et/ou théorique) en prenant comme exemple le virus de la peste équine.

La première description documentée de la peste équine remonte à 1719 lors d'une épizootie qui provoqua la mort de 1700 chevaux dans la région du Cap en Afrique du sud [12]. Ensuite, cette maladie devint une véritable entité nosographique avec l'établissement en différentes régions du continent d'un peuplement humain d'origine européenne et avec l'introduction concomitante d'équidés sensibles.

La peste équine constitue un véritable fléau de l'élevage équin pour les pays infectés et, à ce titre, est inscrite sur la liste A des maladies de l'Office International des Epizooties. Cette maladie, cantonnée depuis des siècles à son berceau africain, est apparue en Europe en 1966 dans la péninsule ibérique puis au Maroc. Bien que cette épizootie ait remis cette maladie sur le devant de l'actualité, elle fut ensuite très vite oubliée et les travaux scientifiques sur le virus équine se sont rapidement arrêtés. Seules deux ou trois équipes dans le monde (notamment en Afrique du sud) ont continué à étudier ce virus. Brutalement, la réapparition de la maladie en Espagne en 1987 puis son extension au Portugal et au Maroc, a mis en évidence l'absence de connaissances fondamentales sur la biologie de ce virus, sur sa structure et, sur un plan plus pratique, sur les méthodes de diagnostic de cette infection.

Cet article présente une synthèse des connaissances nouvelles sur le virus équine, sur l'épidémiologie de la maladie et résume brièvement les principaux résultats de nos travaux en nous limitant toutefois aux domaines de l'épidémiologie.

HISTORIQUE

La peste équine est enzootique sur le continent africain au sud d'une ligne allant du Sénégal à l'ouest, à l'Ethiopie à l'est (figure 1).

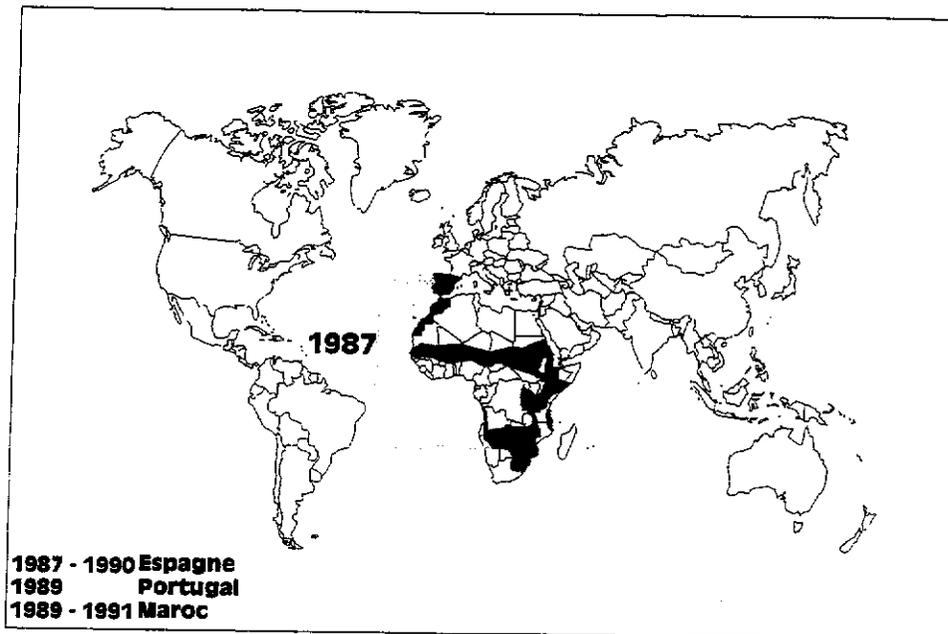
La peste a tendance à se répandre hors de ses zones d'enzootie habituelles et provoque dans les régions où elle apparaît, des flambées épizootiques meurtrières. Trois de ces épizooties ont provoqué des pertes considérables : l'épizootie de 1943-1944 en Egypte et en Palestine, l'épizootie de 1959-1960 au Moyen orient et en Asie du sud-est qui provoqua la mort de 300 000 équidés (l'Iran, l'Irak, le Pakistan, l'Inde, la Turquie, le Liban et Chypre furent infectés) et celle de 1965-1966 dans le Maghreb. En 1965, la peste équine apparut au Maroc puis s'étendit à l'Algérie, la Tunisie et traversa le détroit de Gibraltar en 1966. L'épizootie, provoquée par un virus de sérotype 9 a rapidement été jugulée grâce aux mesures de vaccination et de police sanitaire.

LA PESTE EQUINE DE 1987 A 1995

L'Europe et l'Afrique du Nord restèrent indemnes jusqu'en 1987 où un foyer, causé par le virus sérotype 4, a été confirmé dans la province de Madrid [5] suite à l'importation de zèbres en provenance de Namibie et destinés au zoo de Madrid. Malgré les mesures d'abattage et de vaccination (38 000 équidés vaccinés) [8], une recrudescence de peste équine fut observée dans le sud de l'Espagne [16], dans la province d'Andalousie, l'année suivante. En 1989, la peste traversa la frontière portugaise et, comme elle l'avait fait 24 ans auparavant, le détroit de Gibraltar (mais cette fois, dans l'autre sens !).

Mellor [7] estime à 2000 le nombre d'équidés morts de peste pendant cette année 1989. Les mesures de lutte appliquées en Espagne et au Portugal ont permis à ces deux pays d'éradiquer la peste en 1991 (les derniers cas ont été répertoriés en 1990).

Figure 1
Répartition géographique de la peste équine



Le Maroc a déclaré des cas de peste de 1989 à 1991 (tableau I). Des mesures de prophylaxie sanitaire et médicale ont permis l'éradication de la peste. Le dernier cas officiel de peste équine a été recensé le 10 octobre 1991 dans la province de Kénitra.

En 1995, à la lumière des données épidémiologiques et sérologiques, l'Union européenne a officiellement déclaré le Maroc indemne de peste équine.

TABLEAU I

Tableau synoptique du nombre de cas et de foyers au Maroc de 1989 à 1991

	1989	1990	1991	Total
Nombre d'équidés atteints	512	55	177	1244
Nombre de foyers	23	39	41	103
Nombre de provinces infectées	3	6	20	29

1. LE VIRUS DE LA PESTE EQUINE

Au cours des dix dernières années et notamment grâce aux techniques de biologie moléculaire, les connaissances sur la structure de la particule virale et sur l'organisation du génome ont considérablement progressé [17].

Le virus de la peste équine appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*. Cette famille est constituée de neuf genres : les *Orthoréovirus*, les *Rotavirus*, les *Coltivirus* et les *Orbivirus* qui infectent les espèces animales (y compris l'espèce humaine), les *Cypovirus*, les *Phytoréovirus*, les *Aquaréovirus*, les *Fijivirus* et les *Oryzavirus* qui infectent les plantes et

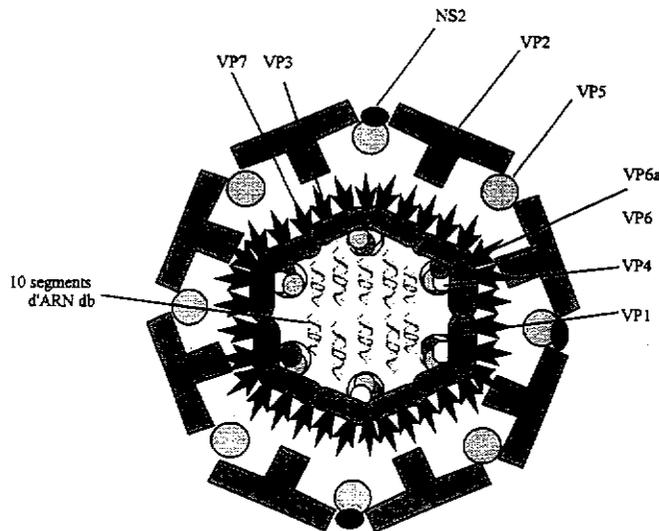
les arthropodes [3].

La capsid externe du virus est composée de deux protéines VP2 et VP5. La capsid interne ou "core", est composée des deux protéines majeures VP3 et VP7 et des trois protéines mineures VP1, VP4 et VP6. Le génome, localisé dans la capsid interne, est constitué de dix segments d'ARN double-brin (db) de tailles différentes [17] numérotés de 1 à 10 en fonction de leur ordre de migration en gel de polyacrylamide et sont classés en segments longs (L pour "large", L1 à L3), moyens (M pour "medium", M4 à M6) et courts (S pour "short", S7 à S10) (tableau II et figure 2).

TABLEAU II
 Gènes et protéines du virus de la peste équine sérotype 4

Segment	Longueur (en pb)	Masse molaire (en kDa)	Protéine	Nombre d'acides aminés	Localisation
L1	≅ 3500	inconnu	VP1	1305	core
L2	3229	2,2 10 ⁶	VP2	1060	capside externe
L3	2792	1,9 10 ⁶	VP3	905	core
M4	1978	1,27 10 ⁶	VP4	642	core
M5	1566	1,06 10 ⁶	NS1	548	non structurale
M6	1751	1,12 10 ⁶	VP5 (VP6 ou VP5')	505	capside externe
S7	1179	7,0 10 ⁵	VP7	354	core
S8	1123	7,6 10 ⁵	NS2	365	non structurale
S9	≅ 1100	inconnu	VP6 (?)	369	core
S10	758	5,0 10 ⁵	NS3/NS3A	217/206	non structurale

FIGURE 2
 Structure du virus de la peste équine (d'après Mertens *et al.* [11])



2. EPIDEMIOLOGIE DE LA PESTE EQUINE

MODALITES DE TRANSMISSION

A l'exception du cas particulier des canidés contaminés par ingestion de produits virulents (viandes ou abats d'équidés infectés), la peste équine se transmet chez les équidés de façon indirecte par l'intermédiaire d'arthropodes hématophages. De nombreux vecteurs semblent potentiellement capables de transmettre la peste équine (notamment les moustiques des genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* ou les tiques des genres *Hyalomma* ou *Rhipicephalus*) [7]. Cependant, le vecteur biologique majeur s'avère être un insecte du

genre *Culicoïdes* [2]. Le virus a été isolé de l'espèce *Culicoïdes imicola* au Zimbabwe [1] et en Espagne [9]. Les espèces de *Culicoïdes* (*C. imicola*, *variipennis*, *obsoletus* et *pulicaris*), dont le rôle dans la transmission de la peste est prouvé ou très fortement suspecté, sont aussi impliquées dans la transmission de la fièvre catarrhale du mouton (ou "bluetongue") [10, 14].

RECEPTIVITE ET SENSIBILITE

Ces deux caractéristiques du terrain, conditionnant l'apparition de la maladie, sont dominées par la notion d'espèce : dans les conditions naturelles, mis à part la

contamination accidentelle des canidés, la peste équine affecte seulement les équidés, surtout le cheval, de loin le plus sensible (formes aiguës et suraiguës le plus souvent mortelles), puis le mulet et le bardot (formes le plus souvent curables), enfin l'âne (forme volontiers inapparente)[12].

La race joue aussi un rôle non négligeable : les races importées sont beaucoup plus réceptives et sensibles que les races locales et ne semblent pas acquérir de résistance, même après plusieurs générations en région infectée.

RESERVOIR DE VIRUS

L'apparition explosive de la maladie certaines années, qui suppose la contamination simultanée d'un grand nombre d'insectes avant l'apparition des premiers cas équins, plaide en faveur de l'existence d'un réservoir de virus présentant une virémie (persistante ou à éclipse). Les équidés ne seraient que les révélateurs d'une virose entretenue à bas bruit chez au moins une espèce hôte différente. La nature de ce réservoir demeure encore inconnue [4].

Certains arguments permettent d'étayer l'hypothèse de l'existence d'un réservoir :

- l'apparition spontanée de la peste équine chez des équidés nouvellement introduits dans des régions jusque là totalement dépourvues de ces animaux ;
- l'absence de porteur chronique chez les équidés (virémie fugace) ;
- la persistance dans certaines régions (Afrique du Sud) de types de virus anciennement isolés malgré une immunisation massive et répétée des équidés contre ces derniers.

De nombreuses études sérologiques réalisées notamment dans les différentes régions africaines d'enzootie, ont montré que des anticorps anti-virus de la peste équine pouvaient être détectés chez de très nombreuses espèces animales : lions, chameaux, hyènes, dromadaires, antilopes, chacals, chiens, zèbres... Cependant, à l'exception des zèbres, le virus n'a jamais pu être isolé chez l'une ou l'autre de ces espèces. En fait, récemment, il a pu être démontré qu'en Afrique du sud, le zèbre (le seul équidé

réellement originaire de ce pays) était capable d'héberger le virus et jouerait en quelque sorte, le rôle de réservoir. Trois espèces de zèbres vivent en Afrique du sud : *Equus zebra*, *Equus grevyi* et *Equus burchelli* (la plus représentée notamment en Somalie, Tanzanie, Zambie, Mozambique, Angola,...). La population de zèbres *Equus burchelli* est estimée à 33 000 individus dans le parc national Krüger. L'étude du statut sérologique anti-AHSV des populations de zèbres sauvages (notamment des conversions sérologiques des jeunes zèbres aux neuf sérotypes) et l'observation de virémies prolongées (d'au moins six semaines chez le zèbre infecté expérimentalement) a permis de conclure que les neuf virus de la peste équine circulent à bas bruit dans la population de zèbres et que le modèle de cycle épidémiologique de la peste équine ne nécessite pas l'intervention d'un réservoir. Par contre, l'épidémiologie de la peste équine en Espagne, au Portugal et au Maroc ne permet évidemment pas d'impliquer le zèbre (même si c'est bien cette espèce qui fut responsable de l'introduction initiale du virus en Europe) pour expliquer le maintien du virus pendant plusieurs années. De même, les espèces classiquement répertoriées comme pouvant jouer un rôle de réservoir en Afrique ne peuvent être incriminées.

3. INTERET DE LA METHODE D'AMPLIFICATION GENIQUE (OU RT-PCR)

Nous avons développé une méthode d'amplification génique [18] qui permet de détecter les segments génomiques S7 complets du virus équine et d'effectuer ainsi un diagnostic de groupe. L'amplification de séquences ribonucléotidiques (ARN) repose sur la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) qui sert de matrice pour l'amplification (d'où le nom de RT-PCR pour "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction"). Cette détection peut être effectuée à partir de prélèvements nécropsiques (rate, poumon, foie, coeur...) ou de sang total prélevé sur héparine ou EDTA [21, 22, 23]. A l'aide d'une sonde moléculaire spécifique du gène S7, nous pouvons confirmer la spécificité du produit d'amplification [13] (figures 3 et 4). La technique RT-PCR s'avère être 18 à 30 fois plus sensible que l'isolement viral ou les tests ELISA d'immuno-capture.

FIGURE 3

Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification obtenus après RT-PCR à partir des acides nucléiques extraits de cellules infectées par les neuf sérotypes de AHSV et par d'autres virus infectant les équidés

Puits 1 à 9 : cellules Vero infectées par les virus des sérotypes 1 à 9 respectivement (AHSV-1 à -9, souches USDA) ; puits 10, 11, 13, 15 et 17 : cellules infectées respectivement par 10) virus de l'artérite virale des équidés (EAV), 11) réovirus équin sérotype 3, 13) herpes virus équin -1 (EHV1), 15) virus grippal équin A/equi/Brentwood/79, 17) adénovirus équin -1. Puits 12, 14, 16, et 18 : acides nucléiques extraits de cellules non infectées : 12) cellules Vero, 14) cellules RK13, 16) cellules MDCK, 18) cellules ED. Puits 19 : témoin eau.

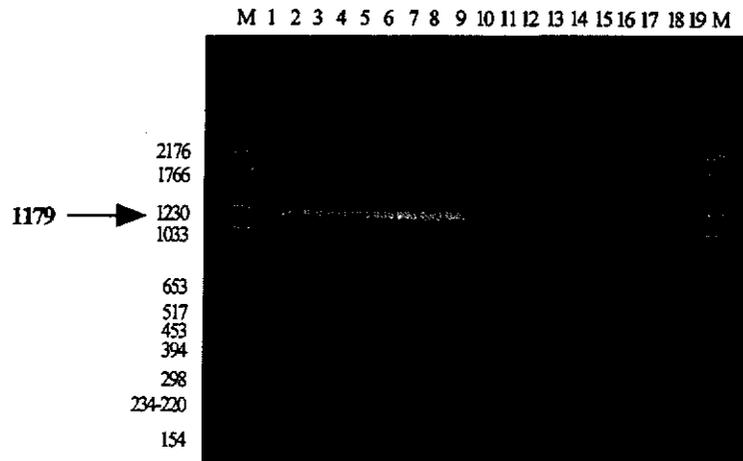
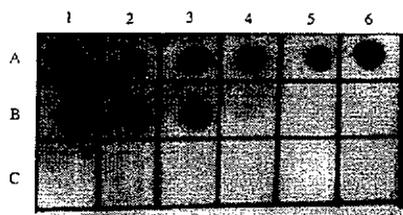


Figure 4

Contrôle de la spécificité des produits d'amplification

Les fragments amplifiés sont déposés sur filtre de nitrocellulose et hybridés avec la sonde interne SI marquée à la digoxigénine. L'hybridation est visualisée par autoradiographie. La disposition et la nature des dépôts des produits d'amplification effectuée à partir des acides nucléiques extraits de cellules infectées ou non sont les suivantes : A1 à A6 et B1 à B3 : AHSV-1 à -9, souches USDA.



4. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE

L'association de la méthode d'amplification génique et du séquençage direct permet une comparaison rapide de différents isolats et constitue un outil efficace dans l'étude de la circulation, de l'évolution et du typage des virus.

Ainsi, lors des épizooties de peste équine en Espagne (1987-1990) et au Maroc (1989-1991), l'hypothèse de deux épizooties indépendantes (une européenne et une

africaine) fut évoquée alors que l'identité des deux virus semblait fortement probable [16]. Nous avons déterminé les séquences génomiques des segments S10 des souches espagnoles et marocaines (AHSV4 SP et AHSV4 M) (figure 5). Les deux séquences n'ont présenté que 0,7 % de divergence [20]. Ce haut degré de similitude constitue un argument indubitable de l'identité de ces deux virus et permet de réfuter les hypothèses d'une réversion vers la virulence du vaccin vivant (utilisé en Espagne) ou de deux épizooties indépendantes et quasi-simultanées.

En octobre 1998, nous avons reçu des prélèvements nécropsiques (cœur, rate, poumons) d'une jument décédée 12 jours après son importation de France au Sénégal. A l'aide d'amorces spécifiques des segments S7 et S10, nous avons pu détecter par RT-PCR, le génome du virus équinestique. La détermination de la séquence nucléotidique du segment S10 et la comparaison de celle-ci avec les séquences des virus des autres sérotypes (figure 5) a permis de conclure que le virus isolé appartenait au sérotype 9. Par les techniques virologiques conventionnelles (inoculation à des lignées cellulaires Vero et BHK21), le virus a pu être isolé et le sérotype (9) confirmé par neutralisation virale. Ainsi, grâce aux outils moléculaires, le diagnostic de laboratoire a pu être posé en 24 heures alors que trois semaines furent nécessaires pour identifier le virus à l'aide des techniques virologiques.

L'analyse phylogénétique illustre la stabilité génétique de segments S10 de différentes souches au sein d'un même sérotype.

5. EPIDEMIOLOGIE THEORIQUE

Dans le domaine de l'épidémiologie théorique, les outils moléculaires peuvent permettre d'apporter une aide certaine que les méthodes virologiques et/ou sérologiques classiques n'autorisent pas.

Ainsi, dans les contextes ibériques et marocains, le modèle du cycle épidémiologique de la peste équine ne permet pas d'expliquer la persistance du virus pendant les périodes inter-épizootiques (aucun réservoir du virus n'est actuellement connu).

Pourtant, la description des foyers de peste en Europe et au Maroc impose de considérer le maintien du virus chez un réservoir pendant les périodes inter-épizootiques. Le tableau III résume la chronologie des épizooties et indique clairement la durée des périodes inter-épizootiques.

FIGURE 5

Dendrogramme obtenu par alignement multiple des séquences en acides aminés des protéines NS3 des virus des 9 sérotypes

AHSV1 à 6 : souche de virus équinestique de sérotype 1 à 6 ; AHSV4 : sérotype 4 souches d'Afrique du Sud (SA et USDA), marocaine (M), espagnole (SP) ; AHSV9SEN98 : sérotype 9 souche sénégalaise (virus isolé en 1998) ; AHSV6UP : sérotype 6 souche de l'Université de Prétoria.

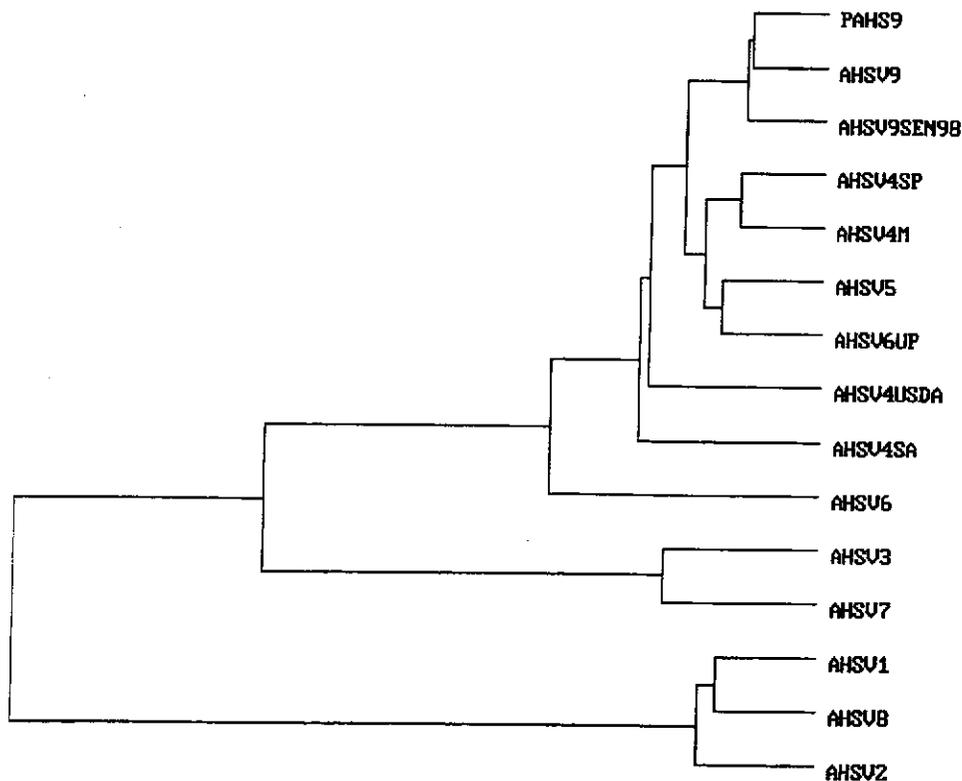


Tableau III

Description chronologique et durée des épizooties en Espagne, Portugal et Maroc de 1988 à 1990
 (p.i : durée de la période inter-épizootique)

	1987	1988	1989	1990
Espagne	août-septembre	octobre-décembre	juillet-novembre	
Portugal			septembre-novembre	
Maroc			octobre-novembre	septembre-octobre
p.i	12 mois	8-9 mois	10 mois	

Sachant que le portage chronique n'a jamais été observé chez le cheval, comment expliquer le maintien du virus en l'absence de vecteur et d'espèce cible pendant ces périodes inter-épizootiques ? La résistance particulière de l'âne à l'infection, l'importance de la population asine (en particulier au Maroc mais aussi dans la zone hispano-portugaise infectée en 1989) sont quelques uns des arguments qui permettent de suspecter un éventuel rôle de l'âne dans le cycle épidémiologique de cet arbovirus.

La persistance de la peste en Espagne pendant quatre ans pourrait s'expliquer par la capacité de survie de *C. imicola* pendant l'hiver (comme cela a pu être démontré lors de campagnes de piégeage d'insectes dans le sud de l'Espagne), saison particulièrement tempérée dans le sud méditerranéen. En l'absence d'un réservoir vertébré identifié et d'une transmission transovarienne chez les *Culicoides*, le virus équine ne pourra survivre que par le biais de cycles ininterrompus de transmission entre des hôtes vertébrés (l'âne ?) et invertébrés. Le virus de la fièvre catarrhale (ou BTV pour virus de la bluetongue) par exemple, infecte les ruminants qui, en général, constituent des populations nombreuses (d'où la forte probabilité qu'un culicoïde pique un bovin virémique) et chez lesquels la durée de la virémie peut atteindre 70 à 100 jours. Cette longue durée de la virémie constitue un mécanisme de survie du virus de la fièvre catarrhale notamment dans les régions où les conditions climatiques empêchent l'activité des insectes vecteurs pendant 2 à 3 mois de l'année.

Le virus pourrait circuler entre la population d'insectes vecteurs dont la densité est excessivement réduite pendant la saison froide et la population d'ânes ou de mules dont la virémie est plus longue que chez le cheval. La durée maximale de la virémie chez le cheval est 18 jours. La virémie du virus équine chez l'âne a été étudiée par inoculation de 16 ânes avec les trois sérotypes 1, 3 et 5 du virus de la peste équine. Les virus de sérotypes 1 et 3 n'ont été détectés que le 8ème jour et à des titres inférieurs à 10^2 DCP50/ml. Le virus de la peste équine sérotype 5 a été détecté du premier au septième jour à un titre identique. Cependant, l'isolement de virus à partir du sang s'avère difficile notamment lorsque les titres viraux sont faibles et il est possible que la durée de la virémie chez l'âne européen

(*Equus asinus*) et africain (*Equus asinus africanus*) soit du même ordre de grandeur que chez le zèbre (six semaines).

La RT-PCR s'étant avérée un outil particulièrement sensible et rapide pour la détection du génome viral dans le sang de chevaux infectés par le virus équine [19], nous avons utilisé cette méthode pour tenter de déterminer la durée moyenne de la virémie chez les ânes et les mulets [7].

Détection du virus ou de son génome

La RT-PCR a permis de détecter le génome viral dans le sang de 4 ânes et de 4 mulets infectés expérimentalement jusqu'au 55ème jour après l'infection (3 animaux sur 8). Les limites maximales de détection du génome dans le temps sont pour les cinq autres animaux de J45 à J51. Aucun produit d'amplification spécifique ou non spécifique n'a pu être détecté à partir des échantillons témoins de sang de onze ânes non infectés par le virus de la peste équine. La détection du virus par isolement en cultures de cellules et par inoculation aux oeufs embryonnés s'est avérée négative pour les prélèvements testés (de J5 à J13) pour les huit animaux.

Conséquences pathogéniques

Le génome viral a pu, par RT-PCR, être détecté dans le sang d'ânes et de mulets jusqu'au 55ème jour après infection. Ces données sont en accord avec la pathogénèse de la peste équine mais aussi avec celle de la bluetongue. La virémie prolongée qui suivrait, chez les ânes et les mulets, l'infection par le virus équine, pourrait être la conséquence d'une fixation du virus aux hématies. Les hématies ainsi infectées sont ingérées par l'insecte vecteur qui, à son tour, amplifie le virus et le transmet aux espèces sensibles. La longue période (55 jours) pendant laquelle le génome viral est détectable dans le sang est inférieure à la durée de vie des hématies (120 jours). Les données obtenues chez l'âne doivent être comparées à celles décrites chez les bovins pour le virus de la BT dont la biologie est très poche de celle du virus équine. Chez les bovins, le génome du virus de la BT est détecté pendant une durée voisine de la durée moyenne de vie des globules rouges [6]. La

différence considérable entre la durée pendant laquelle le virus de la BT est détecté par isolement du virus à des oeufs embryonnés (8 semaines) et la durée pendant laquelle le génome viral est détecté par RT-PCR (pendant 20 semaines) pourrait être expliquée par une réduction de la durée de vie des hématies à la surface desquelles le virus de la BT est fixé ou par une diminution du pouvoir infectieux des particules virales fixées sur les globules rouges. Ces données illustrent la prudence des conclusions qu'il est possible de tirer entre les résultats d'études strictement virologiques et celles qui ne s'appuient que sur la détection des génomes viraux. Les particules virales sont présentes dans des invaginations de la membrane des hématies à l'abri du système immunitaire. De plus, les particules virales associées aux membranes des hématies ressemblent morphologiquement à des cores viraux (particules virales ne possédant pas les deux protéines de surface VP2 et VP5) qui sont peu infectieux pour les cellules de mammifères mais qui le sont pour les cellules d'insectes.

Le sang d'ânes et de chevaux contient des protéases capables de cliver la protéine VP2 du virus de la peste équine ; ce clivage augmente le pouvoir infectieux des particules virales pour les cellules d'insectes. Ainsi, les données obtenues pour le virus de la BT sont susceptibles d'être extrapolées au virus équinestique. Les résultats obtenus par RT-PCR à partir des prélèvements de sang des ânes et des mulets indiquent que le segment génomique S7 est présent dans le sang pendant 55 jours mais ces résultats ne permettent cependant pas de conclure à la présence de virus infectieux. Il serait nécessaire, à cette fin, d'inoculer les prélèvements de sang positifs par RT-PCR, à des souriceaux nouveau-nés, à des chevaux ou à des insectes vecteurs. La question de savoir si une telle virémie est suffisante pour infecter des insectes vecteurs n'est pas résolue.

Conséquences épidémiologiques

En partant de l'hypothèse que le génome détecté provienne de particules virales intactes et infectieuses, les résultats que nous avons obtenus pourraient confirmer le rôle que jouerait l'âne dans la transmission de la maladie. En effet, au cours des dernières épizooties qui ont sévi en Espagne de 1987 à 1990, les ânes ont été suspectés d'être impliqués dans la survie du virus pendant l'hiver [16]. De même, les ânes et les mulets, fort nombreux au Maroc, sont susceptibles d'être responsables du maintien du virus équinestique dans ce pays de 1989 à 1991.

L'hypothèse que les ânes et les mulets puissent jouer le rôle de réservoir du virus entre les périodes épizootiques est-elle en accord avec l'histoire de ces épizooties ?

L'importation de zèbres infectés en provenance de Namibie est à l'origine des premiers foyers de peste équine dans la région de Madrid (Espagne) en septembre 1987 [16]. En 1988, la maladie frappe le sud

de l'Espagne et y perdure jusqu'en 1990. La survie de *Culicoides imicola* infectés pendant la période hivernale, selon Lubroth [4], serait susceptible d'expliquer le maintien de la maladie de 1988 à 1990 dans le sud de l'Espagne où règne un climat hivernal très doux, mais en aucun cas le passage du virus de la région de Madrid vers le sud de l'Espagne en 1988. En effet, un climat hivernal plus rigoureux dans la région de Madrid ne permet pas aux insectes de survivre pendant l'hiver. En revanche, si les ânes ont joué le rôle de réservoir du virus, il est possible de supposer que le virus ait été transmis à bas bruit d'âne à âne par l'intermédiaire des *Culicoides imicola* infectés et qu'à la suite de mouvement d'ânes vers le sud de l'Espagne, ces animaux aient contaminé des *Culicoides* présents dans cette région pendant l'hiver. Un cycle ininterrompu, dans le sud de l'Espagne et du Portugal, se serait alors installé entre hôtes vertébrés et invertébrés. Comme l'attestent les résultats de capture d'insectes à partir des pièges, la population de *Culicoides imicola* augmente du mois de mai aux mois d'octobre et novembre (avec un pic en septembre) puis diminue considérablement pendant les six mois suivants [15]. Or, en Andalousie, la maladie réapparut pendant le mois d'octobre 1988 puis éclata de façon spectaculaire, en 1989, en juillet, août et septembre, période d'activité maximale des insectes [5]. En 1990, seule la région de Malaga a été touchée par l'épizootie qui est intervenue entre les mois de septembre et novembre. Mellor [7] a montré que les *Culicoides imicola* étaient capables de survivre pendant la période hivernale au sud de l'Espagne et du Portugal. L'association de la présence des insectes vecteurs en hiver et d'une virémie persistante chez l'âne serait la cause du caractère enzootique de la maladie en Espagne. Par contre, l'épizootie qui a touché Madrid en 1987 s'est naturellement éteinte avec la disparition des *Culicoides imicola* en hiver.

Au Maroc, l'étude des foyers de peste indique que leurs dates d'apparition coïncident avec la période de forte activité des *Culicoides imicola*. Le premier foyer est apparu en octobre 1989 dans la province de Tétouan puis, après la saison hivernale, la peste a éclaté, en s'étendant vers le sud du pays, du mois d'août au mois de décembre 1990 et en 1991, du mois de juillet au mois d'octobre 1991.

Dans l'hypothèse où la détection du segment génomique S7 dans le sang correspondrait à la présence du virus infectieux (ce qui reste à démontrer), l'âne et le mulet auraient, selon nos résultats, une durée de virémie d'environ 55 jours qui s'avère ainsi trois fois plus longue que la durée maximale connue de la virémie chez le cheval qui est de 18 jours [7, 8].

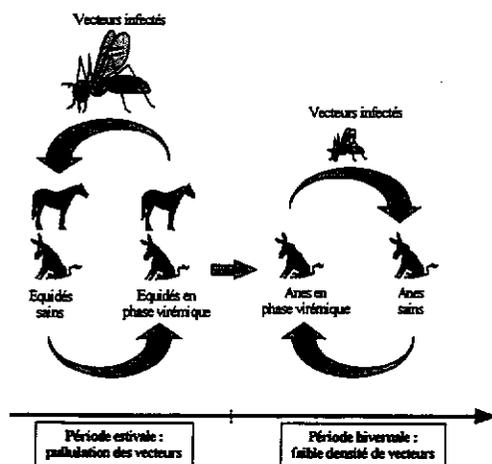
Nous pouvons, dans l'hypothèse où les échantillons de sang d'ânes et de mulets, dans lesquels le génome viral est détecté pendant 55 jours, restent toujours infectieux, proposer le modèle épidémiologique représenté sur la figure 6.

La persistance d'une faible population de moucheron (*Culicoides imicola*, *obsoletus*, *pulicaris*, *variipennis*... , tous susceptibles de transmettre la peste équine)

pendant l'hiver, combinée à la présence d'animaux virémiques, permettrait au virus de continuer à circuler pendant les périodes froides.

FIGURE 6

Hypothèse d'un modèle épidémiologique de transmission de la peste équine



II - CONCLUSION

La peste équine constitue l'un des risques sanitaires majeurs chez les équidés. Les conséquences économiques sont désastreuses pour la filière chevaline lorsqu'un pays est déclaré infecté. Les techniques de diagnostic classiquement utilisées ne s'avèrent pas suffisamment sensibles comme l'a illustré l'apparition de la peste équine en Espagne en 1987.

Nous avons développé un test couplé de transcription-inverse et d'amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR) permettant la détection du virus équine (AHSV) à partir d'échantillons cliniques. Les amorces que nous avons choisies permettent d'amplifier le segment génomique S7 des neuf sérotypes connus du virus de la peste équine. Aucune amplification non spécifique n'est obtenue à partir d'autres acides nucléiques utilisés comme matrices (vis-à-vis des virus les plus couramment rencontrés chez les équidés ainsi que vis-à-vis d'autres *Orbivirus* tels que les 24 sérotypes du virus de la bluetongue et les sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7 du virus de la maladie hémorragique du cerf). Ces résultats permettent d'utiliser la RT-PCR

pour un diagnostic de groupe AHSV.

Pour ce qui concerne l'épidémiologie moléculaire, les techniques d'amplification génique et de séquençage direct permettent de disposer en quelques jours, d'informations précises quant aux degrés de parenté des souches virales entre elles. Ainsi, les marqueurs épidémiologiques fondés sur l'analyse des séquences génétiques sont beaucoup plus pertinents que la seule évaluation des caractéristiques antigéniques que permettent les techniques virologiques classiques (même si le recours à ces dernières reste indispensable).

Enfin, dans le domaine de l'épidémiologie analytique, la RT-PCR a permis d'étayer l'hypothèse selon laquelle les ânes et les mulets pourraient jouer le rôle de réservoir du virus pendant la saison froide. Il serait nécessaire, cependant, de déterminer si les échantillons de sang dans lesquels le segment S7 est détecté sont infectieux pour les vecteurs et/ou les espèces cibles.

III - BIBLIOGRAPHIE

1. BLACKBURN N.K. SEARL E.L., PHELPS R.J. ~ Viruses isolated from *Culicoides* (*Dipt cerat*) caught at the veterinary research farm Mazowe, Zimbabwe. *J. Entomol. Soc. Afr.*, 1985, 48, 331-336.
2. DU TOIT R.M. ~ The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, 1944, 19, 7-16.
3. HOLMES I.H. ~ Classification and nomenclature of viruses. Family *Reoviridae*. In : Fifth Report of

- the international Committee on taxonomy of viruses. Edited by Francki R.I.B., Fauquet C. M., Knudson D.L. and Brown F. *Arch. Virol.*, suppl. 2, 1991, 186-199.
4. LUBROTH J. ~ The complete epidemiologic cycle of African horse sickness : our incomplete knowledge. In : Bluetongue, African Horse Sickness virus and related Orbivirus. Edited by Walton TE and Osburn BI, CRC Press., 1992, 197-204.
 5. LUBROTH J. ~ African horse sickness and the epizootic in Spain 1987. *Equine Pract.*, 1988, 10, 26-33.
 6. MacLACHLAN N.J., NUNAMAKER R.A., KATZ J.B., SAWYER M.M., AKITA G.Y., OSBURN B.I. AND TABACHNICK W.J. ~ Detection of Bluetongue virus in the blood of inoculated calves : comparison of virus isolation, PCR assay and *in vitro* feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.*, 1994, 136, 1-8.
 7. MELLOR P.S. ~ African horse sickness : transmission and epidemiology. *Vet. Res.*, 1993, 24, 199-212.
 8. MELLOR P.S. ~ Epizootiology and vectors of African Horse Sickness Virus. *Comp. Imm. Microbiol.*, 1994, 17(3/4), 287-296.
 9. MELLOR P.S., BONED J., HAMBLIN C., GRAHAMS. ~ Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. *Epidemiol. Infect.*, 1990, 105, 447-454.
 10. MELLOR P.S., HAMBLIN C., GRAHAMS. ~ The occurrence of African horse sickness in Saudi Arabia. *Vet. Rec.*, 1990, 127, 41-42.
 11. MERTENS P.P.C., MARTIN L. A., WADE-EVANS A., HAMBLIN C., MEYER A., O'HARA R., BURROUGHS N. ~ African Horse sickness virus in Europe. *Second annual report.*, 1994, Volume 1, 6.
 12. MORNET et GILBERT. ~ Les maladies animales à virus. La peste équine. L'expansion éditeur, 1968 ; 476 : 195 p.
 13. MOULAY S., ZIENTARA S., SAILLEAU C. and CRUCIERE C. Detection of African Horsesickness viruses by dot blot hybridization using a digoxigenin labelled probe. *Mol. Cell. Probes*, 1995, 9, 233-237.
 14. NEVILL E.M. Cattle and *Culicoides* biting midges as possible overwintering hosts of bluetongue virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1971, 38, 65-72.
 15. RAWLINGS P., MELLOR P.S. ~ African Horse Sickness and the overwintering of *Culicoides spp.* in the Iberian peninsula. *Rev. Sci. Techn. Off. Int. Epiz.*, 1994, 13 (3), 753-761.
 16. RODRIGUEZ M., HOOGHUIS H., CASTANO M. ~ Current status of the diagnosis and control of African horse sickness. *Vet. Res.*, 1993, 24, 189-197.
 17. ROY P., MERTENS P.P.C. and CASAL I. ~ African horse sickness virus structure. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994, 17, 314-273.
 18. SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., EHRLICH H.A. and ARNHEIM N. ~ Enzymatic amplification of β globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. *Science*, 1985, 230, 1350-1354.
 19. SAILLEAU C., MOULAY S., CRUCIERE C., LAEGREID W.W. and ZIENTARA S. ~ Detection of African Horse Sickness virus in the blood of experimentally infected horses: comparison of virus isolation and a PCR assay. *Res. Vet. Science*, 1997, 62, 229-232.
 20. SAILLEAU C., MOULAY S. and ZIENTARA S. ~ Nucleotide sequence comparison of the segments S10 of the nine African horsesickness virus serotypes. *Archives of Virology*, 1997, 142(5), 965-978.
 21. ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. and CRUCIERE C. ~ Diagnosis of the African horse sickness virus serotype 4 by one-tube, one-manipulation RT-PCR reaction from infected organs. *J. Virol. Methods*, 1993, 46(2), 179 - 188.
 22. ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. and CRUCIERE C. ~ Differentiation of African horse sickness viruses by polymerase chain reaction and segments 10 restriction patterns. *Vet. Microbiol.*, 1995, 47, 365-375.
 23. ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S., WADE-EVANS A. and CRUCIERE C. ~ Application of the polymerase chain reaction to the detection of African Horse sickness viruses. *J. Virol. Methods*, 1995, 53, 47-54.