

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE : L'EXEMPLE DE LA GRIPPE DES EQUIDES*

S. Zientara ¹

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 le domaine de l'épidémiologie moléculaire en prenant comme exemple le virus de la grippe des équidés.

Les virus influenza équins évoluent par le biais d'échanges de segments génomiques ou par mutations ponctuelles, des protéines de surface (hémagglutinine - HA - et neuraminidase -N-) notamment.

La détermination et la comparaison des séquences nucléotidiques des gènes cibles (en particulier, du gène codant pour l'HA) permettent, de façon plus précise que les techniques classiques - sérologiques notamment -, de caractériser des isolats viraux et de suivre l'évolution temporelle des souches grippales. Ces méthodes s'avèrent utiles pour adapter la composition des vaccins anti-grippaux en sélectionnant les souches les plus proches des souches circulantes.

SUMMARY : The use of the molecular tools is of a high interest in epidemiology. The interest of the association of these techniques and the classical epidemiological analyses will be illustrated by taking the example of equine influenza viruses.

The determination and the comparison of the nucleotide sequences allow to characterize the virus strains more precisely than the classical methods and are useful to analyze the evolution of the equine influenza viruses. These methods are also useful to select the relevant strains which will be used in the vaccines.



I - INTRODUCTION

La grippe des équidés est la maladie des voies respiratoires la plus pénalisante sur le plan économique pour l'industrie du cheval (courses, compétitions, ventes, ...). La grippe équine est une maladie propre aux chevaux, enzootique pratiquement dans le monde entier. Seuls quelques pays ou régions dans lesquels l'introduction de chevaux en provenance de l'extérieur est rare et très contrôlée paraissent indemnes. Ils sont de toute façon très vulnérables, ainsi qu'on a pu le constater il y a quelques années, lors de la grande épizootie qui a sévi en Afrique du sud. La grippe

équine est causée par un virus *influenza A*, proche du virus de la grippe humaine, avec lequel il partage des antigènes communs. Il s'agit néanmoins de virus différents et il n'y a pas de transmission entre l'Homme et le cheval.

La détermination et la comparaison des séquences nucléotidiques des gènes viraux (en particulier, du gène codant pour l'hémagglutinine, HA) permettent de caractériser des isolats viraux et de suivre l'évolution temporelle des souches grippales.

* Texte de l'exposé présenté lors de la Journée AEEMA, 17 mai 2001

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

II - LES VIRUS INFLUENZA ANIMAUX

Les virus de la grippe sont les uniques représentants de la famille des *Orthomyxoviridae* chez les Vertébrés homéothermes. Le mot « Orthomyxovirus » provient de la combinaison de deux termes grecs : « orthos » : exact et « myxa » : mucus.

Le mot « influenza » utilisé pour qualifier la grippe semble provenir de l'expression italienne « influenza di freddo » (influence du froid).

Ces virus se caractérisent par :

- leur ubiquité, c'est-à-dire leur présence chez un grand nombre de représentants du règne animal (primates, périssodactyles, artiodactyles, chiroptères, mammifères marins, carnivores et de nombreuses espèces d'oiseaux) ;
- leur plasticité, leur capacité à se modifier.

Les modifications antigéniques des virus résultent des modifications génétiques.

Les modifications mineures ou glissement antigénique (ou « drift ») portent sur un ou quelques acides aminés

des protéines de surface du virus (l'hémagglutinine H et la neuraminidase N), qui vont déterminer autant de variants à l'intérieur du même sous-type.

Les modifications antigéniques majeures (ou « shift ») surviennent brutalement. Elles portent sur l'hémagglutinine seule ou simultanément sur l'hémagglutinine et la neuraminidase. Ces modifications, qui caractérisent les nouveaux sous-types A, ne peuvent s'expliquer par des mutations ponctuelles. Les modifications complètes des structures de l'hémagglutinine et de la neuraminidase supposent un changement total des fragments génomiques codant pour ces protéines. Il s'agit d'échange de fragments génomiques entre souches d'origine animale variée à l'occasion d'infections mixtes au cours desquelles deux virus différents infecteraient la même cellule et échangeraient un ou plusieurs de leur huit fragments génomiques. En effet, les orthomyxovirus sont des virus à génome constitué de huit segments d'acide ribonucléique ce qui favorise les recombinaisons génétiques de ce type.

III - LES GRIPPES ANIMALES

Dans le monde vétérinaire, des virus grippaux comparables à ceux que l'on trouve chez l'Homme infectent naturellement les porcs, les oiseaux domestiques ou sauvages, les chevaux mais aussi des espèces aussi différentes que les visons, baleines, phoques, ruminants,...

Il s'agit toujours de virus de types A ou C. Il y a au sein du type A, 15 sérotypes de HA et 9 de NA. Les H3 et 7 ont été retrouvés chez le cheval, H1 et H3 chez le porc, tous les autres chez les oiseaux. Les N8 et N7 ont été isolés chez le cheval, N1 et N2 chez le porc, tous les autres chez les oiseaux.

Deux virus grippaux ont été identifiés chez le cheval : A/equine/Prague/1/56 (H7N7) et A/equine/Miami/1/63 (H3N8) [Timoney, 1996]. Le virus A/equine/Prague/56, prototype du sous-type H7N7, n'a plus été isolé depuis 1980 (dernier isolement en Yougoslavie). Deux hypothèses sont actuellement

retenues : soit le virus continue de circuler de manière silencieuse, soit il a effectivement disparu après avoir été supplanté par un autre sous-type. Les virus de sous-type H3N8 (dont le prototype est A/equine/Miami/63) sont, par contre, répandus sur tous les continents (à l'exception, semble-t-il de l'Australie) [Mumford, 1992 ; Mumford et Wood, 1993].

Il semble qu'actuellement les virus A/equine H3N8 sont les seuls responsables des foyers cliniques qui continuent à être régulièrement observés.

En pratique, les virus circulent dans tous les effectifs de chevaux d'Europe, notamment en France, en Grande-Bretagne et en Irlande, en Europe du Nord, aux Etats-Unis et au Canada. Une grande épizootie a été décrite en 1991 en Chine. L'Inde a été touchée à la fin des années 80, à la suite de l'introduction de chevaux européens.

IV - INTERET DES TECHNIQUES MOLECULAIRES

L'association de PCR (amplification en chaîne par polymérase) et de séquençage des produits d'amplification ainsi obtenus permet d'obtenir, en quelques jours, la séquence nucléotidique (et par conséquent, la séquence en acides aminés correspondante) du gène choisi.

Il est cependant nécessaire de réduire, voire d'éliminer, les changements artéfactuels de séquences, c'est-à-dire causés par les erreurs provoquées par les enzymes utilisées lors de la réalisation de ces méthodes. A titre d'exemple, la transcriptase inverse (RT) qui synthétise de l'ADN à partir de l'ARN, peut induire un taux d'erreur de 10^{-4} . De même, la polymérase employée au cours de la PCR peut entraîner des substitutions nucléotidiques avec une fréquence de 0,2 à $2 \cdot 10^{-4}$ erreur/pb. Ainsi, pour une séquence de 300 pb, après 30 cycles, 0,2 à 2 substitutions artéfactuelles seraient produites.

Afin de limiter ces substitutions artéfactuelles, différentes précautions doivent être prises :

- utiliser des enzymes (RT et polymérases) les plus fidèles possibles ;

- séquencer les amplicons et non pas des segments-clonés ; en effet, les amplicons représentent les séquences « consensus », représentatives de la population génétique correspondante ;
- vérifier la reproductibilité et la répétabilité des techniques employées ;
- ajouter un témoin de séquençage (gène de séquence connue qui sera séquencé simultanément et dans les mêmes conditions que les gènes à tester).

Ainsi, lorsque ces conditions ont été respectées et si le taux de mutations observé entre deux séquences est supérieur au taux calculé de mutations attendues, il est possible de conclure au caractère non-artéfactuel de ces mutations.

Pour ce qui concerne les virus influenza, la variabilité génétique est connue et est le support biologique de leur évolution.

V - EVOLUTION DES VIRUS DE LA GRIPPE DES EQUIDES

1. RESEAU DE SURVEILLANCE DES VIRUS INFLUENZA EQUINS

Sous l'égide de l'Association vétérinaire équine française (AVEF), un réseau de surveillance des virus influenza équins a été constitué en 1998. Ce réseau est similaire au système de surveillance des virus humains. Des vétérinaires sentinelles, volontaires, au nombre de 70, effectuent les prélèvements (écouvillons nasopharyngés), adressent les déclarations d'infection et envoient les échantillons aux laboratoires correspondants. Les souches isolées par les laboratoires du réseau (laboratoire départemental Franck Duncombe, laboratoire Pasteur-Cerba et laboratoire de l'AFSSA-Alfort) sont séquencées.

Le prélèvement est inoculé à l'embryon de poulet par voie amniotique ou par voie allantoïque ou à des cultures de cellules en présence de trypsine. Le virus est détecté et identifié au bout de quelques jours par hémagglutination.

Des tests rapides permettent de confirmer ou d'exclure la présence de virus grippal. Ainsi, un test ELISA à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-nucléoprotéine employé chez l'Homme est utilisé pour détecter en 20 à 30 minutes, les virus équins à partir d'écouvillons nasopharyngés.

2. ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES VIRUS INFLUENZA EQUINS

La dérive antigénique résulte de l'accumulation de mutations lors de la réplication du génome viral. La pression immunitaire engendrée au sein d'une population par le virus dans laquelle il circule, induit une ou plusieurs mutations ponctuelles des antigènes de surface et favorise ainsi l'émergence d'un nouveau variant. La cassure antigénique, plus rare, repose sur l'échange de deux ou plusieurs segments génomiques ; le virus obtenu est donc très différent de chacun des deux virus parentaux.

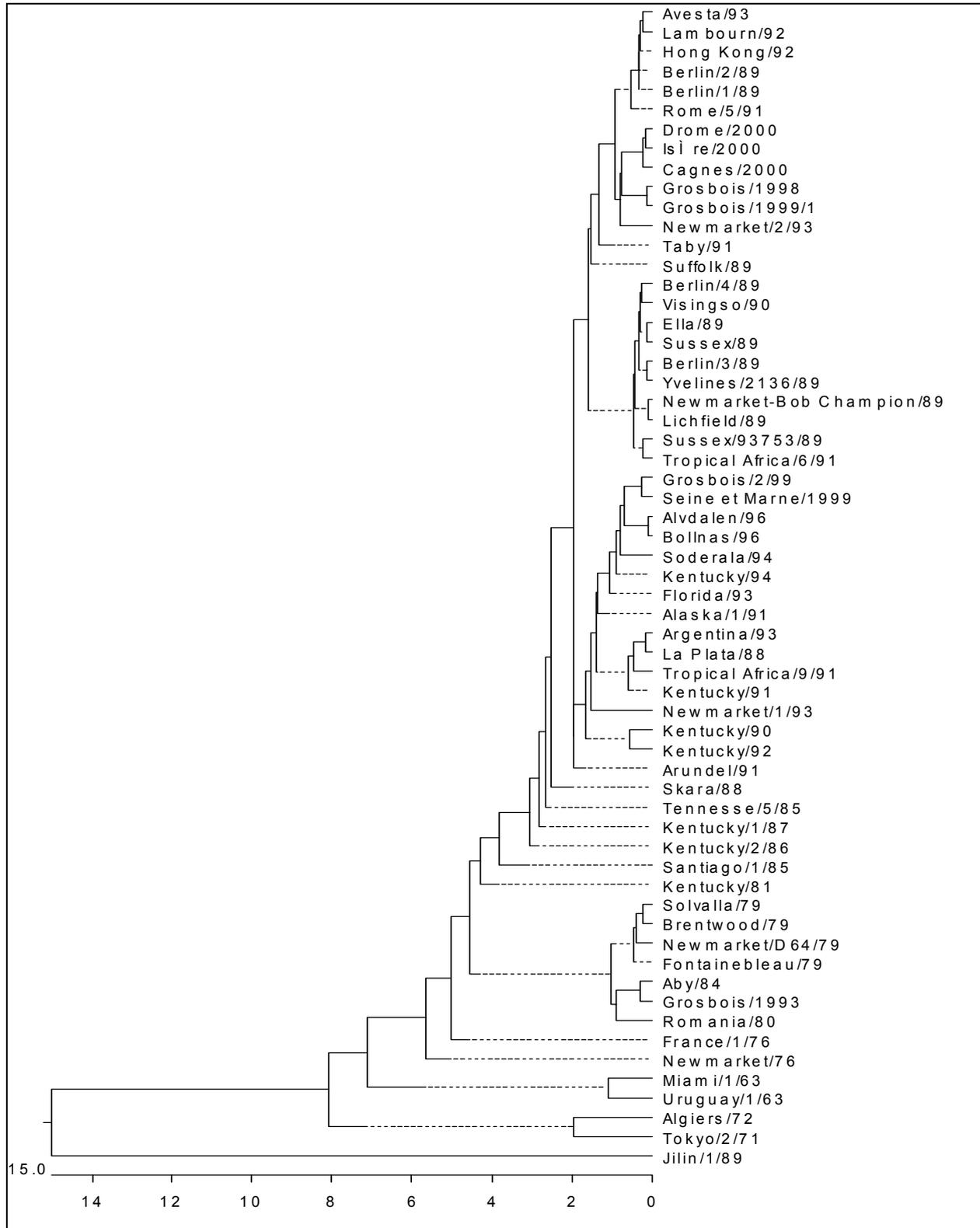
La détermination et la comparaison des séquences nucléotidiques des segments codant pour l'hémagglutinine (en particulier pour le domaine HA1) permettent d'étudier l'évolution des virus grippaux et d'identifier de nouveaux variants.

A l'aide de logiciels spécialisés, les séquences nucléotidiques des différents isolats sont comparées entre elles. Cette comparaison est matérialisée sous la forme d'un arbre (figure 1) dont la longueur des branches séparant deux souches est proportionnelle à leur différence génétique.

La figure 1 présente la comparaison des séquences de 60 isolats.

FIGURE 1

Analyse phylogénétique des souches de virus de la grippe des équidés par comparaison des séquences nucléotidiques des gènes de l'hémagglutinine (HA).



Ainsi, ces méthodes ont permis d'aboutir à des conclusions importantes quant à l'épidémiologie des infections à virus influenza équins [Binns *et al.*, 1993 ; Endo *et al.*, 1992 ; Kawoaka *et al.*, 1989 ; Daly *et al.*, 1996].

L'isolat situé en bas de l'arbre (Jilin/89) a été isolé en Chine en 1989. Le taux de morbidité était de 80% lors d'une épizootie et le taux de mortalité était de 20% [Chambers *et al.*, 1994].

Plus de 13 000 chevaux furent infectés. Les analyses phylogénétiques ont montré que plus de 4 segments géniques sur 8 étaient d'origine aviaire. Ces données génétiques ont confirmé que ce virus a pu franchir la barrière d'espèce et constitue le premier cas de transmission potentielle directe des virus influenza des oiseaux aux équidés.

Daly *et al.* [1996] ont montré que les virus équins H3N8 se répartissaient en deux groupes génétiquement distincts, mais corrélés à des zones géographiques d'isolement. Deux lignages (européens et américains) dans lesquels les souches se répartissent, ont été définis. Le nom de l'isolat ne reflète pas nécessairement la nature de leur séquence génétique. Ainsi, l'isolat Hong Kong/92 (isolé à Hong Kong) appartient au lignage européen [Lai *et al.*, 1994] ; en effet, ce virus a été isolé à partir d'un cheval en provenance d'Europe (et en phase d'incubation lors du voyage).

La souche Miami/63, présente dans certains vaccins, est relativement éloignée des souches récemment isolées en Europe. Il est important de noter que l'immunité anti-hémagglutinine est corrélée avec le taux de protection et que par conséquent, il y a une corrélation relative entre les divergences génétiques et les différences antigéniques entre deux souches distinctes.

La séquence de la souche A/equine/Grosbois/93 est proche de la séquence de la souche A/equine/Fontainebleau/79 ce qui illustre que l'évolution génétique des virus grippaux équins est relativement lente puisque des virus isolés à 16 ans d'intervalle

possèdent des séquences nucléotidiques similaires. De plus, cette souche est proche du groupe des souches du lignage européen [Manuguerra *et al.*, 2000].

La séquence du virus A/equine/Grosbois/98 est proche de la séquence de la souche de A/equine/Newmarket/2/93, prototype du lignage européen. L'étude des sites antigéniques majeurs (cinq sites localisés à la surface de l'hémagglutinine) indique que cinq substitutions caractéristiques des souches du lignage américain sont présentes chez A/equine/Grosbois/98.

Différentes souches (A/equine/1/Drome/2000, Isère/2000, Cagnes-sur-Mer/2000) de virus équins de sous-type H3N8 ont été isolées pendant l'année 2000. L'analyse phylogénétique a montré que ces isolats (mais aussi les souches Grosbois/99 et Seine-et-Marne/99 isolées à l'AFSSA Alfort) appartenaient aux lignages européen et américain (pour les souches Grosbois/99 et Seine-et-Marne/99). Il s'agit de la première mise en évidence de souches du lignage américain en France.

Ces données illustrent la co-circulation en France de souches appartenant aux lignages européen et américain. Afin de mieux préciser la nature des souches qui circulent dans les populations d'équidés, mais aussi afin de choisir de façon la plus pertinente possible les souches qui devront être présentes dans les vaccins, il est nécessaire de disposer d'un grand nombre de souches. Le réseau d'épidémiologie constitue un outil qui devrait permettre de les isoler.

Ces données génétiques renforcent la nécessité d'une surveillance internationale des virus équins qui circulent dans les pays à partir desquels s'effectuent l'essentiel des mouvements de chevaux (vente, courses, compétition, ...). De même, les axes stratégiques quant au choix des souches introduites dans les vaccins s'appuient sur de telles données : nécessité d'introduire une souche du groupe Europe et une souche du groupe Amérique, abandon de la souche ancienne Miami/63, maintien de la souche A/equine/1/Prague/56 H7N7...

VI - PROPHYLAXIE MEDICALE

Chez le cheval, de nombreux vaccins à virus inactivés sont commercialisés en France. Tous ces vaccins comportent une souche du sous-type H7N7 (A/equine/1/Prague/56) et une ou plusieurs souches du sous-type H3N8 (A/equine/2/Miami/63 et Fontainebleau/79 ou Lexington/81). Peuvent être associées d'autres valences (herpès virus EHV-1, réovirus équins 1 et 3, tétanos). La vaccination grippale est devenue obligatoire en 1969 pour tous les chevaux

présentés à un concours ou une exposition, puis pour les chevaux de course (galop, steeple-chase, trot).

Récemment, la composition des vaccins grippaux de certains producteurs a été modifiée sur le marché français : la valence A/Miami/63 a été retirée à cause de la faible protection croisée qu'elle confère par rapport aux souches présentes en France et des souches du lignage européen ont été ajoutées.

VII - BIBLIOGRAPHIE

1. Binns M.M, Daly J.M, Chirnside E.D., Mumford J.A., Wood J.M., Richards C.M. and Daniels R.S. ~ Genetic and antigenic analysis of an equine influenza H3 isolate from the 1989 epidemic. *Arch. Virol.*, 1993, **130**, 33-43.
2. Chambers T.M., Lai A.C.K, Franklin K.M. and Powell D.G. ~ Recent evolution of the hemagglutinin of equine-2 influenza virus in the U.S.A. 1994, In Proceedings of the 7th international Conference Equine Infectious Diseases, 180 Newmarket : R and W Publications. Tokyo, 175-180.
3. Daly J.M., Lai A.C.K., Binns M.M., Chambers T.M., Barrandeguy A.M. and Mumford J.A. ~ Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J. Gen. Virol.*, 1996, **77**, 661-671.
4. Endo A., Pecoraro R., Sugita S. and Nerome K. ~ Evolutionary pattern of the H3 haemagglutinin of equine influenza viruses : multiple evolutionary lineages and frozen replication. *Arch. Virol.*, 1992, **123**, 73-87.
5. Kawoaka Y, Bean W.J. and Webster R.G. ~ Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. *Virology*, 1989, **169**, 283-292.
6. Lai A.C.K., Lin Y.P, Powell D.G, Shortridge K.F, Webster R.G, Daly J. and Chambers T.M. ~ Genetic and antigenic analysis of the influenza virus responsible for the 1992 Hong Kong equine influenza epizootic. *Virology*, 1994, **204**: 673-679.
7. Manuguerra JC, Zientara S., Sailleau C., Rousseau C., Gicquel B., I Rijks and Van der Werf S. ~ Evidence for evolutionary stasis and genetic drift by genetic analysis of MANUGtwo equine influenza H3 viruses isolated in France. *Vet. Microbiol.*, 2000, **74**, 59-70.
8. Mumford J. ~ Progress in the control of equine influenza.1991. In Proceedings of the 6th International Conference of Equine Infectious Diseases. Cambridge, Edited by W. Plowright, P.D, Rosedale and J.F Wade, Newmarket : R and W Publications, 1992, 207-218.
9. Mumford J. and Wood J. ~ Conference report on WHO/OIE meeting : consultation on newly emerging strains of equine influenza. *Vaccine*, 1993, **11**: 1172-1175.
10. Timoney P. ~ Equine influenza. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 1996, **19(3)**, 205-211.

