INTERETS ET LIMITES DES OUTILS MOLECULAIRES DANS LE DIAGNOSTIC ET L'EPIDEMIOLOGIE DE LA FIEVRE CATARRHALE DES OVINS *

S. Zientara [1], Corinne Sailleau [1], E Bréard [1] et Saliha Hammoumi [1]

***RESUME** : Après un bref rappel sur les méthodes conventionnelles du diagnostic du virus de la fièvre catarrhale des ovins, les auteurs rapportent l'intérêt des travaux de séquençage des segments 2, 7 et 10 des souches corses et vaccinale. Des techniques d'amplification génique (RT-PCR) ont été développées. L'intérêt et les limites de ces méthodes sont décrites à la fois dans les domaines du diagnostic et de l'épidémiologie.*

***SUMMARY** : After a brief description of the conventional methods of Bluetongue virus diagnosis, the authors describe the interest of the nucleotide sequence determination of the segments 2, 7 and 10. RT-PCRs were developed. The interests and limits of such methods are described as far as diagnosis and epidemiology are concerned.*

I - INTRODUCTION

La fièvre catarrhale du mouton est une maladie non contagieuse transmise par des arthropodes hématophages du genre *Culicoïdes* et est inscrite sur la liste A de l'O.I.E. Cette maladie disparue d'Europe depuis 1979 est réapparue en 1998 en Grèce. Depuis cette date, plusieurs pays européens se sont déclarés atteints. Ainsi en 2001, la fièvre catarrhale ou «bluetongue» a été rapportée au Kosovo, en Yougoslavie, en Bulgarie, Macédoine, Italie (continent, Sardaigne et Sicile), France et Tunisie [Zientara *et al*., 2001].

Depuis 2001, deux sérotypes circulent dans le bassin méditerranéen : le sérotype 2, présent dans la partie ouest du bassin - Algérie, Tunisie, Corse, Sicile, Sardaigne, sud de l'Italie - et le sérotype 9, présent à l'est - Balkans et Grèce -. En Italie continentale, co-circulent les deux sérotypes 2 et 9.

Depuis l'hiver 2000-2001, la vaccination des moutons corses, à l'aide d'un vaccin vivant monovalent de sérotype 2 (vaccin produit en Afrique du sud) est réalisée par les vétérinaires sanitaires et les directions départementales des services vétérinaires. Cet article se propose de décrire les techniques de détection du virus de la « bluetongue » en insistant sur les outils moléculaires et plus particulièrement sur l'intérêt et les limites de ces méthodes dans les domaines du diagnostic et de l'épidémiologie dite moléculaire.

---

* Texte de l'exposé présenté à la Journée AEEMA, 14 juin 2002

[1] AFSSA Alfort, 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons Alfort cedex, France

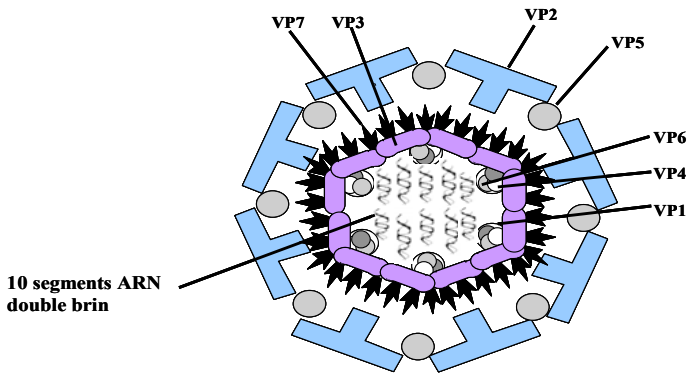
I - DESCRIPTION DU VIRUS DE LA « BLUETONGUE »

Le virus de la « bluetongue » (BT) appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*. Cette famille est composée de virus nus dont le génome est constitué de 10 à 12 segments d'ARN bicaténaire, chaque segment codant pour une ou deux protéines. Ces réovirus constituent un groupe de virus très important, mal connu (régulièrement sont isolés de nouveaux réovirus chez l'homme, les animaux ou les plantes) et capables d'infecter des hôtes aussi divers que les insectes (entomoréovirus), les poissons (aquaréovirus), les plantes (phytoréovirus), l'homme (rotavirus, coltivirus) ou les mammifères (rotavirus, orbivirus, ….) [Roy *et al*., 1990].

A l'exception des rotavirus, les réovirus sont transmis par le biais d'arthropodes. Pour ce qui concerne les orbivirus, dont le chef de file est le virus « bluetongue », la transmission s'effectue par le biais de vecteurs biologiques, les *Culicoïdes.* Ces moucherons appartiennent à la famille des *Ceratopogonidae*, genre *Culicoïdes*. Une espèce (*C. imicola*) est particulièrement importante dans le cycle biologique du virus même si d'autres espèces (*C. nubeculosus, C obsoletus, C pulicaris,* …) sont susceptibles d'intervenir dans la pérennisation du virus dans un biotope spécifique [Mellor et Boorman, 1995].

Le génome du virus BT est constitué de dix segments d'ARN (figure 1). La protéine VP2, codée par le segment 2, est responsable de l'attachement du virus à son récepteur cellulaire, a une activité hémagglutinante et est le support de la spécificité de sérotype. 24 sérotypes différents ont à ce jour été décrits. La capside interne est composée de plusieurs protéines dont VP7 [Roy *et al*., 1990]. Cette protéine, présente sous forme de trimères, est très conservée. Elle induit la synthèse d'anticorps de groupe. Trois protéines non-structurales NS1, NS2 et NS3 (cette dernière est codée par le segment 10) sont synthétisées lors de l'infection [Roy, 1992].

FIGURE 1
Structure du virus de la fièvre catarrhale



II - DIAGNOSTIC DE LA BLUETONGUE

1. DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Le diagnostic de laboratoire est indispensable pour confirmer l'infection d'un animal. Les prélèvements de choix, sont le sang sur EDTA chez l'animal vivant, la rate, le cœur, les nœuds lymphatiques chez l'animal mort. Les prélèvements doivent rapidement être acheminés, sous régime du froid (+4° C). Les échantillons sont inoculés par voie intra-veineuse à des œufs embryonnés de 9 – 11 jours. Trois jours plus tard, les embryons sont récupérés, broyés puis inoculés à des cellules en culture (BHK21 ou Vero). En quatre à cinq jours, apparaît un effet cytopathique non caractéristique. Le virus peut être identifié par neutralisation virale [Lefèvre et Desoutter, 1991].

2. DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

Les anticorps, témoins d'une infection, peuvent être détectés une dizaine de jours après infection par différentes techniques : immunodiffusion en gélose, technique ELISA ou neutralisation virale.

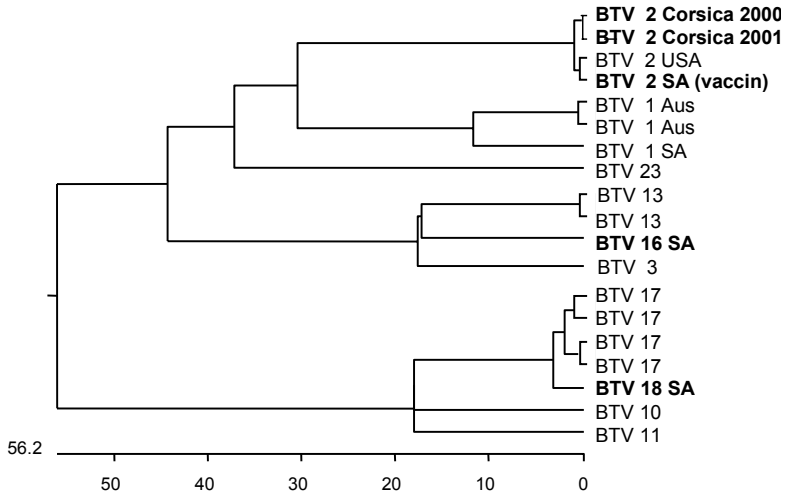
III - DEVELOPPEMENT D'OUTILS MOLECULAIRES

Lors des deux épizooties 2000 et 2001, nous avons isolé une trentaine de souches de virus de la « bluetongue » de sérotype 2. Nous avons déterminé les séquences nucléotidiques des segments 2 (codant pour VP2, protéine spécifique de type), 7 (codant pour VP7, protéine conservé de groupe) et 10 (codant pour la protéine NS3). A titre d'exemple, la figure 2 présente l'arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences des segments 2 des souches corses 2000 et 2001 et les séquences du même segment d'autres souches disponibles dans les banques internationales de séquences.

FIGURE 2

Comparaison des séquences primaires complètes (en acides aminés) des protéines VP2 des souches corses 2000, 2001, vaccinale et des souches dont les séquences sont disponibles dans GenBank (banque de données de séquences)

(en gras : souches séquencées à l'AFSSA Alfort).
SA : Afrique du sud ; Aus : Australie.
BT X : bluetongue, X = numéro du sérotype.



1. INTERET DES RT-PCR DE GROUPE

La connaissance de la séquence des segments 7 et 10 nous a permis de sélectionner des couples d'amorces qui amplifient spécifiquement les segments 7 et 10 des 24 sérotypes.

Ainsi, une technique RT-PCR (transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase) a été développée. Le génome viral peut être spécifiquement détecté en 48 heures à partir du sang ou de la rate contre une dizaine de jours pour la détection du virus à l'aide des techniques classiques.

La RT-PCR permet de détecter jusqu'à 10 DCP50 (1 DCP50 est la quantité de virus capable de détruire 50% d'un tapis cellulaire).

Ainsi, la sensibilité et la rapidité de la PCR en font une technique fort utile pour le diagnostic de la bluetongue.

2. INTERET DES RT-PCR DE TYPE

La détermination et l'étude des séquences des segments 2 des sérotypes 2, 9, 16 et 18 nous ont permis de sélectionner des amorces qui amplifient spécifiquement les segments 2 des sérotypes considérés [Zientara *et al*., 2002]. Ainsi, toutes les souches isolées en Corse ont été typées par PCR (le sérotype a d'ailleurs, à chaque fois, été confirmé par neutralisation virale).

3. LIMITES DES TECHNIQUES MOLECULAIRES

Les limites de ces techniques moléculaires sont générales et en aucun cas particulières au diagnostic du virus de la fièvre catarrhale. Ces techniques produisent de grandes quantités d'oligonucléotides amplifiées (« les amplicons ») susceptibles de contaminer le laboratoire et les prélèvements biologiques et/ou les réactifs. Dans ce cas, des réactions faussement positives peuvent être obtenues. Différentes procédures permettent de limiter ce risque : attribution de pièces spécifiques pour la réalisation des différentes étapes techniques, port de gants, utilisation de contrôles internes,… La seule utilisation de la PCR et l'exonération de l'isolement du virus privent le laboratoire de la connaissance des propriétés biologiques particulières du virus : étude des propriétés antigéniques du virus, étude de la virulence, étude génétique sur d'autres régions du génome….

Par suite, même si les progrès réalisés dans le domaine du diagnostic moléculaire par PCR ont permis d'améliorer la sensibilité et la rapidité de la détection du virus, les techniques virologiques classiques gardent toujours un intérêt réel et confortent la décision finale du vétérinaire biologiste lors du rendu du résultat.

IV - INTERET DES OUTILS MOLECULAIRES DANS L'EPIDEMIOLOGIE

La comparaison des séquences nucléotidiques des segments 2 (environ 2900 nucléotides), 7 (environ 1150 nucléotides) et 10 (environ 750 nucléotides) du virus de la « bluetongue » permet d'étudier de façon extrêmement précise des isolats entre eux. Ainsi, les séquences nucléotidiques des isolats corses 2000 et 2001 en particulier dans les régions génétiques réputées variables s'avèrent très conservées. Ceci permet de conclure que le virus 2001 n'a pas été importé en Corse mais est bien le même que celui présent en 2000. De même, l'identité entre les séquences des souches corses et italiennes confirment le lien épidémiologique que l'on peut suspecter entre les épizooties italienne et corse.

Une corrélation est observée entre les séquences nucléotidiques et l'origine géographique des isolats – notion de « topotype » - . Lorsqu'un nombre conséquent de séquences sera disponible, il pourrait être possible de mieux comprendre l'origine d'une souche sauvage.

A l'inverse, les différences nucléotidiques entre les séquences des segments 10 des souches corse et vaccinale ont permis de sélectionner des amorces qui permettent de différencier, à partir d'échantillons biologiques de mouton (sang, rate), le génome d'une souche sauvage de celui d'une souche vaccinale.

V - CONCLUSION

Les outils moléculaires, en particulier l'amplification génique et le séquençage, ont permis d'améliorer la sensibilité et la rapidité du diagnostic de l'infection par le virus de la fièvre catarrhale des ovins. Cependant, les risques de contamination étant non négligeables, les mesures les plus draconiennes doivent être prises pour éviter des réactions faussement positives dont les conséquences, pour une maladie de la liste A de l'OIE, peuvent être considérables. La comparaison des séquences nucléotidiques, en particulier pour un virus dont chaque segment génique est le support d'une propriété

biologique bien spécifique, permet de mieux analyser l'origine des souches virales, leur évolution, leur degré de parenté et d'apporter ainsi des réponses précises à des hypothèses épidémiologiques.

BIBLIOGRAPHIE

Lefèvre P. C. , Desoutter D. ~ La fièvre catarrhale du mouton (bluetongue). Etude et synthèses de l'IEMVT, Edition du Cirad, Montpellier, 1988, 117 p.

Mellor P. S. and Boorman J. P. T. ~ The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue virus. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1995, **89** : 1-15.

Roy P. ~ Bluetongue virus proteins. *J. General Virology*, 1992, **73**, 3051-3064.

Roy P., Marshall J. J. A. and French T. J. ~ Structure of bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology,* 1990*,* **162**, 43-87.

Zientara S., Hendrikx P., Albina E., De La Rocque S., Gourreau J. M., Grégory M., Libeau G., Sailleau C., Grillet C., Bréard E., Delecolle J. C. ~ La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2001. *Epidémiologie et santé animale*, 2001, **40**, 129-134.

Zientara S., Sailleau C., Rémond M, Lebreton F., Hammoumi, Dubois E., Agier C., Merle G. and Gregory M. ~ Identification of the Bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse transcription and PCR of the genome segment 2. *Vet. Record*, 2002, **150**, 19, 598-601..