CO-CIRCULATION DES VIRUS DE LA MALADIE HEMORRAGIQUE DES CERVIDES ET DE LA FIEVRE CATARRHALE OVINE A LA REUNION EN 2009*

Corinne Sailleau[1], Emmanuel Breard[1], Cyril Viarouge[1], Alexandra Desprat[1], Damien Vitour[1], Micheline Adam[1], Laurent Lasne[2], Arnaud Martrenchar[2], Laura Costes[2], Stéphan Zientara[1] et **Gina Zanella[1]**

RESUME

La fièvre catarrhale ovine (FCO) et la maladie hémorragique des cervidés (epizootic haemorrhagic disease-EHD) sont enzootiques à la Réunion et donnent lieu régulièrement à quelques épisodes cliniques plus ou moins sévères chez les bovins (EHD) ou les ovins (FCO), comme en 2003. Au mois de janvier 2009, des bovins élevés sur l'ile de la Réunion ont présenté des signes cliniques évocateurs de l'une ou l'autre de ces arboviroses. Des analyses par amplification génique (RT-PCR) réalisées sur les prélèvements sanguins de 116 bovins présents dans différentes communes de l'île, ont permis de détecter la présence du génome du virus EHD sur 106 échantillons et, sur 5 d'entre eux, la présence concomitante du virus de la FCO. Sept souches du virus EHD et une souche du virus de la FCO ont été isolées sur œufs embryonnés puis sur culture de cellules BHK21.

L'analyse des séquences nucléotidiques du segment génomique 2 (codant la protéine VP2, responsable de la spécificité de type) des souches isolées a permis d'identifier les sérotypes de ces deux orbivirus et de les comparer aux souches connues.

Mots-clés : Orbivirus, fièvre catarrhale ovine, maladie épizootique hémorragique des cervidés, diagnostic moléculaire.

SUMMARY

Bluetongue virus (BTV) and Epizootic Hemorrhagic disease of deer virus (EHDV) are endemic in Reunion Island and regularly cause some clinical outbreaks more or less severe in cattle (EHDV) or in sheep (BT) as already observed in 2003. In January 2009, cattle raised on the Island of Reunion showed clinical signs suggestive of one or other of these arbovirus diseases. Analysis by polymerase chain reaction (RT-PCR) performed on blood samples from 116 cattle present in various districts of the Island detected the presence of the EHDV genome in 106 samples and, in 5 out of them, the presence of both BTV and EHDV. Seven strains of EHDV and 1 strain of bluetongue virus were isolated in embryonated eggs and BHK21 cell culture.

By analysis of the nucleotide sequences in segment 2 of the genome (encoding the VP2 serotype specific protein) of the isolates, it was possible to identify the serotypes of these two orbiviruses and to compare those sequences with other available in database.

Keywords: Orbivirus, Bluetongue, Epizootic Hemorrhagic disease of deer, Molecular diagnosis.

---

* Texte de la communication orale présentée au cours des Journées scientifiques AEEMA, 21 mai 2010

[1] AFSSA-LERPAZ, 23 Avenue du général de Gaulle 94706 Maisons-Alfort cedex, France

[2] Direction des services vétérinaires- Parc de la Providence 97488 Saint Denis cedex, France

I - INTRODUCTION

Les virus de la fièvre catarrhale ovine (virus FCO ou « *bluetongue virus* ») et de la maladie hémorragique des cervidés ou « *Epizootic hemorrhagic disease of deer virus* - EHDV » appartiennent à la famille des *Reoviridae* et au genre Orbivirus [Verwoerd *et Erasmus*, 2004 ; Maclachlan et Osburn, 2004]. Ces deux virus présentent des similarités très importantes d'un point de vue structural, antigénique, moléculaire mais aussi de leur mode de transmission (transmission par des piqûres de moucherons de type *Culicoides*), de leur spectre d'hôte (les ruminants) et de la pathogénie. Les techniques sérologiques et moléculaires pour le diagnostic de laboratoire de ces deux maladies sont donc très similaires.

Ces deux virus possèdent sept protéines structurales différentes (VP1 à VP7) réparties en deux capsides [Roy, 2005]. La capside externe est composée de VP2 et VP5. La protéine VP2, constituant majeur de la capside externe, est exposée à la surface de la particule virale, et est l'antigène spécifique déterminant le sérotype. Vingt quatre sérotypes du virus de la FCO et 8 sérotypes du virus de l'EHD ont ainsi été identifiés. Les antigènes spécifiques de chaque sérotype induisent la production d'anticorps neutralisants qui ne neutralisent donc pas les autres sérotypes. Le segment d'ARN 2, qui code VP2, constitue la région génomique privilégiée pour effectuer des études de variabilité génétique entre différents sérotypes.

La FCO est présente sur tous les continents entre le 50ème parallèle Nord et le 35ème parallèle Sud. Cette maladie a ré-émergé en Europe en 1998 après 19 ans d'absence et, depuis, pas moins de 9 sérotypes ont été détectés. Les sérotypes 1, 2, 4, 8, 9 et 16 ont circulé largement alors que les sérotypes 6, 11 (et 25) ont circulé de façon plus limitée tant sur le plan géographique que dans le temps.

L'EHDV infecte essentiellement les ruminants sauvages comme le cerf chez lequel la sévérité des symptômes est la plus marquée. Plusieurs sérotypes (notamment les sérotypes 2 (souche Ibaraki), 6 et 7) induisent également une maladie, pouvant être sévère, chez les bovins : les signes cliniques alors observés sont identiques à ceux induits par le virus de la FCO de sérotype 8. Cette maladie est enzootique aux Etats-Unis et au Canada, où elle induit des signes cliniques exclusivement sur certaines espèces de cerfs. En Australie, en Asie du Sud Est, en Afrique Sub-Saharienne, et, depuis 2006, dans les pays du Maghreb (sérotype 6), en Israël et en Jordanie (sérotype 7), elle se manifeste sous forme d'incursion saisonnière et provoque des signes cliniques chez les bovins.

La présence de ces deux Orbivirus a été rapportée à la Réunion à plusieurs reprises. De 1974 à 1977 et en 1979, des données sérologiques ont démontré la présence du virus FCO sur l'île [Lefèvre et Dessouter, 1988]. Début 2003, l'EHDV a provoqué une épizootie sévère chez les bovins [Bréard *et al.,* 2004] et la même année un foyer de fièvre catarrhale a été décrit dans un élevage d'ovins de race Mérinos [Sailleau *et al*., 2005 ; Bréard *et al*., 2005]. En 2008, une étude sérologique réalisée par le laboratoire d'Onderstepoort (Afrique du Sud) sur une centaine de bovins Réunionnais, a montré que 88% des animaux étaient positifs en ELISA FCO et que plus d'une dizaine de sérotypes circulaient ou auraient circulé au cours des dernières années sur l'île [données personnelles]. En effet, des titres élevés en anticorps (supérieurs ou égaux au 1/80) ont été obtenus vis-à-vis des sérotypes 2, 3, 9, 10, 12, 13, 14, 15 et 16, des titres plus faibles (compris entre 1/20 et 1/40) vis-à-vis des sérotypes 1, 5, 20, 21, 23, 8 et 22.

Dans cet article nous décrivons un épisode clinique sur bovins apparu en janvier 2009 ainsi que les techniques de diagnostic de laboratoire utilisées et développées afin d'identifier les virus incriminés dans les maladies observées.

II - DONNEES CLINIQUES

Cent seize bovins présentant des signes cliniques ont été inclus dans cette étude. Ces animaux étaient de race européenne ou croisée et appartenaient à 57 cheptels distribués dans 7 communes de l'île (tableau 1, figure 1).

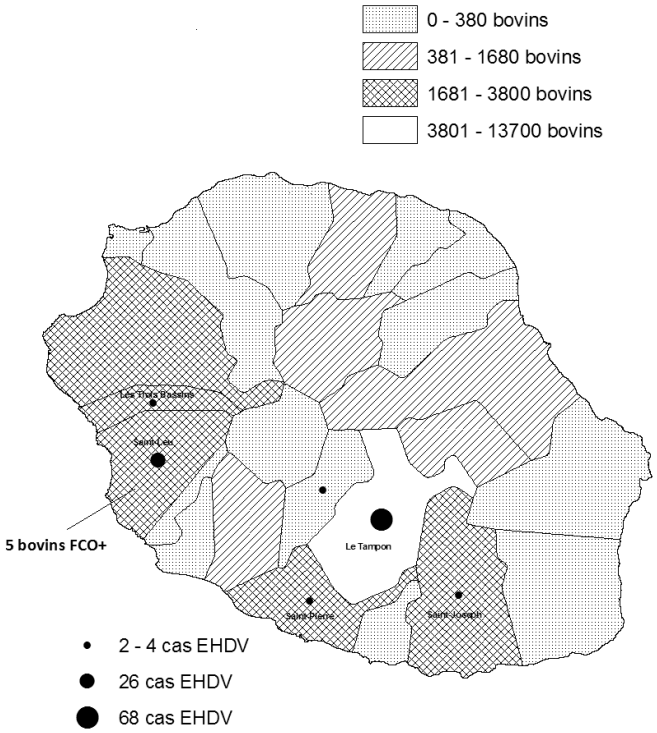
Tableau 1

Répartition du nombre de bovins avec prélèvement, EHDV+ et FCO+ par commune (RT-PCR)

Commune	Nombre de bovins avec prélèvement	Nombre de bovins EHDV+	Nombre de bovins FCO+
Le Tampon	73 (35 cheptels)	68	0
L'Entre-Deux	3 (2 cheptels)	3	0
Les Trois-Bassins	3 (1 cheptel)	3	0
Saint-Joseph	2 (2 cheptels)	2	0
Saint-Leu	30 (15 cheptels)	26	5
Saint-Louis	1 (1 cheptel)	0	0
Saint-Pierre	4 (2 cheptels)	4	0
Total	116 (57 cheptels)	106	5

Figure 1

Localisation des animaux présentant des signes cliniques/densité des bovins par commune



La plupart des animaux ont présenté une congestion des muqueuses orale ou nasale ainsi que des lésions (érosions ou ulcères) sur ces mêmes muqueuses. Pour un tiers, il y a eu une dégradation de l'état général qui s'est traduite par une chute de l'appétit ou un abattement. Quelques animaux ont également présenté du ptyalisme, une hyperthermie, une dyspnée, un jetage, un larmoiement, un œdème des membres ou une boiterie, ainsi qu'une congestion importante de la mamelle. Plusieurs de ces signes cliniques étaient présents chez un même animal au moment de l'examen clinique. Les cinq animaux co-infectés par l'EHDV et le virus de la FCO présentaient uniquement une congestion et des ulcères des muqueuses nasale ou orale.

III - DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

Du sang a été prélevé sur les 116 animaux malades. Plusieurs types d'analyses ont alors été réalisés.

1. DETECTION DE L'ARN VIRAL PAR RT-PCR

Après extraction des acides nucléiques, deux RT-PCR spécifiques des groupes FCO ou EHDV ont été effectuées :

- Pour la FCO : la trousse commerciale (ADI-352, AES) a été utilisée pour amplifier le segment 10 (codant NS3) par RT-PCR en temps réel,
- Pour l'EHDV : le kit "One-step RT-PCR" (Qiagen) a été utilisé avec des amorces spécifiques du segment 7 (codant la protéine VP7) de l'EHDV.

L'utilisation de ces deux types de RT-PCR permet de détecter respectivement les 24 sérotypes de la FCO et les huit sérotypes de l'EHDV.

La présence du génome de l'EHDV a été détectée dans 106 échantillons, et la présence concomitante des génomes de la FCO et de l'EHDV a été détectée dans cinq échantillons (tableau 1). Ces cinq animaux, de race limousine, faisaient partie d'un même cheptel de la commune de St-Leu.

2. INOCULATION SUR ŒUFS EMBRYONNES

Les prélèvements de sang positifs en RT-PCR EHDV et/ou FCO ont été inoculés à des œufs embryonnés de 11 jours [Clavijo *et al.*, 2000]. Les embryons morts qui présentaient des signes hémorragiques ont ensuite été homogénéisés et mis en contact avec des cellules BHK 21. Les surnageants de cultures de cellules présentant un effet cythopathique ont été testés en RT-PCR de groupe FCO et EHDV, afin d'identifier les virus isolés.

Ainsi, 7 isolats EHDV, 1 isolat FCO et 3 isolats FCO/EHDV ont été obtenus.

3. IDENTIFICATION DES SEROTYPES DES SOUCHES ISOLEES

3.1. NEUTRALISATION VIRALE SUR CULTURE DE CELLULES

La neutralisation virale à l'aide de 24 antisérums de référence [OIE, 2009] a permis de déterminer que la souche FCO isolée appartenait au sérotype 2.

Les sérotypes des souches EHDV n'ont pu être identifiés par cette même méthode en raison de l'absence d'antisérums spécifiques.

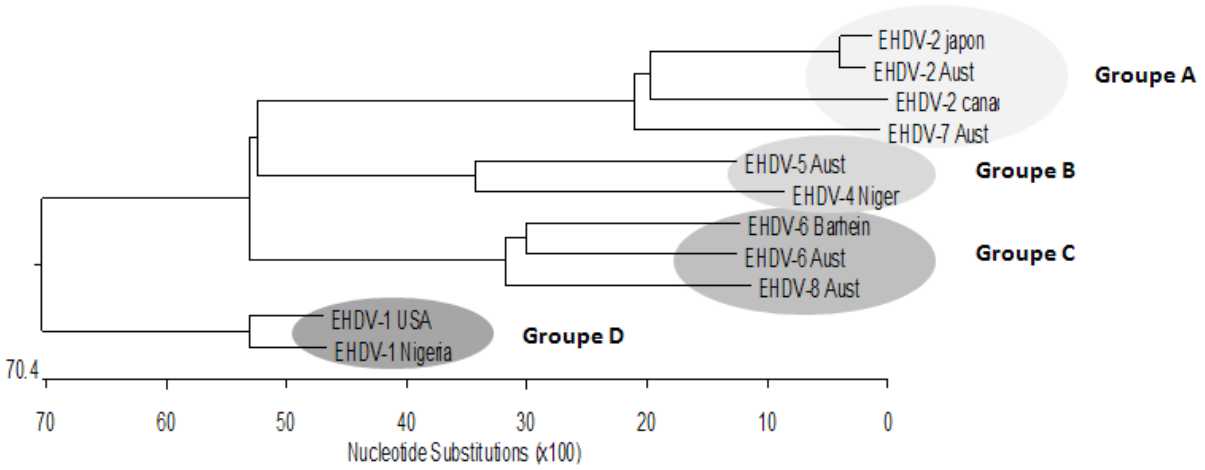
3.2. CHOIX D'UNE METHODE POUR L'IDENTIFICATION DU/DES SEROTYPES DES SOUCHES EHDV ISOLEES

L'absence de technique de diagnostic de type pour l'EHDV (absence de sérums spécifiques et de RT-PCR de type) nécessitait le développement d'une méthode afin d'identifier le sérotype des souches isolées.

L'alignement des séquences nucléotidiques des segments 2 des différents sérotypes de l' EHDV présents dans GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), a permis de les associer en 4 groupes en fonction de leur homologie de séquences (figure 2). Nous avons donc, dans chaque groupe, sélectionné et validé un couple d'amorces qui permet l'amplification spécifique des sérotypes du groupe.

Figure 2

Dendrogramme montrant les relations génétiques entre les séquences du gène 2 des souches EHDV présentes sur GenBank. Les groupes A, B, C et D réunissent les sérotypes qui présentent le plus d'homologie entre eux.



Des RT-PCR utilisant ces quatre couples d'amorces ont été réalisées sur les ARNs extraits des sept souches EHDV. Un produit d'amplification a été obtenu uniquement avec les amorces du groupe C (EHDV 6 et EHDV 8). Les séquences nucléotidiques des produits d'amplification ont été déterminées (Cogenics) et leur analyse à l'aide du logiciel BLAST 2.2.21 (NCBI) a permis d'établir leur appartenance au sérotype 6.

La même méthode a été appliquée à la souche EHDV isolée à la Réunion en 2003. Les résultats obtenus ont montré qu'il s'agissait aussi d'une souche de sérotype 6.

3.3. Determination des sequences nucleotidiques completes des segments 2

Le segment 2 des souches isolées a été séquencé après amplification du gène par RT-PCR ("One-step RT-PCR" (Qiagen)) avec des couples d'amorces spécifiques.

Pour la FCO, des amorces spécifiques du sérotype 2 ont été sélectionnées (à la suite de la détermination du sérotype par neutralisation virale) et utilisées pour l'amplification du segment 2 de la souche isolée.

Les produits de RT-PCR ont été purifiés sur gel ou directement séquencés (Cogenics). Les séquences ont ensuite été analysées avec les logiciels EditSeq et Megalign (DNA Star Inc). La comparaison des séquences avec les séquences présentes dans la banque de donnée GenBank a permis de confirmer l'appartenance de la souche isolée au sérotype 2 (figure 3).

Pour l'EHDV, à partir de la séquence partielle obtenue précédemment et des séquences nucléotidiques des souches de sérotype 6 présentes dans GenBank, des amorces ont été sélectionnées et ont permis d'obtenir les séquences complètes du segment 2 des souches isolées. Les sept souches présentaient une séquence nucléotidique parfaitement identique.

Les relations génétiques avec les autres souches EHDV sérotype 6 ont été analysées avec les logiciels EditSeq et Megalign (DNA Star Inc) (figure 4).

Figure 3

Dendrogramme montrant les relations génétiques entre la séquence du gène 2 de la souche du virus FCO (BTV) isolée et :

A. Les séquences homologues des souches FCO présentes sur GenBank
B. Les séquences homologues des souches FCO de sérotype 2 présentes sur GenBank

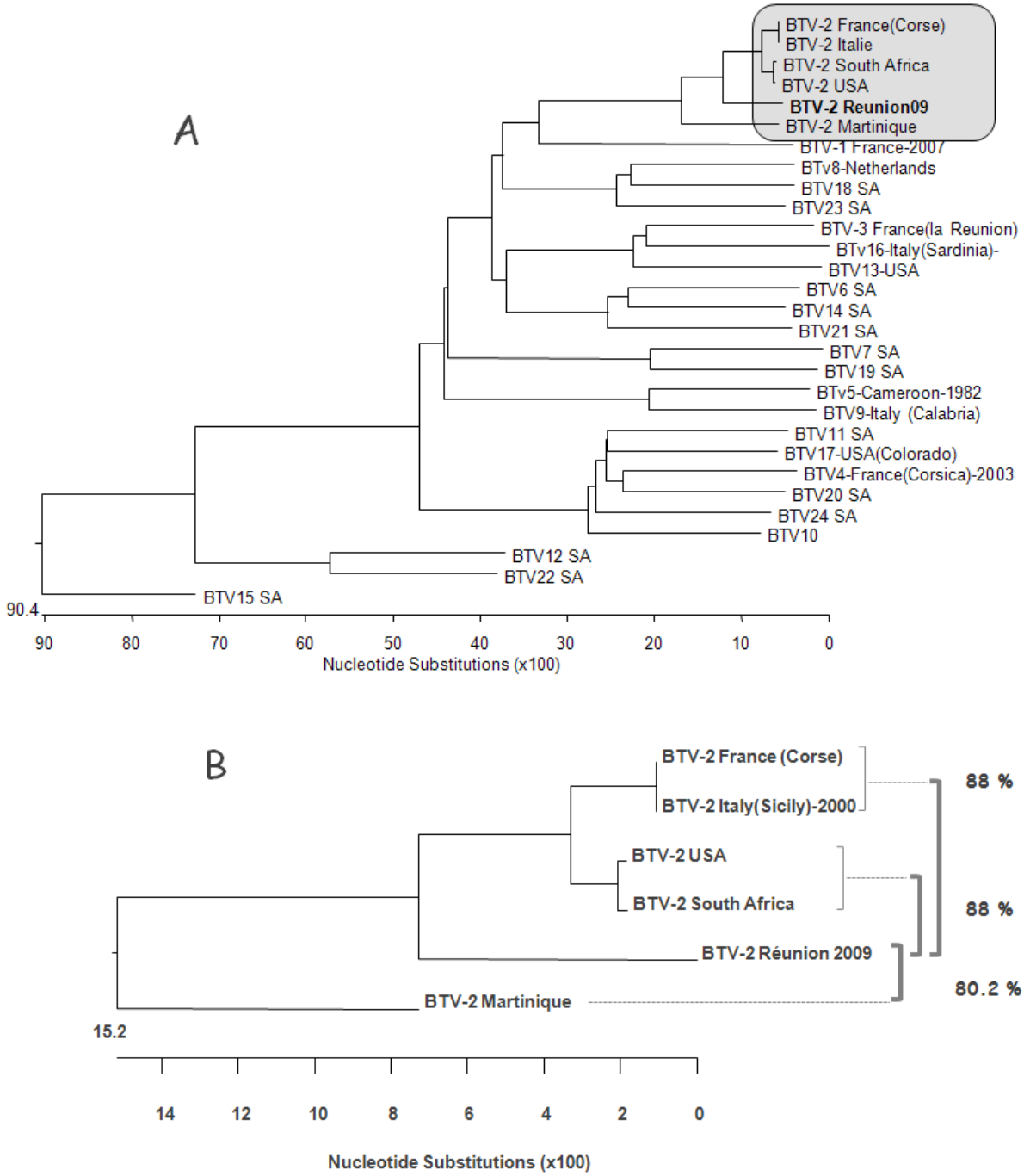
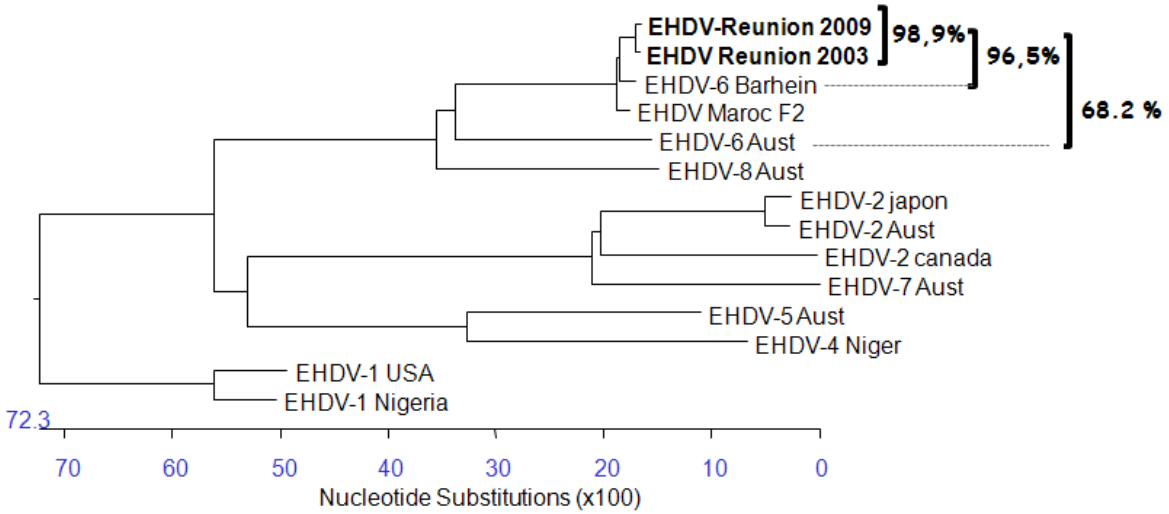


Figure 4

Dendrogramme montrant les relations génétiques entre la séquence du gène 2 des souches EHDV isolées et les séquences homologues présentes sur GenBank. Pourcentage d'homologie entre les souches de sérotype 6.



IV - DISCUSSION

Le nombre de cas lors de cette épizootie a été estimé à au moins 270 sur toute l'ile, dont seulement 116 ont pu être analysés dans notre étude. Sur les 116 animaux testés, 91% ont présenté des RT-PCR positives en EHDV et 4% à la fois en RT-PCR EHDV et en RT-PCR FCO. Ces résultats démontrent l'implication de l' EHDV dans les symptômes « BTV-like » observés. Il est fort probable que d'autres animaux sur l'île aient été co-infectés par les virus de l'EHD et de la FCO.

Les analyses phylogénétiques réalisées à partir du segment génomique 2 indiquent une très forte homologie (98,9%) entre les souches EHDV isolées lors de cette épizootie et la souche isolée en 2003. Ces données suggéreraient la circulation de la même souche sur l'île à sept ans d'intervalle. La comparaison des souches Réunionnaises avec les autres souches de sérotype 6 montre un pourcentage d'identité élevé (96,5%) avec une souche ayant circulé au Bahreïn dans les années 80 et un pourcentage d'identité faible (68,2%) avec une souche Australienne isolée en 1981.

Habituellement, ce virus n'est responsable de signes cliniques que chez les cervidés. Jusqu'en 2003 [Bréard *et al.*, 2004] (date du dernier épisode d'EHD à la Réunion), l'EHDV n'avait été responsable de symptômes sévères chez les bovins qu'à deux reprises en 1959/60 et en 1997 au Japon (EHDV-2 souche Ibaraki) [Omori *et al.*, 1969]. Depuis, les sérotypes 6 et 7 ont provoqué des épizooties importantes chez les bovins respectivement dans le Maghreb et en Israël (en 2006). Des analyses phylogénétiques complémentaires (sur l'ensemble du génome) devraient nous indiquer si les souches d'EHDV-6 isolées à la Réunion en 2003 et 2009 sont proches des souches ayant circulé dans le bassin méditerranéen ces dernières années.

Pour la FCO, même si des analyses sérologiques réalisées en 2009 démontraient la circulation récente du BTV-2 sur l'ile (données personnelles), ce sérotype n'y avait encore jamais été isolé. En 2003, le BTV-3 avait été responsable d'une épizootie sur des moutons [Sailleau *et al.*, 2005 ; Breard *et al.*, 2005]. La comparaison des séquences nucléotidiques du segment 2 de la souche BTV-2 avec les séquences homologues présentes dans Genbank montre des taux de divergence (supérieurs ou égaux à 12%) plus importants que ceux observés habituellement (ce qui ne permet pas d'émettre d'hypothèse

quant à son origine). L'isolement de ce virus, même s'il n'est pas responsable des signes cliniques observés, conforte le caractère enzootique de la FCO à la Réunion.

La présence simultanée de deux Orbivirus, provoquant des signes cliniques similaires, renforce l'importance du diagnostic de laboratoire. Celui-ci est bien développé pour le virus de la FCO mais encore très peu pour l'EHDV. En effet, pour ce dernier, il n'existe pas de technique de diagnostic sérologique rapide de type ELISA et la séroneutralisation sur culture de cellules est longue et assez délicate à interpréter. Le diagnostic repose donc essentiellement sur la détection du virus ou de son génome. Dans ce travail, nous avons développé des techniques de RT-PCR de sous-groupes qui, associées à du séquençage, permettent d'identifier rapidement le sérotype des souches, à partir du prélèvement de sang de l'animal infecté. De plus, l'analyse des séquences est une aide précieuse pour le suivi épidémiologique des souches (évolution spatio-temporelle de la circulation virale et surveillance de l'apparition de nouvelles mutations).

Comme pour le virus de la FCO, les mesures sanitaires à mettre en place lors d'une épizootie d'EHDV sont : la restriction des mouvements d'animaux sensibles, la lutte contre les vecteurs (désinsectisation) et la mise en hébergement des animaux pendant l'activité vectorielle. Ces mesures limitent l'expansion de la maladie mais ne permettent pas son éradication. Seule la vaccination, comme pour la FCO, pourrait permettre une prophylaxie efficace ; cependant, aucun vaccin n'est actuellement disponible.

Enfin, la circulation concomitante de plusieurs souches d'Orbivirus (EHDV et/ou plusieurs sérotypes de FCO) rend possible la co-infection des animaux (BTV/BTV ou BTV/EHDV) comme nous l'avons observé au cours de cet épisode clinique (cinq bovins infectés par les deux virus). De telles co-infections pourraient aggraver les symptômes des animaux. De plus, des mécanismes de réassortiment entre deux sérotypes d'un même groupe [Batten *et al.*, 2008 ; Allison *et al.*, 2010] pourraient être favorisés, risquant de provoquer l'émergence de nouvelles souches ayant des phénotypes plus ou moins virulents.

BIBLIOGRAPHIE

Allison A.B., Goekjian V.H., Potgieter A.C., Wilson W.C., Johnson D.J., Mertens P.P., Stallknecht D.E - Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in the USA containing RNA segments derived from both exotic (EHDV-6) and endemic (EHDV-2) serotypes. *J. Gen. Virol.*, 2010, **91** (Pt 2), 430-439.

Batten C., Maan S., Shaw A.E., Maan N.S., Mertens P.P. - A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. *Virus Res.*, 2008, **137 (1)**, 56-63.

Bréard E., Sailleau C., Hamblin C., Graham S.D., Gourreau J.M., Zientara S. - Outbreak of epizootic haemorrhagic disease on the island of Réunion. *Vet. Record*, 2004, **155** (14), 422-423.

Breard E., Sailleau C., Hamblin C., Zientara S. - Bluetongue virus in the French Island of Reunion. *Vet. Microbiol.*, 2005, Apr 10, **106(**3-4), 157-165.

Clavijo A., Heckert R.A., Dulac G.C., Afshar A. - Isolation and identification of Bluetongue virus. *Journal of Virological Methods*, 2000, **87**, 13-23.

Lefèvre P.C. et Dessouter D. - Fièvre catarrhale du mouton. Etudes et synthèses de l'IEMVT, Ed IEMVT, 1988, pp 115.

Maclachlan N.J., Osburn B.I. - Epizootic haemorrhagic disease of deer. *Infectious diseases of livestock.*, 2004, **2**, 1227-1230.

OIE - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Terrestrial Manual, 6th Edition, 1 & 2. Chapter 2.1.3, 2009.

Omori T.Y., Inaba T., Morimoto Y., Tanaka, Ishitani R., Kurogi H., Munakata K. and Matumoto M. - Ibaraki virus, an agent of epizootic disease of cattle resembling bluetongue. I. Epidemiologic, clinical and pathologic observations and experimental transmission to calves. *Japan J. Microbiol.*, 1969, **13**(2), 139-157.

Roy P. - Bluetongue virus proteins and particles and their role in virus entry, assembly, and release. *Adv.Virus Res*., 2005, **64**, 69-123.

Sailleau C., Bréard E., Gourreau J.M., Galibert T., Zientara S. - La fièvre catarrhale du mouton sur l'île de la Réunion. *Epidémiol. et santé anim.*, 2005, **48**, 101-104.

Verwoerd D., Erasmus B.J. - Bluetongue. - *Infectious diseases of livestock*. 2nd ed. Cape Town: Oxford University Press ; 2004, 1201–1220.