

IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU VIRUS DE LA FIEVRE CATARRHALE OVINE CHEZ DES CHEVRES EN CORSE EN 2014 *

**Cindy Bernelin-Cottet¹, Annabelle Garnier, Corinne Sailleau, Cyril Viarouge, Aurore Romey,
Aurore Fablet, Damien Vitour, Emmanuel Bréard et Stéphan Zientara**



RESUME

Depuis les années 2000, quatre sérotypes du virus de la fièvre catarrhale ovine (BT) ont été identifiés en Corse. Fin 2013, le sérotype 1 du virus (BTV-1) était détecté en Corse et une campagne de vaccination obligatoire contre ce sérotype a été mise en place chez les ruminants domestiques. Dans le cadre de cette vaccination et d'une enquête réalisée sur des troupeaux de chèvres, des échantillons biologiques ont été collectés sur des caprins corses. Le diagnostic de laboratoire a permis de confirmer la présence du BTV-1 dans l'île, mais également d'un autre sérotype de BTV. Le génome de ce virus a été entièrement séquencé et les comparaisons de séquences nucléotidiques suggèrent qu'il s'agit d'un nouveau sérotype du virus de la fièvre catarrhale ovine jamais décrit jusque alors.

Mots-clés : fièvre catarrhale ovine, nouveau sérotype, Corse.

ABSTRACT

Since 2000, four serotypes of the bluetongue virus (BTV) were detected in Corsica, France. At the end of 2013, BTV-1 was detected in Corsica and a compulsory BTV-1 vaccination program for domestic ruminants was initiated. Apart from this vaccination program, biological samples were collected from Corsican goat farms. The laboratory diagnosis confirmed BTV-1 infection in goats in the Island but also evidenced another BTV serotype. The genome of this new serotype was entirely sequenced. Comparisons of nucleotide sequences suggested that this was a new BTV serotype never described earlier.

Keywords: Bluetongue, Novel serotype, Goat, Corsica.



I - INTRODUCTION

La fièvre catarrhale ovine est une maladie infectieuse, non contagieuse, des ruminants domestiques et sauvages [Verwoerd et Erasmus, 2004]. C'est une arbovirose transmise par 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).

* Texte de la communication orale présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA, 20 mars 2015

¹ UPE, ANSES, Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort, UMR 1161 ANSES, INRA, ENVA, Maisons-Alfort, France

Le virus de la fièvre catarrhale ovine est un *Orbivirus* de la famille des *Reoviridae*. Le virus possède une double capsidie qui contient et protège le génome viral composé de dix segments d'ARN double brin, et qui codent sept protéines structurales (VP1 à VP7) et cinq protéines non structurales (NS1 à NS4, NS3A). La protéine VP2 codée par le segment 2 est la protéine majeure de la capsidie externe et est le déterminant antigénique des sérotypes viraux. La protéine VP7 codée par le segment 7 est la protéine majeure de la capsidie interne et est le déterminant antigénique de groupe des virus de la BT. Vingt-six sérotypes du virus de la BT ont été identifiés [Maan *et al.*, 2011b].

La France continentale a connu son premier cas de BT en 2006 avec l'émergence du BTV-8 d'abord apparu en Belgique, aux Pays-Bas et en Allemagne. Ce sérotype s'est largement répandu en 2007 sur le territoire. La même année, la France a été atteinte par un autre sérotype, le BTV-1. Deux campagnes de vaccination obligatoires ont permis de diminuer significativement le nombre de foyers des sérotypes 1 et 8. En 2012, la France a été déclarée indemne. Cette éradication a nécessité plusieurs années de lutte et d'efforts des professionnels et de l'État.

En 2000, la BT a été détectée en Corse chez des moutons à la suite de l'introduction du sérotype 2 (BTV-2) (BTV-2), probablement depuis la Sardaigne [Zientara *et al.*, 2002b]. En 2003 et 2004, les

sérotypes 4 et 16 ont été détectés en Corse [Zientara *et al.*, 2010]. Depuis 2004, aucune nouvelle suspicion de BT n'a été rapportée sur l'île jusqu'en septembre 2013, lorsque le LNR a isolé le BTV-1 à partir de deux troupeaux de moutons situés dans le sud de la Corse [Sailleau *et al.*, 2014]. Le virus s'est rapidement propagé à travers l'île durant les semaines qui suivirent, et une campagne de vaccination obligatoire contre le sérotype 1 a été mise en place par les autorités vétérinaires dans les troupeaux de ruminants domestiques. Au cours de cette campagne de vaccination et également d'une enquête réalisée sur des élevages de caprins fortement parasités, des prélèvements ont été faits chez différents ruminants domestiques avec ou sans signe clinique et testés pour la présence du virus BT. Les différents échantillons collectés ont été envoyés au Laboratoire national de référence de la BT à Maisons-Alfort. Chez des populations de chèvres positives en RT-PCR, un nouveau sérotype, proche du BTV-25 isolé en Suisse, et du BTV-26 isolé au Koweït, a été identifié [Hofmann *et al.*, 2008 ; Maan *et al.*, 2011a]. Les BTV-25 et 26 infectent principalement les caprins sans aucun signe clinique. Le BTV-25 n'est pas cultivable sur lignées cellulaires de mammifères (BHK, BSR – deux types de cellules rénales de hamster) classiquement utilisées pour isoler le BTV. Le BTV-26 est le premier virus mis en évidence comme pouvant être transmis par contact entre les animaux [Batten *et al.*, 2014].

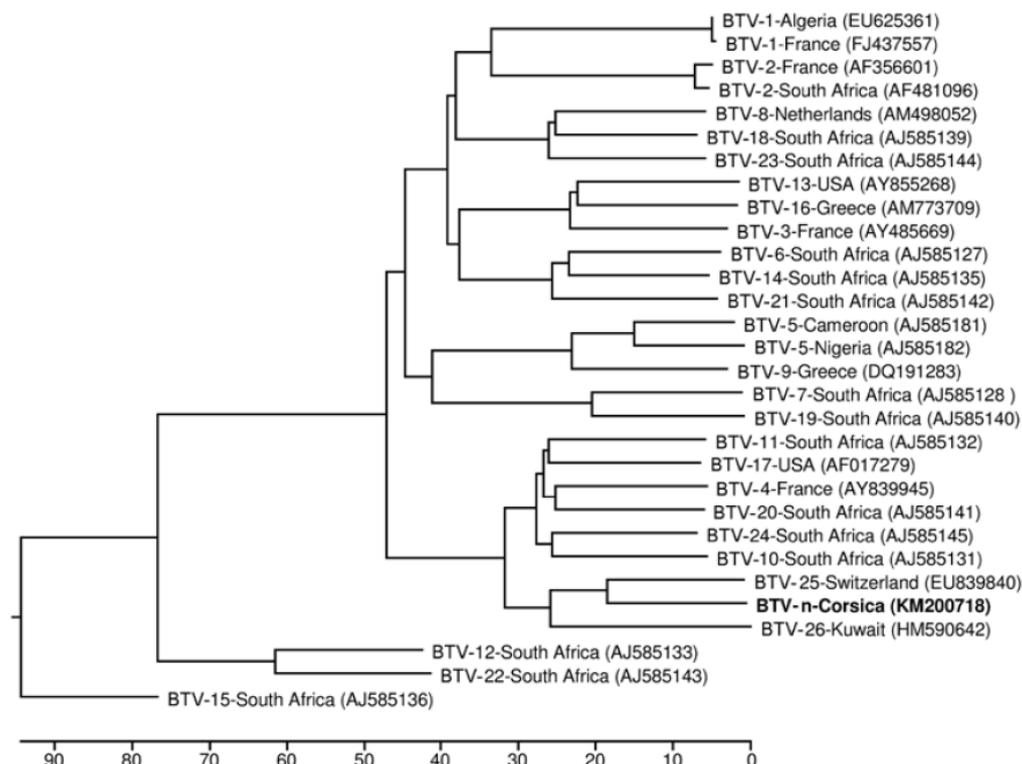
II - CONTEXTE EPIDEMIOLOGIQUE DE L'IDENTIFICATION DE CE NOUVEAU SEROTYPE DE LA BT

Entre janvier et avril 2014, sur 436 prélèvements de chèvres analysés en RT-PCR de groupe (permettant de détecter tous les sérotypes), 86 étaient positifs dont 10 n'étaient pas « typables » par RT-PCR spécifique des sérotypes (1, 2, 4, 8, 9, 11, 16 et 25). En utilisant des amorces dégénérées qui permettent l'amplification d'une région du segment 2 de certains sérotypes de la BT, nous avons obtenu un produit d'amplification dont la séquence nucléotidique montrait la plus forte homologie avec le segment 2 du BTV-25. La comparaison des

séquences nucléotidiques du segment 2 (figure 1) a montré une homologie de 73 % en acides nucléiques et 75 % en acides aminés avec le BTV-25 et de 65 % en acides nucléiques et 60 % en acides aminés avec le BTV-26. Sur le plan phylogénétique, sept segments (1 à 4, 6, 8 et 9) sur les dix segments composant le génome viral montraient une forte similarité avec les segments homologues du BTV-25 : 73 % (seg-2) à 86 % (Seg-1) en acides nucléiques et 67 % (seg-9) à 95 % (seg-3) en acides aminés [Jenckel *et al.*, 2015].

Figure 1

Arbre phylogénétique du segment 2 illustrant les divergences entre le BTV-n (en gras)
et d'autres sérotypes de BTV disponibles sur GenBank
(numéro d'accèsion indiqué entre parenthèses)



III - UN NOUVEAU SEROTYPE ?

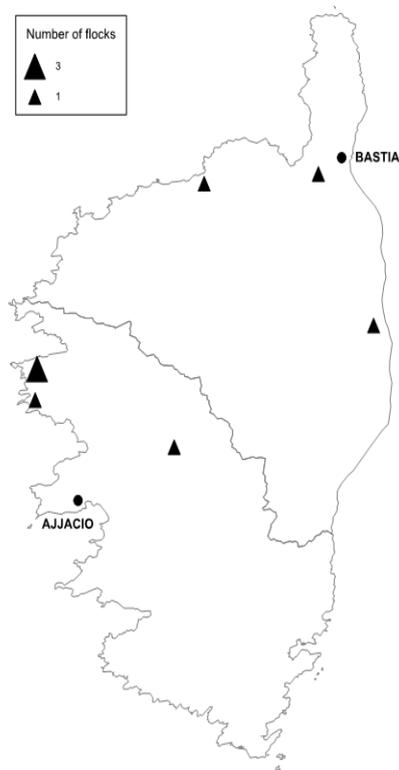
Le BTV-n est génétiquement différent des sérotypes classiques. En effet, le virus n'est pas neutralisé par les sérums de référence dirigés contre les vingt-quatre sérotypes du virus de la BT, ni par un sérum issu d'une chèvre naturellement infectée par le BTV-25. Des critères permettant la définition de sérotype ou de nucléotype ont été définis par Maan *et al.* [2011a], et Hofmann *et al.* [2008]. Douze nucléotypes ont ainsi été établis, les membres d'un même nucléotype étant caractérisés par au moins 66,9 % d'identité dans la séquence nucléotidique de

leur segment 2. Nos résultats montrent que le segment 2 du BTV-n partage 73 % d'homologie avec le BTV-25. Selon la définition de Maan, ce sérotype ne serait donc pas un nouveau nucléotype mais serait un nouveau sérotype appartenant au même nucléotype que le BTV-25 [Zientara *et al.*, 2014].

Géographiquement, le virus BTV-n a été détecté dans huit cheptels corses localisés dans la partie nord de l'île, avec six cheptels côté ouest, un au nord près de Bastia et un à l'est (figure 2).

Figure 2

Localisation des huit cheptels corses infectés par le BTV-n en 2014



IV - LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

Le diagnostic de laboratoire est essentiel pour confirmer les suspicions cliniques de la maladie, mais surtout pour identifier le sérotype viral impliqué [Zientara *et al.*, 2002a]. Le diagnostic moléculaire permet de mettre en évidence le génome complet (ou d'une de ses parties) d'un virus dans les échantillons testés. Le diagnostic moléculaire de la BT (RT-PCR de groupe) permet l'amplification d'une portion du segment 10 (segment très conservé d'un sérotype à un autre) de tous les sérotypes connus de la BT et a permis de détecter ce virus en Corse. Le diagnostic permettant le typage du virus de la BT est fondé sur l'amplification spécifique du segment 2 qui code la protéine VP2, déterminant antigénique du sérotype viral. Des amorces et sondes ont été sélectionnées afin de permettre la détection spécifique de ce nouveau sérotype, à partir des prélèvements biologiques issus de terrain [Zientara *et al.*, 2014].

Le diagnostic sérologique est possible avec les trousse de diagnostic validées et commercialisées pour le diagnostic de la BT (kits pour la détection de l'antigène VP7). La séropositivité des animaux

infectés par ce nouveau sérotype est cependant difficile à détecter avec les différentes trousse testées ce qui pourrait être dû, soit à un manque de sensibilité/spécificité des trousse disponibles, soit à une faible réponse adaptative en anticorps anti-VP7 du BTV-n chez les caprins infectés par ce sérotype.

Dans un premiers temps, le BTV infectieux est amplifié sur œufs embryonnés ou sur cellules d'insectes car ils constituent les systèmes les plus sensibles. Puis, le broyat des œufs infectieux ou des cellules d'insectes infectées est utilisé comme inoculum sur des cellules de mammifères (BSR, BHK, Vero). Une répllication virale dans les cellules se caractérise par des effets cytopathiques (lyse des cellules). La présence du virus doit être cependant confirmée par RT-PCR. Pour le BTV-n, un seul isolat a été obtenu après plusieurs passages sur œufs puis sur BSR, et aucun après inoculation sur cellules d'insectes. Huit isolats (sur les neuf totaux) ont été obtenus à partir d'inoculation de sang de caprins infectés directement sur cellules BSR. Des essais réalisés sur des lignées cellulaires (Vero, BHK),

inoculées avec du sang, n'ont pas permis d'isoler le virus.

Alors que les vingt-quatre sérotypes sont classiquement isolés sur œufs embryonnés et sur cultures de cellules d'insectes, un seul isolat a été

obtenu sur œufs et aucun à partir de cellules d'insectes. De même, des essais réalisés sur des lignées cellulaires (Vero, BHK) n'ont pas permis d'isoler le virus à partir des prélèvements de sang de chèvres.

V - EXPERIMENTATIONS ANIMALES

Actuellement, les plateformes expérimentales de l'ENVA de Maisons-Alfort en France et de l'Institut Friedrich-Loeffler de Riems en Allemagne mènent des expérimentations animales sur caprins. Les animaux ont été inoculés avec des sangs ou des cultures de cellules infectées, et des prélèvements biologiques (sang sur anticoagulant et sérum) sont collectés périodiquement *post*-infection et sont envoyés au laboratoire. Des expérimentations similaires ont également été réalisées sur ovins et bovins. Ces expérimentations permettent d'évaluer la durée de la virémie du BTV-n, de déterminer sa pathogénicité et d'étudier la réponse immune humorale des animaux infectés.

Les premiers résultats *in vivo* indiquent que les espèces ovine et bovine ne semblent pas sensibles au virus BTV-n : aucune virémie/PCRémie n'est observée après inoculation de sang ou de culture cellulaire. Les caprins ne présentent pas de signes cliniques et ont une « PCRémie » positive au moins jusqu'au centième jour après inoculation (article en préparation). Les premiers résultats indiquent également que le BTV-n ne semble pas se transmettre par contact direct (à la différence du BTV-26) ou par voie orale : le virus n'a jamais été détecté chez les caprins non infectés en contact avec les animaux infectés.

VI - LE NUCLEOTYPE « 25, 26 ET N »

On sait que le BTV-n est proche phylogénétiquement des BTV-25 et BTV-26. Au vu de ces premiers résultats, un tableau récapitulatif

de comparaison entre ces trois sérotypes a pu être fait (tableau 1) d'après les données de la littérature.

Tableau 1
Comparaison entre les sérotypes 25, 26 et n (ou « 27 »)

	BTV-25	BTV-26	BTV-n ou BTV-«27»
Infection caprins	Oui	Oui	Oui
Infection bovins	Non	Non	Non
Infection ovins	Oui	Oui	Non
Durée de la virémie	Caprins : 18-25 mois Ovins : faible	Caprins : ? Ovins : 4-9 jours	Caprins (expé) : 100 jours Caprins (terrain) : 6 mois
Transmission	À déterminer	Contact	À déterminer
Culture <i>in vitro</i>	Non	Oui	Oui
Signes cliniques	Caprins : non Ovins : oui (mineurs)	Caprins : non Ovins : oui (mineurs)	Caprins : non Ovins : non

VII - CONCLUSION

Le Laboratoire national de référence de la BT de Maisons-Alfort a détecté et identifié un nouveau sérotype du virus de la fièvre catarrhale ovine, le BTV-n, qui circule chez les caprins corses [Zientara *et al.*, 2014]. Il s'agirait d'un nouveau sérotype « BTV-27 », jamais observé auparavant. Le segment 2 du BTV-n présente une homologie proche du BTV-25 (73 % en acides nucléiques et 75 % en acides aminés) et du BTV-26 (63 % en acides nucléiques et 60 % en acides aminés). Tout comme le BTV-25, le

BTV-n n'a été détecté que chez les caprins, et ne semble pas induire de signes cliniques évocateurs d'une infection. Les séquences codant pour toutes les protéines du virus « BTV-27 » [Jenckel *et al.*, 2015] sont maintenant disponibles et constituent des données importantes et complémentaires à celle du BTV-25 et 26 permettant de mieux connaître ce nouveau nucléotype, constitué de virus de la BT atypiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G. and Thuer B. - Genetic characterization of Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, **14**, 1855-1861.
- Jenckel M., Bréard E., Schulz C., Sailleau C., Viarouge C., Hoffman B., Höper D., Beer M. and Zientara S. - Complete coding genome sequence of putative novel bluetongue virus serotype 27. *Genome Announc.*, 2015, **3**, 15-16.
- 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. and Mertens P.P.C. - Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011a, **17**, 886-889.
- Maan S., Maan N.S., Nomikou K., Veronesi E., Bachanek-Bankowska K., Belaganahalli M.N. *et al.* - Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PLoS ONE*, 2011b, **6**, e26147.
- Sailleau C., Viarouge C., Bréard E., Perrin J.B., Doceul V., Vitour D. and Zientara S. - Emergence of bluetongue virus serotype 1 in French Corsica Island in September 2013. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2014, **10**.1111/tbed.12207.
- Verwoerd D. and Erasmus B.J. - Bluetongue. 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. and Bréard E. - Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, **20**, 2123-2125.
- Zientara S., MacLachlan N.J., Calistri P., Sanchez-Vizcaino J.M., Savini G. - Bluetongue vaccination in Europe. *Expert Rev. Vaccines*, 2010, **9**, 989-991.
- Zientara S., Sailleau C., Bréard E., Hammoumi S. - Intérêts et limites des outils moléculaires dans le diagnostic et l'épidémiologie de la fièvre catarrhale des ovins. *Épidémiol. et santé anim.*, 2002a, **42**, 109-113.
- Zientara S., Sailleau C., Dauphin G., Roquier C., Rémond E.M., Lebreton F. - Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet. Rec.*, 2002b, **150**, 598-601.

