

RÉÉMERGENCE DE LA FIÈVRE CATARRHALE OVINE EN FRANCE, EN SEPTEMBRE 2015 *

Sailleau Corinne¹, Bournez Laure², Bréard Emmanuel¹, Viarouge Cyril¹, Cavalerie Lisa³,
Vitour Damien¹ et Zientara Stéphan¹



RÉSUMÉ

Six ans après l'introduction de la fièvre catarrhale ovine (FCO) sur notre territoire, la France continentale a été déclarée indemne de cette maladie le 12 décembre 2012 après plusieurs campagnes de vaccination. Près de trois ans plus tard, en août 2015, le virus a fait sa réapparition dans le centre de la France (Allier). Un bélier présentant des signes cliniques évocateurs de la maladie a fait l'objet de prélèvements qui ont permis de diagnostiquer une infection par le virus de la FCO. Les différentes analyses réalisées sur le virus ont permis de montrer qu'il s'agissait d'une souche de sérotype 8, génétiquement très proche de celle qui avait circulé lors de l'épizootie majeure en Europe du Nord dès 2006. Sur l'ensemble du cheptel, seul cet animal présentait des signes cliniques. À la suite de ce cas, des enquêtes ont été menées, au niveau local dans un premier temps, puis au niveau national afin de préciser l'étendue de la zone infectée par le virus. Nous présentons ici l'ensemble des outils moléculaire et sérologique utilisés lors de cet épisode ainsi que les résultats de la surveillance mise en place en 2015.

Mots-clés : fièvre catarrhale ovine, réémergence, diagnostic, surveillance.

ABSTRACT

Six years after the introduction of BTV-8 and after two compulsory vaccination campaigns, France was officially declared "free from BT" in December 2012. Almost 3 years later, the disease made his comeback. At the end of August 2015, a ram located in central France (department of Allier) showed clinical signs suggestive of BTV (Bluetongue virus) infection. However, none of the other animals located in the herd showed any signs of the Bluetongue disease. Laboratory analyses identified the virus as BTV serotype 8. Phylogenetic studies showed that the sequences of this strain are closely related to another BTV-8 strain that has circulated in France in 2006-2008. After the detection of BTV-8 virus in this ram, a regional and a national survey were launched in order to evaluate the spread of the infection in France. This paper describes the diagnostic tools used for the detection of this BTV case and the results of the survey carried out.

Keywords: Bluetongue, Re-emergence, Diagnosis, Monitoring.



* Texte de la communication orale présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA, 25 mars 2016

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

² Anses, Unité de coordination et d'appui à la surveillance, Maisons-Alfort, France

³ Direction générale de l'alimentation, bureau de la santé animale, Paris, France

I - INTRODUCTION

La fièvre catarrhale ovine (FCO) est une maladie infectieuse non contagieuse des ruminants domestiques et sauvages [Verwoerd et Erasmus, 2004]. Elle se transmet par l'intermédiaire d'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). Le virus de la fièvre catarrhale ovine est un *Orbivirus* de la famille des *Reoviridae*. Vingt-sept sérotypes du virus de la FCO ont été identifiés [Maan *et al.*, 2011 ; Zientara *et al.*, 2014]. Le 27^{ème} sérotype a été isolé par l'ANSES à partir de prélèvements issus de chèvres corses. Ce nouveau sérotype a la particularité de ne provoquer aucun signe clinique chez les ruminants [Bernelin-Cottet *et al.*, 2015]. Plus récemment, le laboratoire communautaire de référence de Pirbright a fait mention de deux nouveaux sérotypes : l'un détecté dans un vaccin capripox au Moyen Orient et l'autre sur des alpacas en Afrique du Sud [Maan *et al.*, 2015], ce qui porterait à 29 le nombre de sérotypes.

La France continentale a connu son premier cas de FCO en 2006 avec l'émergence du sérotype 8 d'abord apparu en Belgique, aux Pays-Bas et en Allemagne. Après la déclaration de six foyers cette même année, le virus se répand très rapidement les deux années suivantes. Quatorze mille foyers sont déclarés en 2007, année au cours de laquelle un nouveau sérotype, le sérotype 1 est introduit dans le sud de la France. On a compté plus de 30 000 foyers en 2008, avant que l'épizootie ne régresse en 2009 (83 foyers) et 2010 (1 foyer),

grâce notamment à deux campagnes de vaccination obligatoire. En 2012, la France est déclarée indemne. Au premier semestre 2015, seuls les sérotypes 1 et 4 circulaient encore en Europe du sud (Espagne, Italie) et dans les Balkans.

A partir de 2013, la France opte pour une surveillance programmée reposant sur l'analyse sérologique (ELISA) de veaux âgés de moins de 24 mois et non vaccinés. Ce dispositif de surveillance de la FCO en zone indemne a été défini de manière à respecter les caractéristiques minimales exigées par la réglementation européenne (CE/1266/2007). Ainsi, 15 jeunes bovins (répartis dans trois élevages) par département et par an sont testés en 2013 et 2014. Les résultats ont montré un taux d'animaux séropositifs de 9 % et 7 % en 2013 et 2014 respectivement [Perrin *et al.*, 2013, 2014]. Les analyses RT-PCR (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction) réalisées en complément sur ces animaux n'ont pas permis de conclure à une circulation virale. De plus, parmi ces animaux, certains ne rentraient pas dans les critères définis dans le protocole (bovins de moins de deux ans non vaccinés).

Fin août 2015, un bélier de cinq ans localisé dans un élevage mixte de l'Allier fait l'objet de prélèvements sanguins à la suite de signes cliniques évocateurs de la fièvre catarrhale ovine (jetage, œdème de la face et troubles pulmonaires). Nous décrivons dans cet article les outils de diagnostic utilisés pour l'identification et la caractérisation du virus ainsi que les mesures mises en place dès la confirmation de la réémergence de la FCO dans le centre de la France.

II - LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

1. LA RT-PCR

Le prélèvement issu du bélier malade a, dans un premier temps, été analysé au laboratoire départemental Eurofins Coeur de France (03) à l'aide d'une RT-PCR en temps-réel spécifique du groupe FCO (ADI-352, Biomérieux). Le prélèvement a ensuite été acheminé au Laboratoire de

référence FCO de l'ANSES (Maisons-Alfort) pour confirmation et analyses complémentaires.

Des RT-PCR de génotypage (LSI VetMAXTM European BTV Typing -LifeTechnologies, Lissieu, France) ont permis d'identifier le sérotype incriminé (le sérotype 8) et d'infirmar la présence d'un autre sérotype (sérotypes 1, 2, 4, 9, 16).

2. L'ISOLEMENT VIRAL

L'isolement viral a été réalisé par inoculation du sang positif en RT-PCR FCO sur :

- des cellules KC (cellules de *Culicoides variipennis*) ;
- des cellules BSR (cellules de rein de Hamster) ;
- des souris IFNAR -/- (souris déficientes pour le récepteur de l'interféron et très sensibles à l'infection par le virus de la FCO) par voies sous cutanée et intra-péritonéale.

Les cellules BSR ont présenté un effet cytopathogène (ECP) dès le 3ème jour après l'inoculation. La présence de virus dans le surnageant ainsi que dans celui des cellules KC (qui ne présentent pas d'ECP à la suite d'une infection virale) a été confirmée par RT-PCR de groupe FCO. Deux souris IFNAR sur les trois utilisées sont mortes quatre jours après l'inoculation et les prélèvements réalisés ont été analysés par RT-PCR (groupe FCO et génotypage).

Les trois méthodes utilisées ont permis d'isoler le virus et de le produire en quantité suffisante pour d'autres analyses et notamment les analyses moléculaires.

Parallèlement, le sérotype du virus isolé a été confirmé par séroneutralisation à l'aide d'antisérums de référence.

3. ANALYSES DES SÉQUENCES GÉNOMIQUES

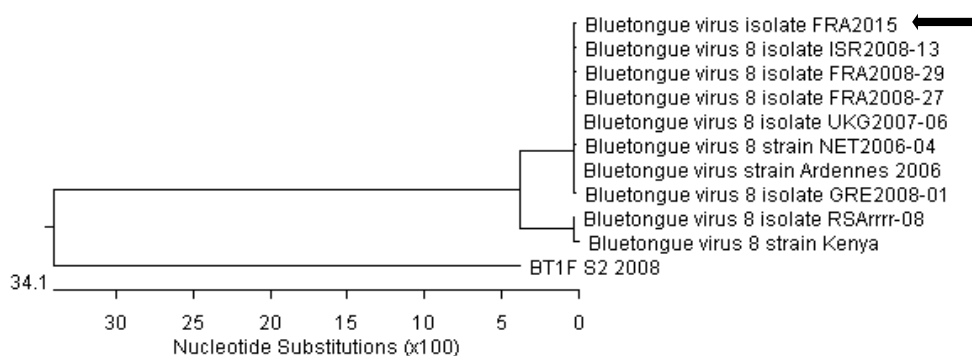
3.1. SÉQUENÇAGE DES PRODUITS DE PCR

Différents couples d'amorces spécifiques de l'ARN viral de la FCO ont été utilisés sur l'extrait d'ARN issu des cultures de cellules infectées pour amplification de différents gènes. Ainsi, les produits PCR obtenus ont pu être séquencés. Les séquences nucléotidiques des segments génomiques codant les protéines VP2, NS2, VP6 et NS3 (S2, S8, S9 et S10) ont été déterminées par séquençage (MWG Eurofins) et comparées à celles présentes dans les banques de données (BLASTN 2.2.28 - NCBI).

Les segments codant les protéines VP2, NS2, VP6 (S2, S8 et S9) et NS3 (S10) ont montré respectivement 99 % et 100 % de similitude avec les gènes homologues de la souche BTV-8 qui a circulé lors de l'épizootie majeure en Europe du nord dès 2006. La figure 1 présente la comparaison entre la séquence génomique du segment 2 avec les segments homologues des souches BTV-8 isolées récemment en Europe.

Figure 1

Dendrogramme montrant les relations génétiques entre le segment 2 (souche FCO 2015) et les gènes homologues d'autres souches de sérotype 8 isolées récemment



3.2. SÉQUENÇAGE NGS

La souche virale isolée a été expédiée à l'ANSES-Ploufragan (unité de Génétique virale et biosécurité) pour séquençage de l'ensemble du génome. Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide de Vector NTI et DNASTAR

Lasergene 8 et comparées à celles présentes dans les banques de données.

Sur l'ensemble du génome (19 186 nucléotides répartis sur 10 segments d'ARN double brins), seuls 19 nucléotides diffèrent de la séquence de la souche BTV-8 2007 et 2008. On constate la

substitution de quatre acides aminés au total sur les segments 1, 3, 8 et 9 (tableau 1). Ces résultats ont confirmé les premières données de séquences et ont permis de conclure qu'il s'agissait bien de la

même souche que celle qui avait circulé à partir de 2006 en Europe du nord, confortant ainsi l'hypothèse de l'absence d'introduction d'une nouvelle souche.

Tableau 1
Nombre de substitutions en nucléotides et en acides aminés par segment génomique entre la souche de FCO isolée en 2015 et celle isolée en 2008

BTV8 2008			
BTV-8 2015	Nucléotides		Acides aminés
	Codants	Non codants	
Segment 1	3	0	1
Segment 2	3	0	0
Segment 3	4	0	1
Segment 4	1	0	0
Segment 5	3	0	0
Segment 6	0	0	0
Segment 7	1	0	0
Segment 8	1	0	1
Segment 9	2	0	1
Segment 10	1	0	0
Nombre total de substitutions	19	0	4

III - MESURES MISES EN PLACE

1. AU NIVEAU LOCAL

❖ Dans l'élevage

Dès la confirmation du cas par le Laboratoire de référence, l'ensemble des animaux de l'élevage a fait l'objet d'analyses sérologiques (ELISA) et PCR. Dix-huit pourcent des bovins et 4 % des ovins se sont révélés positifs en PCR ; les taux de séropositifs étaient respectivement de 42,9 % et de 8,6 %. Aucun de ces animaux ne présentait de signes cliniques.

❖ Dans un périmètre de 2 km autour du foyer

Douze élevages présents dans un rayon de 2 km autour du foyer ont fait l'objet de prélèvements pour une analyse par RT-PCR. Le génome viral a été détecté dans 11 élevages sur les douze analysés. La prévalence animale, calculée en tenant compte de

l'échantillonnage à deux degrés (sélection des élevages, puis des animaux) avec le package survey du logiciel R [Lumley, 2014 ; R Core Team, 2015], était de 10,3 % (IC 95 % [6,2 % - 14,3 %]) chez les bovins et de 3,9 % (IC95 % [1,8 % - 7,2 %]) chez les ovins. La médiane de la prévalence intra-troupeau était de 8 % chez les bovins, variant de 3 à 26 %, et de 4,8 % chez les ovins, variant de 3,4 à 7,7 %.

2. AU NIVEAU NATIONAL

❖ Surveillance programmée

Afin d'estimer l'étendue géographique de l'infection, une enquête nationale a été réalisée entre le 16 septembre et le 20 octobre sur la base de prélèvements pour dépistage par RT-PCR. Soixante élevages bovins par région ont été tirés au sort et 30 animaux y ont été prélevés. Cette

taille d'échantillonnage a été choisie afin de détecter avec une probabilité de 95 % la présence du virus :

1. dans un troupeau si la prévalence intra-troupeau était d'au moins de 10 % ; et,
2. dans la région administrative si la prévalence troupeau était supérieure à 5 % (en supposant une répartition géographique du virus homogène sur le territoire).

❖ Surveillance événementielle

A la suite de ce premier foyer, les acteurs de terrain (éleveurs et vétérinaires) ont été sensibilisés à la surveillance événementielle, *via* les services vétérinaires régionaux (Instruction technique DGAL/SDSPA/2015-785). Ainsi, tout animal présentant des signes cliniques suspects de FCO faisait l'objet de prélèvement de sang pour une recherche du génome par RT-PCR dans les laboratoires départementaux agréés pour le dépistage de la FCO ou directement au LNR. Entre le premier septembre et le 31 décembre 2015, 421 élevages ont fait l'objet d'analyse pour suspicions cliniques. Seuls trois ovins et neuf bovins issus de douze élevages ont été confirmés infectés par le virus. Ces élevages étaient situés dans l'Allier, le Puy-de-Dôme, la Creuse et le Cher.

❖ Sortie de zones réglementées

Des zones réglementées (ZR) ont été définies, en application du Règlement CE 1266/2007, à la suite de la découverte des foyers afin d'empêcher la diffusion du virus par les mouvements d'animaux infectés hors de la zone infectée. Du 2 septembre au 15 octobre, elles étaient constituées de périmètres d'interdiction de 20 km de rayon autour des foyers, d'une zone de protection coalescente de 100 km de rayon autour des foyers, prolongée d'une zone de surveillance de 50 km de large. À compter du 15 octobre, il a été décidé de fusionner les différentes zones en une seule zone de 150 km de rayon autour des foyers, au sein de laquelle les mouvements de ruminants ont été autorisés. La ZR a ensuite été étendue à la faveur de la détection de foyers dans de nouveaux territoires. La sortie des ruminants hors de la ZR n'a été autorisée que sous certaines conditions. Certaines d'entre elles impliquaient des analyses par RT-PCR. La majorité des foyers déclarés ont été découverts à la suite de ces contrôles.

Au total, 149 foyers ont été détectés entre août et décembre 2015 : 11 lors de l'enquête initiale autour du foyer ; 27 lors de l'enquête nationale, 12 dans le cadre des suspicions cliniques et 99 au cours des analyses réalisées pour la sortie de zone réglementée (figures 2, 3 et 4).

Figure 2

Résultat de la surveillance programmée réalisée entre le 16 septembre et le 20 octobre 2015

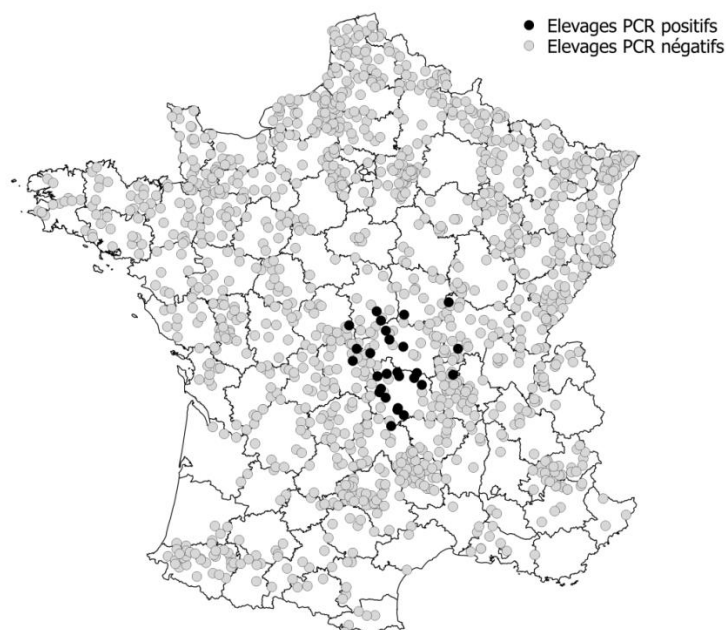


Figure 3
Répartition géographique des foyers de FCO détectés entre septembre et décembre 2015 par modalité de surveillance

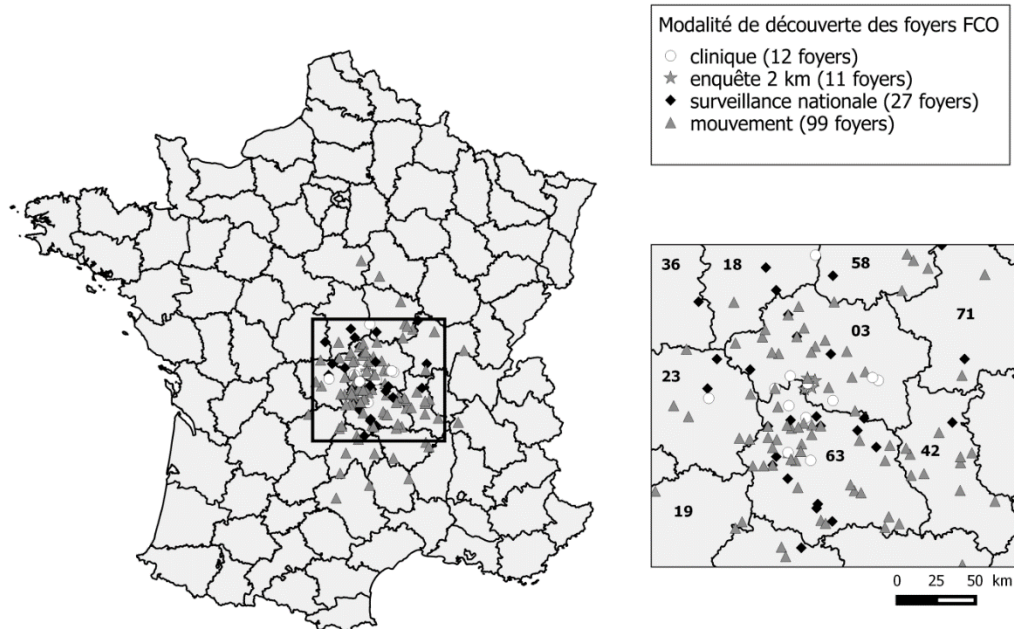
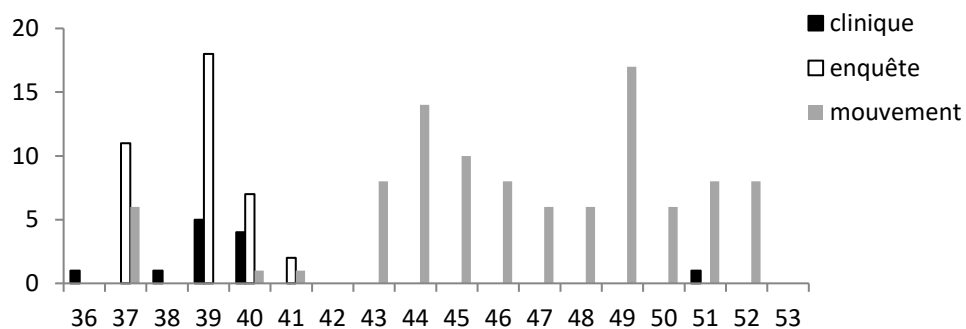


Figure 4
Nombre de foyers détectés par semaine et par modalité de surveillance entre début septembre (semaine 36) et fin décembre (semaine 53) 2015 en France



IV - CONCLUSIONS

Ce nouvel épisode de FCO à sérotype 8 a eu un très faible impact clinique. En effet, seules 12 suspicions sur 421 (soit moins de 3 %) ont pu être confirmées par les analyses de laboratoire. La majorité de ces foyers sont concentrés dans les quatre départements suivants : Puy-de-Dôme,

Allier, Creuse et Loire. Dans tous les cas, seul un animal par élevage semblait présenter des signes cliniques. Le nombre de foyers identifiés, quelle que soit la modalité de détection, reste vraiment très faible. Ces foyers sont toujours localisés dans cette même région, et la prévalence animale

apparaît faible en comparaison de l'épizootie de 2007-2008. Ces données pourraient indiquer un début d'épizootie à l'image de ce qui s'est passé en 2006 dans les départements du nord de la France. Le statut immunologique des bovins français qui, en partie, seraient immunisés contre le virus (infection naturelle ou vaccination lors de la précédente épizootie) pourrait expliquer aussi cette faible circulation virale.

La question sur l'origine de la réémergence du virus s'est posée et plusieurs hypothèses ont été proposées :

- Le rôle de la faune sauvage, qui ne semble pas être l'hypothèse la plus probable. Une étude pilotée par l'ONCFS a montré que les cerfs étaient particulièrement sensibles au virus FCO. Plus de 40 % des cerfs prélevés entre 2008 et 2010 présentaient des sérologies positives vis-à-vis du virus et pour la plupart, le génome viral a été détecté par RT-PCR [Rossi *et al.*, 2014]. Cependant, le même type d'étude réalisée sur des animaux prélevés entre 2011 et 2013 (période au cours de laquelle le virus ne circulait plus chez les ruminants domestiques) a montré que le taux de séropositifs était descendu à 9 % et que le virus n'avait été détecté par RT-PCR chez aucun de ces animaux. Ces résultats semblent indiquer un rôle limité du cerf dans la persistance de la circulation virale ;
- La circulation du virus à bas bruit dans la population de ruminants domestiques depuis la dernière épizootie. Cette circulation virale a pu passer inaperçue du fait, d'une part, de l'absence de signes cliniques chez les animaux : une grande partie de la population bovine et

ovine était immunisée (par une infection naturelle ou par la vaccination) et, d'autre part, de la possibilité de ne pas détecter une très faible circulation virale par le dispositif de surveillance mis en place. Les conditions actuelles, liées à la proportion grandissante d'hôtes naïfs vis-à-vis du BTV-8 (renouvellement de la population) et éventuellement aux conditions météorologiques favorables aux populations de culicoïdes, ont probablement permis une amplification de la circulation virale en 2015.

L'évolution de l'épizootie en 2016 est difficile à prévoir mais on peut supposer qu'en l'absence de vaccination massive, de nouveaux foyers soient identifiés en dehors de la zone actuelle d'infection. Un nouveau dispositif de surveillance programmée fondée sur des analyses sérologiques a été mis en place durant l'hiver 2015-2016 afin d'actualiser la description de la distribution spatiale du virus, d'estimer la séroprévalence du cheptel et d'identifier des zones saisonnièrement indemnes dans la zone réglementée. De plus, un projet LABEX (piloté par l'ANSES) permettra d'estimer la prévalence dans la faune sauvage, de faire une étude sérologique rétrospective dans la faune domestique, de caractériser les isolats viraux à l'aide du séquençage NGS et de développer, en collaboration avec la société IDvet, un nouvel outil sérologique de détection d'infection récente (ELISA IgM).

L'ensemble de ces travaux devrait permettre une meilleure compréhension de l'origine de cette réémergence et d'obtenir des informations cruciales pour optimiser la surveillance de cette maladie dans les années à venir.

BIBLIOGRAPHIE

Bernelin-Cottet C., Garnier A., Sailleau C., Viarouge C., Romey A., Fablet A., Vitour D., Bréard E., Zientara S. - Identification d'un nouveau virus de la fièvre catarrhale ovine chez des chèvres en Corse en 2014. *Épidémiologie et santé animale*, 2015, **67**, 119-124.

Lumley T. - Survey: analysis of complex survey samples. R package version 3.30, 2014.

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., Mertens

P.P.C. - Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, **17**, 886-889.

Maan S., Maan N.S., Belaganahalli M.N., Rao P.P., Singh K.P., Hemadri D., Putty K., Kumar A., Batra K., Krishnajyothi Y., Chandel B.S., Reddy G.H., Nomikou K., Reddy Y.N., Attoui H., Hegde N.R., Mertens P.P. - Full-Genome Sequencing as a Basis for Molecular Epidemiology Studies of Bluetongue Virus in India, 2015. *PLoS One*, e0131257.

- Perrin J.B., Sailleau C., Bréard E., Viarouge C., Dominguez M., Zientara S. - Fièvre catarrhale ovine en 2014 : statut indemne en France continentale-apparition de foyers cliniques dus au sérotype 1 en Corse. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, 2015, **64**, 38-40.
- Perrin J.B., Desvaux S., Sailleau C., Bréard E., Viarouge C., Bournez L., Zientara S. - Fièvre catarrhale ovine en 2014 : maintien du statut indemne en France continentale, maîtrise de l'épizootie de sérotype 1 en Corse. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, 2014, **71**, 41-44.
- R Development Core team. - R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015. <http://www.R-project.org/>.
- Rossi S., Pioz M., Bréard E., Durand B., Gibert P., Gauthier D., Klein F., Maillard D., Saint-Andrieux C., Saubusse T., Hars J. - Bluetongue dynamics in French wildlife: exploring the driving forces. *Transbound Emerg. Dis.*, 2014, **61**, e12-24.
- Verwoerd D. et 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., Bréard E. - Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, **20**, 2123-2125.



Remerciements

Nous remercions l'ensemble des partenaires et acteurs impliqués dans la surveillance de la FCO : le Bureau de la santé animale de la DGAL ; les membres du groupe de suivi de la FCO de la Plateforme ESA ; les services vétérinaires départementaux ainsi que les laboratoires départementaux agréés pour le diagnostic de la FCO ; les éleveurs et les vétérinaires. Nous remercions aussi vivement l'équipe de Yannick Blanchard (ANSES-Ploufragan) pour le séquençage de l'ensemble du génome viral.