

CRISE SANITAIRE DANS L'OcéAN INDIEN : VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE AUX ÎLES MAURICE ET RODRIGUES EN 2016 *

**Relmy Anthony¹, Romey Aurore¹, Gorna Kamila¹, Blaise-Boisseau Sandra¹, Laloy Ève¹,
Meenowa Deodass², Samoisy Karen⁴, Harena Rasamoelina³, Ram Ramjee², Aboo Jahangeer²,
Cardinale Éric⁵, Sailleau Corinne¹, Lecollinet Sylvie¹, Zientara Stephan¹ et Bakkali Kassimi Labib¹**



RÉSUMÉ

La fièvre aphteuse (FA) est une maladie animale virale contagieuse affectant les artiodactyles domestiques et sauvages (bovins domestiques et sauvages comme le buffle africain, porcins, ovins, caprins, ...). Cette maladie répandue dans le monde entier est enzootique dans certaines parties de l'Asie, de l'Afrique, du Moyen-Orient et de l'Amérique du Sud. Elle est plus rarement retrouvée dans les îles. L'agent responsable est un virus du genre *Aphthovirus* appartenant à la famille *Picornaviridae* et nommé FMDV (*Foot-and-Mouth Disease Virus*). Il présente une importante variabilité génétique et antigénique avec sept sérotypes immunologiquement distincts (O, A, C, Asia 1, SAT 1 à 3), chacun subdivisé en plusieurs sous-types. De nombreux cas cliniques ont été rapportés au sud-est de l'Afrique sur les îles Maurice et Rodrigues en juillet-août 2016. Sollicité par les services vétérinaires mauriciens, le LNR de Maisons-Alfort a mis en place un diagnostic d'urgence visant à détecter et caractériser le virus en cause dans cette épizootie. Ces résultats ont permis d'identifier la souche incriminée et de guider le choix du vaccin adapté pour stopper sa propagation. Cet article décrit les conditions de détection de ce virus, les résultats d'analyses et leur interprétation, ainsi que les répercussions de l'épizootie dans ces deux îles.

Mots-clés : fièvre aphteuse, île Maurice, île Rodrigues, diagnostic d'urgence, vaccin.

.../..

* Texte de la communication orale présentée au cours de la Journée scientifique AEEMA, 24 mars 2017

¹ Anses, Laboratoire de santé animale, UMR 1161 (Anses, Inra, Enva), Laboratoire national et OIE de référence pour la fièvre aphteuse, 14 rue Pierre et Marie Curie 94700, Maisons-Alfort, France

² Division des services vétérinaires, Réduit, Maurice

³ Unité de veille sanitaire de la Commission de l'Océan Indien, Blue Tower, rue de l'institut, Ebène, Maurice

⁴ Services vétérinaires de Rodrigues, Rodrigues

⁵ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), Commission de l'Océan Indien. Cyroi Platform, 2 rue Maxime Rivière 97490 Ste Clotilde, île de la Réunion, France

.../..

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease (FMD) is a contagious viral animal disease affecting domestic and wild artiodactyls (cattle, pigs, goats, pigs, African buffaloes ...). This disease is widespread throughout the world and is endemic in parts of Asia, Africa, the Middle East and South America. It is more rarely found in islands. The causative agent is a virus of the genus Aphthovirus within the Picornaviridae family and named FMDV (Foot-and-Mouth Disease Virus). This virus has significant genetic and antigenic variability with seven immunologically distinct serotypes (O, A, C, Asia 1, SAT 1 to 3) each subdivided into several subtypes. A health crisis was reported in southeastern Africa on the Mauritius and Rodrigues Islands in July-August 2016. Upon request, the NRL in Maisons-Alfort implemented an emergency diagnosis aiming at detecting and characterizing the virus involved in this epizootic without delay. The results obtained enabled a precise identification of the FMDV strain involved and guided the choice of the appropriate vaccine to stop its spread. This paper describes the conditions for the detection of this virus, the results of analyzes and their interpretation, and the impact of the epizootic in these two islands.

Keywords: FMD, Mauritius Island, Rodrigues Island, Emergency diagnosis, Vaccine.



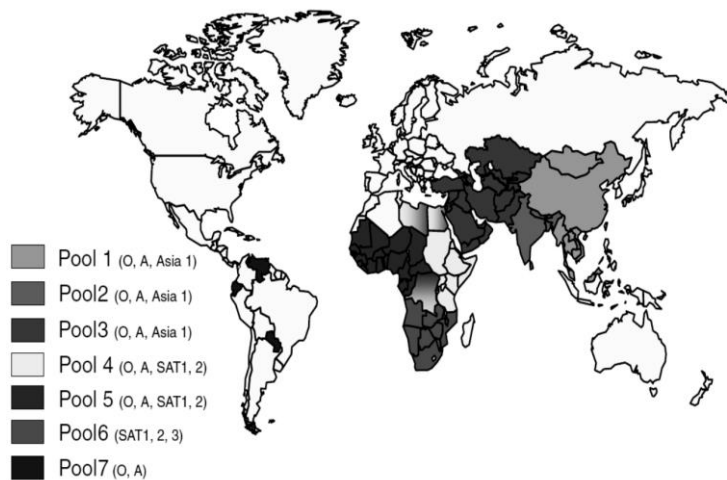
I - INTRODUCTION

Le virus de la fièvre aphteuse (FA) ou FMDV en anglais (*Foot and Mouth Disease virus*) appartient au genre *Aphthovirus* au sein de la famille *Picornaviridae*. C'est un virus non enveloppé à capsid icosaédrique contenant un génome à ARN simple brin de polarité positive. Il présente une importante variabilité génétique et antigénique avec sept sérotypes immunologiquement distincts (O, A, C, Asia1, SAT 1 à 3), chacun subdivisé en plusieurs sous-types. La FA a une répartition mondiale, les zones enzootiques étant regroupées en différents pools selon le sérotype et la souche circulant (figure 1) [Jamal et Belsham, 2013]. Le FMDV provoque une maladie transfrontalière hautement contagieuse qui affecte les artiodactyles qu'ils soient domestiques (bovins, ovins, caprins, et porcins) ou sauvages (buffles, cervidés, sangliers...) [Grubman et Baxt, 2004]. La FA se manifeste par de la fièvre et des vésicules qui apparaissent rapidement dans la bouche, sur la langue, les lèvres, le nez, les mamelles, les pieds et entre les ongles. La maladie entraîne une

morbidity élevée (proche de 100 %) mais une faible mortalité (de l'ordre de 5 %), essentiellement chez les jeunes animaux (myocardite) et chez les femelles gestantes (avortements). Les animaux malades guérissent en 10 à 15 jours, mais la maladie les laisse affaiblis et engendre de lourdes pertes en matière de production de viande et de lait [Grubman et Baxt, 2004]. De plus, il a été rapporté que ce virus peut provoquer une infection asymptomatique de longue durée chez 15 à 50 % des ruminants domestiques ou sauvages infectés [Salt *et al.*, 1993 ; Pacheco *et al.*, 2015]. En cas d'épizootie de FA, l'impact socio-économique engendré est important en raison des mesures de lutte mises en place et des pertes commerciales liées à l'embargo sur les produits animaux et le bétail dans les pays atteints [Thompson *et al.*, 2002]. Pour limiter une propagation du virus, un diagnostic rapide est primordial. Détecter et caractériser le virus permet en effet de pouvoir lutter au moyen d'un vaccin adapté à la souche circulante.

Figure 1

Zones enzootiques regroupées en différents « pools de virus » selon les sérotypes des souches circulantes
[Jamal et Belsham, 2013]



II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. DESCRIPTION DES ÉCHANTILLONS

Des échantillons de tissu épithélial issu de lésions (n = 10), des sérums (n = 15) et des échantillons de sang sur EDTA (n = 15), prélevés à l'île Maurice sur des bovins suspectés d'être atteints de fièvre aphteuse ont été reçus au laboratoire de Maisons-Alfort le 11 août 2016. Des échantillons de tissu épithélial issu de lésions (n = 3) et prélevés à l'île Rodrigues sur des bovins suspectés d'être atteints de fièvre aphteuse ont été reçus, dans un second temps, le 18 août 2016. L'échantillonnage a été effectué dans cinq élevages en provenance de deux régions de l'île Maurice (Vallée-Des-Prêtres et Cité de la Cure), et dans trois élevages de l'île Rodrigues (Soupirs, Les choux et Citrons donis). Les échantillons ont été placés dans un milieu de transport approprié et conservés sous régime du froid négatif jusqu'à l'arrivée au Laboratoire français de référence pour la fièvre aphteuse (tableau 1).

2. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Chaque échantillon de tissu épithélial a été pesé puis broyé avec du sable stérile à l'aide d'un ribolyseur (Ribolyseur Fast-Prep, MP Bio) pour obtenir une suspension à 10 % p/v dans du milieu de culture contenant des antibiotiques (MEM Earl's

avec L-Glutamine (Gibco), Antibiotiques (Pénicilline-Streptomycine 10000 U/ml) (Gibco) à 2 %). Certains échantillons ne contenaient pas suffisamment de tissus pour être traités ; dans ce cas, le liquide de transport a été utilisé pour les analyses. Les sérums ont été utilisés sans préparation préalable. Les sangs EDTA ont été conservés mais n'ont pas été traités.

3. EXTRACTIONS D'ARN

L'extraction des ARN totaux des échantillons a été réalisée à partir des broyats à l'aide de réactifs commercialisés par la société Qiagen (kit QIAamp Viral RNA kit) et de l'automate QIAcube. Les ARN viraux sont obtenus par lyse de l'échantillon avec le tampon de lyse AVL. L'ajout d'éthanol à ce tampon de lyse conditionne la liaison des acides nucléiques (ARN totaux) à la silice des colonnes de Qiagen. L'addition d'ARN de transfert permet d'améliorer la liaison des acides nucléiques (principalement lorsque ceux-ci sont en faibles quantités) à la silice des colonnes. Les inhibiteurs de PCR (sels, métabolites) sont ensuite éliminés par lavages, à l'aide des tampons AW1 et AW2 additionnés d'éthanol. Les acides nucléiques sont ensuite élués dans 60µl de tampon AVE et sont prêts pour servir de matrice pour la RT-PCR.

Tableau 1
Échantillons reçus au laboratoire

Îles	Lieux	Nom Échantillons	Épithéliums	Sérums	Sang EDTA
Maurice	Vallée des prêtres	1A	1	1	1
		2A	1	1	1
		2B	1	1	1
		2C	1	1	1
		3A	1	1	1
	Cité de la Cure	3B	1	1	1
		3C	1	1	1
		4A	1	1	1
		4B	1	1	1
		5A	1	1	1
	Richelieu	1	/	1	1
		2	/	1	1
		3	/	1	1
		4	/	1	1
		5	/	1	1
Rodrigues	Soupirs	F1	1	/	/
	Les choux	F2	1	/	/
	Citrons donis	F3	1	/	/

4. ANALYSES VIROLOGIQUES

4.1. ISOLEMENT VIRAL

Les suspensions de tissu épithélial ont été inoculées sur une monocouche de cellules épithéliales fœtales de langue de chèvre (lignée cellulaire ZZ-R 127) [Brehm *et al.*, 2009], et sur un tapis de cellules épithéliales de rein de porc (lignée IBRS-2), sensibles au virus FA. Après une heure de contact avec les cellules, l'inoculum a été récupéré, puis conservé à -80°C et du milieu MEM à 2 % d'antibiotique a ensuite été ajouté sur les cellules incubées à 37°C sous atmosphère CO₂. Les cultures cellulaires ont été observées pour suivre l'apparition d'un effet cytopathique (ECP) jusqu'à 48h post inoculation (p.i.). En l'absence d'ECP à 48h p.i., un deuxième passage sur cellules sensibles a été réalisé [OIE, 2012]. Un échantillon est considéré négatif si aucun ECP n'est observé à 48h après le deuxième passage sur cellules sensibles. Si la culture cellulaire présente un ECP (au premier ou au second passage), l'échantillon analysé est considéré positif. Une production virale est ensuite

effectuée par mise en culture sur les cellules ZZ-R 127 afin de produire l'isolat pour sa caractérisation et sa conservation dans la souche de laboratoire.

4.2. ELISA DE CAPTURE D'ANTIGÈNE (AG-ELISA)

La suspension de tissu épithélial ou la suspension virale issue de l'isolement viral a été analysée par ELISA de capture d'antigène afin d'identifier le sérotype du virus impliqué. Deux types d'ELISA sont à disposition, la trousse commerciale IZSLER FMDV ELISA (IZSLER) et la méthode recommandée par l'OIE [OIE, 2012].

La trousse commerciale IZSLER FMDV ELISA est un test fondé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux permettant la détection d'antigènes du virus de la fièvre aphteuse éventuellement présents dans l'échantillon à analyser (Broyat d'épithélium, liquide vésiculeux). Les antigènes viraux sont « capturés » au moyen d'anticorps monoclonaux anti-FMDV spécifiques de sérotype.

Ce test permet d'une part, la détection de FMDV de tout sérotype (« pan-FA ») incluant la détection de O, A, C, Asia1 mais également une différenciation des sérotypes O, A, SAT1, SAT2. Il repose sur l'utilisation de couples d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre chacun des sérotypes du virus de la fièvre aphteuse. Les cupules des plaques ELISA ont été saturées par adsorption avec les anticorps monoclonaux spécifiques de sérotype. Le test est réalisé en ajoutant successivement l'échantillon à tester, un anticorps monoclonal pan-FA conjugué à l'enzyme peroxydase (HRPO) et le chromogène substrat de la HRPO. Chaque étape inclut une incubation et des lavages. L'apparition de couleur traduit l'attachement de l'anticorps conjugué au virus FMDV, donc la présence de l'antigène capturé. La coloration est arrêtée par ajout de la solution d'arrêt et la densité optique (DO) est mesurée à 450 nm.

L'ELISA de capture d'antigène (méthode recommandée par l'OIE) cible les antigènes du virus FA et permet de différencier en même temps les sept sérotypes connus du virus de la fièvre aphteuse (O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 et Asia-1). Il repose sur l'utilisation de couples de sérums hyper-immuns obtenus sur lapin et cobaye, contenant donc des anticorps spécifiques dirigés contre chacun des sérotypes de FMDV. Les cupules des plaques ELISA ont été saturées par adsorption avec les anticorps spécifiques présents dans des sérums hyper-immuns de lapin. Le test est réalisé en ajoutant successivement l'échantillon à tester, un sérum hyper-immun de cobaye spécifique du sérotype, le conjugué (un sérum de lapin dirigé contre les anticorps de cobaye) couplé à l'enzyme peroxydase (HRPO) et le chromogène substrat de la HRPO. De même que pour la trousse commerciale, chaque étape inclut une incubation et des lavages. L'apparition de couleur traduit l'attachement du conjugué aux anticorps de cobaye, donc la présence de l'antigène capturé. La coloration est arrêtée par ajout de la solution d'arrêt et la densité optique (DO) est mesurée à 450 nm. (Détail du protocole dans le manuel OIE 2012)

4.3. RT-PCR EN TEMPS RÉEL EN UNE ÉTAPE

Le test repose, dans un premier temps, sur la transcription inverse (RT) de l'ARN du FMDV en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc obtenu est, dans un second temps, amplifié par PCR en temps réel par une ADN polymérase qui utilise des amorces et une sonde TaqMan®, marquée en 5'

par un fluorochrome FAM ou VIC. Les deux réactions enzymatiques sont réalisées successivement, dans un même tube (RT-PCR en temps-réel en une étape). En raison du taux élevé de mutations générées lors de la réplication des virus à ARN, il est recommandé d'utiliser en parallèle deux couples d'amorces spécifiques ciblant deux régions différentes dans le génome du FMDV : la région IRES (Internal Ribosome Entry Site), et la région codant pour l'ARN polymérase ARN dépendante 3D. Un troisième couple d'amorces est utilisé pour détecter le gène de la β -actine cellulaire endogène (présent dans la fraction d'ARN cellulaire extraite). Ces réactions sont effectuées en duplex : en une seule réaction, deux cibles sont détectées simultanément : soit les cibles IRES + β -actine, soit les cibles 3D + β -actine. La sonde pour la cible virale est marquée par un fluorochrome FAM et la sonde ciblant le gène de la β -actine est marquée par un fluorochrome VIC et les RT-PCR en temps réel ont été réalisées comme décrit par Gorna *et al.* [2016].

4.4. RT-PCR MULTIPLEXE CONVENTIONNELLE DE TYPAGE (O, A, SAT1, SAT 2)

Les réactions de RT-PCR ont été développées en utilisant des amorces ciblant deux régions du virus une région conservée, codant pour la polymérase 3D, permettant une détection pan-FA, et une région codant pour la protéine de capsid VP1, spécifique de sérotype (O/A/SAT1/SAT2), ainsi qu'un contrôle interne ciblant le gène codant pour la β -actine. Les amorces ont été conçues pour obtenir des amplicons de tailles différentes permettant de différencier chaque cible par électrophorèse en gel d'agarose (RT-PCR 6-plex). Cette méthode est encore en cours de développement au sein du LNR.

4.5. RT-PCR CONVENTIONNELLE POUR SÉQUENÇAGE

Dans le but de déterminer le sérotype dans un premier temps, puis d'identifier la souche dans un second temps, des amorces spécifiques de sérotype ont été choisies pour amplifier la région du génome codant pour la VP1 de type O, A, SAT1, SAT2. Cinq différentes paires d'amorces ont été ainsi utilisées pour l'amplification du gène codant pour la VP1 du virus. Pour le type O : O-1C244F/EUR-2B52R, type A : A612F/EUR2B52R, type SAT1 : SAT1-559F/SAT-2B208R, type SAT2 : P1-1223F/ SAT-2B208R. [Ayelet *et al.*, 2009 ; Knowles, 2005]. Les produits de PCR sont envoyés à un prestataire pour la réalisation du séquençage.

4.6. ANALYSE BIO-INFORMATIQUE DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES

Le séquençage double brin des amplicons de RT-PCR a été réalisé à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification de la région VP1 par RT-PCR. Les séquences obtenues pour chaque isolat ont été assemblées et vérifiées en utilisant le logiciel ContigExpress (Vector NTI, Invitrogen). Les séquences complètes de VP1 ont été comparées avec celles disponibles dans la base de données NCBI GenBank. Un arbre phylogénétique a été réalisé en utilisant l'algorithme Clustal W du logiciel MEGA 6.06 [Tamura *et al.*, 2013].

5. ANALYSES SÉROLOGIQUES

5.1. ELISA PRIOCHECK NSP

Le test PrioCHECK® FMDV NS (Prionics) pour la détection des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines non structurales du virus de la FA (et précisément les protéines 3ABC) est un test ELISA bloquant en phase solide.

Les cupules des microplaques ELISA ont été sensibilisées avec un anticorps monoclonal spécifique de la protéine 3ABC puis incubées avec l'antigène 3ABC recombinant. Les plaques ELISA fournies dans la trousse commerciale présentent la protéine 3ABC qui a été capturée par l'anticorps monoclonal, fixé au fond des puits. Le test est réalisé en ajoutant d'abord l'échantillon à tester, puis, après lavage, le conjugué, un anticorps monoclonal anti-3ABC couplé à l'enzyme peroxydase (HRPO). Les anticorps spécifiques dirigés contre la protéine 3ABC qui seraient présents dans l'échantillon bloquent donc l'attachement du conjugué à l'antigène capturé. Après incubation puis lavage, le chromogène substrat (TMB) de la HRPO est ajouté. Le développement de la coloration est arrêté par ajout de la solution d'arrêt et la DO est mesurée à 450 nm. L'apparition de couleur traduit l'attachement du conjugué à l'antigène capturé, donc l'absence d'anticorps spécifiques dirigés

contre la protéine 3ABC. Au contraire, si l'attachement du conjugué à l'antigène capturé est bloqué par la présence d'anticorps spécifiques dans l'échantillon à tester, le conjugué non attaché est éliminé au lavage et la couleur apparaîtra peu ou pas, traduisant la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre la 3ABC dans l'échantillon.

5.2. ELISA PRIOCHECK TYPE O

Le test PrioCHECK® FMDV type O (Prionics) pour la détection des anticorps spécifiques dirigés contre le virus de la FA est un ELISA bloquant en phase solide. Les anticorps spécifiques éventuellement présents dans un échantillon vont empêcher la réaction entre l'antigène FA type O fixé sur la plaque et un anticorps monoclonal spécifique. Les cupules des plaques ELISA ont été saturées avec l'antigène FA type O non infectieux. Le sérum à analyser est déposé dans la cupule contenant au préalable du tampon fournis par le kit. Après incubation à température ambiante (22°C +/- 3°C, préconisé par le fournisseur) puis lavage, le conjugué, un anticorps monoclonal marqué à l'enzyme peroxydase (HRPO), est ensuite distribué dans les cupules et incubé à nouveau à température ambiante (22°C +/- 3°C, préconisé par le fournisseur). Après lavage, la solution de substrat chromogène (TMB) de la HRPO est ajoutée. Après incubation, la coloration est arrêtée par l'ajout de la solution d'arrêt et la DO est mesurée à 450 nm. L'apparition de couleur traduit l'attachement du conjugué à l'antigène capturé, donc l'absence d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine de type O dans le sérum testé. Au contraire, si l'attachement du conjugué à l'antigène capturé est bloqué par la présence d'anticorps spécifiques dans l'échantillon à tester, le conjugué non attaché aura été éliminé au lavage et la couleur apparaîtra peu ou pas, traduisant la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine de type O dans l'échantillon

III - RÉSULTATS

1. ANALYSES VIROLOGIQUES

Au cours de la réalisation du diagnostic d'urgence, plusieurs des méthodes présentées ci-dessous ont été réalisées en parallèle.

1.1. ISOLEMENT VIRAL

Les 13 tissus épithéliaux ont été traités et analysés pour l'isolement viral. Un ECP a pu être observé dès 18 heures p.i. sur les cellules ZZ-R 127 pour

huit échantillons sur 13. Un exemple de résultat d'isolement viral sur cellules ZZ-R 127 est montré en figure 2. Sur les 13 échantillons testés en isolement viral, 11 isolats ont pu être obtenus parmi lesquels 10 dès le premier passage, et le

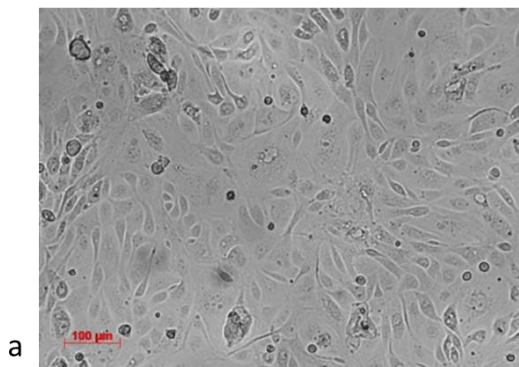
dernier après un second passage sur cellules. La suspension virale isolée a ensuite été analysée par ELISA de capture d'antigène pour déterminer le sérotype viral impliqué.

Figure 2

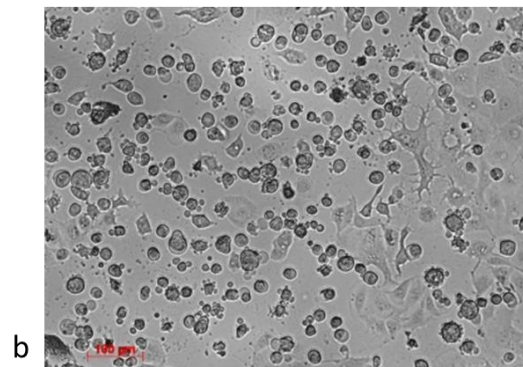
Photos de la lignée cellulaire ZZ-127R.

Tapis cellulaire non infecté, absence d'effet cytopathique (photo a).
Tapis cellulaire infecté par le virus FA, présence d'ECP.
(photo b). Objectif x10, Echelle : 1 cm = 100 µm.

Tapis cellulaire non infecté



Tapis cellulaire infecté



1.2. ELISA DE CAPTURE D'ANTIGÈNE

La trousse commerciale IZSLER a été utilisée sur les broyats des 10 tissus épithéliaux provenant de l'île Maurice en parallèle de l'isolement viral. Bien que les contrôles du kit soient valides, les résultats obtenus n'ont cependant pas permis une identification du sérotype. Le virus pouvant être présent en faible quantité dans le prélèvement et donc dans le broyat, aucun échantillon ne s'est révélé positif à partir de cette matrice. La trousse commerciale a pour spécificité l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui sont produits à partir de certaines souches. La souche circulant en République de Maurice peut être différente de la souche à partir desquelles ont été produits les anticorps monoclonaux.

La méthode recommandée par l'OIE a été utilisée à partir des isolements viraux quand il y a eu des ECP complets, pour l'ensemble des échantillons isolés. Tous les échantillons testés ont été identifiés comme contenant un virus FA de type O.

1.3. RT-PCR EN TEMPS RÉEL

Les deux réactions de RT-PCR ont été réalisées simultanément pour analyser les 13 broyats

d'épithélium. Les deux cibles IRES et 3D ont été détectées pour tous les échantillons testés, confirmant la présence du virus de la fièvre aphteuse dans ces échantillons.

1.4. RT-PCR MULTIPLEXE CONVENTIONNELLE DE TYPAGE (O, A, SAT1, SAT 2)

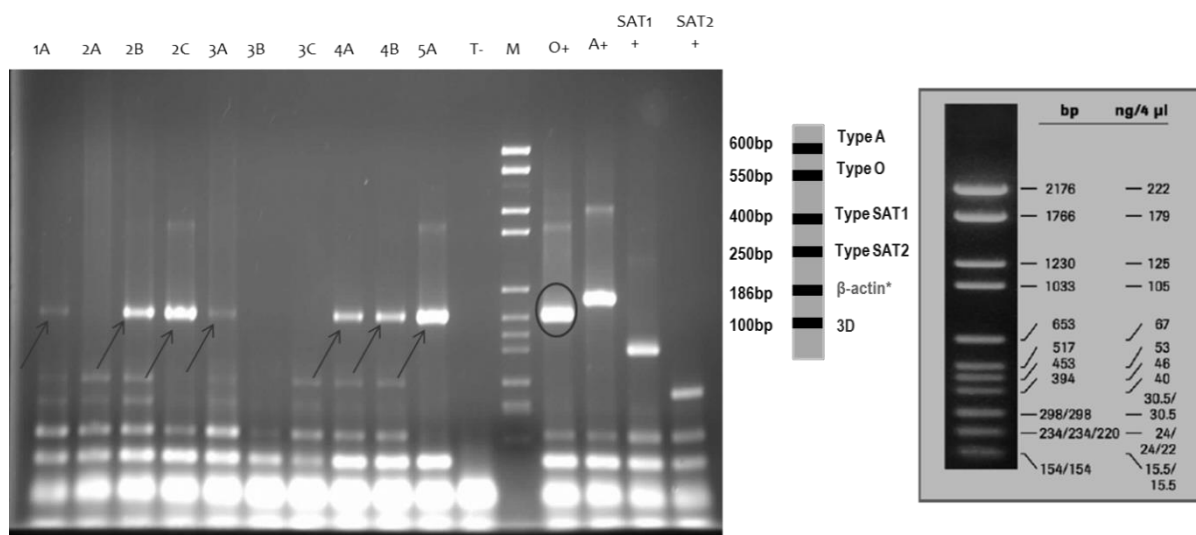
Cette méthode a permis de confirmer, pour les 13 échantillons analysés, la présence du génome de la fièvre aphteuse par la présence d'un amplicon d'une taille compatible avec la taille attendue pour la cible 3D. La présence de l'amplicon β -actine atteste de l'extraction correcte des ARN. Un contrôle positif pour chaque sérotype FMDV a été déposé en parallèle permettant la visualisation et ainsi l'identification du type par la taille des amplicons. Les résultats sont présentés en figure 3 : les amplicons de taille 100 paires de bases (bp) correspondent à la cible 3D et sont présents pour tous les échantillons. Les amplicons de 186 bp correspondant à la cible β -actine sont présents pour tous les échantillons. Les amplicons contrôles ont bien la taille attendue, 600 bp pour le type A, 550 bp pour le type O, 400 bp pour le type SAT1, 250 bp pour le type SAT2. Des amplicons ayant une taille correspondant à celle de

l'amplicon de contrôle type O (550 pb) ont été détectés pour sept échantillons sur les 10 échantillons provenant de l'île Maurice (figure 3) et pour les trois échantillons provenant de l'île Rodrigues. Ces derniers présentaient des résultats

fortement positifs en RT-PCRq. Trois échantillons sur 13 n'ont pas présenté d'amplicon permettant le typage. La méthode a permis d'identifier que le virus présent dans les échantillons est de type O.

Figure 3

**Gel d'agarose de la RT-PCR multiplexe conventionnelle de typage.
Analyse des 10 ARN issus des épithéliums en provenance de l'île Maurice.**



1.5. RT-PCR CONVENTIONNELLE POUR SÉQUENÇAGE

Cette analyse a été réalisée en parallèle de la RT-PCR multiplexe dans le but de déterminer le sérotype par le séquençage. Pour les cinq couples d'amorces utilisées (O, A, SAT1, SAT2, SAT3), des amplicons de la taille attendue ont été obtenus à l'aide des amorces type O pour les 10 échantillons provenant de Maurice. Des amplicons pour les amorces type A ont aussi été retrouvés pour sept échantillons sur les 10 provenant de Maurice. Six échantillons présentant des amplicons pour les types O et A ont été sélectionnés pour le séquençage. Les 3 échantillons de l'île Rodrigues ont été analysés uniquement avec les amorces type O. Les amplicons obtenus étaient à la taille attendue, et ont été envoyés pour le séquençage (figure 4).

1.6. ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES

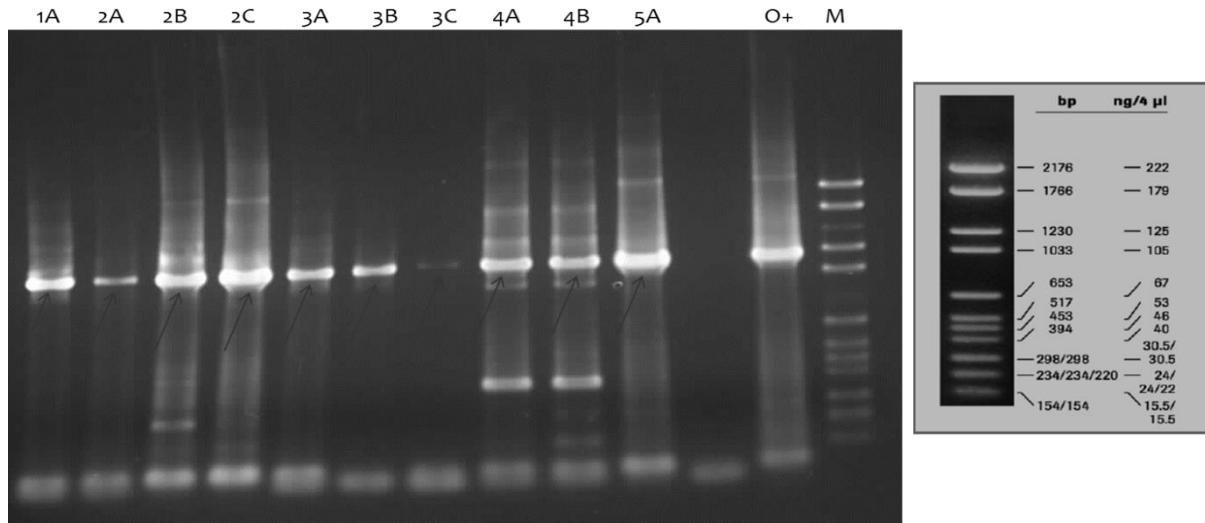
Au sein du laboratoire, les séquences de la région codant pour la VP1, pour chacun des six

échantillons provenant de l'île Maurice ont été analysées et comparées aux gènes homologues présents dans la base de données Genbank. L'identification de la souche a pu être ainsi déterminée : Sérotype O, Topotype ME-SA, Génotype Ind 2001d.

La collaboration avec le laboratoire mondial de référence pour la fièvre aphteuse, situé à Pirbright, a permis de faire une analyse plus fine à l'aide d'un plus grand nombre de séquences. Les séquences VP1 de l'île Maurice sont proches des souches Ind 2001d retrouvées au Népal (O/NEP/17/2015, O/NEP/19/2015, O/NEP/28/2015, O/NEP/6/2016) à 98,90 % de similitude (figure 5a). Les séquences de VP1 provenant des échantillons de l'île Rodrigues ont suivi les mêmes analyses. L'identification de la souche a pu être ainsi déterminée : Sérotype O, Topotype ME-SA, Génotype Ind 2001d. Ces séquences sont proches de ceux des échantillons de l'île Maurice à 99,84 % de similitude (figure 5b).

Figure 4

Gel d’agarose de la RT-PCR conventionnelle pour le séquençage avec les amorces pour le type O.
La taille attendue pour les amplicons est de 1180 pb.
Pour les 10 échantillons provenant de l’île Maurice, l’amplicon majoritaire est à la taille attendue.
Analyse des 10 ARN issus des épithéliums en provenance de l’île Maurice.



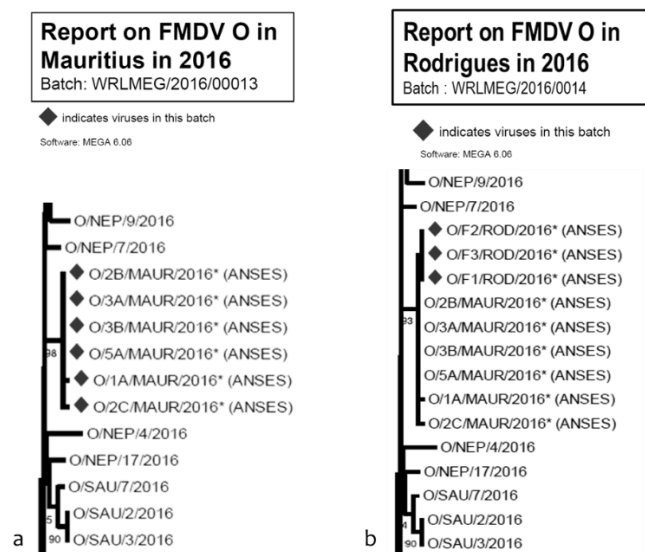
2. ANALYSES SÉROLOGIQUES

Les échantillons de sérums prélevés à l’île Maurice ont été analysés en Elisa NS et type O. Sur les 10 sérums étudiés, trois ont fourni une réponse

positive pour la présence d’anticorps dirigés contre les protéines 3ABC du FMDV et 8 pour la présence d’anticorps dirigés contre la protéine de capsid de FMDV de type O.

Figure 5

Arbres phylogénétiques des isolats de l’île Maurice (Arbre a) et de l’île Rodrigues (Arbre b) issus des rapports de génotypage réalisés par le laboratoire mondial de référence pour la fièvre aphteuse à Pirbright.
Le génotypage a été réalisé sur le gène codant pour la VP1 (protéine de capsid du virus).



Génotype identifié : Topotype ME-SA lignage Ind-2001d.

IV - DISCUSSION

La république de Maurice comprend plusieurs îles dont les îles Maurice et Rodrigues indemnes de fièvre aphteuse jusqu'à cette épizootie. La fièvre aphteuse est apparue sur l'île Rodrigues le 07/07/2016. L'île Maurice a été touchée à son tour au début du mois d'août 2016. Le laboratoire a été contacté le 05/08/2016 pour la réalisation d'analyses complémentaires pour le diagnostic de la fièvre aphteuse, la caractérisation du virus et plus spécifiquement l'identification du sérotype viral impliqué. Cette information est en effet indispensable pour le choix du vaccin à utiliser. A la suite de la déclaration de l'épizootie, une interdiction d'exportation d'animaux et des produits issus des animaux sensibles à la fièvre aphteuse a été mise en place.

La procédure d'urgence préétablie par le laboratoire national de référence en cas de suspicion sur le territoire français a été mise en place pour la gestion de cette épizootie. Le FMDV a été détecté par RT-PCR en temps réel ciblant deux gènes (3D et IRES) chez les 13 animaux testés et isolé à partir de 11 échantillons sur une lignée cellulaire sensible (ZZ-R 127). Le sérotype O a été identifié par ELISA-Ag et RT-PCR conventionnelle de typage (O, A, SAT1, SAT2). Les résultats ont été communiqués à l'île Maurice le 12/08/2016 au soir. L'analyse des séquences de la région codant pour la VP1 (protéine majeure de capsid) a confirmé l'infection par le sérotype O et l'analyse phylogénétique avec des séquences présentes dans la base de données GenBank a montré une homologie avec des séquences de type O appartenant au topotype ME-SA lignage Ind-2001d. Le 17 août 2016, le laboratoire national de référence de Maisons-Alfort (ANSES) a communiqué ces résultats aux autorités mauriciennes.

Avec la collaboration du laboratoire mondial de référence pour la fièvre aphteuse à Pirbright (The Pirbright Institute), l'analyse phylogénétique montre que cette souche est proche de celle retrouvée au Népal en 2015 (98,80 % d'homologie en nucléotides). L'analyse des échantillons envoyés au laboratoire de Pirbright, par le test de relation sérologique entre souche vaccinale et isolat de terrain (ou « vaccine matching ») a permis la commande du vaccin adéquat par les autorités mauriciennes.

Des mesures ont été prises par le gouvernement mauricien pour faire face à cette crise. Une interdiction d'exportation des animaux sensibles ainsi que des produits issus de ces derniers a été instaurée, ce qui a contribué à une perte économique importante. Cette mesure est toujours d'actualité, la République de Maurice doit retrouver un statut indemne pour pouvoir reprendre ses activités d'exportation. La proximité de l'île Maurice et de l'île de la Réunion augmente le risque d'introduction du virus sur le territoire français. Les autorités françaises ont diffusé une dépêche invitant les voyageurs de la région à ne pas transporter des produits pouvant contenir le virus de la fièvre aphteuse. Il s'agit de produits issus des animaux sensibles au virus (produits laitiers, viande, etc.). Actuellement, il n'y a pas de cas de fièvre aphteuse à l'île de la Réunion, mais la vigilance reste élevée.

Le topotype ME-SA lignage Ind-2001d est une souche qui a déjà été retrouvée hors de son pool d'origine (Afrique du nord, Asie de l'est). Elle est essentiellement trouvée en Asie, plus particulièrement en Inde où le lignage Ind2001 est subdivisé en quatre sous-lignages (2001a, 2001b, 2001c et 2001d), le sous-lignage 2001d étant majoritaire [Subramaniam *et al.*, 2015]. Cette souche a été retrouvée en Asie de l'Est, en Arabie Saoudite et au Moyen-Orient [Valdzo-González *et al.*, 2014]. Ce n'est pas la première fois que cette souche s'échappe de son pool d'origine. L'origine de l'introduction de cette souche en république mauricienne n'a pas été déterminée à ce jour, une enquête est en cours pour savoir comment le virus a été introduit dans ces îles.

La fièvre aphteuse est une maladie décrite pour la première fois en 1514 en Italie [Grubman et Baxt, 2004]. Elle est donc toujours d'actualité. L'épizootie décrite dans cet article montre l'impact d'une introduction d'un virus de fièvre aphteuse en pays indemne ayant une politique de non vaccination. A ce jour, l'estimation exacte des pertes économiques n'est pas encore connue. La France n'est pas à l'abri d'une introduction de cette maladie sur son territoire ; la menace reste donc élevée et la vigilance demeure accrue.

BIBLIOGRAPHIE

- Ayelet G. *et al.* - Genetic Characterization of Foot-and-Mouth Disease Viruses, Ethiopia, 1981-2007. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, **15**(9), 1409-1417.
- Brehm K.E. *et al.* - Highly sensitive fetal goat tongue cell line for detection and isolation of foot-and-mouth disease virus. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, **47**(10), 3156-3160.
- Gorna K. - Establishment and validation of two duplex one-step real-time RT-PCR assays for diagnosis of foot-and-mouth disease. *Journal of Virological Methods*, 2016, **235**, 168-175.
- Grubman M.J., Baxt B. - Foot-and-mouth diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, **17**(2), 465-493.
- Jamal S.M., Belsham G.J. - Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Veterinary Research*, 2013, **44**, 116. doi: 10.1186/1297-9716-44-116.
- Knowles N.J. - Pandemic Strain of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype O. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, **11**(12), 1887-1893.
- OIE. - *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*, 2012, 7^{ème} Edition, Chapitre : 2.1.8.
- Salt J.S. - The carrier state in foot and mouth disease-an immunological review. *Br. Vet. J.*, 1993, **149**(3), 207-223.
- Subramaniam S. *et al.* - Evolutionary dynamics of foot-and-mouth disease virus O/ME-SA/Ind2001 lineage. *Veterinary Microbiology*, 2015, **178**, 181-189.
- Tamura K. *et al.*, 2013 - MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, **30**(12), 2725-2729.
- Tamura K., Nei M. - Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, **10**, 512-526.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. - Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 2004, **101**, 11030-11035.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. - MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, **28**(10), 2731-2739.
- Thompson D. *et al.* - Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev. Sci. Tech.*, 2002, **21**(3), 675-687.
- Pacheco J.M. *et al.* - Persistent Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in the Nasopharynx of Cattle; Tissue-Specific Distribution and Local Cytokine Expression. *PLoS One*, 2015 May 21.
- Valdazo-González B. *et al.* - Genome Sequences of Foot-and-Mouth Disease Virus O/ME-SA/Ind-2001 Lineage from Outbreaks in Libya, Saudi Arabia, and Bhutan during 2013. *Genome Announcements*, 2014, **2**(2), e00242-14.

