



Point de vue

Un exemple de réponse aux épidémies : impact de deux crises sanitaires (émergences des virus de la fièvre catarrhale ovine et Schmallenberg) sur un laboratoire de recherche et de référence

S. Zientara, UMR 1161 Virologie Anses-Inra, ENVA, Maisons-Alfort, France

S. Zientara (2012). Un exemple de réponse aux épidémies : impact de deux crises sanitaires (émergences des virus de la fièvre catarrhale ovine et Schmallenberg) sur un laboratoire de recherche et de référence, EuroReference, N°8, ER08-12PV01 <http://www.anses.fr/euroreference/numero8/>

Deux virus transmis par des moucheron (virus de la fièvre catarrhale ovine et virus Schmallenberg) ont émergé dans le nord de l'Europe en 2006 et 2011 respectivement. L'UMR de virologie du laboratoire de l'Anses de Maisons Alfort (France) a été confrontée à l'émergence de ces deux virus en France. En quelques semaines, il a fallu développer et valider des outils de diagnostic sérologique et moléculaire, constituer et animer un réseau de laboratoires afin de pouvoir traiter des milliers de prélèvements et développer des projets de recherche sur les mécanismes physiopathogéniques des infections. La structure d'une UMR mêlant équipes de recherche et LNR permet de répondre à ces différentes exigences dans un laps de temps limité.

Présentation de l'UMR de virologie de Maisons Alfort

Les activités de l'Unité mixte de recherche (UMR) de virologie n°1161 de l'Anses, l'Inra et l'ENVA (qui est située sur le campus de l'École nationale vétérinaire d'Alfort - ENVA -) sont centrées sur les viroses animales à risque zoonotique et/ou d'émergence. L'effectif de l'UMR est d'environ une quarantaine de personnes. Nous développons ainsi i) des méthodes de diagnostic optimisées pour la surveillance épidémiologique et la phylogénie ; ii) l'étude de la physiopathologie de certaines d'entre elles, centrée sur l'étude des risques de transmission interspécifiques, particulièrement dans le sens animal vers l'homme ; iii) de nouvelles approches de vaccination orientées vers des modes d'administration orale. Outre ces activités de recherche appliquée ou plus fondamentale, l'UMR héberge aussi des laboratoires de référence à l'échelle mondiale (laboratoire de référence de l'OIE pour la maladie épizootique hémorragique des cervidés), à l'échelle européenne (laboratoire de référence de l'Union européenne pour les maladies équine) ou nationale (laboratoires nationaux de référence – LNR – pour la fièvre catarrhale ovine, la fièvre aphteuse, la stomatite vésiculeuse, la maladie vésiculeuse des suidés, la peste équine, la fièvre de West Nile). Cette originalité d'associer des activités de référence liées à la tutelle de l'Anses et des activités de recherche permet à cette unité de faire face à des émergences comme ce fut le cas en 2006 (avec l'émergence de la fièvre catarrhale ovine) ou en 2011 (avec l'émergence du virus Schmallenberg).

Rappels sur l'émergence de deux maladies vectorielles en Europe et en France

En août 2006, la Commission européenne notifiait officiellement la présence aux Pays-Bas, en Belgique et en Allemagne, du sérotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) ou *Bluetongue* virus (BTV), un pathogène majeur des ruminants domestiques et sauvages. Bien que circulant dans le bassin méditerranéen depuis plusieurs années, il s'agissait de la première épizootie de FCO documentée en Europe du Nord et de la première circulation du sérotype 8 sur le continent. À la fin de l'année 2006, le Grand-Duché de Luxembourg et la France étaient également touchés (6 foyers). Contre toute attente, ce virus, qui se transmet par l'intermédiaire de petits moucheron du genre *Culicoides*, résista à la période hivernale

et se propagea rapidement à toute une partie du nord de l'Europe en 2007 et 2008. Cette épizootie se caractérisa très vite par une atteinte clinique importante des bovins et par une mortalité pouvant atteindre 30 % chez les ovins [3], et cela en l'absence du vecteur *Culicoides imicola* (responsable de la transmission du BTV dans le bassin méditerranéen), jamais rencontré dans les régions concernées. En France, plus de 50 000 foyers infectés étaient recensés entre 2007 et 2008. Les mesures prophylactiques (vaccination massive) rapidement mises en place ont toutefois permis de maîtriser l'épizootie et la plupart des pays ont retrouvé aujourd'hui leur statut indemne de FCO [5].

Cette émergence soudaine et inattendue du sérotype 8 de BTV (BTV-8) a constitué un événement majeur en santé animale en Europe. Quelques années plus tard, l'histoire semble se répéter avec l'émergence d'une nouvelle arbovirose touchant les ruminants dans le nord de l'Europe.

Au cours de l'été 2011, de nombreux cas de diarrhées fébriles associées à une perte d'appétit et une chute importante de la production de lait étaient rapportés chez des bovins adultes en Allemagne (Rhénanie du Nord et Westphalie), avec parfois des signes cliniques évocateurs de la FCO, laissant craindre une résurgence de ce virus. Ces symptômes étaient transitoires et disparaissaient en général en quelques jours. La recherche de nombreux agents pathogènes dans des prélèvements provenant de bovins malades s'est révélée négative malgré l'utilisation d'approches innovantes comme la bio-puce Epizone Biochip 5.1 qui comporte plus de 2 000 amorces de virus. Après ces multiples investigations, l'Institut Friedrich-Loeffler (FLI) a identifié en novembre 2011 par séquençage haut débit sans a priori, à partir d'échantillons de sang de bovins malades, des séquences nucléotidiques appartenant à un nouveau virus qui fut dénommé Schmallenberg virus (SBV), du nom de la ville d'où provenaient les prélèvements d'origine [1]. L'implication du SBV dans les signes cliniques observés fut confirmée quelques temps plus tard par une infection expérimentale sur des bovins âgés de neuf mois, qui permit de noter que la virémie induite par le SBV semblait être transitoire (4 jours) [1]. L'analyse de la séquence du génome viral indiquait des similitudes avec les virus Akabane, Aino et Shamonda, qui appartiennent au genre *Orthobunyavirus* au sein de la famille des *Bunyaviridae*.

Le FLI a rapidement développé un test de détection du génome du SBV par RT-PCR en temps réel dont le protocole a été partagé avec un certain nombre de partenaires européens. Dans



Point de vue

le même temps, un système de surveillance épidémiologique était mis en place au niveau européen.

Au cours du mois de décembre, les Pays-Bas signalent pour la première fois une action tératogène du SBV chez des ovins, dont les caractéristiques s'assimilent aux effets observés avec les virus Akabane et Aino [1]. Ainsi, des femelles infectées en début de gestation sont capables de transmettre le virus au(x) fœtus (ovins, caprins et bovins) qui développent alors des malformations atypiques conduisant, la plupart du temps, à une mort intra-utérine ou à un décès rapide après leur mise bas. Le 25 janvier 2012, le génome viral était détecté pour la première fois en France par notre laboratoire dans des cerveaux d'agneaux mort-nés provenant de deux élevages situés en Moselle et en Meurthe-et-Moselle (nord-est de la France).

Au 1^{er} juillet 2012, 5 234 foyers de SBV étaient recensés en Europe dont 2 865 chez les bovins, 2 491 chez les ovins et 78 chez les caprins (source: www.survepi.org).

Diagnostic initial des virus BTV et SBV

En France, que ce soit en août 2006 ou en janvier 2012, le LNR risquait de se retrouver en situation « d'embolie » si nous recevions tous les prélèvements biologiques effectués lors de suspicions cliniques de BTV ou de SBV. Par exemple, pour la FCO en 2007, les autorités vétérinaires italiennes exigeaient que les quelques 100 000 bovins (appelés broutards) exportés du centre de la France vers la plaine du Pô soient testés individuellement par RT-PCR ce qui, compte tenu des effectifs du LNR (3 personnes), était impossible. La structure en UMR, associant des activités de recherches à des activités de référence, nous a permis, tout au moins pendant les premières semaines des deux crises respectives, d'effectuer des redéploiements de personnels (des techniciens des autres équipes arrêtaient leurs projets de recherche et venaient en aide à leurs collègues).

Nous avons donc collaboré avec différentes sociétés spécialisées dans le diagnostic vétérinaire (AES-ADIAGENE, LSI, IDvet, IDEXX...) et leur avons demandé de développer des troupes de diagnostic virologique moléculaire sensibles, spécifiques, peu coûteuses et automatisables. Pour la FCO, les sociétés LSI et AES-ADIAGENE ont d'abord utilisé notre test PCR-maison [2, 4] avant de développer leurs propres méthodes. La même approche a été ensuite appliquée pour la crise SBV.

La même procédure a été mise en place pour le développement de troupes sérologiques. Ainsi, en collaboration avec la société IdVet, nous avons pu valider une troupe de diagnostic ELISA fin février 2012 [6]. Il s'agissait du premier test ELISA développé au monde pour détecter les anticorps anti-SBV.

En parallèle, avec l'appui de la Direction générale de l'alimentation du ministère français en charge de l'Agriculture, nous avons mis en place, formé et animé un réseau de 66 laboratoires départementaux vétérinaires qui ont permis de traiter plusieurs milliers de prélèvements biologiques par jour (pour la FCO et le SBV). Ce réseau a dans un premier temps utilisé les troupes de RT-PCR en temps réel de LSI et AES ADIAGENE, développées et validées en collaboration avec notre laboratoire (il est à noter qu'en conséquence tous les prélèvements positifs en RT-PCR étaient adressés à l'UMR pour isolement viral pour BTV et SBV). Pour SBV, le réseau a bénéficié du test sérologique ELISA indirect développé par IDvET permettant la détection des anticorps dirigés contre la nucléoprotéine du virus Schmallenberg.

Ainsi dans ces deux crises sanitaires a été mis en place en six semaines un dispositif de diagnostic à large échelle constitué d'un LNR et d'un réseau d'une soixantaine de laboratoires capables d'effectuer le diagnostic moléculaire par RT-PCR en temps réel d'infection par BTV ou SBV, mais aussi le sérodiagnostic pour le SBV.

Conclusion

Les relations de travail et de confiance qui se sont nouées entre les différents laboratoires nationaux de référence sur la FCO depuis 2000 (émergence du virus dans le bassin méditerranéen) ont permis un échange très rapide et efficace des protocoles et des réactifs pour la mise en œuvre de la détection de BTV et de SBV dans les différents pays européens. Lors de la crise FCO, nous avons développé et validé une méthode de RT-PCR [2] que nous avons rapidement transférée à nos collègues des autres LNR européens. Ainsi, pour ce qui concerne l'infection par le SBV en France, c'est au cours d'une réunion à Bruxelles, en novembre 2011, que nos collègues allemands nous ont fait part de l'identification de ce nouveau virus. Dès la mi-décembre 2011, la RT-PCR spécifique de la détection du SBV était alors disponible au LNR français à Maisons-Alfort. Depuis cette date, de nombreux échanges scientifiques et techniques ont eu lieu entre les laboratoires nationaux.

Ainsi, la crise « FCO » a favorisé la mise en place de liens scientifiques et relationnels entre les différents laboratoires nationaux des Etats Membres de l'Union européenne qui échangent en temps quasi-réel les informations dont ils disposent. Cet atout est considérable en cas d'émergence.

La détection du virus SBV a été réalisée par métagénomique par le laboratoire allemand du FLI. Compte tenu du coût et de la technicité que ce type de technologie nécessite, les collaborations inter-laboratoires permettent à chaque laboratoire de pouvoir bénéficier de ce type de méthode sans pour autant investir des sommes considérables pour une utilisation peut-être relativement épisodique.

Références

- Bernd Hoffmann, Matthias Scheuch¹, Dirk Höper, Et Coll. (2012). Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg infect. Dis.* 18 (3), http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/3/11-1905_article.htm
- Toussaint J.F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods*, 140(1-2), 115-123.
- Toussaint J-F, F. Vandebussche, J. Mast, L. De Meester, N. Goris, W. Van Dessel, E. Vanopdenbosche, P. Kerkhofs, K. De Clercq, S. Zientara, C. Sailleau, G. Czapliski, G. Depoorter, J-M. Dochy. 2006. Bluetongue in northern Europe. *The Veterinary Record*, September 2, 327.
- Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, Roquier C, Remond Em, Lebreton F, Hammoui S, Dubois E, Agier C, Merle G, Breard E. 2002. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *The Veterinary Record*, 150(19), 598-601.
- Zientara Stephan, N James Maclachlan, Paolo Calistri, Jose-Manuel Sanchez-Vizcaino, Giovanni Savini. 2010. Bluetongue Vaccination in Europe. *Expert Review of Vaccines*, 9(9), 989-991.
- Zientara S, E Breard, C Sailleau. Schmallenberg virus serology - Europe (33): Serology, <http://www.promedmail.org>, Thu 5 Apr 2012.