

Première détection du coronavirus équin en France

Par :

- F. Miszczak¹, V. Tesson², J. Dina², S. Corbet², U. B. R. Balasuriya³, S. Pronost¹, A. Vabret²
- ¹Laboratoire Frank Duncombe, IFR 146 ICORE Université de Caen Basse Normandie, 14053 Caen
- ²CHU de Caen, Université de Caen, 14000 Caen
- ³Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, Lexington, KY 40546 (USA)

Résumé

Les coronavirus sont des virus ARN enveloppés qui forment un grand groupe de virus pouvant infecter les mammifères et les oiseaux. A ce jour, deux souches seulement d'ECoV ont été isolées dans le monde, la première en 1999 à partir des selles diarrhéiques d'un poulain aux Etats-Unis (souche NC99) et la seconde au Japon (souche Tokachi09) de lignage probablement différent de la précédente. Dans cette étude, deux "one-step RT-PCR temps réel" (rRT-PCR) ciblant 2 gènes codant pour des protéines structurales ont été développées afin de rechercher les infections à ECoV dans la population équine française. Pour cela, les gènes M et N ont été amplifiés et clonés à partir de l'ARN extrait du surnageant de culture de la souche NC99 puis utilisés en tant que contrôles positifs. Au total, 84 échantillons de selles, collectés à partir de poulains et chevaux adultes diarrhéiques ont été testés. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la présence d'ECoV dans 3 échantillons provenant d'un même animal avec la rRT-PCR spécifique du gène N, et deux échantillons seulement avec celle spécifique du gène M. A ce jour, aucune étude n'avait montré la présence du coronavirus équin en France ou en Europe.

Mots clés : coronavirus équin, diagnostic, RT-PCR en temps réel

Summary

Coronaviruses are enveloped RNA viruses that infect a large number of avian and mammalian species. Only two strains of ECoV was isolated in the world, the first one in 1999 from faeces of a diarrheic foal in USA (ECoV-NC99 strain) and the second one in Japan (Tokachi09 strain) which was probably originated from a different lineage than the NC99 strain. In our laboratory, we developed two one step real-time RT-PCR (rRT-PCR) assays targeting 2 genes encoding for structural proteins in order to diagnose ECoV infection in horses in France. Complete M and N genes were amplified and cloned from RNA extracted from ECoV-NC99 strain tissue culture fluid supernatant then used as positive controls. We screened 84 fecal samples from diarrheic foals and adult horses. When tested using the M gene specific rRT-PCR assay, ECoV was detected in three fecal samples collected from a same animal. However, when tested with the N gene specific rRT-PCR assay, ECoV was only detected in two samples, indicating this assay is less sensitive than the M gene specific assay. To date, there is no report on the detection of ECoV in France or Europe.

Key-words: equine coronavirus, diagnosis, real-time RT-PCR

Introduction

Les coronavirus sont des virus enveloppés qui forment un grand groupe de virus pouvant infecter les mammifères et les oiseaux. Leur génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive. Le coronavirus équin (ECoV) appartient au genre *Betacoronavirus* (anciennement nommé groupe 2) qui est phylogénétiquement proche du coronavirus bovin ainsi que du coronavirus humain OC43. L'ECoV a été isolé pour la première fois en 1999 à partir des selles diarrhéiques d'un poulain en Caroline du Nord aux Etats-Unis, et a été nommé « souche ECoV NC99 » (Guy *et al.*, 2000). La séquence du génome complet de la souche NC99 a été publiée en 2007 (Zhang *et al.*, 2007) et récemment, une équipe de recherche japonaise a identifié une autre souche d'ECoV, nommée Tokachi09, appartenant très probablement à un lignage différent de celui de la souche NC99 (Oue *et al.*, 2011). L'objectif préliminaire de cette étude rétrospective était de « screener » et de détecter le coronavirus équin dans des échantillons fécaux et respiratoires provenant de poulains et de chevaux adultes en France.

1. Matériel et Méthodes

1.1. Echantillons

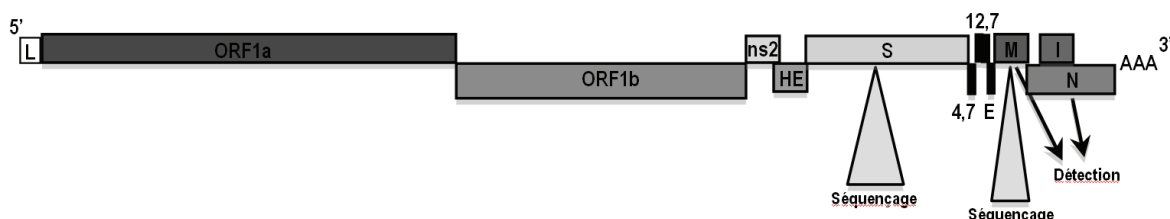
Au total, 237 échantillons, incluant 140 prélèvements fécaux et 97 échantillons respiratoires, ont été « screenés » et testés par diagnostic moléculaire. Ces prélèvements ont été réalisés sur des poulains et des chevaux adultes présentant des signes cliniques tels que des diarrhées, de la fièvre, ou des symptômes associés au système respiratoire. Ces échantillons ont été collectés et stockés à -80°C dans notre laboratoire, entre 2008 et 2011.

1.2. Détection moléculaire

Avant d'être purifiés, les échantillons fécaux ont préalablement été clarifiés. Les acides nucléiques ont ensuite été extraits à l'aide du système automatisé QIASymphony (Qiagen®, Germany) et du kit d'extraction QIASymphony Virus/Bacteria.

Deux tests RT-PCR en temps réel (rRT-PCR) en une cupule, ciblant les gènes N et M ont été conçus et développés afin de détecter le coronavirus équin. Les gènes complets M et N de la souche NC99 ont ensuite été amplifiés et clonés dans un vecteur pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen, USA) et transcrits *in vitro* à l'aide de l'ARN polymérase T7 (Figure I). Les transcrits ARN en ensuite été utilisés en tant que contrôles positifs dans les rRT-PCR.

Figure I : Représentation schématique des 11 ORFs (Open Reading Frame) constituant l'ECoV (Zhang *et al.*, 2007).
Figure I: Schematic representation of 11 ECoV genome ORFs (Zhang *et al.*, 2007).



1.3. Analyse phylogénétique : séquencage des gènes partiels M et S à partir des échantillons détectés positifs ECoV par rRT-PCR

Afin de comparer et de caractériser phylogénétiquement les souches détectées positives ECoV par rRT-PCR, deux couples d'amorces oligonucléotidiques ciblant les gènes M et S1 ont été « designés » à partir de la séquence publiée de la souche NC99 (numéro d'accèsion GenBank : EF446615) et utilisés pour l'amplification de deux fragments respectifs de 635 et 676 pb. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes : ECoV-S1 amorce sens, 5'-caatgcctttatggcttggt-3'; ECoV-S1 amorce anti-sens, 5'-aaactcggagggatctgaa-3'; ECoV-M amorce sens, 5'-acctggactgctgatgaagc-3'; ECoV-M amorce anti-sens, 5'-gtgtccatgcctgaaccttt-3'. Les produits d'amplification à l'issue de la RT-PCR ont ensuite été séquencés, et les séquences nucléotidiques obtenues ont été alignées à l'aide du programme ClustalW avec des séquences de *betacoronavirus* disponibles sur la base de données GenBank. Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode dite de "Neighbor-joining" à l'aide des deux paramètres de correction de Kimura. La souche SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) de Coronavirus humain a été utilisée en tant que souche éloignée afin d'enraciner l'arbre.

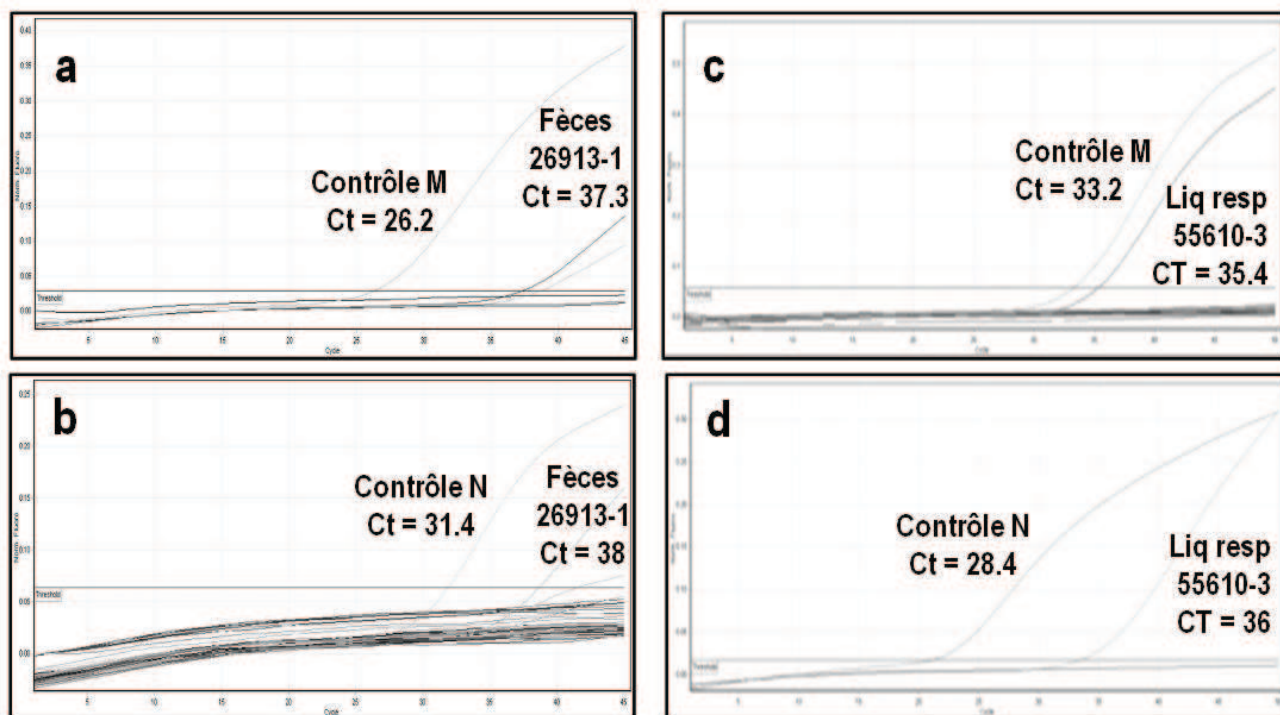
2. Résultats

2.1. Détection de l'ECoV

Parmi les 97 échantillons fécaux testés à l'aide de la rRT-PCR spécifique du gène M, trois échantillons ont été détectés positifs (les échantillons 26913-1, 26913-2 et 26913-3). Ces trois échantillons fécaux ont été prélevés en 2010 chez une même pouliche Pur-Sang de 11 mois présentant des diarrhées. Concernant le diagnostic de ces mêmes 97 échantillons avec la rRT-PCR spécifique du gène N, seul 2 échantillons parmi les trois précédents ont été détectés positifs (les échantillons 26913-1 et 26913-2). Parmi les 140 échantillons respiratoires testés, un seul a été détecté positif (échantillon 55610-3) à l'aide des deux rRT-PCR ciblant spécifiquement les gènes M et N (Figure II).

Figure II : Courbes d'amplification des échantillons positifs pour la rRT-PCR ECoV. **2a** : rRT-PCR spécifique du gène M : contrôle positif Ct=26,2 cycles ; et échantillon fécal (26913-1) Ct=37,3 cycles. **2b** : rRT-PCR spécifique du gène N : contrôle positif Ct=31,4 cycles ; et échantillon fécal (26913-1) Ct=38 cycles. **2c** : rRT-PCR spécifique du gène M : contrôle positif Ct=33,2 cycles ; et échantillon respiratoire (55610-3) Ct=35,4 cycles. **2d** : rRT-PCR spécifique du gène N : contrôle positif Ct=28,4 cycles ; et échantillon respiratoire (55610-3) Ct=36 cycles.

Figure II: rRT-PCR amplification curves of ECoV positive equine samples. **2a**: M gene specific rRT-PCR: positive control Ct = 26.2, and fecal sample (26913-1) Ct = 37.3. **2b**: N gene specific rRT-PCR: positive control Ct = 31.4, and fecal sample (26913-1) Ct = 38. **2c**: M gene specific rRT-PCR: positive control Ct = 33.2, and respiratory sample (55610-3) Ct = 35.4. **2d**: N gene specific rRT-PCR: positive control Ct = 28.4, and respiratory sample (55610-3) Ct = 36.



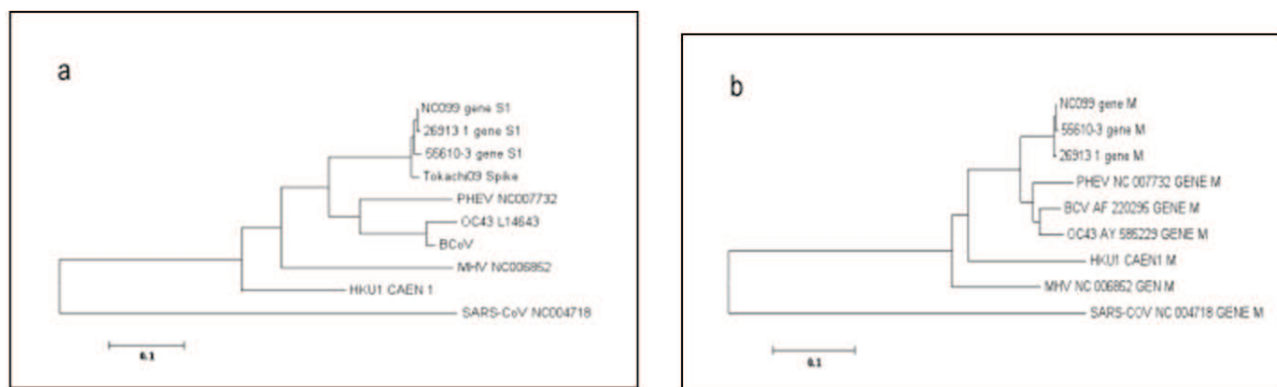
2.2. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique des deux isolats 26913-1 et 55610-3 sur les gènes partiels S1 et M montre que les deux isolats respiratoire et fécal sont tous les deux plus proches phylogénétiquement de la souche d'ECoV NC99 que des autres *betacoronavirus* (Figure III).

Figure III : Etude phylogénétique portant sur les deux isolats français 26913-1 et 55610-3 et des autres betacoronavirus en se basant sur la comparaison des séquences nucléotidiques des gènes partiels S1 et M (3a et 3b).

Les numéros d'accès des séquences du gène S1 utilisées afin de réaliser l'alignement sont : ECoV-Tokachi09 AB555560, Bovine coronavirus BCoV M64667, Human coronavirus HCoV-OC43 L14643, Human coronavirus HCoV-HKU1 Caen1 HM034837, porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus PHEV NC_007732, murine hepatitis virus MHV NC_006852, SARS-CoV NC_004718. Les numéros d'accès des séquences du gène M utilisées afin de réaliser l'alignement sont : BCoV AF220295, HCoV-OC43 AY585229, PHEV NC_007732, HCoV-HKU1 Caen1 HM034837, MHV NC_006852, and SARS-CoV NC_004718.

Figure III: Phylogenetic relationship of the two French isolates 26913-1 and 55610-3 and other Betacoronavirus based on a comparison of partial S1 and M gene nucleotide sequences (3a and 3b). The accession numbers of sequences used for the partial S1 gene alignment were: ECoV-Tokachi09 AB555560, Bovine coronavirus BCoV M64667, Human coronavirus HCoV-OC43 L14643, Human coronavirus HCoV-HKU1 Caen1 HM034837, porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus PHEV NC_007732, murine hepatitis virus MHV NC_006852, SARS-CoV NC_004718. The accession numbers of sequences used for the partial M alignment were: BCoV AF220295, HCoV-OC43 AY585229, PHEV NC_007732, HCoV-HKU1 Caen1 HM034837, MHV NC_006852, and SARS-CoV NC_004718.



En conclusion, cette étude montre pour la première fois la présence du coronavirus équin en France et même en Europe. Cette étude préliminaire sera suivie d'une étude plus approfondie de la souche détectée par rRT-PCR, après isolement sur culture cellulaire. De plus, la recherche du coronavirus équin sera poursuivie dans le cadre d'une étude comprenant un large panel d'échantillons de selles ainsi que des prélèvements respiratoires provenant respectivement de poulains souffrant de diarrhées et montrant des signes cliniques respiratoires.

Références

- Guy, J.S., Breslin, J.J., Breuhaus, B., Vivrette, S., Smith, L.G., 2000. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. *Journal of Clinical Microbiology* 38(12):4523-6.
- Oue, Y., Ishihara, R., Edamatsu, H., Morita, Y., Yoshida, M., Yoshima, M., Hatama, S., Murakami, K., Kanno, T., 2011. Isolation of an equine coronavirus from adult horses with pyrogenic and enteric disease and its antigenic and genomic characterization in comparison with the NC99 strain. *Veterinary Microbiology* 150(1-2):41-8.
- Zhang, J., Guy, J.S., Snijder, E.J., Denniston, D.A., Timoney, P.J., Balasuriya, U.B., 2007. Genomic characterization of equine coronavirus. *Virology* 369(1), 92-104.