



Une décennie de Rhinopneumonie : étude phylogénétique.

Gabrielle Sutton^{1,2}, Marion Jourdan³, Christine Fortier^{1,2}, Virginie Maisonnier³, Stéphanie Dervin³, Christel Marcillaud-Pitel³, Loïc Legrand^{1,2}, Romain Paillot^{1,2} & Stéphane Pronost^{1,2}

¹ LABÉO Frank Duncombe, 14280 Saint-Contest, France.

² Normandie Univ, UNICAEN, BIOTARGEN EA7450, 14280 Saint-Contest, France.

³ RESPE, 14280 Saint-Contest, France.

gabrielle.sutton@laboratoire-labeo.fr



Ce qu'il faut retenir

En 2018, une crise de rhinopneumonie avec un nombre de cas rapportés sans précédent a sévit sur le territoire français. Cette crise a suscité de nombreuses interrogations parmi les propriétaires et éleveurs mais également au sein de la communauté scientifique regroupant les vétérinaires et les équipes de recherche en santé équine.

L'étude génétique des souches collectées au LABÉO Frank Duncombe a permis d'éclaircir certaines interrogations. Nous pouvons en effet affirmer que plusieurs souches ont été impliquées lors de cette crise écartant la possibilité d'une unique souche émergente plus virulente qui aurait été à l'origine de cette crise. Ces résultats étayent l'hypothèse selon laquelle l'augmentation du nombre de cas de rhinopneumonie pourrait avoir un lien avec une baisse de la vaccination, probablement survenue à la suite de la rupture de stock chez les fournisseurs de vaccins en 2017.

Par ailleurs, notre étude a permis d'avoir une meilleure connaissance concernant les souches circulantes.

Résumé

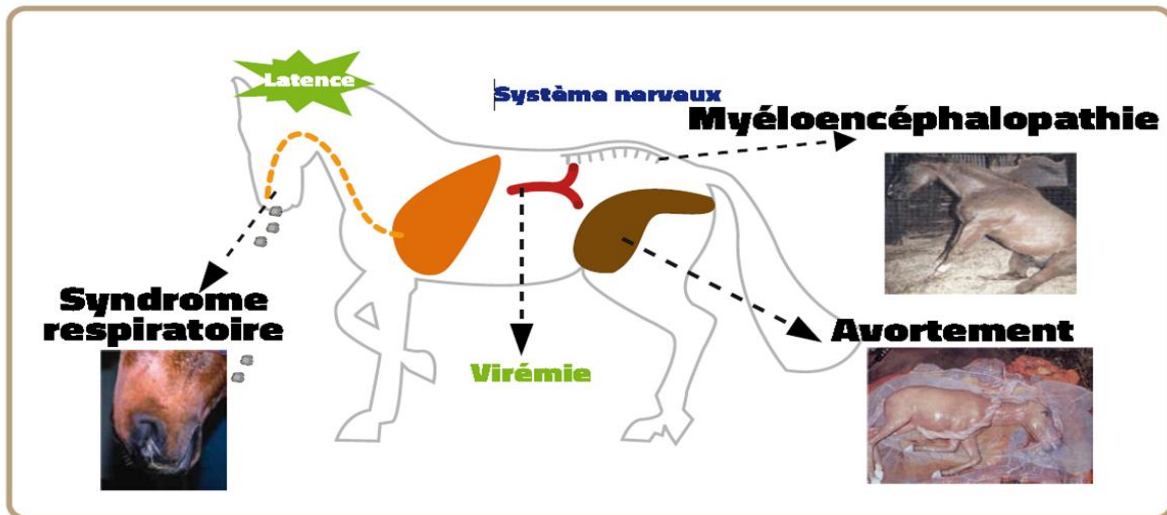
Les herpèsvirus équins de type 1 et 4 sont des virus particulièrement étudiés en raison de leur fort impact sur la santé et l'économie équine. Leurs mécanismes d'action et leur évolution sur le plan génétique sont des paramètres importants à étudier afin d'appréhender au mieux les épisodes infectieux lorsqu'ils surviennent. En 2018, un nombre de cas de chevaux atteints de rhinopneumonie supérieur aux années précédentes a été observé en France. En nous basant sur le typage d'un marqueur de neuropathogénicité décrit dans la littérature et sur le séquençage d'une région clé du génome du virus, nous avons cherché à réaliser un état des lieux de la diversité des souches circulant en France depuis 2010 jusque 2018, année de la crise rapportée dans cet article. Nous avons ainsi pu montrer une certaine diversité génétique des souches et constater une faible évolution des souches caractéristiques des herpèsvirus en France.

1 Contexte et objectifs

Les herpesvirus équins sont des virus appartenant à la famille des Herpesviridae et répartis en deux sous-familles : les Alphaherpesvirus et les Gammaherpesvirus. [1] Ces virus affectent principalement les équidés même si des franchissements de barrière d'espèce ont récemment été observés pour certains d'entre eux (HVE-1, HVE-9). [2-4] Les herpesvirus équins de type 1 et 4 (HVE-1 et HVE-4) appartiennent aux Alphaherpesvirus et au sous genre des Varicellovirus. Anciennement désignés sous le nom de rhinopneumonie (terme désormais associé à l'HVE-4, l'HVE-1 étant nommé virus abortif [5]) ils font l'objet d'un grand intérêt pour la recherche équine en raison de leur fort impact sur la santé et l'économie équine. Bien que génétiquement très proches, l'HVE-1 et l'HVE-4 se distinguent par leur mécanismes d'infection et de réplication ainsi que par les formes cliniques qu'ils engendrent.[6]

Concernant l'HVE-1, le site d'infection se trouve au niveau des muqueuses respiratoires causant une première forme qui est la forme respiratoire conduisant à l'apparition de jetage nasal, de toux et de fièvre. Les particules virales, après avoir infecté les cellules épithéliales du tractus respiratoire, vont disséminer dans l'organisme *via* les leucocytes pouvant ainsi conduire à l'apparition de deux autres formes cliniques : la forme abortive lorsque l'infection s'est propagée jusqu'au niveau de l'utérus, cette forme peut entraîner un avortement ou la naissance d'un poulain mort-né, et la forme neurologique (myéloencéphalopathie) lorsque le virus infecte les vaisseaux sanguins irriguant le cerveau, et pour laquelle des symptômes allant de simples troubles de la locomotion ou une incontinence urinaire jusqu'à une paralysie totale, peuvent être observés (Figure 1). La forme nerveuse de la maladie conduit malheureusement parfois à l'euthanasie de l'animal.[7] La forme oculaire moins fréquemment décrite est cependant rapportée en association avec HVE-1 et d'autres herpesvirus (HVE-2 par exemple).

Figure 1 : Représentation des 3 principales formes cliniques causées par HVE-1 chez le cheval

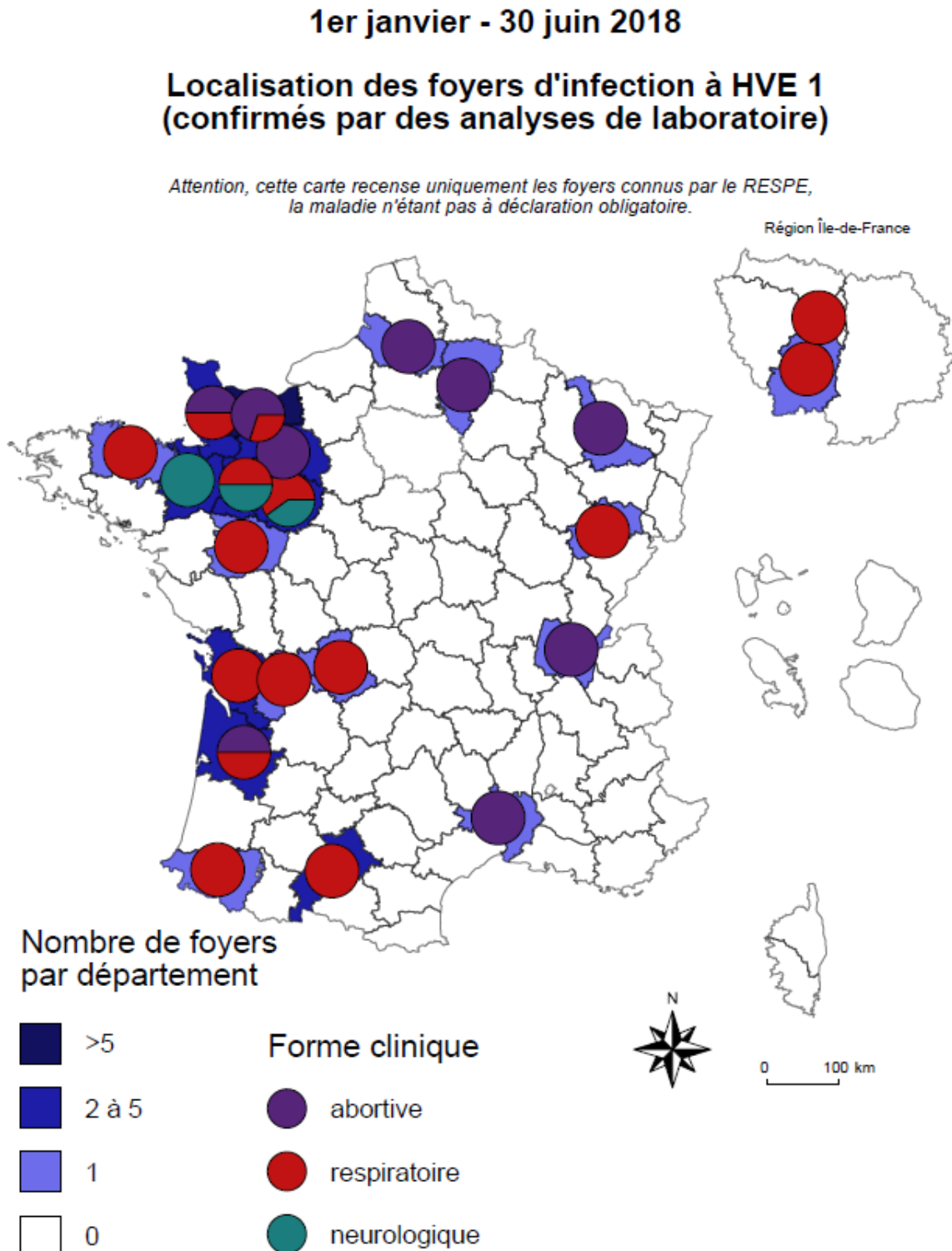


L'HVE-4 va également infecter les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire et induire une forme clinique respiratoire mais n'induit pas ou que très rarement de forme abortive. La forme nerveuse à HVE-4 bien que fortement suspectée n'est pas décrite à ce jour dans la littérature. Cela laisse supposer que si le virus peut entraîner ce type de pathologie, les formes sont plus rares qu'avec HVE-1. Ces deux virus comme tous les herpesvirus ont la particularité de rester à l'état latent chez l'animal, période durant laquelle ils n'induisent aucun signe clinique. Ils peuvent ensuite être réactivés à la faveur d'un stress environnemental ou physique, ou d'un traitement médicamenteux ce qui peut complexifier la gestion des épisodes infectieux rencontrés au sein d'élevages.[8]

Nous nous sommes intéressés au cours de cette étude à la crise de Rhinopneumonie survenue en 2018 en France. Au cours de cette année et en particulier durant les six premiers mois, un nombre de cas très largement supérieur aux années précédentes a été rapporté par le Réseau d'Epidémiologie-Surveillance en Pathologie Equine (RESPE). Des chevaux ont dû être euthanasiés et d'importants moyens ont été déployés au niveau des élevages mais également lors d'événements sportifs afin de limiter au maximum la propagation du virus et l'émergence de nouveaux.

Cette crise ayant eu lieu deux ans après qu'une rupture de stock de vaccins en France (des vaccins ayant dû être importés de pays tiers), il est possible que cela ait entraîné une baisse du niveau de la vaccination contre HVE-1 et HVE-4 diminuant ainsi progressivement la couverture vaccinale. Outre cette hypothèse, nous avons cherché à étudier le profil génétique des différentes souches d'HVE-1 isolées au laboratoire lors de cette crise en les comparant notamment à d'autres souches isolées en France depuis 2010, mais également à des souches isolées à l'étranger.

Figure 2 : Carte de la France sur laquelle sont reportées les données épidémiologiques (différentes formes cliniques et nombre de foyers) du RESPE sur la période du 1^{er} janvier 2018 au 30 juin 2018.



Pour étudier cette diversité des souches nous nous sommes intéressés à une mutation particulière (SNP2254) d'une part, et au séquençage du gène codant l'ADN polymérase d'autre part.

En effet, en 2006, une équipe anglaise, Nugent et collaborateurs, avait établi une corrélation entre une mutation située sur le gène de l'ADN polymérase (ORF30 -enzyme essentielle à la réplication virale) et le caractère neuropathogène du virus HVE-1.[9] Ainsi les souches de type A₂₂₅₄ sont dites « non-neuropathogènes » et les souches G₂₂₅₄ sont dites « neuropathogènes ». Cette corrélation avait par la suite été associée à une activité virale plus ou moins importante favorisant ainsi l'émergence des syndromes neurologiques. Bien que cette hypothèse ait été depuis controversée, nous avons utilisé ce marqueur génétique intéressant pour réaliser une première discrimination des souches de notre étude.

Nous avons également, pour certaines de nos souches isolées sur la période 2010 -2018, séquencé le gène de l'ADN polymérase (ORF30) dans le but de réaliser une étude phylogénétique (comparaison de nos souches). Cette région (ORF30) correspond en effet au gène d'une protéine essentielle à la réplication virale, il s'agit donc d'une région stable dont les modifications sont le reflet d'une éventuelle évolution du virus. Les séquences obtenues ont été comparées à celles d'un grand nombre de souches anglaises très récemment séquencées par l'équipe de Bryant et al. [10] Le but de notre analyse était d'observer les éventuelles évolutions de ces souches au cours du temps, et d'avoir ainsi une meilleure connaissance des souches circulant en France depuis les dix dernières années afin de mieux appréhender la gestion de nouveaux foyers.

2 Méthode

2.1 Préparation des prélèvements

Les échantillons ont été récoltés majoritairement en France et 3 provenaient de Belgique, tous issus de prélèvements dans le cadre d'un diagnostic. En fonction de la forme clinique, ces prélèvements étaient sous la forme d'écouvillons nasaux-pharyngés ou liquides respiratoires, d'organes de fœtus (foie et poumon) et de placenta, de sang total ou d'organes de cheval adulte (foie, poumon et parfois encéphale). Les écouvillons ont été compressés dans 4mL de Minimum Essential Medium avec antibiotiques ou dans du PBS puis 140µL de l'exprimat a été prélevé afin d'en extraire les acides nucléiques. Concernant les organes, des aliquots de 30mg de foie et de poumon, de placenta ou d'encéphale ont été réalisés. Des échantillons de sangs de 2mL ont été aliquotés.

2.2 Extraction d'acides nucléiques

L'ADN viral a été extrait à partir des échantillons préparés en utilisant des kits prévus à cet effet (Qiagen ®, Machery-Nagel ®)

2.3 PCR de détection et de typage

Une première PCR (Polymerase Chain Reaction – test permettant d'amplifier une région cible si elle est présente dans le prélèvement) a été réalisée pour la détection des pathogènes (PCR ciblant la glycoprotéine B). Les acides nucléiques (ADN) ont ensuite été typés à l'aide d'une seconde PCR pour mettre en évidence la présence de la mutation associée à la neuropathogénicité ou non (SNP2254 permettant d'identifier une Adénine ou une Guanine en position 2254).[9]

2.4 Séquençage de l'ORF30 et analyse

Six échantillons ont été sélectionnés parmi ceux récoltés en 2018 et 10 autres parmi ceux récoltés entre 2010 et 2017 dans le but de séquencer l'ORF30 (ADN polymérase) complet. La comparaison des séquences a ensuite permis la construction d'un arbre phylogénétique basé sur notre région cible (ORF30 : ADN polymérase)

3 Résultats

3.1 Crise 2018 – Epidémiologie et typage A/G2254

Comme mentionné précédemment un grand nombre de cas d'HVE-1 (et HVE-4) a été rapporté en 2018. En effet, pour l'année complète, 55 foyers ont été identifiés par le RESPE et 51 foyers ont été analysés au laboratoire LABÉO Frank Duncombe, représentant 76 échantillons. La répartition des échantillons selon les formes cliniques rencontrées est décrite dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Données épidémiologiques décrivant la crise HVE-1 2018. * Tous les cas ne font pas l'objet d'une analyse de laboratoire. **Certains cas sont issus de praticiens non affiliés au RESPE

	Forme Respiratoire	Avortement	Forme Neurologique	Informations manquantes	Total
Nombre de cas rapportés par le RESPE	33	17	5	/	55
Nombres de cas analysés au laboratoire	19*	19**	5	8	51
Nombre d'échantillons typés A/G2254	21	18	13	7	59
Nombres d'échantillons typés A2254	12	17	10	2	41
Nombres d'échantillons typés A2254	9	1	3	5	18

Comme on peut le voir dans le tableau, le nombre de cas respiratoires et d'avortements est supérieur au nombre de cas neurologiques. Les deux types de souches A2254 ou G2254 ont été retrouvés dans différents foyers indépendamment de la forme clinique, même si pour les avortements la forme A2254 est prépondérante. Cela exclu d'une part, l'idée d'une unique souche responsable de cette crise et confirme d'autre part, le fait que la mutation en position 2254 n'est pas le seul facteur conférant la neuropathogénicité d'une souche. On notera cependant un plus grand nombre de souches A2254 typées au cours de cette année 2018 par comparaison au nombre de souches G2254.

3.2 Phylogénie

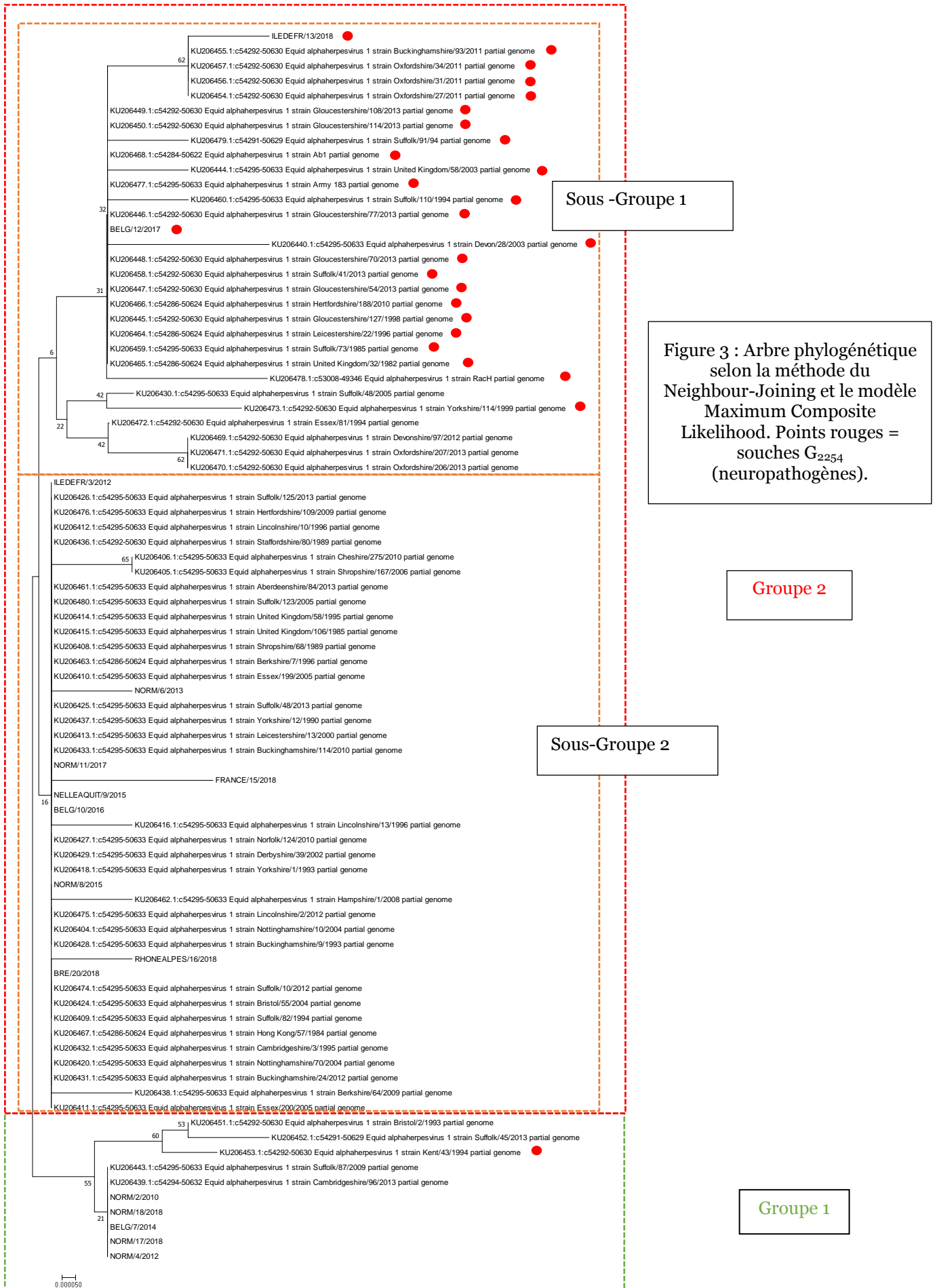
Parmi les souches isolées en 2018, 6 ont été sélectionnées pour le séquençage complet de l'ORF30 et comparées à d'autres souches : 10 souches françaises analysées entre 2010 et 2017 au laboratoire et 67 souches étrangères décrites dans les banques de données internationales. Les séquences ont toutes été comparées à la séquence de l'ORF30 de la souche de référence Ab4 AY665713. Les différentes mutations observées sont répertoriées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Mutations observées au niveau de l'ORF30 par comparaison à la séquence de référence AY665713 (Ab4). *mutations entraînant un changement d'acide aminé.

Mutation comparé à la référence AY665713 (Ab4)	G96A	A174N	A175G	G314T	C333G	A359-	G890G	A916N	A932N	A949R	C1256T	G1286A	C2081T	G2254A	T2568C	G2953-	G2968A	G3003-	-3024T	-3108T
NORM/6/2013												X*		X*						
FRANCE/15/2018					x	x								X*	x					
NORM/8/2015														X*						
BRE/20/2018	x													X*						
RHONEALPES/16/2018											X*			X*						
NORM/11/2017										R				X*					x	x
BELG/10/2016	x													X*						
BELG/12/2017																				
ILEDEFRA/14/2018							x	N	N				x			x		x		
NORM/2/2010	x		X*											X*			X*			
NORM/18/2018	x													X*			X*			
BELG/7/2014	x													X*			X*			
NORM/4/2012	x													X*			X*			
NORM/17/2018	x													X*			X*			
NELLAQU/9/2015	x	x		x										X*						
ILEDEFRA/3/2012														X*						

Seulement deux souches parmi les 16 sélectionnées ont le profil G₂₂₅₄. 5 souches (NORM/2/2010, NORM/4/2012, BELG/7/2014, NORM/17/2018, NORM/18/2018) semblent présenter un profil très similaire concernant la séquence de cet ORF30 avec deux mutations en position 96 et 2968 (par comparaison à la séquence de référence). Les autres mutations observées semblent plus ponctuelles ou du moins propres à chaque souche séquencée. La mutation en position 96 retrouvée chez ces souches n'entraîne pas de changement d'acide aminé. Si les changements de nucléotides au niveau des séquences permettent de différencier les souches isolées (dans le temps et dans l'espace), l'information sur le changement d'acide aminé est importante car elle peut entraîner un changement de comportement des souches par un changement de conformation des protéines.

L'analyse des séquences de notre étude couplée à celle de séquences internationales a également permis la construction d'un arbre phylogénétique selon la méthode du Neighbour-Joining et le modèle Maximum Composite Likelihood (Figure 3). Deux groupes se distinguent sur cet arbre phylogénétique; le second groupe étant lui-même subdivisé en deux sous-groupes dont l'un comprend la majorité des souches G₂₂₅₄ étudiées. Dans notre étude, les souches sont réparties indépendamment des années et de la répartition géographique.



3.3 Discussion et Conclusion

Cette étude a permis de réaliser un premier état des lieux concernant les souches d'HVE-1 circulant en France. Ces premiers résultats montrent une certaine diversité des souches circulantes et excluent la possibilité d'une seule et unique souche à l'origine de la crise observée en 2018. Notre travail a donc permis de répondre à cette question qui émanait du terrain, à juste titre, au vu du plus grand nombre de cas d'HVE-1 rapporté en 2018 en comparaison aux autres années. Si les données récoltées en 2018 montrent un plus grand nombre de cas avec les souches « dites neuropathogènes » associées aux épisodes neurologiques, des cas ont également été rapportés en présence de souches « dites non neuropathogènes ». Ceci confirme les précédentes études menées dans notre laboratoire mais également par d'autres équipes et renforce le message selon lequel tout cas d'infection à HVE-1 doit être traité avec les mêmes mesures sanitaires quel que soit le type de souche incriminé (<https://respe.net/prevention/fiche-technique-confirmer-dune-maladie/>). Cependant, ces travaux de typage présentent un intérêt d'un point de vue recherche pour mieux suivre l'évolution des souches et mieux les prévenir demain. Ainsi, il n'est pas exclu que les souches G₂₂₅₄ soient plus virulentes que les souches A₂₂₅₄, en ayant un pouvoir de multiplication plus important, sans pour autant systématiquement entraîner la forme nerveuse de la maladie.[11]

En comparant les souches isolées dans notre étude (majoritairement en France et 3 souches Belges) aux souches étudiées par Bryant et al. [10], nous avons pu observer un profil phylogénétique similaire. Les herpèsvirus équins ont une évolution génétique lente et c'est ce que nous pouvons constater avec les résultats présentés ci-dessus, puisque les souches françaises sont réparties dans tous les groupes identifiés indépendamment de l'année et de la répartition géographique. D'une manière générale, les virus à ADN évoluent moins rapidement que les virus à ARN (cas du virus de la grippe équine par exemple). Il est possible que la caractéristique de latence de ce virus ait un rôle dans la persistance et l'évolution lente des différentes souches.

L'étude de séquences sur une région cible semble être une approche solide mais n'est représentative que d'un fragment du génome de chaque souche. Le séquençage complet semblerait être l'approche la plus complète mais il existe une alternative plus simple à réaliser aujourd'hui qui est la technique du Multi Locus Sequence Typing (MLST).[12] Cette méthode consiste à concaténer (regrouper entre eux) des petits fragments de génomes issus de plusieurs sites identifiés comme variables. Cette technique permet ainsi de comparer des séquences plus représentatives du génome des souches et d'approfondir l'étude phylogénétique. Cette approche est en cours de développement au laboratoire pour compléter les premières observations.

4 Applications pratiques

Cette étude nous a apporté de nouvelles connaissances concernant les souches d'HVE-1 circulant en France. Nous pouvons comparer nos souches à celles circulant dans les autres pays, en particulier chez les grandes nations du cheval. Concernant la gestion de crises, les informations à retenir sont que les souches n'ont pas beaucoup évolué depuis les dix dernières années, et que quel que soit le type de souche isolé (neuropathogène ou non neuropathogène), les mesures sanitaires à mettre en place sont identiques. Un autre point important à prendre en compte, et qui peut être associé à la dernière crise de rhinopneumonie, est la vaccination. Il est en effet tout à fait possible que la diminution de vaccination observée suite à la rupture de stock de vaccin en France ait engendré un affaiblissement de la couverture vaccinale et donc conduit à une dissémination accrue du virus.

Les applications pratiques de cette étude sont donc d'améliorer la communication concernant les bénéfices de la vaccination, notamment à l'échelle des élevages et d'effectuer un suivi rigoureux dans les élevages des chevaux ayant déjà été diagnostiqués positifs pour l'HVE-1 ou l'HVE-4.

5 Perspectives

Suite à cette étude, les perspectives sont de continuer de réaliser un suivi des souches en temps réel tout en améliorant les outils génétiques à notre disposition, avec l'outil MLST en particulier.

Une autre perspective est l'amélioration des outils sérologiques et le suivi du statut immunitaire de populations cibles ayant suivi ou non un protocole de vaccination.

Il est fort possible que plusieurs épisodes soient liés à une réactivation chez un animal porteur d'une souche latente pouvant entraîner par la suite la propagation du virus. Les travaux sur la latence seront donc abordés par notre groupe.

Remerciements : Ces travaux ont été financés par l'IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation), les Fonds Eperon, la région Normandie et le CPER 2015-2020 _CENTAURE PREACH diagnostic, traitement, PREvention des Affections locomotrices et cardio-respiratoires touchant les Chevaux, sources d'innovation pour la santé de l'Homme est cofinancée par l'Union européenne dans le cadre du programme opérationnel FEDER/FSE 2014-2020.

6 Références

1. Davison, A.J.; Eberle, R.; Ehlers, B.; Hayward, G.S.; McGeoch, D.J.; Minson, A.C.; Pellett, P.E.; Roizman, B.; Studdert, M.J.; Thiry, E. The Order Herpesvirales. *Arch Virol* **2009**, *154*, 171–177.
2. Fukushi, H.; Tomita, T.; Taniguchi, A.; Ochiai, Y.; Kirisawa, R.; Matsumura, T.; Yanai, T.; Masegi, T.; Yamaguchi, T.; Hirai, K. Gazelle Herpesvirus 1: A New Neurotropic Herpesvirus Immunologically Related to Equine Herpesvirus 1. *Virology* **1997**, *227*, 34–44.
3. Kasem, S.; Yamada, S.; Kiupel, M.; Woodruff, M.; Ohya, K.; Fukushi, H. Equine Herpesvirus Type 9 in Giraffe with Encephalitis. *Emerg Infect Dis* **2008**, *14*, 1948–1949.
4. Schrenzel, M.D.; Tucker, T.A.; Donovan, T.A.; Busch, M.D.M.; Wise, A.G.; Maes, R.K.; Kiupel, M. New Hosts for Equine Herpesvirus 9. *Emerg Infect Dis* **2008**, *14*, 1616–1619.
5. Telford, E.A.R.; Watson, M.S.; Perry, J.; Cullinane, A.A.; Davison, A.J. The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *DNA sequence* **2019**, *7*.
6. Patel, J.R.; Heldens, J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *The Veterinary Journal* **2005**, *170*, 14–23.
7. Paillot, R.; Case, R.; Ross, J.; Newton, R.; Nugent, J. Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines. *24*.
8. Slater, J.D.; Borchers, K.; Thackray, A.M.; Field, H.J. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology* **1994**, *75*, 2007–2016.
9. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.C.; Mumford, J.A.; Swann, Z.; Newton, J.R.; Bowden, R.J.; Allen, G.P.; Davis-Poynter, N. Analysis of Equid Herpesvirus 1 Strain Variation Reveals a Point Mutation of the DNA Polymerase Strongly Associated with Neuropathogenic versus Nonneuropathogenic Disease Outbreaks. *J Virol* **2006**, *80*, 4047–4060.
10. Bryant, N.A.; Wilkie, G.S.; Russell, C.A.; Compston, L.; Grafham, D.; Clissold, L.; McLay, K.; Medcalf, L.; Newton, R.; Davison, A.J.; et al. Genetic diversity of equine herpesvirus 1 isolated from neurological, abortigenic and respiratory disease outbreaks. *Transbound Emerg Dis* **2018**, *65*, 817–832.
11. Franz, M.; Goodman, L.; Van de Walle, G.; Osterrieder, N.; Greenwood, A. A Point Mutation in a Herpesvirus Co-Determines Neuropathogenicity and Viral Shedding. *Viruses* **2017**, *9*, 6.
12. Garvey, M.; Lyons, R.; Hector, R.; Walsh, C.; Arkins, S.; Cullinane, A. Molecular Characterisation of Equine Herpesvirus 1 Isolates from Cases of Abortion, Respiratory and Neurological Disease in Ireland between 1990 and 2017. *Pathogens* **2019**, *8*, 7.