



4722

26<sup>ème</sup> journée d'étude1<sup>er</sup> mars 2000

LES HARAS NATIONAUX

## Structure et fonctionnement d'un réseau d'épidémiosurveillance équine - Premier bilan d'une meilleure connaissance Épidémiologique de la grippe équine

Par C. PUYALTO-MOUSSU <sup>1</sup>, F. VALON <sup>2</sup>, S. ZIENTARA. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> AFSSA Dozulé, 14430 Goustranville

<sup>2</sup> Clinique Vétérinaire du Parc de Brières. 44117 St André des Eaux

<sup>3</sup> AFSSA Alfort, 22 rue Pierre Curie, 94703 Maisons-Alfort.

### Résumé

Un réseau d'épidémiosurveillance des pathologies équines (baptisé le RESPE) s'est constitué depuis un an sous l'égide de l'Association vétérinaire équine française. Les objectifs de ce réseau, son mode de fonctionnement, ses partenaires sont présentés. Deux réseaux fonctionnent en parallèle : un réseau de vigilance clinique et un réseau spécialisé. Ce dernier est consacré à la surveillance des virus respiratoires et notamment des virus grippaux. Les résultats attendus avec ce réseau ainsi que les données obtenues à partir des souches récemment isolées en France seront présentés ainsi que quelques rappels sur cette pathologie virale majeure.

*Mots-clés : Epidémiologie - Pathologie respiratoire - grippe équine - équidés*

### Summary

This paper reports the organisation of an epidemiological network of the equine infectious diseases in France. The different partners of this surveillance system and the circulation of the data are described. The results obtained on the surveillance and evolution of the equine influenza viruses isolated in France are reported.

*Key-words : Epidemiology - Respiratory diseases - Equine influenza - Horses*

4722

## INTRODUCTION

Des structures de surveillance des maladies infectieuses équine ont été créées ces 15 dernières années dans un certain nombre de pays (Angleterre, Suisse, Etats-Unis...). Ces réseaux se sont orientés de façon prépondérante vers les maladies infectieuses avec parfois une restriction à un syndrome particulier (Ex : réseau sur les encéphalites aux Etats-Unis). Lors de réunions de concertation, les professionnels français de la filière cheval (éleveurs, entraîneurs, vétérinaires, laboratoires...) ont exprimé un fort besoin d'informations actualisées sur la fréquence, la localisation et la diffusion des maladies infectieuses majeures ainsi que sur certaines pathologies non infectieuses. Ce souhait était d'autant plus justifié que les transports fréquents, parfois sur de longues distances des chevaux de compétition (sport, courses) favorisent la diffusion d'un certain nombre de maladies que l'ensemble de la filière doit connaître pour essayer de les maîtriser. La commission Epidémiologie de l'Association des vétérinaires équins français a donc proposé la création d'un réseau français de surveillance des pathologies équine avec les objectifs suivants : estimer l'incidence d'un certain nombre de pathologies équine au sein de clientèles équine variées, attirer l'attention des éleveurs et des praticiens sur le développement d'épizooties (ex : grippe équine), déceler précocement l'apparition de maladies exotiques (ex : encéphalites) ou de nouvelles maladies, enfin, constituer une souchothèque des principaux agents infectieux équine (bactéries, virus) circulant en France.

### 1. Fonctionnement du réseau

Le réseau a une couverture nationale et fonctionne dans le cadre de la commission Laboratoire – Epidémiologie de l'Association vétérinaire équine française.

*Population observée* : il s'agit des équidés au sens large (chevaux, poneys, ânes,...), quelle que soit leur utilisation.

*Principaux acteurs du réseau* : Le comité de pilotage du réseau est constitué de membres de l'AFSSA (Service de virologie-Alfort, Services de microbiologie et d'épidémiologie - Dozulé), de membres des écoles vétérinaires, de vétérinaires praticiens et de représentants de laboratoires d'analyse publics et privés. Le réseau comprend 70 vétérinaires sentinelles volontaires représentant les différentes activités hippiques (élevage, entraînement, loisirs)

*Mode de fonctionnement* :

Il a été proposé qu'un double système de recueil d'informations soit mis en place :

**Réseau « vigilance clinique »** : les vétérinaires sentinelles adressent tous les 15 jours au gestionnaire du réseau (AFSSA Dozulé) un formulaire papier ou un fichier informatique contenant les informations suivantes : maladie concernée, le lieu d'apparition (commune, département), le nombre d'animaux atteints par foyer, les méthodes de diagnostic (clinique, examens de laboratoires) mises en œuvre ainsi que leurs résultats. Le diagnostic clinique et la prescription des examens complémentaires sont effectués par le vétérinaire traitant en accord avec les protocoles proposés par le réseau.

**Réseau spécialisé « syndrome grippal »** : un recueil d'informations plus précis, comprenant des examens complémentaires gratuits et un questionnaire clinique et épidémiologique, est effectué chaque année sur un thème particulier. Une étude des pathologies respiratoires d'origine virale a été proposée pour 1999-2000. Des kits de prélèvements spécifiques au diagnostic de ces pathologies ont été déposés chez les vétérinaires sentinelles et les analyses sont effectuées au frais du réseau dans trois laboratoires référencés. Les recherches effectuées concernent principalement la grippe (ELISA, Inhibition de l'hémagglutination, PCR, culture cellulaire) et les virus herpès EHV1 et EHV4 (culture cellulaire, PCR). Des cinétiques sérologiques sont également proposées au client par les vétérinaires sentinelles. Le séquençage des souches isolées est ensuite réalisé.

*Diffusion des informations*

L'enregistrement, l'analyse et la diffusion (revues professionnelles et revues scientifiques) des résultats sont à la charge de l'AFSSA et du comité de pilotage du réseau, avec les clauses de confidentialité habituelles. La base de données du réseau ainsi que son site Web sont gérés à l'AFSSA Dozulé. Un bulletin

propre au réseau est publié tous les 2 mois et est adressé aux vétérinaires sentinelles ainsi qu'aux membres de la commission laboratoire-épidémiologie de l'AVEF.

La diffusion des informations auprès des vétérinaires sentinelles passe par la diffusion bimensuelle d'un bulletin répertoriant les foyers enregistrés. Un site WEB est également disponible pour le grand public et les membres du réseau avec des droits d'accès distincts.

A l'issue de 6 mois de fonctionnement, le réseau a enregistré 51 suspicions de foyers grippaux dont 21 ont été confirmés par mise en évidence du virus grippal. Au cours de la même période, 4 souches grippales ont pu être isolées.

## **2. La grippe des équidés**

Dans le monde vétérinaire, des virus grippaux comparables à ceux que l'on trouve chez l'homme infectent naturellement les porcs, les oiseaux domestiques ou sauvages, les chevaux mais aussi des espèces aussi différentes que les visons, baleines, phoques, ruminants,...

Il s'agit toujours de virus de types A ou C. Il y a au sein du type A, 15 sérotypes de HA et 9 de NA. Les H3 et 7 ont été retrouvés chez le cheval, H1 et H3 chez le porc, tous les autres chez les oiseaux. Les N8 et N7 ont été isolés chez le cheval, N1 et N2 chez le porc, tous les autres chez les oiseaux.

### **a - La grippe du cheval**

La grippe des équidés est la pathologie des voies respiratoires la plus pénalisante sur le plan économique pour l'industrie du cheval (courses, compétitions, ventes, ...). Deux virus grippaux ont été identifiés chez le cheval : A/equine/Prague/1/56 (H7N7) et A/equine/Miami/1/63 (H3N8) (TIMONEY, 1996).

Le tableau clinique est très proche de celui observé chez l'homme.

La période d'incubation est de 2 à 5 jours. La grippe peut revêtir différentes formes cliniques :

#### **- une forme mineure ou inapparente**

L'état général n'est pas altéré. Les signes cliniques sont discrets : malaise fébrile de courte durée ou hyperthermie modérée et fugace.

#### **- une forme majeure simple**

Les animaux présentent un syndrome fébrile avec hyperthermie (40 à 41 °C). Le tableau clinique est celui d'une laryngo-trachéo-bronchite. Le signe le plus fréquent est la toux forte, quinteuse, sèche et douloureuse associée à un jetage nasal séreux. Les animaux sont fréquemment anorexiques et affaiblis. Des signes de conjonctivite, d'épiphora, d'œdème des membres, de myalgie, de tachypnée et/ou dyspnée peuvent être observés.

Chez les chevaux adultes, la mortalité est pratiquement nulle. Chez les jeunes poulains, la maladie peut être grave et entraîner une pneumonie virale mortelle.

#### **- une forme majeure compliquée**

La grippe suit une évolution biphasique : à une première phase de bronchite catarrhale succède une phase de surinfection bactérienne (fréquemment *Streptococcus zooepidemicus*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*,...). Rhino-sinusite purulente, bronchite, œdème pulmonaire, congestion pulmonaire, broncho-pneumonie... sont les principales manifestations cliniques de ces complications.

### **b - Evolution des virus influenza**

Chez l'homme, la grippe est une infection respiratoire aiguë qui se manifeste sous la forme d'épidémies annuelles dont les agents étiologiques sont les virus grippaux de type A et B. Il s'agit de virus enveloppés, qui échappent à la réponse immunitaire de l'hôte par la variation antigénique de leurs glycoprotéines de surface, l'hémagglutinine et la neuraminidase, principales cibles des anticorps neutralisants. La variabilité génétique des virus grippaux s'exerce selon deux mécanismes distincts, la dérive et la cassure, et résulte de la nature ARN et segmentée de leur génome.

La dérive génétique, qui se traduit par une dérive antigénique du fait de la pression de sélection exercée par les anticorps neutralisants, résulte de l'accumulation de mutations lors de la réplication du génome viral. Ainsi, l'apparition constante de nouveaux variants antigéniques nécessite la réactualisation annuelle de la composition du vaccin grippal, afin d'assurer l'adéquation avec les virus grippaux circulants.

La cassure antigénique, plus rare, ne s'applique qu'aux virus grippaux de type A. Elle correspond à l'apparition d'un virus d'un sous-type nouveau, vis-à-vis duquel la population humaine ne possède pas d'anticorps. Elle résulte du fait qu'il existe 15 sous-types d'hémagglutinine (H1 à H15) et 9 sous-types, de neuramidase (N1 à N9). Alors que l'ensemble des sous-types est retrouvé chez les oiseaux, réservoir des virus grippaux, seuls certains sous-types ont circulé chez l'homme. Les événements de cassure antigénique donnent lieu à des virus susceptibles d'initier des pandémies de grippe comme ce fut le cas, chez l'homme, en 1918 (grippe espagnole H1N1), en 1957 (grippe asiatique H2N2) et en 1968 (grippe de Hong Kong H3N2). L'émergence d'un nouveau sous-type viral peut résulter d'événements de réassortiment génétique par échange de segments génomiques.

Chez le cheval, l'apparition de réassortants a aussi été décrite.

### **3 - Analyse génétique des virus de la grippe des équidés**

#### ***a - Contexte bibliographique***

DALY *et al.* (1996) ont analysé 39 souches isolées entre 1963 et 1994 en Europe et en Amérique. Les caractéristiques antigéniques (à l'aide de sérums de furets ou de cheval) ou génétiques (par détermination de la séquence en nucléotides du gène codant pour HA1) ont été déterminées. Sur la base des relations antigéniques entre ces souches, trois groupes ont pu être constitués : un premier groupe qui comprend les isolats d'origine américaine (et un seul isolat d'origine anglaise Newmarket/1/93), un deuxième groupe formé des isolats d'origine européenne (France, Angleterre, Suède, Roumanie) et un troisième qui ne contient que deux isolats (un italien et l'isolat Hong Kong/92) (Lai *et al.*, 1992). La comparaison des séquences en nucléotides et en acides aminés de ces mêmes souches montre une grande dispersion entre les isolats. Ainsi, la souche de référence A/equine/2/Miami/63 présente un fort pourcentage de divergence avec les isolats récents. Ceux-ci peuvent d'ailleurs être classés en deux groupes : le groupe A constitué des isolats américains (et les deux isolats anglais Aru/91 et Newmarket/1/93) et le groupe B formé des souches européennes (+ l'isolat Hong Kong/92). Des mutations sont observées notamment au niveau des sites antigéniques connus (B et D surtout), substitutions qui sont à rapprocher des variations des propriétés antigéniques des différents isolats.

L'analyse phylogénétique de ces isolats indique que les virus équin H3N8 ont évolué en 2 lignages distincts à partir de 1987 : un lignage européen et un lignage américain (BINNS *et al.*, 1993 ; CHAMBERS *et al.*, 1994 ; DALY *et al.*, 1996 ; ENDO *et al.*, 1992 ; KAWOAKA *et al.*, 1989 ; OXBURGH *et al.*, 1994). L'isolat d'origine anglaise Newmarket/1/93, génétiquement et antigéniquement proche des souches américaines, a en fait été isolé à partir d'un cheval importé en novembre 1993 des Etats-Unis en Grande-Bretagne (de même la souche Aru/91, isolée en Grande-Bretagne, a sans doute été importée des Etats-Unis). Ainsi, circulent en Europe, des souches strictement d'origine européenne et des souches qui plusieurs années auparavant, ont été importées du continent américain (LINDSTROM *et al.*, 1994 ; DALY *et al.*, 1996). La souche Hong-Kong /92, proche des souches européennes, a été isolée lors du foyer de grippe en 1992 à l'hippodrome de Hong Kong. En fait, l'apparition de la grippe serait due à un cheval importé de Grande-Bretagne ou d'Irlande (LAI *et al.*, 1992). Ainsi, le lieu d'isolement d'une souche grippale ne présume en rien d'une éventuelle parenté avec les souches qui circulent dans la même région géographique.

#### ***b - Analyse des souches isolées en France***

Le réseau d'épidémiosurveillance, notamment le réseau spécialisé « grippe », a permis l'isolement de six isolats de virus influenza équin.

Sont présentés les résultats des analyses portant sur deux souches isolées par le laboratoire de l'AFSSA Alfort au centre de Grosbois en 1993 (A/equine/Grosbois/93) et en 1998 (A/equine/Grosbois/98) (Manu-guerra *et al.*, in press).

A l'aide d'anti-sérums spécifiques (par techniques sérologiques) mais aussi à l'aide d'amorces spécifiques de sous-type (par amplification génique), le sous-type a été déterminé. Les deux virus appartiennent au sous-type H3N8.

Ensuite, les séquences nucléotidiques des segments codants pour l'hémagglutinine (en particulier pour le domaine HA1) ont été déterminées. Ces séquences ont été comparées à celles de 57 autres séquences présentes dans les banques de données (figure 1) (MANUGUERRA *et al.*, 1999).

La séquence de la souche A/equine/Grosbois/93 est proche de la séquence de la souche A/equine/Fontainebleau/79 ce qui illustre que l'évolution génétique des virus grippaux équins est relativement lente puisque des virus isolés à 16 ans d'intervalle possèdent des séquences nucléotidiques similaires. De plus, cette souche est proche du groupe des souches du lignage européen.

La séquence du virus A/equine/Grosbois/98 est proche de la séquence de la souche de A/equine/Newmarket/1/93, prototype du lignage américain. L'étude des sites antigéniques majeurs (5 sites localisés à la surface de l'hémagglutinine) indique que 5 substitutions caractéristiques des souches du lignage américain sont présentes chez A/equine/Grosbois/98.

Une souche a récemment été isolée en octobre 1999 par l'AFSSA Alfort à partir de chevaux de race TF (souche Grosbois/99). Les premières analyses génétiques semblent indiquer que cette souche appartiendrait au groupe « américain » (données non publiées).

## CONCLUSION

Ces données illustrent la co-circulation en France de souches appartenant aux lignages européen et américain. Afin de mieux préciser la nature des souches qui circulent dans les populations d'équidés mais aussi afin de choisir de façon la plus pertinente possible les souches qui devront être présentes dans les vaccins, il est nécessaire de disposer d'un grand nombre de souches (MUMFORD and WOOD, 1992 ; 1993). Le réseau d'épidémiologie constitue un outil qui devrait permettre de les isoler.

### 4 - La grippe et le diagnostic en médecine vétérinaire

Les techniques utilisées pour effectuer le diagnostic d'une infection grippale sont très proches de celles employées en médecine humaine (TIMONEY, 1996).

#### \* Virologie

Le virus grippal étant responsable d'une infection localisée, non systémique, seule la recherche du virus au niveau des voies respiratoires permettra de la mettre en évidence et ce par écouvillonnage des cavités naso-pharyngées.

Le prélèvement est inoculé à l'embryon de poulet par voie amniotique ou par voie allantoïque ou à des cultures de cellules en présence de trypsine. Le virus est détecté et identifié au bout de quelques jours par hémagglutination.

Des tests rapides permettent de confirmer ou d'exclure la présence de virus grippal. Ainsi, un test ELISA à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-nucléoprotéine employé chez l'homme est utilisé pour détecter en 20 à 30 minutes, les virus équins à partir d'écouvillons naso-pharyngés.

#### \* Sérologie

Le diagnostic sérologique peut aussi être utilisé directement ou dans le cadre d'un diagnostic de groupe. Différentes techniques sont employées : l'IHA, l'IDG, la fixation du complément.

## 5 - Traitement

Chez le cheval, le traitement instauré est essentiellement symptomatique. Il est absolument essentiel que les animaux malades soient mis au repos pendant une période minimale de 3 semaines dans un environnement propre et correctement ventilé afin que les épithéliums respiratoires retrouvent leur intégrité physique et fonctionnelle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BINNS, M.M., DALY, J.M., CHIRNSIDE, E.D., MUMFORD, J.A., WOOD, J.M., RICHARDS, C.M., and DANIELS, R.S., 1993. Genetic and antigenic analysis of an equine influenza H3 isolate from the 1989 epidemic. *Arch. Virol.*, 130: 33-43.
- CHAMBERS, T.M., LAI, A.C.K., FRANKLIN, K.M., and POWELL, D.G., 1994. Recent evolution of the hemagglutinin of equine-2 influenza virus in the U.S.A. In *Proceedings of the 7th international Conference Equine Infectious Diseases*, 180 Newmarket : R and W Publications. Tokyo, 175-180.
- DALY, J.M., LAI, A.C.K., BINNS, M.M., CHAMBERS, T.M., BARRANDEGUY, A.M., and MUMFORD, J.A., 1996. Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. *J. Gen. Virol.*, 77: 661-671.
- ENDO, A., PECORARO, R., SUGITA, S., and NEROME, K., 1992. Evolutionary pattern of the H3 haemagglutinin of equine influenza viruses : multiple evolutionary lineages and frozen replication. *Arch. Virol.*, 123: 73-87.
- KAWOAKA, Y., BEAN, W.J., and WEBSTER, R.G., 1989. Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. *Virology*, 169: 283-292
- LAI, A.C.K., Lin, Y.P., POWELL, D.G., SHORTRIDGE, K.F., WEBSTER, R.G., DALY, J., and CHAMBERS, T.M., 1994. Genetic and antigenic analysis of the influenza virus responsible for the 1992 Hong Kong equine influenza epizootic. *Virology*, 204: 673-679.
- LINDSTROM, S., ENDO, A., PECORARO, R., SUGITA, S., HIROMOTO, Y., and NEROME, K., 1994. Genetic divergency of equine (H3N8) influenza viruses : cocirculation of earliest and recent strains In *Proceedings of the 7th International Conference of Equine Infectious Diseases*. Newmarket : R and W Publications, Tokyo, 307.
- MANUGUERRA, J.C., ZIENTARA, S., SAILLEAU, C., ROUSSEAU, C., GICQUEL, B., and VAN DER WERF, S., 2000. Evidence for evolutionary stasis and genetic drift by genetic analysis of two equine influenza H3 viruses isolated in France. *Vet Microbiol*, in press
- MUMFORD, J., 1992. Progress in the control of equine influenza. 1991. In *Proceedings of the 6th International Conference of Equine Infectious Diseases*. Cambridge, Edited by W. PLOWRIGHT, P.D., ROSSDALE and J.F WADE, Newmarket : R and W Publications, 207-218.
- MUMFORD, J.A., and WOOD, J., 1993. Conference report on WHO/OIE meeting : consultation on newly emerging strains of equine influenza. *Vaccine*, 11: 1172-1175.
- OXBURGH, L., BERG, M., KLINGEBORG, B., EMMOTH, E., and LINNE, T., 1994. Evolution of H3N8 equine influenza virus from 1963 to 1991. *Virus Research*, 34: 153-165.
- TIMONEY, P., 1996. Equine influenza. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 19(3), 205-211.

Figure 1

Dendrogramme des séquences en acides aminés du domaine HA1 des virus influenza équin H3N8 (d'après Manuguerra et al., 1999)

