

Apport du séquençage à haut débit lors d'un épisode d'émergence de **diarrhée épidémique porcine** en France

Béatrice Grasland (1) (beatrice.grasland@anses.fr), Nicolas Rose (2), Fabrice Touzain (1), Yannick Blanchard (1)

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité de génétique virale et biosécurité, Ploufragan, France

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité d'épidémiologie et bien-être porcin, Ploufragan, France

Résumé

La diarrhée épidémique porcine (DEP) a provoqué des épizooties sévères en Asie et aux États-Unis récemment. En mai 2014, de nouveaux foyers de DEP ont été décrits en Europe après une longue période d'absence de la maladie, le dernier foyer datant de 2006 en Italie. La DEP a été classée en danger sanitaire émergent de première catégorie rendant obligatoire la déclaration de tout cas en France en se basant sur les signes cliniques. Le séquençage haut débit ou NGS (Next Generation Sequencing) a été utilisé en parallèle des outils moléculaires de diagnostic lors d'un foyer de DEP en France en décembre 2014. L'apport du séquençage NGS dans un contexte d'émergence, est ici décrit, notamment sa contribution à l'épidémiologie moléculaire grâce au séquençage du génome viral complet.

Mots-clés

Emergence, porc, séquençage NGS

Abstract

Contribution of Next-Generation Sequencing during an emergent outbreak of porcine epidemic diarrhoea in France

Recently, severe outbreaks of porcine epidemic diarrhoea (PED) have struck Asia and the U.S. After a long period of absence dating back to an Italian outbreak in 2006, new European outbreaks were reported in May 2014. Since PED has been classified as a category 1 emerging health hazard in France, the notification of all cases based on clinical signs is compulsory. Next-generation sequencing (NGS) was used in addition to conventional biomolecular diagnostic tools during a December 2014 PED outbreak in France. The contribution of NGS to molecular epidemiology using full-genome virus sequencing during disease emergence is discussed.

Keywords

Emergence, Pig, NGS

L'agent étiologique de la diarrhée épidémique porcine (DEP) est un alpha-coronavirus, le virus de la DEP (vDEP), virus enveloppé à ARN simple brin positif de 28 kilobases. Ce virus n'affecte pas l'Homme. La DEP affecte particulièrement les porcelets sous la mère qui présentent des vomissements et une diarrhée profuse. Après une première description en Europe à la fin des années 1970 avec des épizooties jusqu'aux années 1990, la DEP a touché l'Asie dont la Chine dans les années 1980 et la Corée en 1993. À partir de 2010, une nouvelle épizootie sévère a été rapportée en Chine. La maladie a émergé aux États-Unis à partir d'avril 2013 et a occasionné la perte de plus de huit millions d'animaux dans 33 États et est toujours d'actualité plus de deux ans après son introduction. Dès avril 2013, différentes souches de vDEP ont été caractérisées. Certaines souches qualifiées de hautement pathogènes entraînent jusqu'à 95-100 % de mortalité chez les porcelets sous la mère. D'autres souches, dénommées « InDel », présentent à la fois une insertion et une délétion dans le gène S codant pour la protéine de spicule (responsable de l'attachement à la cellule). La première souche « InDel » décrite aux États-Unis, USA/OH851/2014, n'entraînait aucune mortalité de porcelets sous la mère et affectait davantage les truies que les jeunes porcelets (Vlasova *et al.*, 2014). Dans ce contexte, au regard du risque de propagation du virus en France, la DEP a été catégorisée, à titre provisoire, en tant que danger émergent de première catégorie (AM du 12 mai 2014), ce qui rend obligatoire, sur le sol français, la déclaration de tout cas présentant un ou plusieurs groupes d'âge atteint d'une diarrhée sévère, contagieuse et aqueuse, et dont le taux de morbidité chez les porcs en croissance est supérieur à 80 % et/ou le taux de mortalité chez les porcelets sous la mère est supérieur à 30 % (note de service DGAL/SDSPA/2014-708 du 02/09/2014).

Dans le cadre du dispositif de surveillance événementielle de la DEP en France, une suspicion a été notifiée dans le département du Nord le 1^{er} décembre 2014. Le lendemain de la réception des échantillons, l'analyse en RT-PCR quantitative spécifique du vDEP confirmait la présence d'un virus de DEP. L'amplification et le séquençage par la méthode Sanger des gènes N et S ont permis de caractériser, 67 heures après réception des échantillons, la souche (FR/01/2014) présente dans l'élevage comme une souche « InDel » phylogénétiquement proche de deux souches de vDEP isolées en Allemagne en Mai 2014 (Hanke *et al.*, 2015). En parallèle des tests de confirmation du diagnostic DEP,

le séquençage haut débit (NGS pour next generation sequencing) a été entrepris afin d'obtenir la séquence complète du génome de la souche FR/001/2014 (Figure 1). Le séquençage NGS présente plusieurs avantages que n'apporte pas le séquençage Sanger utilisé en première intention pour le séquençage des gènes N et S. Dans le cadre d'une émergence virale, le séquençage NGS permet d'obtenir rapidement des informations sur la séquence d'un agent pathogène (viral ou non) sans connaissance préalable de la nature de cet agent, et en particulier sans disposer d'outils moléculaires spécifiques de cet agent (par exemple des amorces PCR). Connaître la séquence génomique complète de l'agent pathogène permet d'étudier l'épidémiologie moléculaire à partir de l'ensemble de la séquence du virus et ainsi de pouvoir émettre des hypothèses sur l'origine de la souche. Ce point est particulièrement important pour les virus à ARN qui possèdent, le plus souvent, deux caractéristiques entraînant des évolutions rapides et significatives des génomes: i) un taux de mutation généralement élevé du fait d'une absence d'activité de relecture de la RNA polymérase entraînant des erreurs et ii) une propension importante à la recombinaison. Par exemple, en Italie, un événement de recombinaison entraînant une permutation complète du gène S entre un coronavirus de gastro-entérite transmissible et un vDEP a été décrit (Sozzi *et al.*, 2014). Dans le cadre du foyer de DEP en France, le séquençage NGS a été réalisé à partir des échantillons prélevés dans l'élevage affecté et la séquence du génome complet a été obtenue 73 heures après réception des échantillons. Ce résultat montre qu'en absence d'outils moléculaires spécifiques de l'agent incriminé, seulement six heures supplémentaires auront été nécessaires pour avoir l'identification et la séquence complète du génome. Les résultats du séquençage NGS a permis de confirmer que la souche présente dans l'élevage du Nord affecté présentait sur le génome complet 99,9 % d'identité avec la souche « InDel » isolée en Allemagne en mai 2014, 99,8 % avec une souche « InDel » américaine isolée en juin 2013 (USA/Indiana12.83/2013) et 99,4 % avec la souche « InDel » américaine USA/OH851/2014 (Grasland *et al.*, 2015). Le séquençage NGS permet également de savoir si plusieurs souches du même virus circulent dans l'élevage affecté et également si d'autres agents viraux connus ou non sont présents (co-infections), situation fréquemment décrite dans les cas de DEP. En séquençage NGS, les séquences obtenues appelées « reads » peuvent être comparées à une référence et une séquence continue (contig) peut être ainsi obtenue. Si le génome du virus est inconnu et qu'aucune

référence n'existe, les séquences individuelles sont assemblées *de novo* pour obtenir une ou des séquences continues. Dans le cadre de cette suspicion de DEP, le NGS a permis de démontrer qu'aucun autre virus à ARN n'était présent dans les prélèvements et d'identifier un seul variant de vDEP.

Le séquençage NGS permet, dans le cadre d'une émergence, d'identifier rapidement un (des) agent(s) étiologique(s) potentiel(s) sans avoir recours à des méthodes diagnostiques spécifiques pour cet agent. Il permet aussi (dans la plupart des cas) d'obtenir suffisamment d'information sur la séquence de l'agent infectieux pour réaliser des travaux d'épidémiologie moléculaire, retracer son histoire et donc potentiellement son origine. Il permet également de s'assurer que d'autres virus non-suspectés en premier lieu (connus ou non) peuvent être présents ou pas. Ceci est un point très important afin de fournir tous les éléments nécessaires au gestionnaire du risque concernant le choix des mesures de lutte pouvant être mises en œuvre pour limiter la diffusion du ou des agents viraux pathogènes concernés.

Remerciements

Les auteurs remercient la Direction générale de l'Alimentation (DGAL) et le projet CoVetLab sur les coronavirus porcins pour le support financier ainsi que la Plateforme d'épidémiologie en santé animale (Plateforme ESA) pour l'élaboration du dispositif de surveillance en France sur la base des objectifs définis par la DGAL.

Références bibliographiques

- Grasland, B., Bigault, L., Bernard, C., Quenault, H., Toulouse, O., Fablet, C., Rose, N., Touzain, F., Blanchard, Y., 2015. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus gene indel strain isolated in France in December 2014. *Genome Announc.* 3(3).
- Hanke, D., Jenckel, M., Petrov, A., Ritzmann, M., Stadler, J., Akimkin, V., Blome, S., Pohlmann, A., Schirrmeyer, H., Beer, M., Hoper, D., 2015. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg. Inf. Dis.* 21(3), 493-496.
- Sozzi, E., Papetti, A., Lelli, D., Boniotti, B., Moreno, A., Brocchi, E., Alborali, L., Lavazza, A., Cordioli, P. 2014. Diagnosis and investigations on porcine epidemic diarrhoea (PED) in north Italy. In: 8th Annual meeting of Epizone, Copenhagen, Denmark, 23-24/09/2014.
- Vlasova, A.N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M.R., Rossow, K.D., Rovira, A., Collins, J., Saif, L.J., 2014. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg. Inf. Dis.* 20(10), 1620-1628.

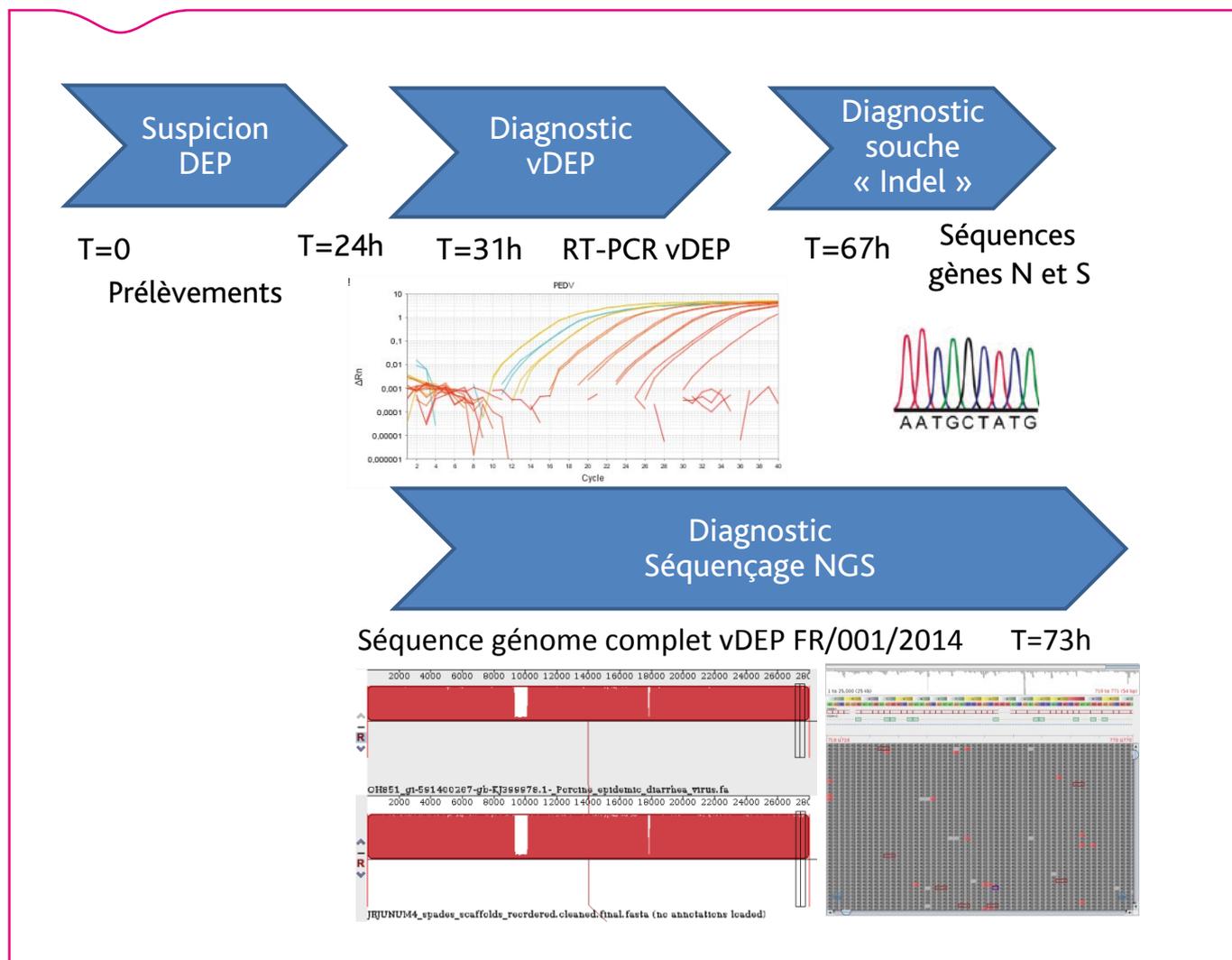


Figure 1. Étapes réalisées pour établir le diagnostic de DEP lors de son émergence en France en décembre 2014