



## **Projet « Emergences et risques sanitaires » (ATP) CIRAD, 2010-2013**

6 & 7 Novembre 2013

### **Axe 1 - Biologie des agents infectieux émergents**

#### Synthèse des résultats

Les maladies infectieuses affectent tous les organismes vivants, et co-évoluent avec leurs hôtes depuis des millions d'années. Le déplacement des agents pathogènes de façon naturelle ou anthropique multiplie les contacts des pathogènes avec leurs hôtes mais aussi entre eux. Selon la nature de l'interaction entre ces agents pathogènes, la cooccurrence peut conduire à l'exclusion compétitive ou la coexistence. Elle peut aussi engendrer l'émergence de nouveaux génotypes par recombinaison. Ces déplacements de pathogènes peuvent gravement compromettre les mesures de contrôle de ces pathogènes que ce soit par le contournement de la protection vaccinale chez les animaux ou de la résistance variétale chez les plantes.

Pour prendre en compte la dimension transfrontalière des maladies et anticiper les risques sanitaires, la surveillance doit être articulée avec les activités d'évaluation et de gestion des risques conduites aux niveaux national et international (OIE, FAO, OMS, etc...) et avec les acteurs de terrain. Les impacts des changements globaux sur la dynamique et l'émergence des maladies infectieuses questionnent les acteurs de la santé animale, de la santé végétale, et de la recherche. L'axe 1, qui comprend deux groupes, dont l'un travaille sur les maladies animales et l'autre sur les maladies végétales, a cherché à comprendre le potentiel d'évolution des pathogènes pour améliorer la surveillance et le contrôle des maladies, en s'appuyant sur différents modèles.

**Modèle 1 - Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) :** le TYLCV est un virus invasif, originaire du Moyen Orient qui a émergé sur tous les continents. Il est responsable de la maladie virale la plus grave sur la tomate. Les objectifs spécifiques pour ce modèle étaient (i) d'évaluer son potentiel d'évolution par recombinaison et par réassortiment et (ii) de caractériser en conditions naturelles et expérimentales des traits biologiques de deux de ses souches en vue de paramétrer un modèle de prédiction de l'évolution à long terme de leur dynamique de coexistence.

## Evaluation du potentiel d'émergence virale par recombinaison

Par Michel Peterschmitt, Cica Urbino et Jean-Michel Lett

### 1. Contexte

Outre la mutation, la recombinaison est un facteur important de variation génomique pour certains groupes de virus tels que les *Begomovirus*. Contrairement à la mutation qui modifie un génome de proche en proche, la recombinaison peut engendrer en une seule étape des modifications importantes par la séparation ou le rapprochement de groupes de mutation et en créant des virus chimères issues de l'assemblage de génomes d'espèces différentes. Des *begomovirus* émergents de type recombinant ont été isolés en contexte épidémique sur coton, manioc ou tomate. Dans ce projet, nous avons évalué le potentiel d'évolution des *begomovirus* par recombinaison par des approches en conditions contrôlées et grâce au suivi d'un épisode naturelle d'émergence d'un recombinant au Maroc.

### 2. Potentiel d'émergence des *begomovirus*

Grâce à une banque de recombinants aléatoires d'un *begomovirus* infectant la tomate, le Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), nous avons mis en évidence un potentiel inattendu d'évolution chez les *begomovirus*. Contrairement aux prédictions qui pouvaient être faites sur la base des résultats de la littérature, nous avons pu montrer avec un modèle *begomovirus*, que la recombinaison aléatoire n'est pas forcément létale même entre des virus qui divergent de près de 20% (Vuillaume et al. 2011, PLoS Pathogens 7,5). Ainsi, les 47 recombinants générés aléatoirement in vitro entre le TYLCV et une espèce originaire de Mayotte, le Tomato leaf curl Comoros virus (ToLCKMV), étaient non seulement tous infectieux mais présentaient une accumulation virale intra-plante similaire ou intermédiaire à celle des virus parentaux. Le potentiel d'émergence de ces recombinants a été confirmé en montrant sur un échantillon de 27 recombinants tirés aléatoirement, que tous sont transmis par le vecteur naturel, *Bemisia tabaci* et que la virulence de certains d'entre eux était significativement plus forte que celles des parents. Ces résultats soulignent un risque potentiel en cas de rencontre du TYLCV et ToLCKMV qui, pour le moment, occupent des aires géographiques distinctes.

Cette première approche nous indiquait que les *begomovirus* pouvaient être hautement tolérants à la recombinaison mais on ne savait pas encore quelle était la diversité de recombinants qui pouvait être naturellement générée au sein d'une plante. Grâce à des travaux réalisés à l'UMR PVBMT de la Réunion et par l'UMR BGPI de Montpellier sur des plantes

de tomate co-inoculées avec les virus parentaux utilisés précédemment pour l'approche in-vitro, nous avons pu montrer que la diversité naturelle était au moins aussi importante que celle générée in vitro (Martin et al, 2011, Plos Pathogens 7,9 ; Urbino et al. 2013, PLoS One 8,3). Les recombinants sont détectés dès 18 jours après co-inoculation de virus parentaux et composent environ 50% de la population virale à 120 jours post inoculation. Même si les points de recombinaison se répartissent sur toute la longueur du génome et que la composition des recombinants intra-plante est largement soumise à des phénomènes aléatoires liés à la création des recombinants et à de la dérive au sein de la plante, des traces de sélection sont également visibles. Ainsi, la distribution des points de recombinaison est significativement différente d'une distribution aléatoire, et certains recombinants augmentent en fréquence et sont détectés dans plusieurs plantes inoculées parallèlement. L'apparition des recombinants semblent avoir un effet contrasté sur la fréquence des parents car celle du TYLCV diminue au cours du temps alors que celle du ToLCKMV se maintient. Un recombinant hautement virulent est devenu dominant dans une des plantes co-inoculées. Sur la base de son *infectivité*, son accumulation intra-plante et son efficacité de transmission qui sont similaires ou intermédiaires à celles des virus parentaux, ce recombinant aurait le potentiel de se maintenir dans un environnement naturel.

La pertinence de ces conclusions a été attestée par une émergence naturelle d'un recombinant de TYLCV au Maroc. Alertée par une société semencière suite à la détection de symptômes de TYLCV sur une variété de tomate tolérante à ce virus, nous avons effectué une enquête au Maroc. Il s'agissait de déterminer si le changement de comportement de la variété tolérante pouvait être lié à l'émergence d'un nouveau variant de TYLCV. L'enquête a révélé la présence d'un virus issu d'une recombinaison entre le TYLCV et un autre *begomovirus*, le Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV). Ce recombinant appelé IS76 a quasiment remplacé les populations de virus parentaux ; sur les 200 échantillons testés, le TYLCSV n'a été détecté que sur 2 plantes en co-infection avec IS76, et le TYLCV n'a pas été détecté. Nous faisons l'hypothèse que le remplacement du TYLCV et du TYLCSV par IS76 est lié à une meilleure compétitivité de IS76 par rapport aux virus parentaux ce que nous sommes en train de tester en conditions contrôlées (Peterschmitt et al. 2013, 7th International Geminivirus Symposium, 3-9 Novembre 2013)

### **3. Conclusion**

La plupart des résultats disponibles sur la recombinaison des *begomovirus* se limitent à la détection de traces d'évènements de recombinaison sur des génomes de *begomovirus* à l'aide de logiciels adaptés tel que RDP3. L'originalité de nos travaux a été de montrer expérimentalement que le potentiel d'évolution des *begomovirus* par recombinaison est très important. Nos conclusions reposent sur trois approches complémentaires, une approche in vitro qui a permis de nous affranchir de la pression de sélection de la plante, une approche in planta qui nous a permis d'estimer le niveau diversité des recombinants générés et de distinguer les facteurs stochastiques et déterministes qui façonnent les populations de recombinants, et une approche au champ qui a permis de tester la pertinence de nos résultats obtenus en conditions contrôlées.

## **Les invasions biologiques favorisent les interactions entre espèces ou souches virales émergentes dans un même environnement : le cas du TYLCV à La Réunion**

Equipe « Génomique et épidémiologie des agents pathogènes émergents » de l'UMR PVBMT  
+ Equipe « Epidémiologie végétale et vection » de l'UMR BGPI

### **1. Contexte**

Les invasions biologiques sont responsables des principales maladies virales émergentes. La dissémination et l'introduction de nouveaux agents pathogènes émergents dans un même environnement favorisent la cooccurrence entre plusieurs espèces ou souches. Selon la nature de l'interaction entre ces agents pathogènes, la cooccurrence peut conduire à l'exclusion compétitive ou la coexistence. L'introduction successive et fortuite sur l'île de la Réunion de deux souches émergentes du *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV-Mld et TYLCV-IL), responsable de l'une des plus importantes maladies virales de la tomate dans le monde, a permis d'étudier les phénomènes d'invasion et de compétition entre ces deux souches virales émergentes en milieu tropical insulaire.

### **2. Résultats**

Grâce à une surveillance épidémiologique réalisée dans le bassin maraîcher réunionnais pendant sept ans (2003 à 2010), nous avons pu observer le remplacement rapide mais partiel de la souche Mild résidante (TYLCV-Mld) par la souche nouvellement arrivée (TYLCV-IL). Pour comprendre les facteurs associés à ce remplacement, deux traits biologiques liés à la *fitness* (valeur sélective) ont été mesurés en comparant ces souches : la capacité de colonisation de la plante hôte et l'efficacité de transmission par son insecte vecteur *Bemisia tabaci*.

Nous avons pu montrer que TYLCV-IL est écologiquement plus apte à se propager, ce qui explique sa dissémination rapide et sa prévalence croissante. Cependant, la persistance du TYLCV-Mld en plein champ, tout particulièrement dans les infections mixtes avec le TYLCV-IL, nous a incités à poursuivre nos investigations expérimentales notamment en évaluant les effets des infections mixtes sur ces traits biologiques. Ainsi, nous avons démontré que la *fitness* relative des souches virales peut changer radicalement entre les infections simples et les infections mixtes.

Ces données expérimentales ont permis de paramétrer un modèle épidémiologique prédisant que les deux souches peuvent coexister à long terme grâce à l'assistance conférée par la souche la plus compétitive. Ce cas rare de facilitation unilatérale entre deux agents pathogènes conduit donc au maintien de la souche la moins compétitive dans le bassin maraîcher réunionnais.

Enfin, notre étude a également permis d'estimer pour la première fois le nombre de virus efficacement transmis par *B. tabaci*. Ainsi, nous avons démontré que même pour un virus

transmis sur le mode circulant par un insecte porteur de millions de génomes viraux, un à deux génomes viraux seulement participent effectivement au cycle de transmission suivant.

### 3. Conclusion

L'originalité de notre approche est d'avoir pu (i) relier la dynamique épidémique des deux souches émergentes de TYLCV dans le bassin maraîcher réunionnais avec les traits biologiques clés impliqués dans leurs différences de *fitness* (capacité de colonisation de la plante hôte et efficacité de transmission par leur insecte vecteur) ; (ii) estimer leur *fitness* relative à la fois sur le terrain et au laboratoire ; et enfin (iii) paramétrer un modèle prédictif sur leur devenir à long terme. En conclusion, alors que la plupart des recherches en virologie se sont traditionnellement concentrées sur les propriétés spécifiques de chaque espèce ou souche virale, notre étude met en lumière l'importance et la complexité des interactions entre deux souches d'un même agent pathogène, où l'assistance unilatérale peut-être responsable de la coexistence et du maintien dans l'agrosystème de la souche la moins compétitive et la moins sévère.

L'ensemble de ce projet a fait l'objet d'une publication soumise au journal *Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences* (Péréfarres et al., soumis) et de deux présentations orales dans des congrès internationaux (Thébaud et al., 2013 ; Lett et al., 2013).

Péréfarres F., Thébaud G., Lefeuvre P., Chiroleu F., Rimbaud L., Hoareau, M., Reynaud, B. and J.-M. Lett (2013). Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of an emerging virus. Soumis à *Proceedings of the Royal Society B*.

Thébaud G., Péréfarres F., Lefeuvre P., Chiroleu F., Rimbaud L., Hoareau, M., Reynaud, B. and J.-M. Lett (2013). Coexistence of two viral strains in epidemics through assistance in co-infected hosts. *Workshop in Virus Evolution*, March 7-9, State College, Pennsylvania, USA.

Lett J.-M., Péréfarres F., Lefeuvre P., Chiroleu F., Rimbaud L., Hoareau, M., Reynaud, B. and G. Thébaud (2013). Coexistence of two geminivirus emerging strains through assistance. 7<sup>th</sup> *International Geminivirus Symposium*, November 3-9, Hangzhou, China.

**Modèle 2 - Plum pox virus (PPV) :** le PPV, qui a été disséminé au niveau mondial, est responsable de la plus grave maladie virale des arbres fruitiers à noyau. De ce fait, c'est un virus de quarantaine en France, ainsi que dans de nombreux autres pays. L'objectif spécifique pour ce modèle était de mieux caractériser sa dissémination.

## **Inférence sur la dissémination de virus par une approche d'épidémiologie moléculaire quantitative**

Equipe « Epidémiologie végétale et vexion » de l'UMR BGPI

### **1. Contexte**

Afin de maximiser l'efficacité des politiques de gestion des maladies infectieuses humaines, animales et végétales, il est essentiel de comprendre comment les agents pathogènes se propagent dans les populations. En apportant des informations sur la proximité génétique entre isolats d'un agent pathogène prélevés sur différents individus, l'épidémiologie moléculaire contribue à réduire le nombre de scénarios épidémiologiques compatibles avec la répartition spatio-temporelle des individus malades. Pour les agents pathogènes évoluant très rapidement, comme les virus à ARN, la richesse de l'information génétique peut ainsi permettre de reconstruire l'ensemble des événements de transmission au sein d'un foyer de maladie. Cependant, la conception d'une méthode permettant de combiner rigoureusement les informations temporelles, spatiales et génétiques constitue aujourd'hui un défi.

### **2. Résultats**

En collaboration avec l'Unité BioSP (INRA, Avignon) et le groupe du Pr. Daniel Haydon (Université de Glasgow), nous avons développé un modèle épidémio-évolutif permettant de reconstituer le déroulement d'une épidémie (chaines de transmission du virus, distances et dates de transmission) à partir d'informations temporelles, spatiales et génétiques sur le pathogène (Morelli et al., 2012). Cette avancée méthodologique permet une meilleure prise en compte des dépendances entre temps, espace et génétique, ce qui permet d'inférer plus finement les dynamiques de transmission et d'estimer avec plus de précision des paramètres épidémiologiques tels que la distance moyenne des transmissions. Dans un premier temps, cette approche a été appliquée à deux épidémies de fièvre aphteuse qui ont causé des pertes substantielles et qui demandent un effort de surveillance conséquent et continu dans l'espace et le temps.

Nous avons ensuite commencé à transposer cette approche pour améliorer nos connaissances sur les processus de dissémination du *Plum pox virus*, agent responsable de la sharka des *Prunus*. A l'échelle d'un bassin de production, le séquençage de 250 génomes complets de

PPV isolés à partir d'arbres dont la localisation est précisément connue a permis de mettre en évidence plusieurs introductions d'inoculum dans les vergers étudiés à partir de populations virales circulant régionalement, et d'avoir un premier aperçu des flux de virus au sein d'un verger et entre vergers (Bertranpetit, 2012). Ces données génétiques seront ultérieurement modélisées conjointement aux données spatiales, ce qui demande d'adapter la méthode précédemment décrite au cas où l'on ne dispose pas d'information temporelle.

### **3. Conclusion**

Par ces travaux à l'interface entre biologie évolutive et épidémiologie, nous chercherons à inférer les processus et paramètres épidémiologiques clés en utilisant la répartition spatio-temporelle des génotypes d'agents pathogènes. Le séquençage de génomes d'agents pathogènes étant de plus en plus répandu, les méthodes d'inférence des chaînes de transmission à partir de génomes d'agents pathogènes associés à des données spatio-temporelles devraient jouer un rôle important pour comprendre la dissémination d'épidémies humaines, animales ou végétales.

### *Références*

Morelli M.J., Thébaud G., Chadœuf J., King D.P., Haydon D.T., Soubeyrand S. (2012) A Bayesian inference framework to reconstruct transmission trees using epidemiological and genetic data. *PLoS Computational Biology* 8(11): e1002768.

Bertranpetit E. (2012) Reconstruction des évènements de dissémination du Plum pox virus dans un foyer de maladie via l'analyse du polymorphisme viral. Rapport de Master 2 Dynamique des Interactions Parasite-Hôte-Environnement (Université Montpellier 2).

**Modèle 3 - *Xanthomonas citri* pv. *citri*** : cas d'une bactérie à transmission aérienne peu polymorphe. Le développement d'outils moléculaires discriminants et l'épidémiologie moléculaire de ce pathogène émergent en Afrique doivent permettre de répondre à des questions d'épidémiologie à l'échelle locale et à l'échelle régionale. Différentes situations de nouvelles émergences décrites récemment en Ethiopie (2006), en Somalie (2008), au Mali (2008), au Sénégal (2011) et au Burkina-Faso (en cours de caractérisation) permettent de comparer des épidémies associées à des variants pathogènes et des groupes génétiques différents chez cette phytobactérie.

## **Invasion de la bactérie *Xanthomonas citri* pathogène des agrumes en Afrique subsaharienne**

Equipe « Génomique et épidémiologie des agents pathogènes émergents » de l'UMR PVBMT

### **1. Contexte**

*Xanthomonas citri* pv. *citri* est la bactérie responsable du chancre Asiatique des agrumes présente dans de nombreuses régions agrumicoles tropicales et subtropicales. C'est un organisme de quarantaine dans l'Union Européenne chez lequel il existe deux principaux variants pathogènes : un pathotype « A » généraliste pouvant infecter la majorité des espèces d'agrumes cultivés et un pathotype « A\* » plus spécialiste n'attaquant principalement que les limettiers et *Citrus macrophylla*. Le bassin méditerranéen constitue l'un des derniers gros bassins de production agrumicole indemne. Absente du continent Africain, la maladie est apparue très récemment dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne au Mali (2006), en Somalie (2008), Ethiopie (2006). La maladie a été observée pour la première fois au Sénégal en 2010 et au Burkina-Faso au cours de ce projet. Nous avons dans ce projet analysé ces situations d'invasions de populations bactériennes pour en décrire l'épidémiologie et les facteurs qui ont conduit à ces invasions. A une plus large échelle, nous avons cherché à comprendre les relations de descendance ou phylogénétiques entre ces différentes populations Africaines de *X. citri* et en relation avec une collection mondiale de souches. En plus de l'analyse de séquences, nous avons développé un nouvel outil de génotypage ciblant 31 minisatellites adaptés à l'épidémiologie à large échelle de ce pathogène. Une base de données en ligne permettant de partager des données de typage moléculaire, de les analyser et de les comparer à une collection de référence a été créée.

### **2. Résultats**

- ***L'invasion des populations de *Xanthomonas citri* en Afrique de l'ouest est le résultat d'activités humaines***

Les nouvelles épidémies de chancre asiatique décrites dans 2 pays connus pour être indemnes de la maladie (2010 au Sénégal et 2012 au Burkina Faso) ont été l'occasion de décrire deux

situations d'invasion et de mieux comprendre les causes des invasions et les facteurs ayant conduit à ces épidémies.

Une collection de 526 souches a été typée à l'aide du schéma MLVA-14 (MultiLocus Variable Number of Tandem Repeats Analysis) ciblant 14 microsatellites adaptés à l'épidémiologie à petite échelle. L'analyse de la structure des populations révèle l'existence de deux groupes qui sont peu éloignés génétiquement. Ces groupes sont constitués autour de deux complexes clonaux formés d'individus ne différant que par un seul microsatellite. Ce réseau de descendance bien marqué révèle une structure épidémique : l'existence d'individus appartenant à un même complexe clonal dans plusieurs régions suggère aussi une distribution récente de cette population bactérienne probablement par le biais du transport de matériel végétal infecté. Cette forte structure clonale associée à une faible diversité génétique supporte une introduction récente à partir d'un mélange de souches ou d'au moins deux introductions de souches relativement proches génétiquement. En effet, toutes les souches sénégalaises de *X. citri* pv. *citri* appartiennent à une même lignée génétique partagée avec une des populations présentes au Mali dans la zone urbaine de Bamako (population M2).

Après la première description du chancre asiatique en 2012 au Burkina Faso, 46 souches ont été isolées à partir d'échantillons et analysées par l'approche MLVA-14. La comparaison des profils génétiques des souches du Burkina Faso avec ceux des souches de la population malienne M1 distribuée dans l'ensemble du Mali a révélé l'existence d'haplotypes partagés. Ces deux populations ne sont pas génétiquement différenciées. La construction de réseaux de descendance a montré l'existence d'un énorme complexe clonal regroupant ces souches et pointant le fort lien épidémiologique entre la population M1 du Mali et celle du Burkina Faso. La plus faible diversité génétique observée au Burkina Faso supporte une introduction à partir du Mali. Comme pour le Mali et le Sénégal, la récente introduction supportée par une forte structure clonale et une faible diversité est le résultat d'activités humaines. Les pépiniéristes par une méconnaissance de la maladie ont certainement joué un rôle important dans la dispersion du pathogène.

- ***Un nouveau schéma MLVA ciblant des minisatellites pour l'épidémiologie à large échelle de *Xanthomonas citri****

*Xanthomonas citri* pv. *citri* est une bactérie génétiquement peu polymorphe. L'analyse des séquences de 6 gènes de ménage (MLSA) n'a permis de révéler que six profils de séquence chez une large collection de souches de *X. citri* pv. *citri*. Le génotypage par MLST (MultiLocus Sequence Typing) (devenu méthode de référence pour étudier la phylogénie de nombreux taxons bactériens) est donc inadapté à notre modèle. Des méthodes existantes et plus discriminantes produisant des empreintes génétiques complexes (rep-PCR), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ciblant des séquences insertionnelles étaient moins adaptées aux analyses épidémiologiques. Les microsatellites développés sont adaptés aux analyses d'épidémiologie moléculaire à petite échelle spatio-temporelle mais ont un taux de polymorphisme trop important, générant de l'homoplasie, pour décrire fidèlement les relations génétiques entre souches distantes dans l'espace et le temps.

L'analyse in silico de génomes de *X. citri* pv. *citri* à l'aide des outils développés sur le site <http://minisatellites.u-psud.fr/> a permis de sélectionner 51 minisatellites qui ont été testés sur une collection de 20 souches de référence. Nous avons retenu 31 loci polymorphes (schéma MLVA-31) qui ont permis de séparer une collection mondiale de souches de *X. citri* pv. *citri* en 7 groupes génétiques regroupant des souches du pathotype A ou du pathotype A\*. Un groupe contenait des individus des 2 pathotypes suggérant que plusieurs événements au niveau génétique ont pu conduire à l'acquisition d'un spectre d'hôtes large ou restreint. Alors que la plupart des groupes ne sont constitués que par des souches d'origine géographique limitée, un groupe contient des souches originaires de la plupart des zones agrumicoles (Asie, Océan Indien, Amérique du Sud, Floride) suggérant la dissémination mondiale de cette lignée qui aurait contribué aux principales épidémies.

Toutes les souches du Sénégal, Mali et Burkina-Faso appartiennent au pathotype A et sont distribuées dans 2 groupes génétiques. La population M1 du Mali et celle du Burkina Faso appartiennent au groupe génétique distribué mondialement et de plus partagent les mêmes séquences par l'approche MLSA. La population M2 du Mali et celle du Sénégal appartiennent à un autre groupe réunissant des souches d'Inde, du Pakistan et du Bangladesh et partagent elles aussi un même profil de séquence. Le lien épidémiologique entre ces deux populations sénégalaise et malienne M2 est possible mais ces populations ont pu aussi tirer leur origine d'une autre source commune ou de sources génétiquement proches.

Le taux de mutation moins élevé des minisatellites (MLVA-31) et l'approche multilocus permettent de prévenir les phénomènes d'homoplasie et d'étudier les relations de descendance à des échelles épidémiologiques plus larges. Le schéma MLVA-31 permettant l'analyse de 31 loci montrant des niveaux de diversité différents a montré un niveau de résolution bien adapté à des questions d'épidémiologie et en adéquation avec les lignées phylogénétiques décrites.

- ***Une base de données en ligne pour le typage moléculaire et le suivi épidémiologique de X. citri***

Une base de données *Xanthomonas citri* au sein de la plateforme « MLVABank » de génotypage de bactéries à des fins d'analyses épidémiologiques a été créée.

Le site web MLVAbank ([http://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA\\_bank/Genotyping/](http://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/)) dédié aux données MLVA a été utilisé pour rendre accessible d'une façon interactive les profils du schéma MLVA-31. Ce site web rend possible la visualisation des données avec un tri possible et analyse de groupes génétiques (clustering), la soumission de requêtes comme le partage de base de données qui sont maintenues et gérées par différents propriétaires une fois qu'un agrément a été donné par un curateur. Les profils génétiques issus du schéma MLVA-31 de 129 souches représentant la diversité de *X. citri* pv. *citri* ont été mis en ligne sur la base de données privée *Xanthomonas citri* du site.

**MLVABank** est le site le mieux adapté aux besoins du projet et le plus accessible du fait des

collaborations avec l'Institut de Génétique et Microbiologie de l'Université Paris Sud, Orsay et a donc été choisi en conséquence. Des modifications sur des fonctionnalités ont été faites :

- Création et gestion de base de génotypage.
- Visualisation intelligente des données de génotypage.
- Requête sur les bases de données.
- Génération et gestion automatique de génotypes issus des bases créées.

La description de nouveaux profils génétiques pourra donner lieu à une caractérisation plus poussée des souches bactériennes pour pouvoir dans la mesure du possible associer des caractères liés au pouvoir pathogène ou à l'adaptation à certains stress à des profils génétiques. Cette base de données se situe dans le cadre d'un schéma d'épidémiosurveillance et permettra de suivre l'évolution de ce pathogène de quarantaine.

### 3. Conclusion

La description de nouvelles invasions de populations de *X. citri* pv. *citri* en Afrique de l'Ouest a révélé l'importance des activités humaines comme moteur des migrations tant pour l'introduction du pathogène dans les pays concernés que pour la dispersion dans les vergers à l'échelle locale. Une approche d'épidémiologie moléculaire a montré les forts liens épidémiologiques existant entre les populations du Burkina Faso et celles du Mali. Le développement d'un schéma de typage moléculaire adapté à l'épidémiologie à large échelle (MLVA-31) a permis d'émettre des hypothèses sur des sources d'inoculum pour les différentes introductions africaines et de replacer ces souches dans une phylogénie mondiale. Ces données ont été intégrées dans une base de données nouvellement créée et interactive disponible sur un site web MLVAbank ([http://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA\\_bank/Genotyping/](http://bioinfo-prod.mpl.ird.fr/MLVA_bank/Genotyping/))

#### ***Publications en relation avec le projet***

Leduc, C. Vernière, C. Boyer, K. Vital, O. Pruvost, Y. Niang, J.Y. Rey. 2011. First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A causing Asiatic citrus canker on grapefruit and Mexican lime in Senegal. *Plant Disease*, 95:1311

Juhasz C.C., Leduc A., Boyer C., Guérin F., Vernière C., Pruvost O., Wonni I., Ouedraogo L. 2013. First Report of *Xanthomonas citri* pv. *citri* Causing Asiatic Citrus 1 Canker in Burkina Faso. *Plant Disease* (à paraître).

Pruvost Olivier , Maxime Magne, Karine Vital, Alice Leduc, Christophe Tourterel, Christine Drevet, Virginie Ravigné, Lionel Gagnevin, Fabien Guérin, Ralf Koebnik, Valérie Verdier, a Christian Vernière. 2013. *In silico* mining of minisatellite markers from whole bacterial genome sequences: a new multilocus Variable-Number Tandem Repeat typing scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *Soumis à BMC Microbiology*

**Modèle 4 - Virus de la PPR (peste des petits ruminants) et virus de la maladie de Newcastle : étude de la phylogéographie et de la phylogénie de deux virus très liés à la mobilité et la migration saisonnière animale.**

## **Le potentiel d'échappement du virus de la PPR (peste des petits ruminants) et du virus de la maladie de Newcastle**

par Patricia Gil, Renata de Almeida, Geneviève Libeau, Renaud Lancelot, Emmanuel Albina

### **1. Contexte**

Pour prendre en compte la dimension transfrontalière des maladies animales et anticiper les risques sanitaires, la surveillance doit être articulée avec les activités d'évaluation et de gestion des risques conduites aux niveaux national et international (OIE, FAO, OMS, etc...) et avec les acteurs de terrains. Les impacts des changements globaux sur la dynamique et l'émergence des maladies infectieuses questionnent les acteurs de la santé animale, et de la recherche. Afin de développer une approche régionale de la surveillance et du contrôle des maladies, nous avons mené plusieurs actions: identification et actualisation des bases de données sur l'étendue la maladie, mise en place d'enquêtes, protocoles de surveillance, et en lien avec les épidémiologistes de l'unité, d'outils d'évaluation des systèmes de surveillance, conduite d'analyses de risque. Les produits de la recherche contribuent en retour à améliorer les dispositifs de surveillance et de contrôle, à identification des zones et périodes à haut risque d'émergence et à la gestion des risques sanitaires. Les résultats obtenus dans le cadre de cet ATP sont présentés pour deux virus modèles, le virus de la peste des petits ruminants (PPRV) et la maladie de Newcastle (NDV). Dans le cas de ces virus, PPRV (*morbillivirus*) et NDV (*avulavirus*), les génomes sont petits, cependant, leur taux de réplication et l'infidélité de leur polymérase font que la diversité générée sur de courts fragments peut être informative.

### **2. Surveillance globale des virus**

**PPRV.** L'étude de la répartition géographique des génotypes de PPRV (ou lignées) montre à l'heure actuelle un mécanisme de remplacement/extinction ou de coexistence de ces génotypes dans certaines régions. En effet, on observe la diffusion importante du génotype II en Afrique de l'Ouest, prenant le pas sur le génotype I connu auparavant. En Afrique de l'Est et du Nord, le génotype IV d'origine asiatique supprime le génotype III établi antérieurement au Soudan en lien avec des émergences de PPRV chez une nouvelle espèce cible, le dromadaire. Ce génotype cosmopolite émerge également dans de nouveaux territoires, par exemple le Maghreb (Egypte (2006) la Tunisie, l'Algérie et le Maroc (2006 à 2008) (Kwiatk et al, 2011, Emerg Infect Dis). Aucun représentant de ce génotype n'a été retrouvé en Afrique de l'Ouest, y compris en Mauritanie, frontalière du Maroc et de l'Algérie. En revanche, nos études en Mauritanie et au Sénégal entre 2010 et 2013 ont démontré la présence d'un seul et même génotype (II), rassemblant des souches très proches, cette fois encore accompagnée de l'extinction du génotype précédemment décrit, le génotype I (2 publiés en cours). Dans la

perspective de la mise en place d'un programme global de contrôle de la PPR (Albina et al, 2013, Vet Microbiol), il est important de déterminer si cette évolution est de nature à changer l'épidémiologie et l'impact de la maladie sur ce continent. Notre objectif est d'élucider les facteurs d'évolution critiques de l'émergence, de virulence et d'adaptation à de nouveaux hôtes.

**NDV.** De larges enquêtes épidémiologiques conduites en Afrique sur NDV responsables de la maladie de Newcastle (ND), ont permis une révision de la classification de ces virus en 14 génotypes et de proposer 10 nouveaux sous-génotypes (Servan de Almeida et al, 2009, Vaccine ; Maminiana et al, 2010, PLoS One ; Servan de Almeida et al, 2013, PLoS One, accepté). Dans cette étude, une reconstruction phylogénétique complète des souches NDV a été effectuée.

Une comparaison des quatre principales méthodes phylogénétiques (ML, MrBayes, MP et NJ) sur les séquences complètes de gènes F également réalisée, montre que les performances de MrBayes étaient légèrement supérieures à ML, et ces deux dernières nettement meilleures que NJ et MP. L'analyse des gènes F et HN, confirmé par génome complet par les deux méthodes les plus robustes ML et MrBayes, nous a permis d'affiner la classification NDV.

Les sept souches isolées du Mali dans cette étude se regroupent dans le génotype XIV avec d'autres souches décrites précédemment en Afrique de l'Ouest par Snoeck et al., 2009 et Cattoli et al., 2009. Dans ce génotype trois sous-génotypes (XIVa, XIVb et XIVc) ont été proposés. De même dans le génotypes VI, nous proposons la création du sous-génotype VI<sub>f</sub> regroupant nos isolats d'Ethiopie suffisamment distincts et confirmons la présence du Génotype XI à Madagascar décrit précédemment par notre équipe (Maminiana et al., 2010, PLoS One).

### **3. Potentiel d'émergence illustré par ces deux virus (point présenté dans l'ATP)**

#### **PPRV : Diversité générée pour échapper au control des si-RNA, antiviraux biologiques**

L'axe de recherche portant sur des antiviraux biologiques basés sur l'interférence ARN a été exploré pour définir s'il existe un risque d'émergence de virus résistants après un traitement. L'interférence ARN (ARNi) utilisé dans un but thérapeutique doit pouvoir limiter l'impact d'une infection en ciblant l'expression de gènes viraux. Dans cette étude, nous avons constaté la propension *in vitro* de PPRV, un virus à ARN relativement stable, d'échapper à l'inhibition d'un ou plusieurs siRNA ciblant les régions conservées du gène de la nucléoprotéine. Dès 2005, nous avons identifié trois séquences principales actives contre le gène de la nucléoprotéine (N) des *morbillivirus* (Servan de Almeida et al, 2007, J Gen Virol ; Keita et al, 2008, Antiviral Res ; Antivir Ther). Ces dernières années, nous avons concentré nos efforts sur l'examen du potentiel évolutif de PPRV sous pressions de siRNA seuls ou en combinaison (Holz et al, 2012, J Virol). Après traitement *in vitro* du PPRV avec un ou deux siRNA, des mutations nucléotidiques ponctuelles simples ou multiples (synonyme ou non) ainsi qu'une délétion d'un tronçon de six nucléotides ont été observées au niveau de la cible des siRNA.

Aucune autre modification dans le gène N PPRV n'a été mise en évidence par ailleurs. Un nombre limité de positions d'acides aminés a été modifié pour les trois régions cibles, ceux situés en position centrale. Toutefois, la fréquence des substitutions d'acides aminés à ces positions est élevée, les proportions pour chacun des sites étant de 1/2, 1/3 et 1/7 nucléotides. Cette fréquence est en proportion inverse du nombre de codons possibles pour l'acide aminé correspondant, avec une préférence pour la substitution synonyme quand l'option se présente. Comme on aurait pu le prévoir, la suppression du tronçon de 6 nucléotides a suivi la «règle de six » strictement observé des *Paramyxovirus* lors de leur réplication, et dont la taille de génome est un multiple de six nucléotides. Ces résultats montrent que l'utilisation de siRNA de façon isolée comme thérapie antivirale est inappropriée. Cette pratique pourrait accélérer l'évolution et l'émergence de souches ayant des propriétés modifiées tel qu'un phénotype plus virulent. Une telle plasticité génomique chez les *morbillivirus* était inattendue, car ce sont des virus relativement stables, plus particulièrement la région cible du gène N choisi. Le taux de mutations par site et par an est 7 à 12 fois plus élevé que le taux de mutation normal du virus. Pour la première fois également, une délétion importante d'un gène essentiel induisant une protéine plus courte est observée sans retentissement sur la capacité de réplication du virus muté. Fort heureusement, aucun mutant n'était observé avec une combinaison de trois siRNA après 20 passages successifs du virus en leur présence.

**NDV : La mise en évidence d'un nouveaux génotype à Madagascar et de sous-génotypes en Afrique de l'Ouest pose la question de la capacité de ces « nouveaux » virus à échapper à la protection vaccinale conférée par des souches plus anciennes.**

En effet, des cas sporadiques de ND ont déjà été signalés dans les fermes commerciales vaccinées avec le vaccin La Sota de génotype II, un vaccin largement utilisé. Cependant il reste à démontrer si ces observations sont liées à une réduction de l'efficacité du vaccin ou à sa mauvaise mise en œuvre. Si l'on admet que des souches de NDV responsables des flambées sporadiques de ND chez les poulets vaccinés ont pu échapper à la réponse immunitaire, comme observé en Chine, Californie du Sud et Etats adjacents, Mali, Cameroun, Nigeria et Burkina Faso, elles contribuent alors à l'émergence de nouveaux génotypes. Les variations génétiques les paramyxovirus aviaires (APMV-1) ne devraient pas être à l'origine de défaillance vaccinale car il n'est admis qu'un seul sérotype sur la base des tests de neutralisation et d'expériences de protection croisée.

L'étude menée à Madagascar a permis d'isoler et de caractériser quatre virus ND sur leur génotypique et leur pathotype. Les analyses phylogénétiques basées sur les gènes F et HN et le génome complet, ont fait l'objet de la proposition du nouveau génotype XI. En effet, les isolats de NDV malgaches forment un groupe assez éloigné pour constituer un nouveau génotype. La variation génétique maximale observée entre les isolats de génotype XI (5%) est compatible avec l'existence d'un ancêtre commun présent il y a 50 ans. Le taux de mutation d'environ 1% par décennie dans des conditions naturelles de terrain en périodes épizootiques permet d'envisager ce scénario qui s'accorde avec la première introduction en 1946 d'un génotype de NDV à Madagascar. De plus, l'on constate que les souches de NDV circulant actuellement (sous-génotype VIIId répandu en Asie, Europe et Afrique) et le génotype

prédominant XI à Madagascar ont une distance génétique significative (de 21% à 25%) avec la souche La Sota. Par conséquent une vaccination sub-optimale associée à des différences génétiques de cette ampleur peut être responsable de cas sporadiques de ND dans les populations de volailles vaccinées à Madagascar.

Certains aspects vont cependant à l'encontre de cette hypothèse : l'alignement de séquences multiples des quatre isolats malgaches réalisés avec plusieurs séquences publiées, y compris les souches vaccinales membres du génotype II, a révélé que tous les épitopes neutralisants identifiés à ce jour et les récepteurs prédis dans les glycoprotéines F et HN sont conservées. Cependant, toutes les souches de génotype XI possèdent quinze et onze substitutions originales d'acides aminés respectivement sur les protéines F et HN, certaines concentrées dans une courte région invariable dans la tête globulaire de la protéine F et HN ce qui suggère une sélection au fil du temps par les réponses immunitaires de l'hôte. On suppose que ces substitutions ont entraîné des changements majeurs dans la conformation des protéines, dus aux acides aminés de polarité différente, et abouti à la dérive antigénique. Il est tentant de supposer qu'elles peuvent jouer un rôle dans la virulence ou l'émergence de mutants d'échappement et enfin le manque apparent d'efficacité du vaccin observée sur le terrain.

L'échappement de la souche d'épreuve de génotype XI au vaccin a été attesté en conditions contrôlées en collaboration avec l'Anses-Ploufragan. En effet, l'efficacité des vaccins, souches La Sota et Hitchner, se caractérise par une absence de morbidité et de mortalité des poulets vaccinés après épreuve, mais par l'excrétion de la souche d'épreuve.

#### **4. Conclusion**

Les études mises en place se limitent aux maladies présentes dans les régions des réseaux de santé où l'unité CMAEE est impliquée par exemple dans l'Océan Indien et en Afrique de l'Ouest, et pour lesquelles nous disposons de jeux de données, d'une expertise scientifique et d'avantages comparatifs ce qui est le cas pour la maladie de Newcastle et la peste des petits ruminants. Les interacteurs tels que les services vétérinaires, organisés en réseaux régionaux de santé nous permettent d'avoir un accès privilégié aux terrains, aux échantillons permettant ainsi d'optimiser les actions de recherche appliquée, la mise en réseau du partenariat, et de contribuer à la vision internationale de ces maladies.

Les activités scientifiques décrites ci-dessus relèvent également d'une approche intégrative incluant l'évaluation des situations épidémiologiques, l'étude de la diversité des souches virales, la caractérisation et la plasticité des génomes viraux. A cette approche et plus particulièrement pour la PPR, on peut ajouter des activités de développement d'outils de diagnostic, de traitements et de vaccins et ceci dans le cadre d'une référence nationale et internationale pour la maladie. Le contrôle progressif de PPR et son éradication sont d'ailleurs des objectifs affichés (après l'éradication de la peste bovine).