

## **Epidémiologie moléculaire de circovirus porcin (PCV2) en relation avec la maladie d'amaigrissement du porcelet**

*Claire de BOISSÉSON (1), Véronique BÉVEN (1), Laurent BIGARRÉ (1), Richard THIÉRY (2),  
Nicolas ROSE (3), Eric EVENO (3), François MADEC (3) et André JESTIN (1)*

*Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*

*(1) Unité Génétique Virale et Biosécurité, BP 53, 22440 Ploufragan*

*(2) Unité Maladies Infectieuses et Parasitologie des Poissons, BP 70, 29280 Plouzané*

*(3) Unité Epidémiologie Porcine et Assurance Qualité, BP 53, 22440 Ploufragan*

### **Epidémiologie Moléculaire de Circovirus porcin en relation avec la Maladie d'Amaigrissement du Porcelet**

Le Circovirus porcin de type 2 (PCV2) est désormais reconnu comme l'agent étiologique majeur de la Maladie d'Amaigrissement du porcelet (MAP). Dans cette étude, le PCV1 et le PCV2 ont été recherchés dans des échantillons de porcs provenant d'élevages affectés (MAP(+)) ou non affectés (MAP(-)) par la MAP. Le PCV2 a été détecté par PCR chez 100 % des animaux issus d'élevages MAP(+) et 76 % des porcs issus d'élevages MAP(-), alors que le PCV1 n'a été détecté chez aucun d'entre eux. Les séquences complètes de 38 isolats de PCV2 ont été déterminées. Vingt-trois nouveaux variants, caractérisés par un taux d'identité nucléotidique élevé (94,6 à 99,9 %), ont été identifiés. Bien qu'elles présentent une forte homologie avec les séquences de PCV2 disponibles dans les banques, les séquences isolées en France forment un groupe distinct. Les 10 séquences MAP(-) ont montré une variabilité légèrement plus élevée que les 13 séquences MAP(+). Aucun marqueur moléculaire associé à l'un des deux états sanitaires étudiés n'a pu être identifié. En conséquence, et compte tenu de la méthode utilisée ici, les épisodes de MAP observés en Bretagne ne sont pas dus à l'émergence d'un nouveau génotype de PCV2.

### **Molecular epidemiology of Porcine circovirus in relation with Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome**

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is recognised as a primary cause in Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). In this study, both PCV1 and PCV2 types were checked in pigs originating from PMWS-affected (PMWS+) and non-affected (PMWS-) herds. PCV2 was identified by PCR in 100 % of animals from PMWS(+) herds and in 76 % from PMWS(-), while PCV1 was not detected. The complete sequences of 38 PCV2 isolates were determined, of which 23 new variants were identified, displaying 94.6 to 99.9 % nucleotide identity one to another. Although highly related to all the PCV2 sequences available in databases, the isolates from France gathered in a distinct sub-cluster. Compared with the 13 PCV2 from PMWS(+) farms, the 10 PMWS(-) sequences exhibited a slightly higher variability. No viral molecular marker specific to a pathogenic state could be identified, even by including other PCV2 variants isolated from PMWS-suffering animals from other countries. We conclude that the PMWS outbreaks in Brittany are likely not due to the emergence of a new genotype of PCV2.

## INTRODUCTION

La maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) affecte les porcelets dans les unités de post-sevrage et d'engraissement. Elle se caractérise cliniquement par une perte de poids, des symptômes respiratoires ou digestifs, et une hypertrophie des ganglions lymphatiques. La déplétion lymphocytaire et l'infiltration histiocytaire des tissus lymphoïdes sont les lésions les plus typiques.

Le circovirus porcin de type 2 (PCV2), de la famille des *Circoviridae*, est reconnu comme l'agent étiologique majeur de la MAP (ALLAN et al, 2002). Cependant, son rôle exact reste mal défini puisque l'infection par le PCV2 n'entraîne pas systématiquement l'expression clinique de la maladie. Le génome du PCV2 est une molécule d'ADN simple brin circulaire d'environ 1,77 kb. Il présente une forte homologie avec celui du circovirus porcin de type 1 (PCV1), identifié à l'origine comme contaminant de culture cellulaire (TISCHER et al, 1974). L'infection par le PCV1 chez le porc est asymptomatique et largement répandue selon différentes enquêtes sérologiques (ALLAN et ELLIS, 2000).

En France, les premiers foyers de MAP sont apparus en 1996 (MADEC et al, 2000). La régression de la maladie a été observée à partir de 1999 en réponse à l'amélioration des pratiques d'élevage. Au moment de l'émergence, les deux types de Circovirus porcin (PCV1 et PCV2) ont été identifiés par PCR dans quelques échantillons issus de porcs affectés de MAP.

La présente étude avait pour but d'inventorier les séquences génomiques de PCV1 et de PCV2 présentes en Bretagne durant les épisodes de MAP. De plus, nous avons comparé les souches de PCV2 obtenues dans des élevages affectés ou non par la MAP afin de clarifier la relation entre les séquences de virus circulant et l'apparition de la maladie.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Échantillons

Vingt-trois élevages situés en Bretagne, excepté deux localisés dans le département de l'Ain, ont été sélectionnés selon les critères décrits par ROSE et al (2003). Les élevages dans lesquels l'expression clinique de la MAP était observée depuis moins de deux ans ont été classés MAP(+) tandis que les élevages exempts de tout historique de MAP ont été classés MAP(-).

Entre juillet 2000 et janvier 2002, 31 porcs provenant de 13 élevages MAP(+) et 25 porcs provenant de 10 élevages MAP(-) ont été autopsiés. Des échantillons de tissus (poumon, amygdale, iléon, ganglions trachéo-bronchique, inguinal et mésentérique) ont été prélevés et conservés à -20° C. L'âge des animaux, les données cliniques et les lésions ont été enregistrés (tableau 1).

Un animal (m1), provenant d'un élevage classé MAP(-), a été considéré comme cas sporadique de MAP en raison des

lésions typiques observées à l'autopsie. En conséquence, la souche PCV2 Fd13 isolée chez ce porc a été classée avec les souches issues d'élevages MAP(+) (tableau 1).

### 1.2. Détection et séquençage des génomes de PCV

L'ADN total a été extrait des tissus à l'aide du kit Dneasy Tissue Kit (Qiagen). Deux séries de PCR ont été réalisées avec les amorces PF2/PR2 et CF8/CR8 décrites par LAROCHELLE et al (1999) afin d'amplifier les séquences spécifiques de PCV1 et de PCV2 respectivement. L'amplification des génomes PCV2 détectés grâce aux amorces CF8/CR8 a été réalisée à l'aide des amorces 64CA2 (5'-AGGAGGGCGTTCTGACTGTG-3') et 1723CA2 (5'-GTTGAATTCTGGCCCTGCTC-3'). Cette PCR a permis de générer des fragments de 1660 pb, chevauchant partiellement les fragments de 263 pb obtenus avec les amorces CF8 et CR8, l'assemblage des séquences de ces deux fragments permettant d'obtenir la totalité de la séquence virale. Deux jeux d'amorces (98F (5'-GTGGGTGTTCACTCTGAA-TAA -3') / 721R (5'-CACACAGTCTCAGTAGATCAT-3') et 665F (5'-TTACCATGGTGAAGAAGTGGT -3') / 220R (5'-AATTAGCGAACCCTGGAGGT -3')) ont permis, pour quelques échantillons, d'amplifier avec davantage de sensibilité des fragments de 644 pb et 1343 pb respectivement, couvrant la totalité du génome du PCV2.

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées en employant des polymérases haute fidélité (DyNAzyme EXT DNA Polymerase (Ozyme) et Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Gibco BRL Life Technologies)). Les produits de PCR ont été purifiés selon leur taille avec les kits Qiaquick PCR purification kit et Qiaquick gel extraction kit (Qiagen), marqués avec le kit ABI Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) et enfin séquencés dans les deux sens avec le séquenceur 373 DNA sequencer (Applied Biosystems).

L'amplification et le séquençage complet des génomes de PCV2 ont été réalisés pour 19 porcs provenant de 7 élevages MAP(+) et 19 porcs provenant de 7 élevages MAP(-). Les séquences ont été obtenues à partir de l'extrait de poumon des 38 animaux, exceptés les porcs m6, m8, et m3 pour lesquels les ganglions trachéo-bronchiques et inguinaux ont été utilisés respectivement.

Afin d'évaluer la diversité virale au sein d'un même individu, les isolats de PCV2 issus des 6 échantillons tissulaires de deux porcs ont été séquencés.

### 1.3. Analyse des séquences

Les alignements multiples des séquences génomiques de PCV2 ont été obtenus avec le logiciel CLUSTALW (version 1.8.2). L'analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide des programmes du package PHYLIP (version 3.573) par les méthodes de distance (plus proche voisin) et de parcimonie. Les résultats ont été évalués statistiquement par la méthode du Bootstrap. Le programme TREEVIEW (version 1.6.6) a été utilisé pour dessiner les arbres.

**Tableau 1** - Identification des élevages, caractérisation des animaux et des souches de PCV2 associées.

Elevage (n° dept) MAP (+/-)	Identification de l'animal	âge (s)	Signes cliniques, lésions, pathogènes associés	PCV2	Numéro d'accession
<b>A</b> (22) MAP(+)	<b>p1</b>	11	MAP typique	<b>Fd1</b>	AY322000
	<b>p2</b>	11	MAP typique	<b>Fd2</b>	AY321999
	<b>p3</b>	11	MAP typique	<b>Fd1</b>	AY322000
<b>B</b> (22) MAP(+)	<b>p4</b>	13	MAP typique	<b>Fd3</b>	AY321984
	<b>p5</b>	13	MAP typique, signes de PDNS	<b>Fd3</b>	AY321984
	<b>p6</b>	12	signes de MAP	<b>Fd3</b>	AY321984
	<b>p7</b>	16	MAP typique	<b>Fd4</b>	AY321986
	<b>p8</b>	16	bronchopneumonie, néphrite interstitielle, oedème des membres	<b>Fd3</b>	AY321984
<b>C</b> (35) MAP(+)	<b>p9</b>	13	signes de MAP	<b>Fd5</b>	AY321997
	<b>p10</b>	13	amaigrissement, pleurésie, pneumonie	<b>Fd5</b>	AY321997
	<b>p11</b>	13	pleurésie, péritonite, péricardite	<b>Fd6</b>	AY321998
<b>D</b> (29) MAP(+)	<b>p12</b>	12	MAP typique	<b>Fd7</b>	AY321990
	<b>p13</b>	12	MAP typique	<b>Fd7</b>	AY321990
<b>E</b> (01) MAP(+)	<b>p14</b>	11	MAP typique, signes de PDNS	<b>Fd8</b>	AY321995
	<b>p15</b>	11	amaigrissement, péricardite, péritonite, pleuropneumonie	<b>Fd9</b>	AY321996
<b>F</b> (22) MAP(+)	<b>p16</b>	15	MAP typique, signes de PDNS	<b>Fd10</b>	AY321991
	<b>p17</b>	15	signes de MAP, péricardite, pleurésie, périhépatite, péritonite	<b>Fd10</b>	AY321991
<b>G</b> (29) MAP(+)	<b>p18</b>	15	MAP typique	<b>Fd11</b>	AY321988
	<b>p19</b>	15	MAP typique, signes de PDNS	<b>Fd12</b>	AY321989
<b>H</b> (22) MAP(-)	<b>m1</b>	18	MAP typique, signes de PDNS	<b>Fd13</b>	AY321985
	<b>m2</b>	14	hernie et abcès de l'ombilic	<b>Fh14</b>	AY321982
<b>I</b> (22) MAP(-)	<b>m3</b>	14	lymphosarcome multifocal	<b>Fh15</b> <b>Fh16</b>	AY321992 AY321993
	<b>m4</b>	14	amaigrissement, iléite proliférative nécrosante associée à <i>Lawsonia</i> et <i>Pasteurella multocida</i>	<b>Fh16</b>	AY321993
<b>J</b> (22) MAP(-)	<b>m5</b>	14	néphrite, hernie inguinale	<b>Fh17</b>	AY322004
	<b>m6</b>	14		<b>Fh17</b>	AY322004
	<b>m7</b>	14		<b>Fh17</b>	AY322004
<b>K</b> (29) MAP(-)	<b>m8</b>	17	pneumonie interstitielle légère	<b>Fh18</b>	AY321987
	<b>m9</b>	17	pneumonie interstitielle légère	<b>Fh18</b>	AY321987
	<b>m10</b>	17	pleurésie, péricardite, pneumonie interstitielle associée à <i>Pasteurella multocida</i> et <i>Streptococcus suis</i> 2	<b>Fh18</b>	AY321987
<b>L</b> (56) MAP(-)	<b>m11</b>	15		<b>Fh19 *</b>	AY322003
	<b>m12</b>	15		<b>Fh20 *</b>	AY321983
	<b>m13</b>	15		<b>Fh19</b>	AY322003
<b>M</b> (29) MAP(-)	<b>m14</b>	16		<b>Fh21</b>	AY322001
	<b>m15</b>	16		<b>Fh22</b>	AY322002
	<b>m16</b>	16		<b>Fh22</b>	AY322002
<b>N</b> (29) MAP(-)	<b>m17</b>	15		<b>Fh23</b>	AY321994
	<b>m18</b>	15		<b>Fh23</b>	AY321994
	<b>m19</b>	15		<b>Fh23</b>	AY321994

Seuls les échantillons identifiés comme positifs par PCR et soumis au séquençage sont portés ici. La localisation des élevages est donnée en numéro de département. La dernière colonne donne les numéros d'accession à GenBank des séquences de PCV2. PDNS : Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome (Dermatite-Néphrite). Fd : France diseased, Fh : France healthy. Les six échantillons de tissus prélevés sur les porcs m11 et m12 ont été soumis à l'analyse complète par PCR et séquençage (\*).

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Détection de PCV1 et PCV2

Le PCV1 n'a été détecté dans aucun échantillon, quel que soit le statut de l'élevage au regard de la MAP. En revanche, les séquences spécifiques du PCV2 ont été détectées dans 100 % (31/31) des porcs provenant des 13 élevages MAP(+) et dans 76 % (19/25) des porcs issus des 10 élevages MAP(-).

### 2.2. Caractérisation moléculaire des souches de PCV2

Au total, 23 séquences distinctes de PCV2 ont été identifiées, 13 à partir des élevages MAP(+) et 10 à partir des élevages MAP(-). Le degré de similarité entre ces séquences est très élevé (94,6 à 99,9 % d'identité nucléotidique). Elles sont constituées de 1767 nucléotides (nt), exceptées Fh17 et Fh16 (1768 nt et 1778 nt respectivement). La souche Fh16 présente une insertion de 11 nt située en aval de l'origine de répllication virale et en amont de gène associé à la répllication (ORF1).

La variabilité à l'échelle d'un individu a été évaluée pour deux porcs, en déterminant la séquence des isolats de PCV2 amplifiés à partir des six prélèvements de tissus. Pour ces deux animaux, un unique variant a été identifié quel que soit le tissu d'origine.

Chacun des 23 variants identifiés a été isolé dans un seul élevage. Un maximum de deux variants a été trouvé dans chaque élevage (tableau 1).

### 2.3. Analyse phylogénétique

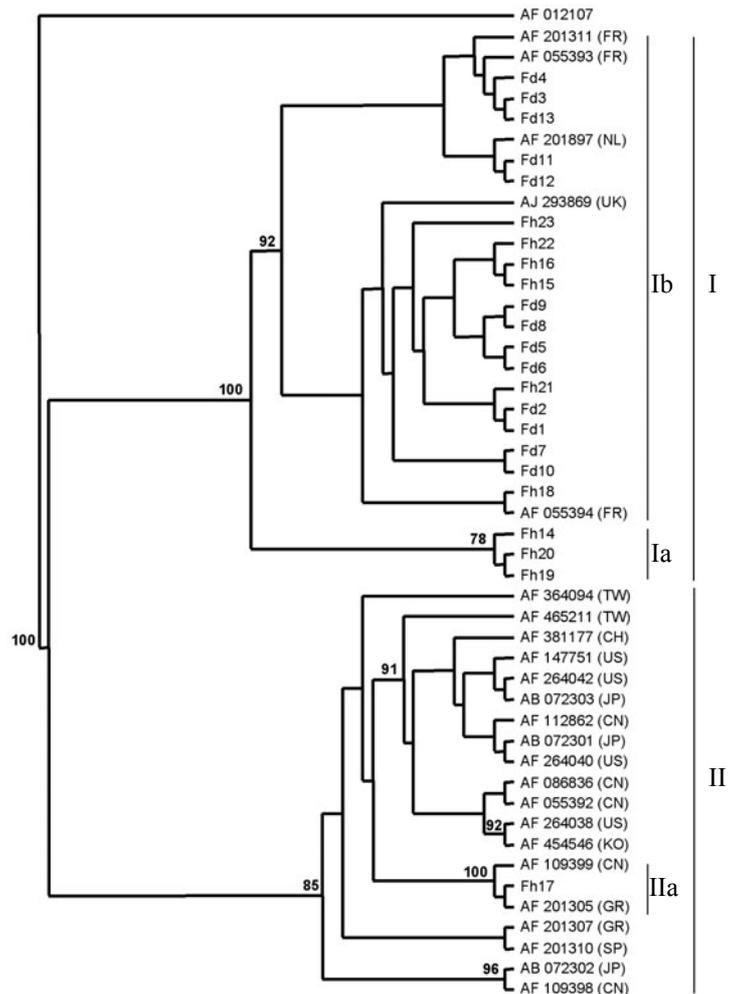
Les relations phylogénétiques entre les 23 souches de PCV2 de la présente étude et des séquences extraites des banques de données ont été étudiées. Deux groupes principaux supportés par des valeurs de bootstrap significatives ont été obtenus (figure 1). Le premier groupe (I) rassemble presque toutes les séquences de cette étude, plus trois isolats de France déjà décrits et deux séquences isolées au Royaume Uni et aux Pays Bas. A l'intérieur de ce groupe, deux sous-groupes ont été identifiés : le sous-groupe Ia, composé de trois isolats provenant d'élevages MAP(-), et le sous-groupe Ib dans lequel 19 séquences de cette étude sont réparties, quel que soit leur statut vis à vis de la MAP.

Le second groupe (II) inclut un sous-groupe (IIa) composé d'un isolat d'Allemagne, un isolat du Canada, et le seul isolat de France (Fh17) exclu du groupe I. Tous les autres sous-groupes du groupe II rassemblent des séquences originaires de pays distants les uns des autres (figure 1).

### 2.4. Comparaison des séquences de PCV2 des élevages MAP(+) et MAP(-)

Le degré de similarité entre les séquences issues d'élevages MAP(+) (99,5 à 99,9 % d'identité nucléotidique) est plus

**Figure 1** - Relations phylogénétiques entre 47 séquences génomiques complètes de PCV2

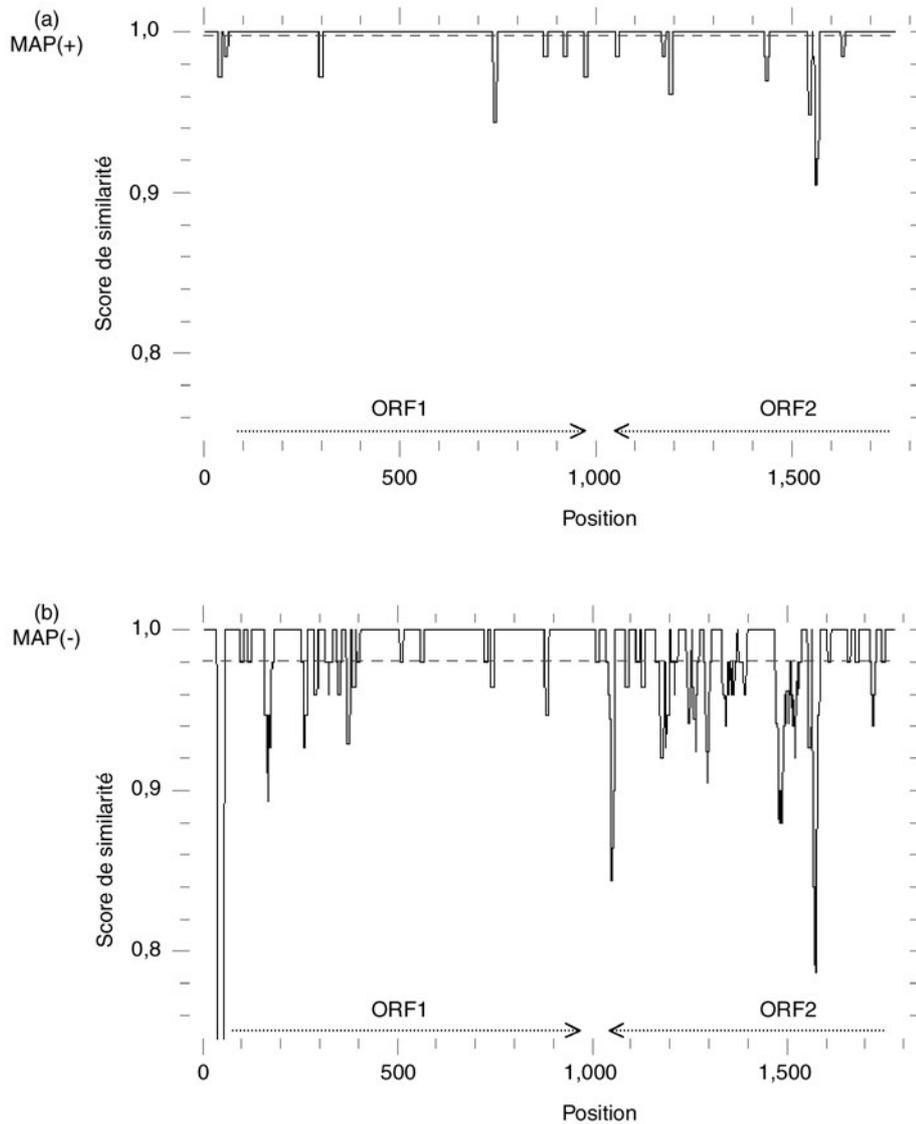


Vingt-trois séquences de la présente étude sont comparées avec 24 séquences de PCV2 extraites de GenBank (numéro d'accèsion, et (FR) : France, (NL) : Pays-Bas, (UK) : Royaume Uni, (TW) : Taiwan, (CH) : Chine, (US) : USA, (JP) : Japon, (CN) : Canada, (SP) : Espagne, (KO) : Corée, (GR) : Allemagne). Une méthode de calcul basée sur la distance génétique (plus proche voisin) a été utilisée ici. Des résultats équivalents ont été obtenus par la méthode de parcimonie. Les valeurs de bootstrap significatives sont indiquées en pourcentage pour 1000 re-échantillonnages. Une séquence de PCV1 (AF 012107) est utilisée comme groupe extérieur. Les groupes principaux (I, II) et sous-groupes d'intérêt (Ia, Ib, IIa) sont mentionnés.

élevé que celui des séquences isolées dans les élevages MAP(-) (94,6 à 99,9 % d'identité nucléotidique). Ce résultat a été confirmé par la comparaison de graphique de similarité nucléotidique au long des séquences des deux groupes (figure 2).

Les séquences consensus issues des deux groupes de séquences se sont révélées être strictement identiques. Toutes les variations nucléotidiques et peptidiques observées chez les souches MAP(-) de la présente étude ont été trouvées dans des séquences de PCV2 extraites de banques de données et isolées chez des animaux souffrant de MAP.

**Figure 2** - Courbes de similarité nucléotidiques des séquences de PCV2 isolées d'élevages MAP(+) et MAP(-)



Le programme PLOTSIMILARITY (GCG Wisconsin package) a été utilisé pour tracer des courbes de score de similarité au moyen d'une fenêtre de 10 nucléotides se déplaçant le long des séquences. (a) est obtenu pour les 13 séquences de PCV2 issues d'élevages MAP(+) et (b) pour les 10 séquences de PCV2 issues d'élevages MAP(-). Les lignes pointillées représentent les similarités moyennes sur la totalité de la longueur des séquences. Les flèches pointillées signalent la localisation des deux gènes principaux (ORF1 : associé à la réplication, ORF2 : gène de capside).

### 3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Contrairement à nos observations au moment de l'émergence de la MAP en Bretagne (LE CANN et al, 1997), le PCV1 n'a été détecté dans aucun des échantillons de la présente étude. Ce résultat est cohérent avec la faible prévalence (3-5 %) rapportée par d'autres équipes (MANKERTZ et al, 2000 ; CALSAMIGLIA et al, 2002). Il va dans le sens de l'hypothèse émise par CALSAMIGLIA et al. (2002) selon laquelle la séroprévalence du PCV1 aurait été surestimée dans des études sérologiques antérieures, du fait d'épitopes communs entre PCV1 et PCV2.

L'analyse phylogénétique a montré que les souches de PCV2 isolées en France, au Royaume Uni et aux Pays-Bas forment un groupe génétiquement très proche bien que dis-

tinct, du groupe formé par toutes les autres souches de PCV2 isolées en Amérique de Nord, en Asie, en Allemagne et en Espagne. Cette situation indique que les variants isolés en France pourraient dériver d'un pool génétique viral restreint, probablement d'un ancêtre unique, qui se serait disséminé en France. Dans ce contexte, la souche Fh17 qui présente une très forte homologie avec des séquences d'origine allemande et canadienne, aurait été soumise à un autre mode d'introduction.

Lors de la comparaison des séquences de PCV2 isolées dans les élevages MAP(+) et dans les élevages MAP(-), une légère différence de variabilité génétique a été observée : les souches issues d'élevages MAP(-) sont plus hétérogènes que les souches MAP(+). Cependant, cette hétérogénéité est due principalement aux trois souches du sous-groupe la

(figure 1) et à la souche Fh17, les six autres souches issues d'élevages MAP(-) étant très proches des isolats provenant d'élevages MAP(+). Par ailleurs, plusieurs mutations ponctuelles observées sur le génome de ces quatre même souches MAP(-) ont été observées chez des souches d'origine étrangère isolées de porcs affectés par la maladie.

Ce travail montre que le taux de mutation du PCV2 est très faible, puisqu'un seul variant est détecté chez un même individu. Cependant, des séquences virales à la fois distinctes et partageant un taux de similarité très élevé, ont été isolées dans chacun des élevages, ce qui témoigne de la capacité d'évolution du virus à l'échelle de la région.

En conclusion, nous n'avons pas identifié de marqueur moléculaire associé à la virulence des souches de PCV2 isolées

dans un contexte d'expression clinique de MAP, ce qui confirme que l'apparition des épisodes de MAP en Bretagne n'est pas liée à l'apparition d'un nouveau variant de PCV2. Il est vraisemblable que le virus ait envahi les élevages porcins bien avant l'apparition de la MAP, celle-ci ayant été déclenchée par un ou plusieurs co-facteurs qui restent à identifier.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Nicolas ETERRADOSSI pour son aide dans l'analyse phylogénétique.

Ce travail a été financé par les fonds européens de développement et de restructuration (FEDER 5B), et par The European Commission for shared-cost RTD actions (QLRT-1999-00307).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLAN G. M., ELLIS J. A., 2000. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 3-14.
- ALLAN G., MC NEILLY F., MEEHAN B., KENNEDY S., JOHNSTON D., ELLIS J., KRAKOWKA S., FOSSUM C., WATTRANG E., WALLGREN P., 2002. *Vet. Rec.*, 150, 255-256.
- CALSAMIGLIA M., SEGALES J., QUINTANA J., ROSELL C., DOMINGO M., 2002. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 1848-1850.
- LAROCHELLE R., ANTAYA M., MORIN M., MAGAR R., 1999. *J. VIROL. Methods*, 80, 69-75.
- LE CANN P., ALBINA E., MADEC F., CARIOLET R., JESTIN A., 1997. *Vet. Rec.*, 141, 660.
- MADEC F., EVENO E., MORVAN P., HAMON L., BLANCHARD P., CARIOLET R., AMENNA N., MORVAN H., TRUONG C., MAHE D., ALBINA E., JESTIN A., 2000. *Livest. Prod. Sci.*, 63, 223-233.
- MANKERTZ A., DOMINGO M., FOLCH J. M., LECANN P., JESTIN A., SEGALES J., CHMIELEWICZ B., PLANA-DURAN J., SOIKE D., 2000. *Virus Res.*, 66, 65-77.
- ROSE N., LAROUR G., BLANCHARD P., JESTIN A., MADEC F., 2003. *Prev. Vet. Med.*, 61, 209-225.
- TISCHER I., RASCH R., TOCHTERMANN G., 1974. *Zentralbl. Bakteriol.*, 226, 153-167.