



HAL
open science

Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection

Sarah Gallien

► **To cite this version:**

Sarah Gallien. Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2018. Français. NNT : 2018NSARC135 . tel-02138168

HAL Id: tel-02138168

<https://theses.hal.science/tel-02138168>

Submitted on 23 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

AGROCAMPUS OUEST
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : « Microbiologie, virologie et parasitologie »

Par

« **Sarah GALLIEN** »

« **Etude comparative de la transmission de virus de
diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection** »

Thèse présentée et soutenue à « Ploufragan », le « 1^{er} octobre 2018 »

Unité de recherche : **Unité Génétique Virale et Biosécurité, Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

**Unité Epidémiologie et Bien-être Porcin, Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

UMR Infectiologie et Santé publique, Institut nationale de la recherche agronomique

N° d'ordre : 2018-17

N° de série : C-135

Rapporteurs avant soutenance :

Etienne Thiry, Professeur, Université de Liège
Nicolas Bertho, Chargé de Recherche, INRA de Jouy-en Josas

Composition du Jury :

Président : Lucile Montagne, Professeur, AGROCAMPUS OUEST

Examineurs : Lucile Montagne, Professeur, AGROCAMPUS OUEST
Elodie Monchatre-Leroy, Directeur de projets de recherche, ANSES Nancy
Astrid Vabret, Professeur, CHU Caen

Dir. de thèse : Béatrice Grasland, Directeur de projets de recherche, ANSES Ploufragan-Plouzané

Co-dir. de thèse : Nicolas Rose, Ingénieur Recherche, ANSES Ploufragan-Plouzané
Mustapha Berri, Ingénieur Recherche, INRA Centre-Val-de-Loire

Sommaire

Remerciements	1
Préambule	3
Liste des abréviations	4
Liste des figures	5
Introduction.....	6
1. Le virus de la diarrhée épidémique porcine, le PEDV	7
1.1. Un coronavirus	7
1.2. Structure et organisation du génome du PEDV.....	9
1.3. Réplication.....	10
1.4. Récepteurs et facteurs d'entrée du virus.....	11
1.5. Propriétés biologiques et physico-chimiques	12
1.6. Culture cellulaire in vitro	12
1.7. Détection et quantification du PEDV.....	12
2. Physiopathogénie de la diarrhée épidémique porcine et mise en place de la réponse immunitaire	13
2.1. Tropisme cellulaire et dose minimale infectante.....	13
2.2. Signes cliniques et lésions des tissus digestifs	14
2.2.1. Signes cliniques.....	14
2.2.2. Lésions	14
2.3. Mise en place de la réponse immunitaire suite à l'infection par le PEDV.....	17
2.3.1. La réponse immunitaire innée	17
2.3.2. La réponse immunitaire adaptative	19
2.4. PEDV et apoptose	20
3. Epidémiologie	21
3.1. Epidémiologie du PEDV dans le monde	21
3.1.1. Historique avant 2010	21
3.1.2. A partir des années 2010.....	22

3.1.2.1. En Asie	22
3.1.2.2. En Amérique.....	23
3.1.2.3. En Europe	25
3.1.3. Epidémiologie moléculaire du PEDV	26
3.2. Mode de propagation de cet agent pathogène	30
3.2.1. Transmission horizontale	30
3.2.1.1. Quantification.....	30
3.2.1.2. Transmission directe par contact avec des matières contaminées	31
3.2.1.3. Voie aérienne	32
3.2.1.4. Transports et vecteurs passifs indirects.....	32
3.2.1.5. Plasma porcin	33
3.2.2. Cas de l'excrétion dans la semence et dans le lait	34
4. Prophylaxie, lutte et assainissement en élevage	35
4.1. Mesures de prophylaxie à l'échelle du troupeau vis-à-vis du PEDV	35
4.1.1. Vaccins et stratégies thérapeutiques	35
4.1.2. Immunisation des truies pendant la gestation.....	37
4.2. Méthodes de lutte et d'assainissement des élevages.....	37
4.2.1. Dans l'aliment.....	38
4.2.2. Dans les lisiers	39
4.2.3. Dans les bâtiments d'élevage et les véhicules de transport d'animaux	39
4.2.4. Réglementation mise en place afin de lutter contre PEDV	40
Problématique et objectifs de la thèse	42
Partie 1 : Suivi d'un élevage français infecté par une souche « S-InDel » de PEDV et comparaison de la transmission horizontale d'une souche « S-InDel » et d'une souche « S-non-InDel » de PEDV.....	45
Article 1: Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: descriptive epidemiology and control measures implemented	49
Article 2: Better horizontal transmission of a US « S-non-InDel » strain compared to a French « S-InDel » strain of porcine epidemic diarrhea virus.....	73

Partie 2 : Evaluation de la circulation du PEDV en centre d'insémination artificielle sur l'année 2015 et de l'excrétion d'une souche « S-InDel » française et d'une souche « S-non-InDel » américaine de PEDV dans la semence	87
Article 3: No evidence of PEDV infection in French artificial insemination centers in 2015.....	91
Article 4: Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars.....	104
Article 5: Limited shedding of an «S-InDel» strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in semen and questions regarding the infectivity of the detected virus	114
Partie 3 : Comparaison de la pathogénicité et de l'immunité intestinale induites chez des porcs infectés par une souche « S-InDel » française et d'une souche « S-non-InDel » américaine de PEDV	137
Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French «S-InDel» or an US «S-non-InDel» strain of porcine epidemic diarrhea virus	140
Discussion générale.....	172
Références.....	181
Annexe 1 : Plan Management Qualité	196
Annexe 2 : Revue scientifique sur le PEDV.....	220
Annexe 3 : Publications, communications et formations.....	238
Annexe 4 : Publication poster Journées de la Recherche Porcine 2018	242
Annexe 5 : Attestation de management qualité de la thèse.....	245

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), l'Institut national de la recherche agronomique (INRA), le Laboratoire national de contrôle des reproducteurs (LNCR) et INAPORC d'avoir financé ce projet de thèse.

Je remercie aussi les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse, les docteurs Etienne Thiry, Nicolas Bertho, Lucile Montagne, Elodie Monchatre-Leroy et Astrid Vabret. Je tiens à remercier également les membres de mon comité de pilotage de thèse, Sophie Lepoder, François Meurens, Virginie Catinot, Edith Authié, Nathalie Pozzi et Erwan Watrin pour leurs conseils et les échanges que nous avons pu avoir.

Je souhaite aussi remercier mes directeurs de thèse, les docteurs Béatrice Grasland, Nicolas Rose et Mustapha Berri, pour leur accueil, leur patience, leur soutien ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont accordé. Je vous remercie aussi pour votre disponibilité et votre aide qui ont permis le bon déroulement de ce projet de thèse. Béatrice et Nicolas, je vous remercie encore de m'avoir soutenue du début à la fin de cette thèse, de m'avoir préparée au concours de l'école doctorale, de m'avoir formée à la mise en place de projets expérimentaux et de m'avoir donné les clés pour pouvoir continuer dans le monde de la recherche. Mustapha, je te remercie pour tous les échanges de connaissances que nous avons pu avoir lors de mes séjours à Nouzilly. Merci pour votre aide à tous dans la préparation des congrès et des articles, vous avez toujours été de bons conseils. Merci à toi Béatrice pour toute la confiance que tu m'as accordée dès mon arrivée en GVB, pour tous les échanges constructifs que nous avons pu avoir lors de nos réunions et de tous les bons moments que nous avons passé pendant ces trois ans.

Je tiens aussi à remercier Mathieu Andraud pour son implication dans ce projet de thèse, sa disponibilité et toute l'aide qu'il a pu m'apporter sur la partie modélisation ainsi que Christelle Fablet pour son expertise et son investissement.

Un grand merci également à toute l'équipe du SPPAE, Frédéric Paboeuf, Angélique Moro, Gérald Ledigueher, Nadège Morin, Audrey Fougeroux, André Keranflech, Jean-Marie Guionnet, sans qui rien de ce projet n'aurait pu être possible. J'ai vraiment apprécié travailler et échanger avec vous lors de nos réunions de préparations d'essais et de mes séjours en animalerie. Vous êtes une super équipe.

Je remercie aussi toutes les personnes des unités GVB et EBEP de l'ANSES et de l'UMR ISP de l'INRA Centre Val de Loire de Nouzilly qui ont participé à ce projet de thèse : Lionel Bigault pour son aide et sa disponibilité lors de ma formation aux différentes techniques lorsque je suis arrivée en GVB

ainsi que pour ses conseils ; Cécilia Bernard pour son accueil, sa gentillesse, sa patience à toutes épreuves, son soutien et ses conseils ; Claire Chevaleyre, Isabelle Fleurot et Sandrine Melo pour leurs accueils chaleureux lors de mes séjours à Nouzilly, leurs soutiens, leurs disponibilités et leurs aides lors de ma formation aux différentes techniques à mon arrivée dans l'équipe IMP ; Christelle Rossignol pour son travail sur la partie histologie/immunohistologie du projet.

Un grand merci à tous mes collègues de l'unité GVB et de l'équipe IMP ; ce fut un réel plaisir de travailler avec vous. Je vous remercie pour votre soutien au cours de ces trois ans de thèse et pour l'accueil que vous m'avez fait. Merci à Yannick Blanchard et Ignacio Caballero-Posadas pour votre accueil dans vos unités respectives, votre soutien et vos conseils sur le plan technique et scientifique. Merci à Claire, Hélène, Daniel, Fabrice, Pierrick, Edouard, Renée, Julie, Laurent et Michel pour votre gentillesse, votre bonne humeur et tous les bons moments que j'ai pu passer avec vous ; Merci à Véronique, Maelan, Aurélie, Françoise pour votre sympathie. Je remercie aussi les anciens de l'unité GVB, Estelle, Marine et Guy, ça a été un plaisir de vous rencontrer lors de cette aventure.

Je remercie aussi tous les doctorants et anciens doctorants de l'ANSES avec lesquels j'ai passé de bons moments. De façon plus générale, je tenais à remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser pendant ces trois ans et qui ont pu me conseiller.

Pour finir, je tiens à remercier du fond du cœur ma famille et mes amis pour leurs encouragements et leurs soutiens. Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue et qui ont rendu tout cela possible. Merci à toi, Ghislain, pour ton amour, ton soutien et ta patience au cours de ces trois ans. Encore un grand merci pour tout !

Préambule

Un syndrome entérique d'allure collective s'est déclaré en novembre 2014 dans un élevage de porcs naisseur-engraisseur du nord de la France. Les porcs étaient diarrhéiques et montraient des signes d'anorexie. Des taux de mortalité d'environ 3,5% et de 25% ont été rapportés dans cet élevage chez les porcs en engraissement et les porcelets en maternité respectivement suite à l'infection. L'analyse des fèces et des organes prélevés sur des animaux morts ont révélé la présence d'un coronavirus, le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) (Grasland et al., 2015b). Depuis les années 1990, aucun cas de PEDV n'avait été enregistré sur le territoire français jusqu'à cette date. Les signes cliniques et les mortalités constatées lors de cette réémergence se sont avérés être moins sévères que ceux observés dans certains cas de diarrhée épidémique porcine (DEP) déclarés la même année sur le continent américain (signes cliniques plus sévères et mortalités des porcelets sous la mère compris entre 80 et 100%). Une étude approfondie de ce virus PEDV réémergent français ainsi qu'une comparaison avec ces virus PEDV américains entraînant une mortalité plus importante a été entreprise dans le cadre de ce travail de thèse.

Liste des abréviations

1/δ : taux de latence	ISG : Interferon Stimulated Genes
3CL : 3C-like protease	LB : Lymphocyte B
3CLSP : 3C-like serine protease	LT : Lymphocyte T
AIF : Apoptosis-inducing factor	MAdCAM-1 : Mucosal addressin cell adhesion molecule-1
APDI : Arrêté préfectoral portant déclaration d'infection	MAPK : MAP kinases
APMS : Arrêté préfectoral de mise sous surveillance	Neu5Ac : Acide N-acétylneuraminique
APRIL : A proliferation-inducing ligand	NF-κB : Nuclear Factor-Kappa B
α4 : alpha 4	NK : Natural Killer
BAFF : B-cell activating factor	nsp : Protéine non-structurale
BCoV : Coronavirus bovin	NTD : N-Terminal domain
β_b : taux de transmission indirect	ORF : Cadre ouvert de lecture
β_w : taux de transmission direct	pAPN : porcine Aminopeptidase N
CCL25 : C-C motif ligand 25	PCV2 : Circovirus porcin de type 2
CCL28 : C-C motif ligand 28	PDCoV : Deltacoronavirus porcin
CCR10 : C-C motif receptor 10	PEDV : Virus de la diarrhée épidémique porcine
CCR9 : C-C motif receptor 9	PLP2 : Papai-Like Protease 2
CIA : Centre d'Insémination Artificielle	PRCV : Coronavirus respiratoire porcin
CoV : Coronavirus	PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
CTD : C-Terminal domain	PRRSV : Virus du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc
DC : Cellules dendritiques	RdRp : ARN polymérase dépendante de l'ARN
DEP : Diarrhée Epidémique Porcine	RhBatCoV-HKU2 : Rhinolophus bat coronavirus HKU2
DGAL : Direction générale de l'alimentation	RLR : RIG-I-like receptors
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	SADS-CoV : Coronavirus du syndrome aigu de diarrhée
EOPS : Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés	Sc-BatCoV-512 : Scotophilus bat coronavirus 512
FIPV : Feline Infectious Peritonitis Virus	SDPP : Plasma de porc séché
HCoV-229E : Human Coronavirus-229E	STING : Simulator of interferon genes
HE : Héماغglutinine-Estérase	TBK1 : TANK-binding kinase 1
ID₅₀ : Dose infectieuse 50	TCID₅₀ : 50% Tissue Culture Infective Dose
IFN : Interféron	TGEV : Virus de la gastroentérite transmissible
Ig : Immunoglobuline	TGF-β : Transforming growth factor beta
IκBα : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor alpha	TLR : Toll-like receptor
IL : Interleukine	TNFα : Tumor necrosis factor alpha
IPMA : Immunoperoxidase sur culture de macrophages	
IRF3 : Interferon Regulatory Factor 3	

Liste des figures

Figure 1 : Analyse phylogénétique de coronavirus montrant la répartition en quatre genres : *Alpha* (Alpha-CoV), *Beta* (Beta-CoV), *Gamma* (Gamma-CoV) et *Delta* (Delta-CoV) coronavirus.

Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation génomique et structurale du PEDV.

Figure 3 : Macrolésions observées en cas d'infection par le PEDV.

Figure 4 : Lésions histo-pathologiques notées lors d'une infection par le PEDV.

Figure 5 : Récapitulatif des épisodes épizootiques de DEP dans le monde avant 2009.

Figure 6 : Nombre de cas de DEP aux Etats-Unis sur la période janvier 2014-février 2018.

Figure 7 : Récapitulatif des épisodes de DEP dans le monde à partir de 2010.

Figure 8 : Analyse phylogénétique des souches de PEDV basée sur la séquence nucléotidique du gène S (A) ou sur les génomes complets (B).

Figure 9 : Modèle SEIR et paramètres de transmission.

Figure 10 : Représentation schématique de la transmission horizontale du PEDV par contact direct et indirect (homme, matériel...).

Introduction



En 2013, 40 ans après le premier cas de diarrhée épidémique porcine (DEP) en Europe, la DEP est apparue aux États-Unis jusqu'alors indemne de cette maladie. Le coronavirus responsable de la maladie, le virus de la DEP (PEDV) s'est rapidement propagé dans tout le pays et dans plusieurs pays d'Amérique entraînant un impact significatif sur la production de porcs (perte de 10 % de la production totale aux États-Unis). Deux types de souches ont été identifiés: des souches hautement virulentes dites « S-non-InDel », et des souches dites « S-InDel » présentant des insertions/délétions dans le gène S. L'infection par le PEDV provoque l'apparition de diarrhées aqueuses et peut entraîner jusqu'à 100 % de mortalité chez les porcelets de moins de 10 jours d'âge. Cette synthèse bibliographique fait le bilan des connaissances actuelles sur les caractéristiques virales du PEDV, la physiopathogénie de ce virus, l'épidémiologie de ce pathogène et les moyens de lutte qui lui sont associés.

1. Le virus de la diarrhée épidémique porcine, le PEDV

1.1. Un coronavirus

Le PEDV est un pathogène entérique appartenant à l'ordre des *Nidovirales* et à la famille des *Coronaviridae* (Masters, 2006). Les coronavirus ont été décrits pour la première fois au milieu des années 1960 et ont été isolés par la suite chez plusieurs espèces incluant l'Homme, la souris, le porc et le poulet (Masters P and Perlman S, 2013). Ils sont la cause de maladies respiratoires, entériques mais aussi neurologiques et hépatiques majeures chez de nombreux animaux et chez l'Homme (Gerdtz and Zakhartchouk, 2017). Les coronavirus sont divisés en deux sous-familles, les *Coronavirinae* et les *Torovirinae*. La sous-famille des *Coronavirinae* est, elle-même, divisée en quatre genres : les *Alphacoronavirus*, les *Betacoronavirus*, les *Gammacoronavirus* et les *Deltacoronavirus*. Chez le porc, six coronavirus ont été identifiés dont quatre *Alphacoronavirus* : le virus de la gastroentérite transmissible (TGEV), le coronavirus respiratoire porcin (PRCV) qui est un mutant du TGEV, le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) et le coronavirus du syndrome aigu de diarrhée (SADS-CoV) ; un *Betacoronavirus* : le virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine ou virus de la maladie du vomissement et du dépérissement (PHEV) et un *Deltacoronavirus* : le deltacoronavirus porcin (PDCoV) (Li et al., 2014a, Stevenson et al., 2013, Marthaler et al., 2014, Marthaler et al., 2013, Laude et al., 1998, Zhou et al., 2018) (Figure 1).

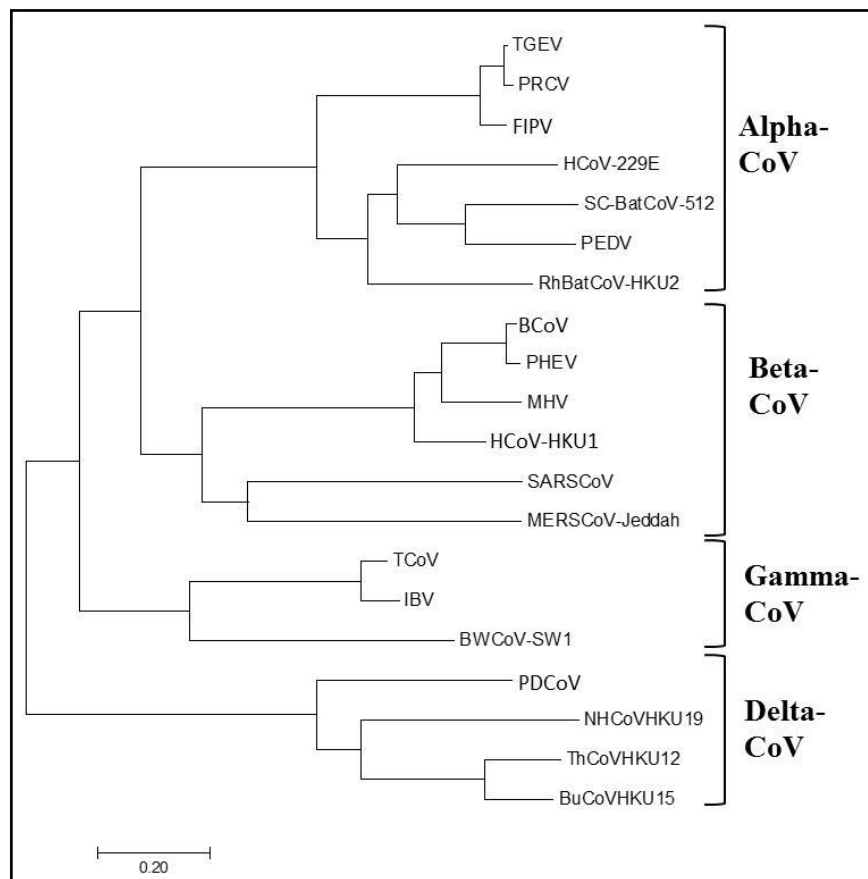


Figure 1: Analyse phylogénétique de coronavirus montrant la répartition en quatre genres : *Alpha* (Alpha-CoV), *Beta* (Beta-CoV), *Gamma* (Gamma-CoV) et *Delta* (Delta-CoV) coronavirus. Les alignements des séquences ont été réalisés par le programme Muscle et les arbres phylogénétiques en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel MEGA7. Les noms et identifiants Genbank (GB) des coronavirus utilisés pour construire l'arbre sont indiqués ci-après : Alphacoronavirus : Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV, GB : NC_003436.1), *Feline infectious peritonitis virus* (FIPV, GB : AY994055), *Scotophilus bat coronavirus 512* (Sc-BatCoV-512, GB : NC_009657.1), *Porcine respiratory coronavirus* (PRCV, GB : DQ811787), *Rhinolophus bat coronavirus HKU2* (RhBatCoV-HKU2, GB : EF203064), *Human coronavirus-229E* (HCoV-229E, GB : NC_002645), *Porcine transmissible gastro-enteritis virus* (TGEV, GB : DQ811789) (Gallien et al., 2016)

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. La principale caractéristique de cette famille est la taille de son génome comprise entre 25,4 et 31,7 kb. Ces virus sont les plus grands virus à ARN connus. Leurs génomes ne sont pas segmentés et possèdent tous la même organisation. Le premier cadre de lecture ouvert (ORF) occupe les deux premiers tiers du génome et code pour les différentes protéines permettant la réplication et la transcription du génome dont l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp). Le dernier tiers du génome comprend les gènes des protéines de structure toujours dans le même ordre : la protéine

Hémagglutinine-Estérase (HE), quand elle est présente, puis les protéines S-E-M et N. Entre ces gènes, d'autres cadres de lecture peuvent être présents et codent pour des protéines dites accessoires. La localisation génomique et le nombre de gènes accessoires varient d'une espèce virale de coronavirus à l'autre. L'enveloppe des coronavirus contient trois ou quatre protéines virales : les protéines S, M, E et parfois la protéine HE chez certains coronavirus (*Betacoronavirus*). La plus importante de ces protéines est la glycoprotéine S qui permet la reconnaissance entre la particule virale et la cellule hôte ainsi que la fusion du virion avec la membrane de cette dernière. La glycoprotéine M est, quant à elle, le composant le plus abondant des particules virales et donne sa forme à l'enveloppe du virion. La protéine E est un petit polypeptide de 8,4-12 kDa soit 76-109 acides aminés. Elle correspond aussi au composant minoritaire des virions. La protéine HE interagit avec différents types d'acide sialique et possède une activité acétyl-estérase qui élimine les groupes acétyle des O-acétylé de l'acide sialique. Ainsi, elle pourrait à la fois avoir un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule hôte et favoriser la libération des virions néoformés en détruisant le récepteur viral. La protéine de nucléocapside ou protéine N se lie à l'ARN des virions et fournit une base structurale à la nucléocapside hélicoïdale (Masters, 2006).

1.2. Structure et organisation du génome du PEDV

Le PEDV est un virus enveloppé d'un diamètre compris entre 95 et 190 nm et possède un génome à ARN positif simple brin d'environ 28 kb avec une coiffe en 5' et une queue polyadénylée en 3' (Grasland et al., 2015a). Le génome comprend une région non traduite (UTR pour *UnTranslated Region*) en 5' et en 3' et 7 ORF qui codent pour les quatre protéines structurales, les protéines S, E, M, et N, et 16 protéines non structurales du complexe de réplication/transcription codées par l'ORF1a/b (nsp 1 à nsp 16) et l'ORF3 codant une unique protéine accessoire dont la fonction pourrait être un canal ionique favorisant l'export de nouveaux virions formés (Figure 2). L'organisation du génome est la suivante : 5'-ORF1a/1b-S-ORF3-E-M-N-3'. Les protéines S, E, M et N ont un poids moléculaire respectivement de 150 à 200 kDa, 7 kDa, 20 à 30 kDa et 58 kDa. La protéine S ou protéine de spicule, est une glycoprotéine de type I composée de 1 383 acides aminés. Elle contient un peptide de signal pour le clivage par des protéases cellulaires (acides aminés 1 à 18), des épitopes de neutralisation en positions 499 à 638, 748 à 755, 764 à 771 et 1 368 à 1 374 ; et un court domaine cytoplasmique. Cette protéine peut être divisée en deux domaines : un premier domaine S1 allant du 1^{er} au 789^{ème} acide aminé et un deuxième domaine S2 allant du 790^{ème} au 1 383^{ème} acide aminé. Cette protéine de spicule permet la régulation des interactions avec les récepteurs glycoprotéiques des cellules hôtes spécifiques du PEDV, les entérocytes, permettant ainsi l'entrée du virus dans ces cellules (Jung and Saif, 2015, Song and Park, 2012, Wang et al., 2012a). Cette protéine est aussi la cible des anticorps neutralisants et est associée à une adaptation de la croissance *in vitro* du PEDV

ainsi qu'à une atténuation de la virulence du virus *in vivo* (Lawrence et al., 2014). La protéine M, protéine de membrane, joue un rôle important dans l'assemblage du PEDV en interagissant avec les protéines S et N. Elle induit aussi la production des anticorps qui neutralisent le virus en présence du complément et elle joue un rôle dans l'induction de l'interféron α (IFN α). La protéine de nucléocapside (N) lie l'ARN dans la nucléocapside. Les épitopes de cette protéine pourraient être importants pour stimuler l'immunité à médiation cellulaire (Jung and Saif, 2015, Song and Park, 2012, Wang et al., 2012a). La protéine E est une petite protéine transmembranaire jouant un rôle central dans l'assemblage des virions en incitant la courbure ou en aidant la scission de la membrane (Fischer et al., 1998, Song and Park, 2012).

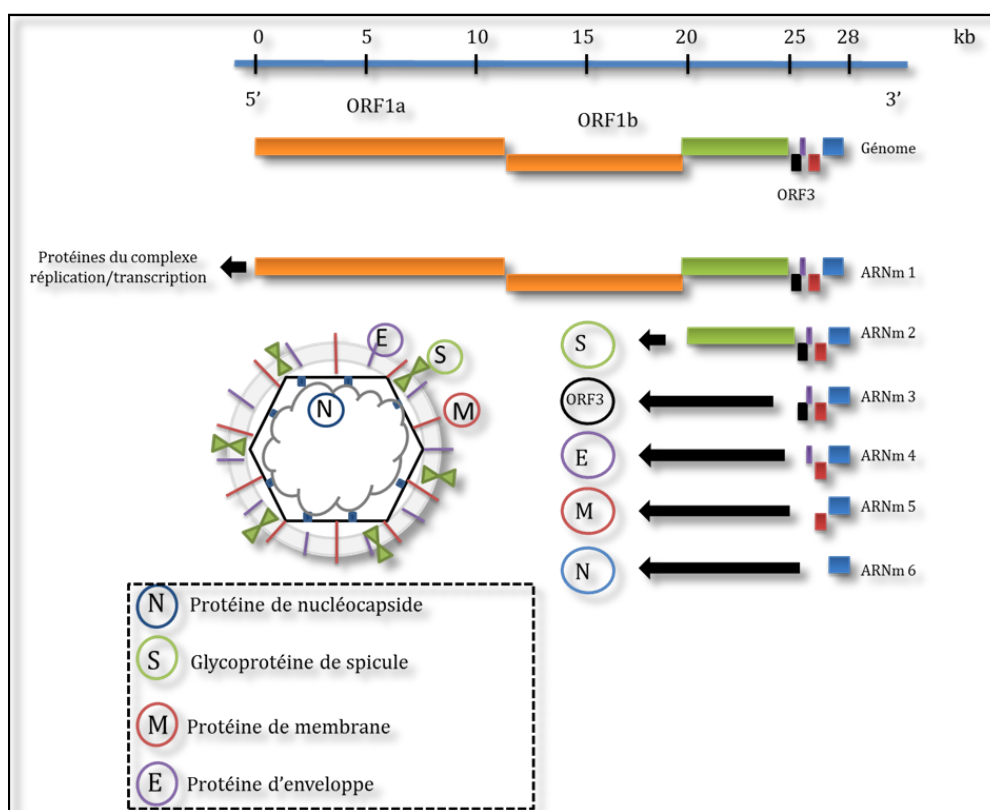


Figure 2: Représentation schématique de l'organisation génomique et structurale du PEDV

(Gallien et al., 2016)

1.3. Réplication

L'infection des cellules cibles par les coronavirus est initiée par l'attachement de la particule virale à la cellule cible. Cet attachement est initié par la protéine S. La liaison de cette protéine S au récepteur cellulaire cible entraîne un changement de conformation de cette dernière. Dans certains cas, l'induction de ce changement de conformation nécessite un pH acide. Une étape de fusion membranaire va suivre cette étape d'attachement spécifique. Après la formation du complexe de réplication/transcription, la polymérase virale RdRP va utiliser le génome viral comme matrice pour

la synthèse de nouveaux génomes et d'un ensemble d'ARN sub-génomiques (Figure 2). Les ARN sub-génomiques seront, par la suite, traduits en protéines structurales, protéines S, E, M et N, et en protéines accessoires. Les protéines S, E et M produites seront ensuite insérées dans le réticulum endoplasmique et transiteront par le compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique granulaire. Les nucléocapsides vont être formées par la protéine N afin de permettre l'encapsidation des nouveaux génomes produits. Puis, par bourgeonnement dans le compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique granulaire, les protéines S, E et M s'associent avec les nucléocapsides pour former les virions de nouvelle génération. Finalement, les virions seront exportés des cellules infectées par le transport vésiculaire d'exocytose (Masters, 2006). Le PEDV va pouvoir utiliser des régulateurs de l'autophagie dans le cadre de sa réplication (Guo et al., 2017).

1.4. Récepteurs et facteurs d'entrée du virus

Le virus de la DEP utilise majoritairement le récepteur pAPN (porcine aminopeptidase N) et son corécepteur, l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac), pour entrer dans les cellules cibles. Le récepteur pAPN est aussi connu sous le nom de CD13. Ce récepteur est une métalloprotéinase membranaire monomérique ou dimérique de type II zinc-dépendante de 150 kDa. Il est exprimé majoritairement à la surface des cellules épithéliales des reins, de l'intestin (8 % des protéines totales de la membrane), des hépatocytes, des ostéoblastes, des cellules endométriales, des cellules stromales de la moelle osseuse et sur les membranes des neurones synaptiques (Jung and Saif, 2015, Nam and Lee, 2010, Liu et al., 2015, Mou et al., 2009). Ce récepteur possède sept domaines (domaines I à VII). Le premier domaine est constitué d'une courte queue cytoplasmique en N terminal, le deuxième domaine est un segment transmembranaire liant le troisième domaine. L'activité peptidase du récepteur est permise par les domaines V et VI. Le dernier domaine, le domaine VII est localisé en C-terminal (Sjostrom et al., 2000). L'entrée du PEDV se fait en plusieurs étapes, la protéine S, et plus particulièrement sa sous-unité S1, va reconnaître de façon spécifique le récepteur pAPN et une combinaison irréversible avec le domaine fonctionnel va être établie. Cette combinaison irréversible est suivie d'une étape de fusion membranaire permise par la sous-unité S2 de la protéine S (Jung and Saif, 2015, Shan et al., 2015). L'interaction du PEDV avec le récepteur pAPN va être majoritairement localisée au niveau du domaine VII du récepteur (Kamau et al., 2017). Liu *et al.*, (2015) ont montré que les sucres ou des analogues des sucres pourraient servir de substances antivirales pour bloquer l'infection par le PEDV en s'attachant aux corécepteurs Neu5Ac. La sous-unité S1 de la protéine S, composée de deux domaines NTD (*N-Terminal Domain*) et CTD (*C-Terminal Domain*), pourrait aussi servir à la fabrication d'un vaccin afin de neutraliser l'infection par le PEDV. En effet, les anticorps monoclonaux dirigés contre ces fragments pourraient servir d'agents

immunothérapeutiques en bloquant l'attachement du PEDV au récepteur pAPN et au corécepteur Neu5Ac (Liu et al., 2015).

1.5. Propriétés biologiques et physico-chimiques

Le PEDV est relativement stable dans une gamme de température comprise entre 4 et 50°C et dans une gamme de pH allant de 6,5 à 7,5 à une température de 37°C et allant de pH 5 à 9 à une température de 4°C (Jung and Saif, 2015). Il est sensible à certains désinfectants comme les produits contenant du phénol, du peroxyde d'hydrogène, du chlore, de l'ammonium quaternaire ou du glutaraldéhyde (Jung and Saif, 2015) ainsi qu'à certaines combinaisons bien précises de température et de temps permettant son inactivation. Il est notamment capable de survivre pendant au moins 10 minutes à 71°C ou 7 jours à 20°C (OIE).

1.6. Culture cellulaire *in vitro*

La culture cellulaire du PEDV peut être réalisée sur cellules Vero (cellules de rein de singe vert africain) et sur cellules MARC-145 (une autre lignée de cellules de rein de singe vert africain) (Jung and Saif, 2015). Elle déclenche des mutations dans la séquence de la protéine S (Lawrence et al., 2014) et nécessite l'utilisation d'une protéase exogène telle que la trypsine. Cette dernière permet le clivage du récepteur protéique du virus avant la fusion membranaire et la translocation dans la cellule (Utiger et al., 1995). La dépendance à la trypsine du PEDV *in vitro* est cohérente avec le tropisme tissulaire du virus pour le petit intestin qui est riche en trypsine chez le porc. Quelques souches de PEDV adaptées en culture cellulaire perdent leur dépendance à la trypsine (Nam and Lee, 2010, Wicht et al., 2014). Le PEDV peut aussi utiliser l'héparane-sulfate pour se lier aux cellules Vero (Huan et al., 2015).

1.7. Détection et quantification du PEDV

Le diagnostic de la DEP est confirmé par la détection du PEDV. Ceci peut être réalisé via l'utilisation de différentes méthodes telles que la microscopie électronique, la RT-PCR et l'immunohistochimie couplée à de l'histopathologie (Geiger and Connor, 2013, Jung and Saif, 2015). Le diagnostic de la DEP peut aussi être effectué via la détection des anticorps spécifiques dirigés contre le PEDV. Les anticorps dirigés contre le virus peuvent être détectés par IPMA (immunoperoxidase monolayer assay), par immunofluorescence, par l'utilisation de tests de neutralisation virale ou par l'utilisation de méthodes immuno-enzymatique (ELISA). Les tests ELISA présentent certains avantages tels que la rentabilité et la mise en œuvre simple et rapide offrant un rendement élevé. Différents tests ELISA ont été développés. Des réactions croisées ont été observées entre la souche Miller de TGEV et différentes souches de PEDV (la souche virulente « S-non-InDel »

originale PC22A isolée aux États-Unis, la souche « S-InDel » Iowa 106 isolée aux États-Unis, la souche américaine présentant une délétion de 197 acides aminés dans la protéine S (S197delPC177) et la souche ancienne européenne de référence CV777). En effet, les antigènes du PEDV peuvent être détectés non seulement en utilisant les antisérums de porcs obtenus avec le PEDV mais aussi en utilisant l'antisérum hyperimmunisé obtenu avec la souche Miller du TGEV. Ces réactions croisées sont dues au fait que ces souches de PEDV et celle de Miller de TGEV partagent au moins un épitope conservé sur la région N-terminale de leurs protéines N. La réaction croisée doit donc être prise en compte lors du développement du dosage par la méthode immuno-sérologique et de l'interprétation des résultats (Jung and Saif, 2015, Lin et al., 2015). Gerber et al., (2014) ont validé un test ELISA indirect anti-immunoglobuline G pour le PEDV basé sur la partie S1 de la protéine S ayant une sensibilité et une spécificité de 86,2% et 91,6% respectivement (Gerber et al., 2016). Depuis de nombreux tests ELISA (indirects, par compétition) ont été évalués et permettent de détecter des anticorps anti PEDV avec une bonne performance (Gerber et al., 2016, Strandbygaard et al., 2016).

2. Physiopathogénie de la diarrhée épidémique porcine et mise en place de la réponse immunitaire

De nombreuses conséquences de l'infection par le PEDV à l'échelle de l'organisme, de l'organe et de la cellule chez les porcs ont pu être démontrées. Son tropisme cellulaire ainsi que sa dose minimale infectante ont aussi pu être déterminés.

2.1. Tropisme cellulaire et dose minimale infectante

Les cellules cibles du PEDV sont les entérocytes. Les entérocytes dans les villosités expriment en grande quantité le récepteur pAPN, récepteur majoritairement utilisé par le PEDV qui lui favorise l'accès à ces cellules (Jung and Saif, 2015). Le PEDV commence à se répliquer dans le cytoplasme des entérocytes matures entre 12h et 18h post-infection. Le maximum de réplication dans les entérocytes va être observé entre 48h et 72h post-infection (Madson et al., 2014). Cette réplication virale va provoquer une atrophie marquée des villosités dans l'intestin grêle. Le PEDV peut aussi se répliquer dans les voies respiratoires et plus spécifiquement dans les macrophages alvéolaires des poumons (Jung and Saif, 2015). Il a aussi été montré que le PEDV infectait les cellules caliciformes intestinales connues pour sécréter des mucines permettant la formation des couches de mucus nécessaires au maintien de l'intégrité intestinale (Jung and Saif, 2017).

La dose minimale infectieuse du PEDV est relativement faible. Elle a été déterminée pour des animaux de différents âges avec une souche de PEDV hautement pathogène. Chez des porcelets de 5 jours d'âge, la dose infectieuse 50 (ID₅₀) trouvée est de 0,056 TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose)/ml soit 1000 fois plus faible que chez des porcelets âgés de 3 semaines, à savoir 56 TCID₅₀/ml.

Les porcelets nouveaux nés sont donc plus sensibles à l'infection par le PEDV que des porcs plus âgés (Thomas et al., 2015).

2.2. Signes cliniques et lésions des tissus digestifs

2.2.1. Signes cliniques

Des différences cliniques en réponse à l'infection par le PEDV apparaissent en fonction de l'âge de l'animal, et de la pathogénicité de la souche de PEDV (Crawford et al., 2015). Dans une population naïve, les porcs sont atteints de fortes diarrhées aqueuses et de vomissements. Une perte d'appétit va apparaître quel que soit l'âge de l'animal et la morbidité peut atteindre les 100 % (Geiger and Connor, 2013). La diarrhée induite par le PEDV est une conséquence de la malabsorption due à une perte massive des entérocytes. Les entérocytes infectés ont des problèmes de fonctionnement qui contribuent à une malabsorption et donc à l'apparition de diarrhées. Dans les entérocytes infectés, l'observation en microscopie électronique révèle une perte de densité dans le cytoplasme cellulaire et une rapide dégénérescence des mitochondries qui aboutit à un manque de transport d'énergie nécessaire à l'absorption (Ducatelle et al., 1981). Les porcelets sous la mère présentent les signes cliniques de la DEP dès 24 à 48 h après l'infection persistant jusqu'à la mort de l'animal, soit 3 à 4 jours après l'infection (Grasland et al., 2015a). La sévérité de la maladie est plus importante chez les porcelets nouveaux nés du fait que leur système immunitaire est encore immature et qu'ils sont plus vulnérables à la déshydratation et au déséquilibre hydro-électrolytique. Le remplacement des entérocytes dans les villosités est aussi plus lent chez les porcelets nouveaux nés (7 à 10 jours) que chez les porcelets sevrés (2 à 4 jours) (Thomas et al., 2015). La mortalité chez ces porcelets peut atteindre les 100 % en cas de souche hyper virulente. Les porcs en atelier post-sevrage et en engraissement ainsi que les animaux du troupeau reproducteur (verrats, truies et cochettes) présentent généralement des diarrhées modérées avec ou sans vomissement (Crawford et al., 2015, Grasland et al., 2015a). Ils peuvent aussi présenter des signes d'anorexie. Une forte morbidité est observée chez ces animaux mais la mortalité reste faible (1 à 3 %) (Geiger and Connor, 2013). Ils guérissent une semaine après l'apparition des symptômes (Grasland et al., 2015a). Chez les truies et les cochettes, l'infection par le PEDV va influencer leurs performances de reproduction (Olanratmanee et al., 2010). Les signes cliniques de la DEP peuvent être confondus avec ceux provoqués par de nombreux autres agents pathogènes viraux à tropisme digestif tels que le TGEV ou le rotavirus (Chasey and Cartwright, 1978, Pensaert and de Bouk, 1978, Li et al., 2014b).

2.2.2. Lésions

Les lésions macroscopiques et microscopiques associées à l'infection par le PEDV sont similaires à celles entraînées lors de l'infection par le TGEV (Madson et al., 2014). De sévères

atrophies des muqueuses concentrées au niveau de l'intestin grêle sont observées. La paroi intestinale devient fine et transparente laissant apparaître un contenu luminal jaunâtre et aqueux (Figure 3) (Stevenson et al., 2013).

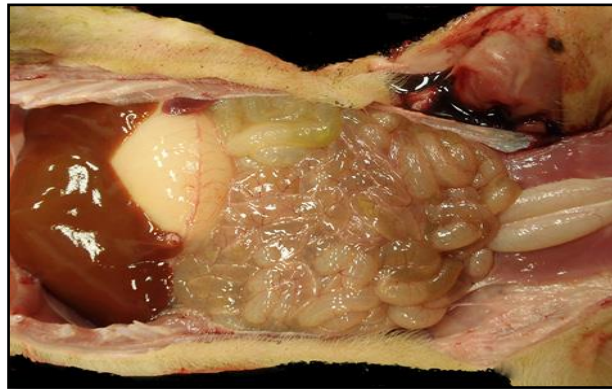


Figure 3 : Macrolésions observées en cas d'infection par le PEDV (Stevenson et al., 2013)

Les cellules épithéliales infectées par le PEDV vont présenter des changements morphologiques. Après l'apparition des premiers symptômes chez de jeunes porcelets infectés par la souche CV777, soit 6 h après l'infection, les entérocytes du jéjunum présentent un faible nombre de ribosomes libres dans le cytoplasme et peu de réticulum endoplasmique. Les citernes de réticulum sont souvent dilatées et les mitochondries présentent une forme arrondie et des crêtes mitochondriales déformées. Lorsque les cellules sont plus sévèrement affectées, le cytoplasme est très peu chargé et possède de larges vacuoles distendues de réticulum endoplasmique lisse, un appareil de Golgi multi stratifié, un noyau pâle, rond et central ainsi que des mitochondries gonflées. Les membranes cellulaires sont parfois dissociées. La cellule perd sa forme et, parfois, les jonctions tripartites perdent contact et la cellule est libérée de l'épithélium dans la lumière intestinale. Ces cellules vont aussi présenter des microvillosités courtes et irrégulières avec des plateaux terminaux fragmentés (Figure 4). Différents types de cellules anormales couvrant les villosités apparaissent 12 h et 24 h après l'apparition des premiers symptômes. Le premier type cellulaire contient des particules virales et est morphologiquement identique aux cellules infectées dégénérantes. Le deuxième type cellulaire possède, quant à lui, une forme de colonne et des microvillosités irrégulières avec un plateau terminal incomplet. Ces cellules sont riches en gouttelettes lipidiques et ne présentent pas de particules virales (Coussement et al., 1982).

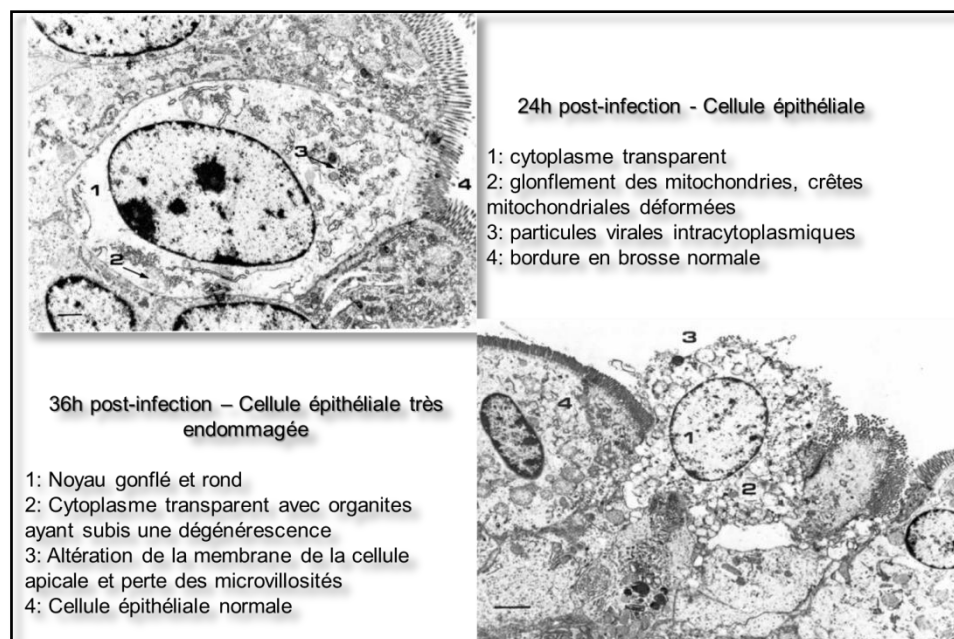


Figure 4 : Lésions histo-pathologiques notées lors d’une infection par le PEDV

(Ducatelle et al., 1982)

L’infection par le PEDV va aussi affecter la réorganisation des microfilaments dans les cellules épithéliales et l’organisation des jonctions tripartites. Le PEDV va impacter la voie des MAP kinases (MAPK) qui régule les changements des jonctions serrées et microfilaments des cellules en régulant négativement certaines protéines des jonctions serrées et des jonctions d’ancrage (Zhao et al., 2014). La distribution des occludines présentes dans les jonctions serrées va notamment être perturbée (Luo et al., 2017). L’altération des jonctions serrées et d’ancrage résultant de l’infection par le PEDV va pouvoir entraîner la formation d’une brèche dans la barrière épithéliale et permettre au PEDV d’atteindre la matrice extracellulaire et finalement la circulation systémique (Jung and Saif, 2015).

Les cellules caliciformes intestinales sont elles aussi sujettes à l’infection par le PEDV. La perte ou le dysfonctionnement de ces cellules va perturber le maintien de l’homéostasie intestinale et l’intégrité de l’épithélium intestinal via la perturbation de la sécrétion des mucines impliquées dans la formation du mucus protégeant l’intestin (McCauley and Guasch, 2015). L’infection par le PEDV provoque une réduction significative du nombre de cellules caliciformes au niveau intestinal chez les porcelets infectés sevrés ou sous la mère. Il en découle une réduction de la quantité de mucines dans le petit intestin. La diminution de ces cellules caliciformes et des mucines produites pourrait augmenter la sensibilité à des infections bactériennes ou virales entériques secondaires. La sévérité de la DEP pourrait donc être augmentée par ces co-infections secondaires (Jung and Saif, 2017).

2.3. Mise en place de la réponse immunitaire suite à l'infection par le PEDV

2.3.1. La réponse immunitaire innée

La détection du PEDV par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) va entraîner l'initiation de la réponse immunitaire innée antivirale. Deux types majoritaires de PRR pour la reconnaissance des virus à ARN existent : les « Toll-like receptor » (TLR) et les « RIG-I-like receptors » (RLR) (Thompson and Locarnini, 2007). L'interaction d'un agent viral avec ces récepteurs va générer une signalisation qui résulte en une réponse interféron (IFN) de type I et/ou la production de cytokines pro-inflammatoires (Thompson and Locarnini, 2007). Il a été montré que pour une souche « S-InDel » de PEDV, une activation de l'expression des ARNm de RIG-I, de TLR3, TLR4 et TLR7 et, au contraire lors d'une infection par une souche « S-non-InDel » de PEDV, une répression des TLR4, TLR7, TLR8 et TLR9. L'activation et la répression de l'expression de ces ARNm vont entraîner respectivement une augmentation du niveau d'expression de TNF (Tumor Necrosis Factor) α ou une atténuation de l'expression de TNF α et d'IFN α (Temeeyasen et al., 2017). Un pic d'IFN α va être observé au moment de l'apparition des signes cliniques de la DEP et de l'excrétion du PEDV dans les fèces. Ce pic d'IFN α coïncide avec un pic d'ARN viral observé dans les sérums titrés des porcs infectés (Annamalai et al., 2015). *Zhang et al., (2016)* ont démontré que la production d'IFN β était significativement supprimée au cours de l'infection par le PEDV. Cette équipe a aussi montré que 16 protéines non-structurales du PEDV inhibaient les activités du promoteur d'IFN β ainsi que celles du promoteur d'IRF3 impliqué dans la production d'IFN de type I. La protéine non-structurale virale, nsp1, interrompt l'assemblage de l'« enhanceosome » d'IRF3 et de la « CREB-binding protein » (CBP) en dégradant CBP. Les protéines N, E, M et l'ORF3 montrent aussi une activité inhibitrice sur la production d'IFN β (Zhang et al., 2016). La protéine N du PEDV joue aussi un rôle sur l'activité IRF3. Elle agit aussi sur « TANK-binding kinase 1 » (TBK1) qui permet la coordination de l'activation d'IRF3 et de « NF-Kappa-B-Activating Kinase » (NF- κ B) en inhibant l'interaction entre IRF3 et « TANK-binding kinase 1 » (TBK1), étape critique pour la phosphorylation et l'activation d'IRF3 et donc pour la production d'IFN de type I. La protéine N va, en effet, interagir avec TBK1 empêchant ainsi le recrutement d'IRF3 par TBK1 (Ding et al., 2014). L'infection par le PEDV va aussi supprimer l'induction de l'expression de gènes stimulés par l'IFN ou « Interferon Stimulated Genes » (ISG) par l'IFN β (Zhang et al., 2016). La suppression de l'expression de ces gènes va impacter la capacité des cellules proches des cellules infectées par le virus à établir un statut antiviral (Schindler et al., 2007). Par contre, la protéine N du PEDV n'inhibe pas l'induction de l'expression d'ISG par l'IFN α (Ding et al., 2014). L'activité de l'interféron peut aussi être perturbée par la protéine non-structurale « Papai-Like Protease 2 » (PLP2) codée par l'ORF1a. PLP2 va agir comme une désubiquitinase virale en interférant avec les voies de signalisation médiées par RIG-I et STING (Xing et al., 2013). L'activation de l'« IFN- β

promoteur stimulator 1 » (IPS-1) va aussi être bloquée après infection par le PEDV entraînant une inhibition de la voie RIG-I (Cao et al., 2015a).

Les cellules immunitaires recrutées dans la mise en place de la réponse immunitaire innée, telles que les cellules Natural-Killer (NK) et les cellules dendritiques (DC), vont aussi être affectées par l'infection de l'organisme par le PEDV comme décrit ci-après.

Les cellules NK ont un rôle prépondérant dans la contention de l'infection virale (Vivier et al., 2008). Elles ont une action cytolytique dirigée contre les virus infectant les cellules hôtes (Campbell and Hasegawa, 2013) et produisent certaines cytokines telle qu'IFN γ , qui contribue à l'activation des macrophages. Les cellules NK vont aussi avoir un rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative via leurs communications avec les DC (Shekhar and Yang, 2015). L'infection par le PEDV va diminuer la fréquence de cellules NK produisant de l'IFN γ et leurs propriétés lytiques chez les porcelets sous la mère (Annamalai et al., 2015, Wang et al., 2012b).

Le PEDV va aussi jouer un rôle dans l'activation ou l'inhibition de certains facteurs de transcription tel que NF- κ B, connu pour être impliqué dans la régulation de la transcription de cytokines et de chimiokines et, par conséquent, la régulation des réponses immunitaires de l'hôte (Schutyser et al., 2003, Cao et al., 2015b). L'activité de NF- κ B dans les cellules épithéliales de l'intestin semble être dépendante de la dose et de la réplication du virus. En effet, une souche non atténuée du virus va activer de façon plus intense cette voie comparativement à une souche atténuée telle que la souche vaccinale CV777 (Guo et al., 2015). Pendant l'infection par le PEDV, l'homodimère NF- κ B composé par les protéines p65 migre vers le noyau. Une accumulation de NF- κ B p65 a été observée dans le noyau 12h après l'infection. Une augmentation de la présence de NF- κ B p65 est aussi révélée à 36h et 48h post-infection dans le noyau. Les récepteurs TLR2, TLR3 et TLR9 vont contribuer à l'activation de la voie NF- κ B en réponse à l'infection par le PEDV (Cao et al., 2015b). Des études récentes ont montré que des composants du virus tels que la partie centrale de la protéine N était importante pour stimuler spécifiquement l'activation de NF- κ B. Cette activation était dépendante de la présence du récepteur TLR2 sur les cellules épithéliales intestinales (Cao et al., 2015b). Par ailleurs, des essais *in vitro* ont montré que l'expression stable de la protéine E dans les cellules épithéliales intestinales activait aussi la voie de signalisation NF- κ B (Xu et al., 2013a). En revanche, une autre étude plus récente a montré que le PEDV pouvait inhiber NF- κ B via sa protéine non structurale, nsp 1. Cette dernière est capable d'interférer avec la phosphorylation et la dégradation d'I κ B α , de bloquer l'activation de NF- κ B p65 et de supprimer les IFN de type I (Zhang et al., 2017b).

2.3.2. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative intestinale va être induite après un premier contact entre l'antigène et les cellules dendritiques. Ces dernières vont intercepter l'antigène puis elles vont migrer dans des sites inducteurs de la réponse immunitaire tels que les ganglions lymphoïdes mésentériques. Arrivées dans les ganglions lymphoïdes mésentériques, ces cellules vont activer les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT). Après leur activation, les LB et les LT vont proliférer, se différencier et sortir des ganglions lymphoïdes mésentériques via la lymphe pour être drainés dans la cavité abdominale et entrer dans la circulation. Le porc possède des ganglions lymphatiques inversés, la migration dans le tissu ganglionnaire a donc lieu via les vaisseaux lymphatiques afférents ou via les veinules post-capillaires. Une fois arrivée dans la circulation, la majorité des lymphocytes activés naïfs migre au niveau des sites dits effecteurs où l'antigène a été initialement détecté grâce à l'action des adhésines vasculaires et des chimiokines (Wilson and Obradovic, 2015). Certains LB vont se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps (ASC pour Antibody Secreting Cells) et vont produire des immunoglobulines A, G et M (Habtezion et al., 2016). Les plaques de Peyer sont les principaux organes lymphoïdes secondaires où les LB naïfs vont se différencier en ASC à IgA (Mora and von Andrian, 2008). Les ASC à IgA sont initialement des ASC à IgM/IgD, ces ASC vont subir un switch ou commutation de classe d'immunoglobuline. Le switch de classe est un processus au cours duquel les ASC qui exprimaient les IgM/ IgD acquièrent l'expression des IgA. Ce switch de classe peut se faire à la fois via la voie T dépendante, une voie dépendante de la présence de l'antigène, ou via la voie T indépendante, une voie qui est cette fois-ci dépendante de la présence cytokines (Cerutti, 2008b). Les ASC à IgA vont ensuite migrer préférentiellement dans l'intestin du fait de la présence d'antigènes spécifiques dans ce tissu. Ils vont s'accumuler dans l'intestin et plus particulièrement dans la lamina propria. L'adressage des ASC à IgA dans l'intestin passe notamment par l'interaction entre l'adhésine vasculaire MAdCAM-1 et son récepteur lymphocytaire $\alpha 4\beta 7$. L'adressage des ASC à IgA dans l'intestin grêle va aussi être dépendant de la présence des chimiokines CCL25 et de CCL28 pour l'adressage dans la lamina propria du colon. En effet, les ASC à IgA présentent à leur surface les récepteurs de CCL25 et de CCL28 soient CCR9 et CCR10. L'adressage des ASC à IgA dans la lamina propria intestinale donne lieu à la libération locale d'IgA dimériques qui vont se lier aux récepteurs pIgR exprimés sur les cellules épithéliales intestinales pour ensuite être libérées dans la lumière intestinale (Cerutti, 2008a, Mora and von Andrian, 2008). Dans la muqueuse intestinale, les ASC à IgA ont une demi-vie courte et leur formation dépendra à la fois des lymphocytes B naïfs récemment activés et les lymphocytes B mémoires (Mora and von Andrian, 2008).

Les IgA anti-PEDV sont retrouvées au niveau intestinal à partir du 21^{ème} jour suivant l'inoculation. Une réponse IgA et IgG anti-PEDV par les ASC (IgA-ASC ou IgG-ASC) apparaît dès le 21^e jour post-infection dans le tissu lymphoïde intestinal. Dans le sang, la présence des IgA et des IgG

anti-PEDV a été notée bien en amont, entre le 12^e et le 15^e jour post-infection et augmente pour atteindre une quantité maximale aux 21^e et 32^e jours post-infection respectivement pour les IgA et les IgG. De plus, les ASC à IgA ont été détectées par la technique d'ELISPOT de façon constante à partir du 14^e jour post-infection (de Arriba et al., 2002a). Par ailleurs, des réponses prolifératives des lymphocytes ont été détectées chez des porcelets ayant été inoculés avec la souche virulente entre le 4^e et le 21^e jour post-infection dans les ganglions lymphatiques mésentériques et dans le sang. Une réponse faible et moins régulière a été observée dans la rate. La prolifération lymphocytaire la plus importante correspond à celle des cellules mononucléaires des ganglions mésentériques lymphatiques. Les porcelets inoculés avec la souche CV777 présentent une réponse proliférative des lymphocytes moins importante que les porcelets inoculés avec la souche virulente (de Arriba et al., 2002b).

Le PEDV va aussi affecter la réponse immunitaire adaptative via des interactions avec les cellules dendritiques. Des essais *in vitro* ont montré que la souche PEDV CV777 induisait une stimulation de la réponse cellulaire T et une interaction du virus avec les cellules dendritiques dérivées de monocytes. A 48h post-infection, *in vivo*, le virus PEDV induisait une augmentation de la capacité des cellules dendritiques intestinales à échantillonner et à présenter l'antigène entraînant ainsi la prolifération des lymphocytes T et une stimulation de la réponse immunitaire. Par ailleurs, la capacité des cellules dendritiques à migrer vers les tissus cibles infectés est aussi augmentée lors de l'infection par le PEDV. La souche CV777 permettrait donc de développer la réponse immunitaire adaptative et serait donc un bon candidat vaccin (Gao et al., 2015).

2.4. PEDV et apoptose

Le PEDV va aussi affecter le mécanisme de la mort cellulaire par apoptose. Lors de l'infection par le PEDV, le facteur induisant l'apoptose mitochondriale (AIF) migre vers le noyau engendrant une apoptose d'origine virale. Cette apoptose pourrait potentiellement permettre au PEDV d'échapper aux défenses du système immunitaire inné, qui réduisent l'infection virale en éliminant les cellules infectées, ou de faciliter la libération et la dissémination des virions produits (Kim and Lee, 2014). La protéine E du PEDV va aussi activer la voie NF- κ B en induisant un stress du réticulum endoplasmique et entraîner la production d'IL-8, cytokine pro-inflammatoire et de Bcl-2, facteur anti apoptotique. La protéine E du PEDV jouerait donc un rôle important dans la protection des cellules hôtes des dommages fonctionnels et de l'apoptose (Xu et al., 2013a, Xu et al., 2013b).

3. Epidémiologie

Le PEDV, depuis sa découverte dans les années 70, a touché différents pays européens, asiatiques et du continent américain. Différents types de souches virales ont été identifiés et des liens épidémiologiques entre différentes régions du monde ont pu être établis.

3.1. Epidémiologie du PEDV dans le monde

3.1.1. Historique avant 2010

Les premiers cas de diarrhée épidémique porcine (DEP) ont été identifiés dans les années 70 en Europe, au Royaume Uni et en Belgique (Wood, 1977, Pensaert and de Bouk, 1978). Le virus responsable de cette maladie, le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV), a été isolé pour la première fois en 1977 en Belgique (souche de référence CV777) et a été classé dans la famille des *Coronaviridae* (Pensaert and de Bouk, 1978). Suite à ces premiers cas des années 70, des irrptions sporadiques de DEP sont décrites dans les années 80-90 dans plusieurs pays d'Europe (Song and Park, 2012). Le virus a continué à se propager et à persister sous forme enzootique dans la population porcine européenne puis la prévalence du PEDV dans cette population a commencé à diminuer pour des raisons inconnues (Van Reeth and Pensaert, 1994, Carvajal et al., 1995). Dans les années 2005-2006, des foyers de DEP ont été décrits en Italie dans la vallée de Pô. Des cas de diarrhées aqueuses chez des porcs de tout âge et de tout statut (porcelets, porcs à l'engrais, reproducteurs) de 63 troupeaux différents ont été enregistrés. L'agent étiologique responsable de ces foyers a été confirmé par microscopie électronique, par RT-PCR et par ELISA comme étant le PEDV. Les porcs présentaient des baisses de consommation alimentaire associées à ces épisodes diarrhéiques. Des mortalités des porcelets nouveaux nés supérieures à 34% ainsi que des morbidités comprises entre 20 et 80% chez les animaux en post-sevrage et en engraissement ont aussi été enregistrées (Martelli et al., 2008) (Figure 5).

Parallèlement aux cas européens, des cas de DEP ont été identifiés sur le territoire asiatique en Chine, en Corée du Sud, en Thaïlande et au Japon (Takahashi et al., 1983, Kweon et al., 1993, Puranaveja et al., 2009). En Chine, le PEDV a été décrit pour la première fois en 1986 dans une exploitation porcine de la région de Shanghai. De nombreux cas ont, par la suite, été rapportés dans le pays (Song and Park, 2012). Au Japon, au cours des années 1993 et 1994, des épizooties de DEP ont conduit à la mort de 14 000 porcs avec une mortalité observée chez les porcelets sous la mère allant de 30 à 100%. Les adultes affectés montraient une baisse de l'appétit et de leur production laitière. Au cours de l'hiver 1996, une deuxième vague d'épizooties provoquée par le PEDV a été enregistrée au Japon avec une perte d'environ 70% des porcs affectés (Song and Park, 2012). Le PEDV a été totalement éradiqué sur le territoire en 2007. En Corée du sud, les premiers cas de DEP ont été identifiés en 1992 et l'étude de la séroprévalence pour le PEDV en abattoir sur la période

août 1997-juillet 1999 a révélé une séroprévalence moyenne de 45%. Ces données suggèrent que le PEDV était devenu enzootique dans certaines régions coréennes et ce malgré l'utilisation importante de vaccins basés sur la souche de référence CV777. Dans les années 2007-2008, de nouveaux cas de DEP sont apparus en Thaïlande dans des élevages engraisseurs et se sont étendus aux élevages naisseurs-engraisseurs avec une perte enregistrée chez les porcelets nouveaux nés de 100% (Park et al., 2013, Song and Park, 2012, Puranaveja et al., 2009). En 2009, des foyers de DEP ont également été confirmés au Vietnam (Do et al., 2011) (Figure 5).

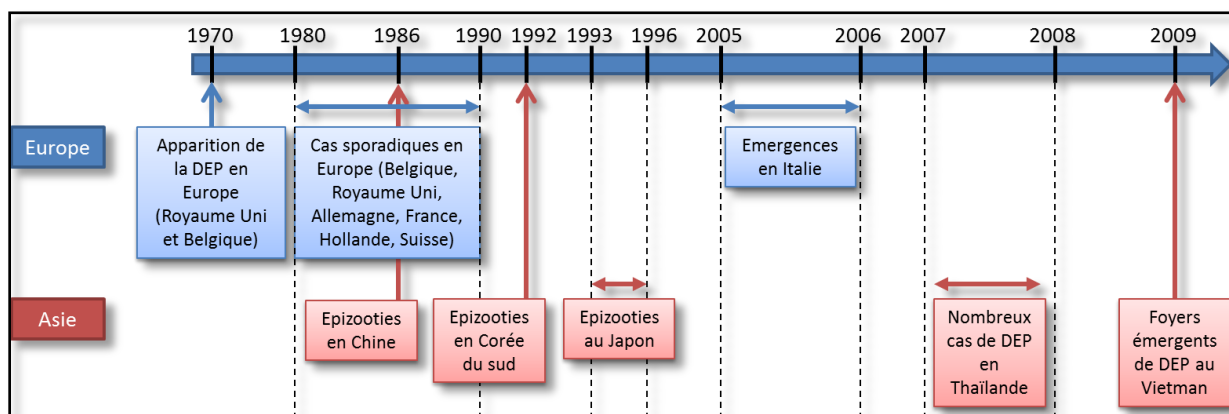


Figure 5: Récapitulatif des épisodes épidémiologiques de DEP dans le monde avant 2009

3.1.2. A partir des années 2010

3.1.2.1. En Asie

Au début du mois d'octobre 2010, des cas sévères de DEP sont apparus en Chine. Dix régions chinoises ont été touchées entre 2010 et 2012 malgré l'utilisation fréquente de vaccins basés sur la souche CV777 de PEDV. Les cas de DEP étaient caractérisés par une forte mortalité (80 à 100%) et une morbidité de 100% des porcelets sous la mère. Une perte de 1 000 000 de porcelets ainsi que de sévères pertes économiques ont été enregistrées suite à cette épizootie (Sun et al., 2012). Deux types de souches de PEDV ont été identifiés comme étant responsables de ces cas de DEP, des souches dites « S-non-InDel » et des souches dites « S-InDel » avec des insertions/délétions dans la partie S1 du gène S et entraînant des cas cliniques moins sévères (Jung and Saif, 2015). Le PEDV est actuellement toujours présent sur le territoire chinois (Giordano et al., 2018).

Depuis 2010, des cas sévères de DEP ont aussi été rapportés dans le nord du Vietnam. Le virus s'est propagé rapidement et des foyers récurrents et persistants ont été observés dans les troupeaux infectés. Les émergences de DEP ont été observées tout au long de l'année contrairement à ce qui avait été rapporté par le passé avec des cas signalés uniquement pendant la période froide. Actuellement, le PEDV est toujours présent sur le territoire et continue de circuler largement et est devenu un enjeu majeur pour les éleveurs de porcs (Diep et al., 2018).

Les syndromes diarrhéiques chez des porcelets dans les exploitations porcines de Taïwan ont commencé en décembre 2013 et l'agent responsable de cette épizootie a été confirmé comme étant le PEDV : 68 échantillons prélevés dans 25 exploitations porcines différentes se sont révélés positifs pour le PEDV par RT-PCR. La morbidité enregistrée était comprise entre 80 et 100% et la mortalité entre 90 et 100% (Lin et al., 2014).

Au Japon, en octobre 2013 et sept ans après le dernier cas de DEP répertorié, le PEDV a de nouveau été détecté dans la préfecture d'Okinawa et s'est propagé ensuite dans les préfectures d'Ibaraki, de Kagoshima et de Miyazaki. En avril 2014, 33 des 47 préfectures japonaises étaient affectées par la DEP, 418 foyers de DEP avaient été diagnostiqués et 83 000 porcelets sur une population de 333 000 animaux infectés avaient succombé à l'infection par le PEDV. La propagation de la maladie a eu lieu très rapidement dans cette population porcine naïve (Sasaki et al., 2017, 2014).

Des cas de DEP ont aussi été observés à partir de 2014 aux Philippines. Les porcelets étaient affectés par d'importantes diarrhées aqueuses accompagnées de vomissements et de fort taux de mortalité étaient enregistrés (Kim et al., 2016).

3.1.2.2. En Amérique

Une épizootie sévère de DEP est apparue en 2013 aux Etats-Unis dans l'état de l'Iowa alors que le pays avait toujours été indemne de cette maladie. Le virus s'est rapidement propagé dans tout le pays (Figure 6). L'arrivée de cette maladie sur le territoire a eu un impact significatif sur la production de porc, une perte de 10% de la population de porcs domestiques soit environ la perte de 7 millions de porcelets a été enregistrée après seulement une période épidémique d'un an (Jung and Saif, 2015). Le virus de la DEP s'est, par la suite, rapidement propagé dans d'autres pays de l'Amérique du Nord et du Sud tels que le Canada, le Mexique et la Colombie (Jung and Saif, 2015, Trujillo-Ortega et al., 2016, Grasland et al., 2015a). La maladie est aujourd'hui enzootique aux Etats-Unis avec une augmentation du nombre de cas tous les hivers (Figure 6).

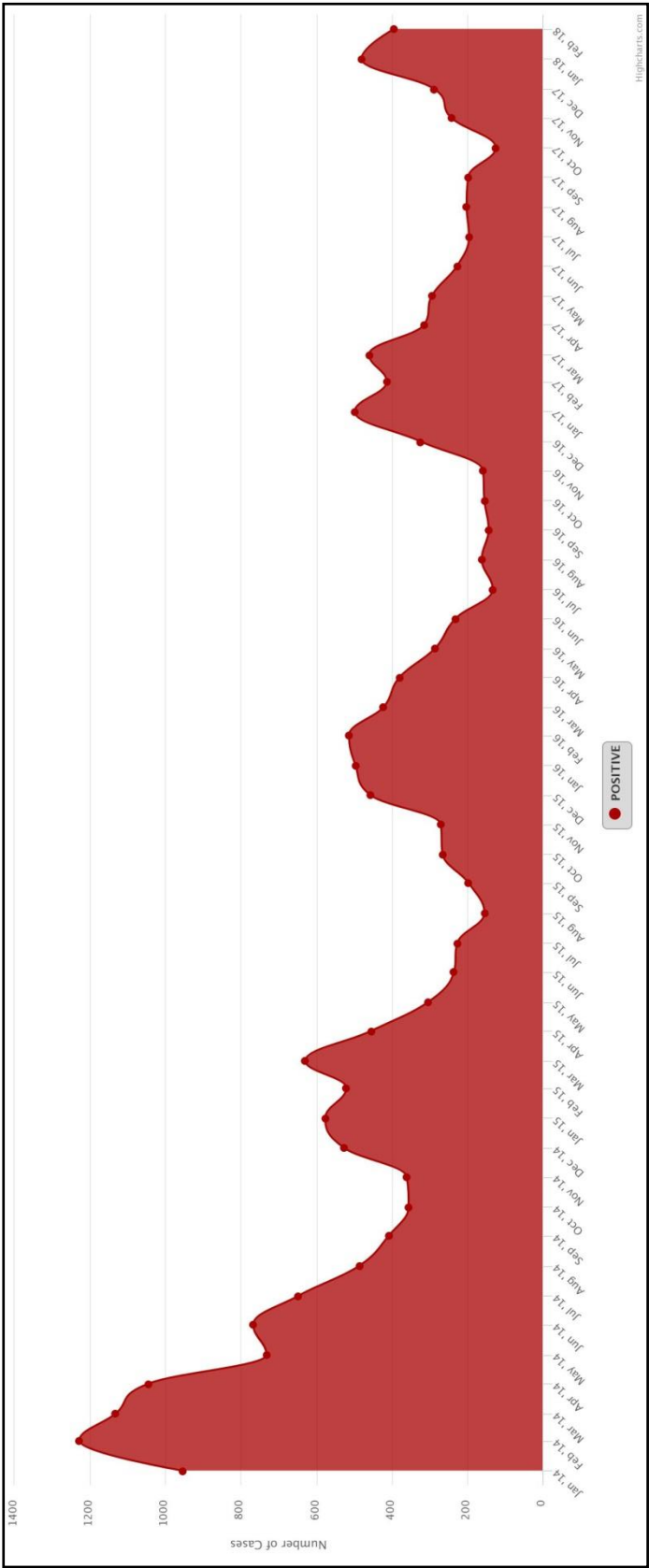


Figure 6: Nombre de cas de DEP aux Etats-Unis sur la période janvier 2014-février 2018

(<http://cadms.ucdavis.edu/swine/dashboard?key=8a79dc9e3b08048c9856888324ea33b0f83d0800>)

3.1.2.3. En Europe

A partir de 2014, de nouveaux cas de DEP ont été répertoriés en Europe. Des cas ont été décrits en Espagne, en Italie, en Hollande, en Allemagne, en France, en Belgique, en Autriche et en Slovénie (EFSA, 2016).

En mai 2014, des cas de DEP chez des porcs de tout âge ont été rapportés dans un élevage engraisseur du sud de l'Allemagne. Les premiers cas ont été observés après l'introduction de nouveaux porcs charcutiers provenant d'un gros élevage naisseur. Les signes cliniques étaient présents depuis une semaine lorsque 20 porcs environ sont morts de l'infection (Hanke et al., 2015b). Un cas similaire a été décrit en décembre 2014, en France, dans un élevage naisseur-engraisseur alors qu'aucun cas de DEP n'avait été décrit depuis les années 1990. Dans cet élevage, la maladie a provoqué une mortalité allant de 3,3 à 5,5% chez les porcs en engraissement et une mortalité cumulée au moment du sevrage de 25% chez les jeunes porcelets (Grasland et al., 2015b). A la même période, des cas de DEP se sont déclarés en Slovénie (Toplak et al., 2016). Des cas de DEP ont aussi été identifiés en 2014 aux Pays-Bas. Le premier cas de PEDV a été identifié en novembre 2014, le virus s'est ensuite propagé au cours de l'année 2015. Au total, 75 foyers de PEDV ont été répertoriés entre novembre 2014 et la fin de l'année 2015 (Dortmans et al., 2018). Une émergence de PEDV a aussi été observée pendant l'été et l'automne 2014 dans le centre de l'Ukraine entraînant la mort de 30 000 porcelets. Lors de ce cas, la souche de PEDV isolée n'étaient pas du même génotype que celles isolées dans les autres pays européens (Carr et al., 2015).

En janvier 2015, de nouveaux cas de DEP ont été enregistrés cette fois-ci en Belgique et au Portugal. Les premiers cas de DEP au Portugal ont été observés dans le sud du pays, la maladie s'est par la suite propagée dans le nord du pays (Christiaens et al., August 31st-September 3rd 2015, Mesquita et al., 2015) (Figure 7).

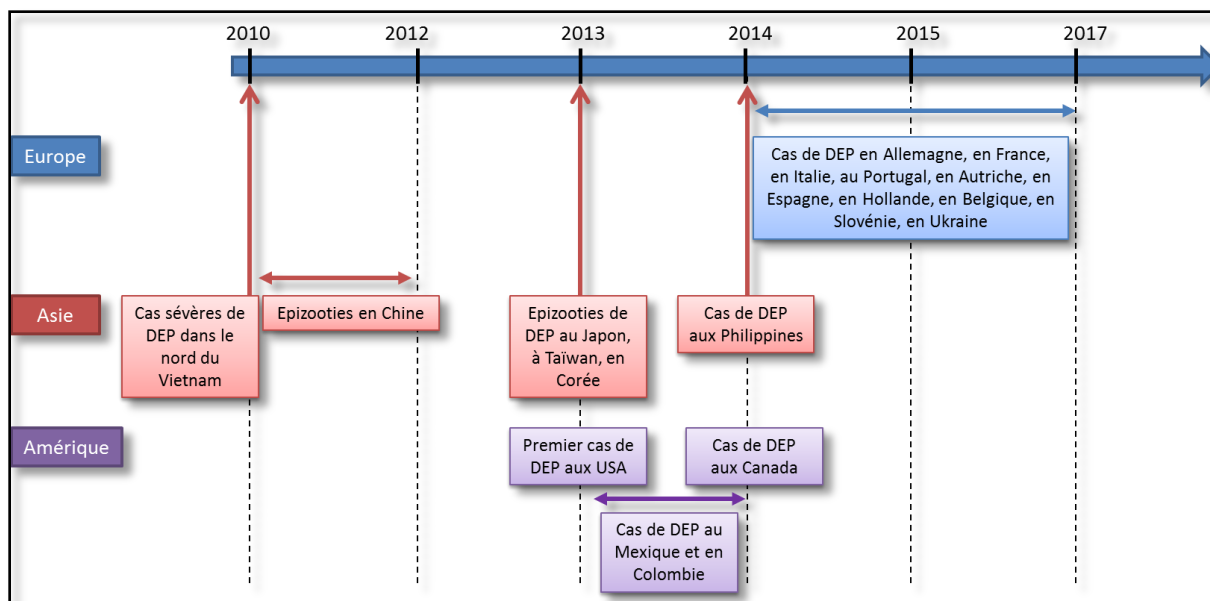


Figure 7: Récapitulatif des épisodes de DEP dans le monde à partir de 2010

3.1.3. Epidémiologie moléculaire du PEDV

Aux États-Unis comme en Chine, deux types de souches circulent : des souches qualifiées d'hypervirulentes dites « S-non-InDel » et des souches dites « S-InDel » présentant une délétion et une insertion de nucléotides dans le gène S (Grasland et al., 2015a). L'analyse phylogénétique basée sur le gène S a révélé que les souches « S-InDel » isolées aux États-Unis partageaient 99,8 à 100 % d'identité nucléotidique les unes avec les autres. Ces souches partagent aussi 96,6 à 97,1 % d'identité nucléotidique pour le gène S avec les 67 autres souches de PEDV nord-américaines « S-non-InDel » analysées par Vlasova et al., (2014). Cette analyse met aussi en évidence que le gène S de la souche chinoise CH/ZMZDY/11 isolée en Chine en 2011 est proche des gènes S des souches « S-non-InDel » de PEDV isolées aux États-Unis (Figure 8A). L'analyse phylogénétique basée sur la séquence du gène S révèle la présence de deux groupes. Le premier génogroupe (G1) contient les séquences de tous les PEDV dits « S-InDel » (Figure 8A) alors que le deuxième génogroupe, le génogroupe 2 (G2), comprend les souches dites « S-non-InDel » circulant en Asie et en Amérique (Figure 8A) (Lee, 2015). A l'heure actuelle, en Europe, seules des souches « S-InDel » circulent (en vert clair sur la figure 8A). Une seule exception a été rapportée en Ukraine en 2014 avec des élevages affectés par la DEP avec une souche « S-non-InDel » (en vert foncé) apparentée à une souche « S-non-InDel » américaine (USA/Kansa29/2013) et à une souche « S-non-InDel » chinoise (China/YJ7C/2012) (Carr et al., 2015). L'étude du gène S de la souche isolée en Belgique en 2015 a aussi montré une homologie de séquence de 99% avec la souche allemande isolée en mai 2014 (99% d'identité) comparativement aux souches belges historiques (96%) et aux souches américaines contemporaines hautement virulentes. Cette nouvelle souche belge isolée appartient comme toutes les souches européennes

évoquées précédemment au groupe des souches « S-InDel » (Christiaens et al., August 31st-September 3rd 2015). Une étude plus récente menée sur le génome complet de 38 souches de PEDV isolées en Allemagne et dans le sud-est de l'Europe a révélé l'existence d'un cluster homogène de PEDV « S-InDel » différent de celui regroupant les souches historiques, suggérant bien une réintroduction du PEDV en Europe. Ces résultats suggèrent aussi une introduction unique et simultanée du PEDV en Allemagne et en Europe centrale en 2014. Ainsi la région de Baden-Wuerttemberg en Allemagne a été considérée comme pouvant jouer le rôle de hotspot dans l'introduction et l'évolution du PEDV (Hanke et al., 2017). Les souches isolées aux Pays-Bas en 2014 et en 2015 appartiennent elles aussi au cluster de PEDV « S-InDel » évoqué précédemment suggérant aussi une réintroduction du PEDV aux Pays-Bas en 2014 (Dortmans et al., 2018). Les analyses comparatives des séquences amplifiées sur le gène S des souches PEDV isolés au Portugal et en Slovénie en 2015 ont aussi montré une forte identité avec les souches isolées en Allemagne (100% et 99,7% respectivement) (Mesquita et al., 2015, Toplak et al., 2016), ainsi qu'en Italie, aux Pays Bas, et en Autriche entre 2014 et 2015 (EFSA, 2016).

En Asie, les deux types de souches (en bleu) circulent mais uniquement depuis 2011 pour les souches « S-non-InDel » (en bleu foncé). Des analyses moléculaires sur 38 souches de PEDV isolées dans la province de Shandong fortement touchée par la DEP, ont été menées sur le gène S du virus. Ces analyses ont révélé que ce gène avait une taille comprise entre 4146 et 4161 nucléotides et partageaient de haut niveaux d'identité de séquences nucléotidique (93,3 et 99,6%) et protéique (92,1 et 99,4%) avec les 41 souches de PEDV de références utilisées (souches de PEDV isolées dans d'autres régions chinoises en 2012, en Corée et au Japon lors des émergences de 2013-2014, en France, en Belgique, en Allemagne lors des cas 2014-2015, la souche CV777 et les souches vaccinales asiatiques). Parmi ces 38 souches, 31 souches ont été classées dans le génotype G2 alors que les 7 autres ont été classées dans le génotype G1. Cette étude a révélé aussi de multiples insertions ou délétions dans les gènes S des souches de PEDV et la prédominance des génotypes G1 et G2 qui ont circulés dans la province de Shandong sur la période 2012-2015 (Zhang et al., 2017c). Une deuxième étude très récente a été réalisée pour mieux connaître la diversité génétique et l'épidémiologie moléculaire des souches de PEDV circulant en Chine sur la période 2016-2017 par une analyse de séquence du gène S de 11 souches isolées en 2016-2017. Ces souches ont montré une identité, à la fois, nucléotidique de 93-94% et en acides aminés de 92-93% avec la souche CV777. Les souches chinoises circulant en 2016-2017 appartiennent majoritairement au génotype G2 et sont génétiquement différentes des souches vaccinales (Zhang et al., 2017a).

L'analyse d'épidémiologie moléculaire des souches coréennes isolées depuis les épizooties de 2013 a révélé qu'elles étaient proches des souches chinoises virulentes et des souches émergentes virulente américaines (99,2 à 99,9% d'identité nucléotidique). En revanche, elles diffèrent génétiquement des

souches européennes, des souches coréennes historiques et des souches vaccinales utilisées en Corée (Park et al., 2013, Lee and Lee, 2014, Choi et al., 2014). Un autre variant de PEDV (KOR/KNU-1406/2014) a été isolé en mars 2014 en Corée du sud. Ce variant s'est révélé être plus proche de la souche « S-InDel » américaine OH851 (99,7% d'identité nucléotidique) que des souches américaines virulentes émergentes (Lee et al., 2014).

L'analyse phylogénétique basée sur les génomes complets de PEDV a permis d'identifier également la présence de deux groupes (Figure 8B) séparant les anciennes souches circulant en Europe et en Asie (génogroupe 1), des nouvelles souches de PEDV circulant depuis 2011 en Asie et ensuite en Amérique et en Europe (génogroupe 2). Cette analyse révèle aussi qu'il existe un ancêtre commun récent avec la souche chinoise AH2012 et les souches de PEDV américaines « S-non-InDel » (Vlasova et al., 2014).

L'étude de la séquence du génome complet de la souche « S-InDel » de PEDV isolée dans le nord de la France en décembre 2014 a montré que cette souche était génétiquement apparentée à la souche allemande isolée en mai 2014 (99,9% d'identité nucléotidique) et à la première souche américaine « S-InDel » isolée, la souche USA/Indiana12.83/2013 (99,8% d'identité nucléotidique). Il a aussi été montré que cette souche était apparentée à la souche américaine « S-InDel » isolée en 2014, (USA/OH851/2014) (99,5% d'identité nucléotidique). Le fait que la souche française soit plus proche de la souche « S-InDel » américaine USA/Indiana12.83/2013 que de la souche « S-InDel » américaine USA/OH851/2014 pourrait suggérer que les souches « S-InDel » circulant en Europe aujourd'hui auraient été introduites sur le continent européen et américain en même temps ou introduites sur le continent européen avant leur introduction sur le territoire américain en 2013 (Hanke et al., 2015a, Grasland et al., 2015b).

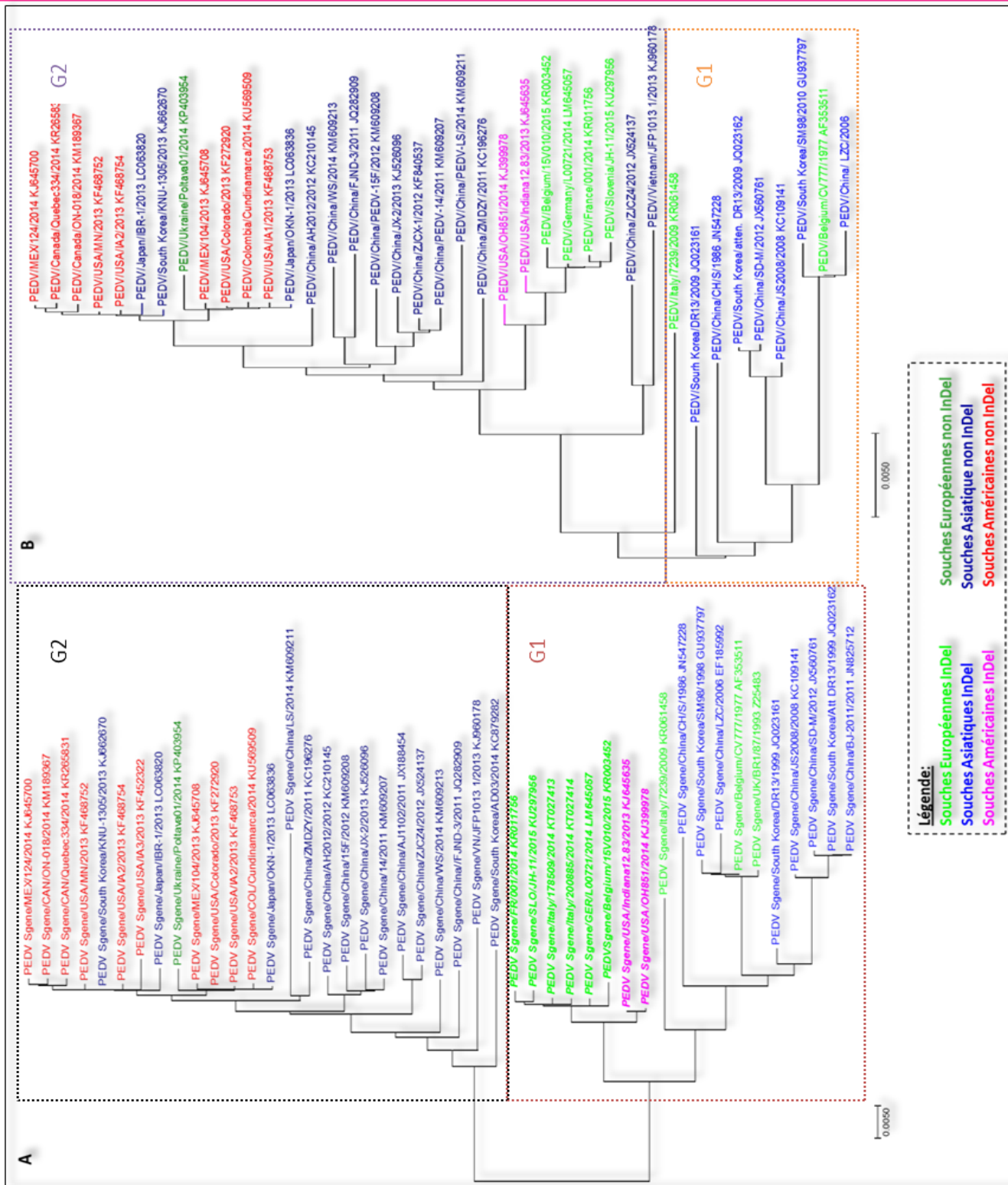


Figure 8: Analyse phylogénétique des souches de PEDV basée sur la séquence nucléotidique du gène S (A) ou sur les génomes complets (B). Les alignements des séquences ont été réalisés par le programme Muscle et les arbres phylogénétiques en utilisant la méthode *Neighbor-Joining* à l'aide du logiciel MEGA7. Le nom de la souche, le pays d'isolement et l'année, le numéro Genbank sont indiqués dans le nom de chaque souche. La localisation d'isolement par continent est indiquée par des couleurs : en bleu pour l'Asie, en vert pour l'Europe et en rouge/rose pour l'Amérique. Les souches dites « S-InDel » sont indiquées en couleur claire (bleu clair, vert clair et rose) et les souches « S-non-InDel » en couleur foncée (bleu foncé, vert foncé et rouge)

3.2. Mode de propagation de cet agent pathogène

3.2.1. Transmission horizontale

Le PEDV peut se transmettre dans une population porcine de différente manière. La transmission horizontale de ce pathogène viral peut se faire via la voie oro-fécale, l'air, le lait, l'aliment ou encore via le transport d'animaux ou des contacts avec des vecteurs contaminés.

3.2.1.1. Quantification

La quantification de la transmission horizontale passe par l'utilisation de modèles épidémiologiques. Ces modèles permettent de modéliser l'évolution dynamique des états de santé des individus hôtes au sein d'une population. Ils consistent à diviser la population hôte en différents compartiments correspondant aux différents états cliniques et/ou infectieux des individus et à relier ces compartiments entre eux via des taux de passage d'un compartiment à l'autre. Différents types de modèles épidémiologiques existent. Les plus simples sont les modèles SI ne contenant que deux classes d'individus : les individus qui ne sont pas infectés par l'agent pathogène mais qui y sont sensibles (« susceptible » S) et les individus qui sont infectés (« infectieux » I) par ce dernier et excréteurs. Ce type de modèle convient pour des maladies chroniques pour lesquelles les individus infectés le restent à vie, mais pas aux maladies où le phénomène de l'immunité acquise modifie la sensibilité de l'hôte à l'infection. Pour prendre en compte le phénomène de l'immunité acquise, un compartiment peut être rajouté au modèle précédent. Ce compartiment correspond au compartiment R (« recovered ») : les animaux passent d'un statut « susceptible » à un statut « infectieux » puis guérissent et s'immunisent et sortent ainsi de la dynamique en atteignant un statut « recovered ». Les animaux du compartiment R possèdent une immunité acquise qui va être soit permanente, soit temporaire (Choisy, 2010), on parlera dans ce cas d'un modèle SIRS pour représenter le retour à un état sensible. Pour certains pathogènes porcins, tels que le virus de l'influenza A (Rose et al., 2013) ou le circovirus porcine de type 2 (PCV2) (Andraud et al., 2008), une période de latence entre l'infection de l'animal et sa contagiosité doit aussi être prise en compte. Cette période correspond à la multiplication au sein de l'hôte du pathogène. La prise en compte de cette période de latence au sein du modèle se fait par l'ajout d'un compartiment E (« exposed ») au modèle précédent. Ce dernier modèle est appelé modèle « SEIR ». Les flux entre les différents compartiments de ce modèle correspondent à la force d'infection (λ) prenant en compte le taux de transmission du pathogène (β) qui est une constante spécifique du pathogène et la proportion d'individus infectieux au sein de la population qui varie en fonction du temps. Les autres paramètres caractérisant ces modèles épidémiologiques sont la durée de la période de latence ($1/\delta$) et la durée d'excrétion ($1/\sigma$) (Choisy, 2010) (Figure 9). Avant ce travail de thèse, aucun modèle épidémiologique n'existait pour le PEDV bien que le comportement des deux types de souches virales ainsi que leur

maintien au sein des populations porcines suggéraient des différences quantitatives de transmission. La représentation de la dynamique d'infection au sein d'une population de porcs infectés et sensibles à l'aide de modèles de ce type permet d'estimer les paramètres du modèle à partir des données observées d'occurrence des nouvelles infections se produisant en fonction du temps. De telles expérimentations dites de transmission sont couramment mises en place pour estimer les paramètres de transmission des pathogènes porcins : PCV2 (Andraud et al., 2008), Influenza porcine (Cador et al., 2016); virus du SDRP (Rose et al., 2015) entre autres.

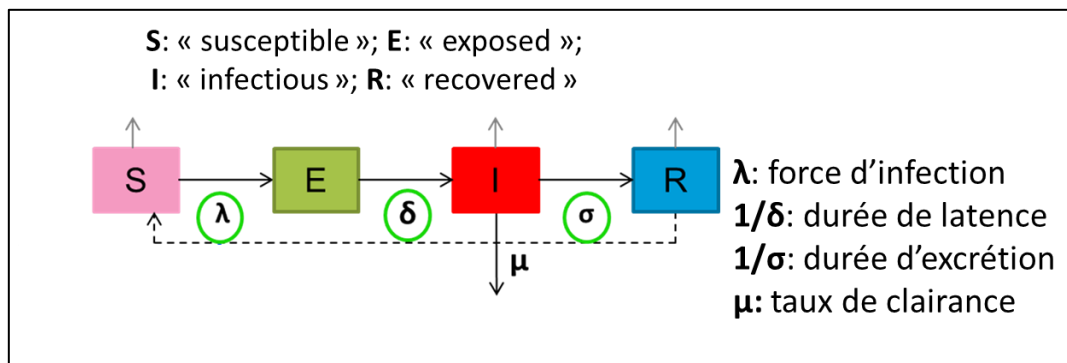


Figure 9 : Modèle SEIR et paramètres de transmission

3.2.1.2. Transmission directe par contact avec des matières contaminées

La voie principale de transmission du virus est la voie oro-fécale, c'est-à-dire, les contacts directs entre congénères infectés ou avec leurs fèces contaminées (Jung and Saif, 2015) (Figure 10). La taille de l'élevage est considérée comme un facteur de risque dans la propagation du PEDV notamment par voie oro-fécale (Sasaki et al., 2016). La présence de PEDV dans les lisiers peut aussi créer une potentielle voie de transmission oro-fécale du PEDV à plus long terme. Une équipe de recherche a donc réalisé une étude sur la survie et l'infectiosité du PEDV dans des fosses à lisiers extérieures à ciel ouvert afin de déterminer le temps de survie du virus dans ces produits d'élevage secondaires. L'étude a révélé que le PEDV pouvait survivre et être infectieux plus de 9 mois dans ces fosses à des températures comprises entre 0 et 19°C. La présence aussi longue du PEDV dans les fosses à lisiers pose donc le problème d'une possible contamination par le virus d'environnements non contaminés via l'épandage des lisiers. L'épandage de ces lisiers contaminés pourrait conduire à infecter des hôtes sensibles via le sol, les eaux de surfaces et les bio-aérosols (Tun et al., 2016). Le PEDV pourrait aussi être transmis à la population de porcs domestiques via les contacts avec des animaux de la faune sauvage contaminés. Il a été montré que des populations de sangliers sauvages présents à la frontière nord-coréenne et dans les régions montagneuses de la Corée du Sud étaient positives pour le PEDV. Un taux d'infection par le PEDV de 9,75% sur une population de 200 sangliers a été relevé. Les souches isolées pour ces cas étaient proches phylogénétiquement des souches

chinoises récentes (Lee et al., 2016). Le PEDV circule donc bien actuellement dans les populations de sangliers sauvages dans certaines régions du monde et pourrait donc entraîner la contamination d'élevages de porcs hors-sol ou en plein air.

3.2.1.3. Voie aérienne

Une deuxième voie de transmission possible du PEDV est la voie aérienne. Le génome du PEDV a, en effet, été détecté dans des échantillons d'air collectés dans une salle où des porcs avaient été infectés expérimentalement par le PEDV. Des porcs inoculés avec ces échantillons d'air positifs pour le PEDV ont développé les signes cliniques de la maladie. Le PEDV a aussi été détecté dans leurs fèces et dans les tissus digestifs prélevés au moment des abattages démontrant ainsi que le PEDV présent dans l'air était bien infectieux. Cependant des prélèvements positifs d'air à distance des élevages contaminés n'ont pas permis de reproduire l'infection (Alonso et al., 2014). Une étude complémentaire a été mise en œuvre afin de déterminer quels types de particules présentes dans l'air pouvaient véhiculer le PEDV. En effet, lorsque les pathogènes sont en suspension dans l'air, ils circulent en association avec des particules de différentes tailles et de différentes compositions. La taille de la particule à laquelle le pathogène est associé va déterminer la distance sur laquelle le pathogène peut être transporté, le site sur lequel il va être déposé ainsi que sa survie et sa capacité d'infection. Plus la particule est petite et plus le pathogène peut être transporté sur une longue distance et plus la particule est grande et plus elle tend à avoir des implications sérieuses : elle va être capable de pénétrer dans les voies respiratoires et digestive par inhalation et d'établir l'infection. La vitesse de dispersion des pathogènes en suspension dans l'air fait qu'ils sont difficiles à contenir et qu'il est donc difficile de se protéger contre eux. Dans cette étude des particules de tailles différentes (0,4 μ m à 10 μ m) ont été testées pour le PEDV. L'ARN du PEDV d'une souche « S-non-InDel » a été détecté dans toutes les particules testées et a été trouvé en plus forte concentration dans les particules ayant une taille comprise entre 3,3 μ m et 10 μ m. Le PEDV se disperse donc en utilisant un vaste éventail de tailles de particules et peut donc se disséminer sur des distances plus ou moins longues (Xie et al., 2007, Alonso et al., 2015) (Figure 10).

3.2.1.4. Transports et vecteurs passifs indirects

Le PEDV peut aussi être transmis dans un élevage naïf via le personnel, l'utilisation de matériel contaminé ou les mouvements de véhicules de transports d'animaux contaminés (Geiger and Connor, 2013). Après l'arrivée de la DEP aux USA, les potentielles voies d'introduction du virus et de contamination des élevages dans le pays ont été explorées. Des analyses sur des véhicules ayant servi à transporter des porcs ont été pratiquées et ont révélé que le PEDV était présent dans 5.2% des véhicules « propres » de transport d'animaux arrivant dans les élevages. Ces résultats ont mis en

évidence que le processus de transport des animaux entre élevage ou vers les abattoirs était source de transmission si des mesures d'hygiène adéquates n'étaient pas mises en place (Lowe et al., 2014). Une étude investiguant les facteurs épidémiologiques associés à la propagation du PEDV au Japon a aussi révélé des résultats appuyant l'importance des véhicules dans le risque d'introduction du PEDV dans les élevages indemnes de la maladie. Le nombre de camion d'alimentation visitant les exploitations au cours des deux semaines précédant l'apparition de la DEP s'est révélé être un facteur de risque d'introduction du PEDV dans les exploitations non exposées localement (Sasaki et al., 2016) (Figure 10).

3.2.1.5. Plasma porcin

L'aliment utilisé en élevage porcin a aussi été considéré comme une source d'introduction du PEDV dans les élevages lors des émergences de 2013 aux USA et surtout au Canada. En effet, le plasma de porc séché (SDPP) peut être utilisé dans l'alimentation des porcelets après le sevrage afin d'améliorer leur croissance, leur prise alimentaire et pour réduire les diarrhées post-sevrage (rôle immunitaire protecteur) (Ferreira et al., 2009). Le sang utilisé pour la production de SDPP est collecté en abattoir sur les porcs destinés à la consommation humaine (Peace et al., 2011, Pettigrew, 2006, Van Dijk et al., 2001, Zhao et al., 2007) et peut contenir différents pathogènes tels que le PEDV en cas de virémie au moment de l'abattage (Pasick et al., 2014). L'aliment complet contenant du SDPP contaminé peut être source d'introduction du pathogène en élevage (Bowman et al., 2015).

Une étude canadienne a montré que du SDPP contaminé avec du PEDV était infectieux pour les porcs l'ingérant alors que l'aliment complet fabriqué avec ce dernier n'était pas infectieux pour les porcs en conditions expérimentales (Pasick et al., 2014). Le PEDV peut aussi être présent dans des aliments exempts de SDPP (contaminations croisées lors des procédés de fabrication) et être transmis aux porcs par voie alimentaire. Des porcs indemnes de la maladie ont présenté des signes d'infection par le PEDV après consommation d'aliment contaminé (Dee et al., 2014a). La dose minimale infectieuse dans l'aliment est équivalente à $5,6 \times 10^1$ TCID₅₀/ml (Schumacher et al., 2015). La viabilité du PEDV dans l'aliment complet peut être influencé par le processus de fabrication mais aussi par les ingrédients utilisés dans la composition de l'aliment (Pujols and Segalés, 2014, Dee et al., 2015). Une survie plus importante du PEDV dans des aliments contenant du tourteau de soja a notamment été observée (Dee et al., 2015). Cette viabilité du PEDV est plus importante dans de l'aliment humide stocké à température ambiante que dans de l'aliment sec dans les mêmes conditions de stockage (28 jours vs 7 jours)(Goyal, 2014) (Figure 10).

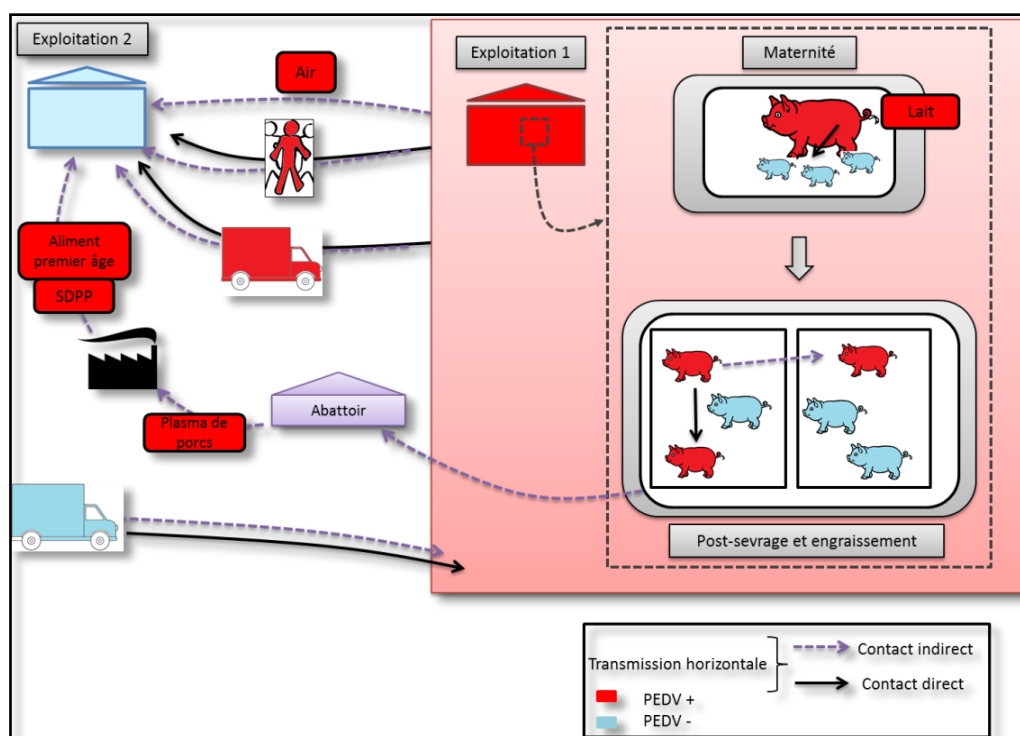


Figure 10: Représentation schématique de la transmission horizontale du PEDV par contact direct et indirect (homme, matériel. . .) (Gallien et al., 2016)

3.2.2. Cas de l'excrétion dans la semence et dans le lait

Actuellement la transmission du PEDV par la voie vénérienne n'a pas été mise en évidence mais elle reste possible car une phase de virémie est observée lors de la primo-infection (ANSES, 2014)(ANSES, 2014)(ANSES, 2014)(ANSES, 2014)(ANSES, 2014)(ANSES, 2014)(ANSES, 2014)(ANSES, 2014). Cette hypothèse d'infection de la truie par voie vénérienne est également supportée par le fait que le génome viral du PEDV a été détecté dans des semences de verrats infectés dans un centre d'insémination artificielle (CIA) canadien affecté par la DEP. Cette détection pouvait aussi bien être liée à la présence du PEDV dans la semence de verrats qu'à la contamination de la semence lors de la collecte (Dufresne and Robbins, 2014).

La présence du PEDV a été démontrée dans des échantillons de lait des truies et peut représenter une potentielle voie de transmission du PEDV aux porcelets nouveau-nés (Sun et al., 2012).

4. Prophylaxie, lutte et assainissement en élevage

4.1. Mesures de prophylaxie à l'échelle du troupeau vis-à-vis du PEDV

Différentes mesures de prophylaxie dans la gestion de la santé d'un troupeau porcin peuvent être employées. La voie vaccinale a notamment été envisagée de même que l'immunisation « naturelle » des truies gestantes avec des fèces contaminées par le PEDV.

4.1.1. Vaccins et stratégies thérapeutiques

Les premiers vaccins contre le PEDV ont été développés en Asie dans les années 1990. En Chine, en 1995, pour contrôler la maladie, un vaccin inactivé bivalent TGEV et PEDV basé sur la souche CV777 a été introduit. Après les cas émergents de 2010, un nouveau vaccin bivalent TGEV et PEDV atténué basé sur la souche AJ1102 chinoise virulente a aussi été développé. Ces vaccins sont actuellement en cours d'évaluation clinique. Au Japon et en Corée du Sud, un vaccin vivant atténué basé sur la souche « S-InDel » 83P-5 isolée en 2013 est utilisé. Deux souches virulentes de PEDV sud-coréennes ont aussi été atténuées et utilisées en vaccination intramusculaire (souche SM98-1, vaccins virus vivant ou inactivé) ou par voie orale (souche DR-13, vaccins virus vivants).

Ainsi un programme avec des doses de vaccination multiples de 3 à 4 vaccinations intramusculaires avec des souches vivantes et atténuées à deux ou trois semaines d'intervalle avant la mise bas a été testé. Les résultats obtenus ont montré que l'utilisation de vaccins commerciaux permettait d'augmenter le taux de survie de porcelet infectés avec une souche virulente de PEDV de 18,2 à 80%. Cependant tous les vaccins ne réduisent pas les taux de mortalités et l'excrétion virale. En 2015, en Chine, un vaccin trivalent atténué (PEDV, TGEV et rotavirus porcin) basé sur la souche CV777 de PEDV a été approuvé (Gerdtz and Zakhartchouk, 2017). L'utilisation de vaccin atténué reste cependant controversée du fait des capacités de mutations importantes du PEDV, mutations qui pourraient entraîner un retour de virulence sans occulter les possibilités de recombinaisons entre souches vaccinales et souches sauvages.

Aux USA, le premier vaccin contre le PEDV a été développé par Harrisvaccines™ dans l'Iowa en 2013. Le vaccin atténué est basé sur une version du PEDV où le gène S est tronqué. Le vaccin induit une immunité chez les jeunes porcs après deux injections en intramusculaire à trois semaines d'intervalle. Les porcelets vaccinés et challengés avec un homogénat de tissus intestinaux issus de porcelets malades ont présenté des signes cliniques moins sévères et une réduction de l'excrétion virale au cours des 72 premières heures. Ce vaccin s'est aussi révélé efficace sur des truies naïves. En effet, après trois vaccinations à 8, 5 et 1 semaine avant la mise-bas, les porcelets issus des truies vaccinées et non vaccinées ont été mis en contact avec une souche virulente de PEDV entre 2 et 6 jours d'âge. Les résultats obtenus montrent que 69% de mortalité a été observée chez porcelets issus de truies vaccinées vs 91% chez les porcelets issus de truies non vaccinées. Le vaccin a aussi été évalué sur des truies qui avaient déjà été exposées par le passé au PEDV. La vaccination a ainsi

permis de réduire la mortalité des porcelets de 3% via l'induction de haut titres en anticorps dirigés contre la protéine S1 du PEDV dans le colostrum des truies vaccinés (Gerds and Zakhartchouk, 2017).

Un deuxième vaccin contre le PEDV a été développé aux USA par Zoetis en 2014. Ce vaccin est composé du virus entier inactivé formulé avec un adjuvant. Le vaccin a été testé chez des truies négatives pour le PEDV, elles ont été vaccinées deux fois à 3 semaines d'intervalle avec le vaccin ou un adjuvant. Le vaccin s'est révélé être sûr et immunogène avec une induction d'anticorps neutralisants pour tout le virus et pour la protéine S. Ce vaccin a par la suite été testé dans les conditions terrains dans une exploitation positive pour le PEDV. Des truies ont été vaccinées à 5 et 2 semaines avant mise bas avec le vaccin ou un placebo. Le vaccin a entraîné une réduction de la mortalité pré-sevrage provoquée par le PEDV de 6,3% chez les porcelets issus de truies vaccinées, soit 1,8% de porcelets/truie survivant en plus avec l'utilisation du vaccin.

Un troisième vaccin a été récemment développé au Canada par the Vaccine and Infectious Disease Organization-InterVac. Le vaccin est basé sur un virus inactivé formulé avec un adjuvant. Lorsqu'il est administré à des truies séronégatives à 4 et 2 semaines avant la mise-bas, des niveaux élevés d'anticorps neutralisants contre le PEDV ont été retrouvés dans le colostrum et dans le lait ainsi que dans le sérum des porcelets issus de ces truies vaccinées. Des porcelets issus de truies vaccinées avec ce vaccin et des porcelets issus de truies non vaccinées ont été challengés avec une souche « S-non-InDel », la souche US/Colorado/2013. Les porcelets issus des truies vaccinées ont montré un taux survie de 95% accompagné d'une réduction des signes cliniques, de la perte de poids et de l'excrétion virale. Tous les porcelets issus des truies non vaccinées ont présenté des signes cliniques importants, une perte de poids importante ainsi que des signes de déshydratation avec 50% des porcelets qui sont morts 6 jours après l'infection (Gerds and Zakhartchouk, 2017).

Les vaccins actuellement commercialisés ne permettent pas d'induire 100% de protection. D'autres alternatives ont donc été explorées. Chez les *Nidovirus*, les protéases 3CLSP (3C-like serine protease) et 3CL (3C-like protease) jouent un rôle prépondérant dans la réplication virale (Xue et al., 2008). Le développement de médicaments antiviraux ciblant ces protéases peut donc être une stratégie intéressante dans une perspective thérapeutique. Un criblage des composants ciblant ces protéases a été réalisé et deux composants ciblant la protéase 3CL du PEDV ont été identifiés comme étant des inhibiteurs de la réplication du PEDV. Ces résultats pourraient permettre de développer des médicaments antiviraux contre le PEDV (Shi et al., 2018). Un traitement interféron lambda (IFN λ) peut aussi être envisagé pour contrer l'infection par le PEDV. Les IFN λ agissent de façon prépondérante au niveau des muqueuses en étant acteur de la mise en place de l'activité antivirale suite à la stimulation de gènes impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire (Hernandez et al., 2015, Kotenko et al., 2003). Une étude récente a montré que l'utilisation d'IFN λ permettait de

supprimer l'infection par le PEDV dans des cellules épithéliales intestinale porcine IPEC-J2. L'utilisation d'IFN λ pour stimuler la réponse immunitaire contre le PEDV chez les porcelets pourrait donc être une voie thérapeutique pour combattre la DEP chez les porcelets (Li et al., 2017). Cependant cette voie thérapeutique reste assez coûteuse ce qui pourrait constituer un frein pour son application en élevage.

L'administration d'anticorps neutralisants peut protéger de l'infection lors d'épreuves virulentes. Le développement d'anticorps neutralisants pour le PEDV pourrait donc permettre d'induire une certaine protection des porcelets vis-à-vis du PEDV. Un anticorps neutralisant pour le PEDV a été isolé de cellules B d'un porc vacciné contre le virus. Cet anticorps nommé PC10 cible un épitope conformationnel de la protéine S du PEDV, il va permettre de neutraliser l'infection par le PEDV (souches « S-InDel » et « S-non-InDel ») en interférant avec l'entrée du virus après liaison avec la protéine S. PC10 pourrait donc être un candidat pour une protection passive contre le PEDV (Fu et al., 2017).

4.1.2. Immunisation des truies pendant la gestation

Une autre stratégie préventive contre le PEDV est d'immuniser les truies gestantes. L'immunisation des truies gestantes permet de mieux contrôler l'épizootie et de réduire le nombre de morts chez les porcelets sous la mère. Avant les deux dernières semaines de gestation, l'immunisation des truies peut être entreprise via l'exposition à une souche virale virulente par le biais de fèces ou d'intestins broyés de porcs infectés (« backfeeding »). Cependant, cette méthode d'immunisation augmente le risque de répandre d'autres infections au sein de l'élevage via la présence d'autres pathogènes tels que le PCV2 dans les fèces ou les intestins broyés (Jung and Saif, 2015). L'immunisation des truies contre le PEDV peut permettre d'augmenter le titre en anticorps colostraux et donc de conférer une immunité passive aux porcelets via un transfert passif d'IgA, d'IgG et d'IgM. La durée de l'immunité fournie par le colostrum maternel dépend du titre en anticorps de la mère (Song et al., 2015). En Europe, le « backfeeding » est interdit par la législation (Regulation (EC) No 767/2009 Annex III: List of materials whose placing on the market or use for animal nutritional purposes is restricted or prohibited as referred in Article 6) (EFSA, 2014) mais cette méthode a été mise en place aux Etats-Unis afin de limiter les pertes considérables lors des émergences de DEP en 2013.

4.2. Méthodes de lutte et d'assainissement des élevages

Actuellement, il existe différentes méthodes de biosécurité, de désinfection ou d'assainissement des matériaux, des bâtiments d'élevage, des usines de fabrication d'aliments

porcins, des véhicules de transport d'animaux ou des produits secondaires de l'élevage tels que les lisiers.

4.2.1. Dans l'aliment

Suite à la mise en évidence de la présence du PEDV dans des aliments utilisés en élevage porcin, une réflexion portant sur l'utilisation de protocoles d'assainissement de ces aliments contaminés ainsi que des structures contaminées par ces aliments s'est mise place.

Un premier travail de recherche a été effectué pour fournir des données *in vivo* sur la capacité d'un biocide à assainir un aliment contaminé par le PEDV. L'aliment a été traité avec une solution contenant du formaldéhyde et des acides organiques nommée Sal CURB® ayant déjà eu un effet positif sur la réduction des salmonelles dans l'aliment (Wales et al., 2010, Wales et al., 2013). L'aliment contaminé par le PEDV traité avec le Sal CURB® a permis de prévenir l'infection et la maladie clinique chez des porcelets naïfs nourris avec cet aliment traité. Ce produit a entraîné un effet significatif de réduction de la charge et de la viabilité virale (Dee et al., 2014b).

Le PEDV étant un virus sensible à la chaleur, l'hypothèse d'un traitement thermique de l'aliment au cours du procédé de granulation afin de limiter l'infectiosité du PEDV a aussi été étudiée. Ainsi, des températures élevées de 68,3, 79,4 et 90,6°C et des temps d'exposition allant de 45, 90 et 180 secondes appliqués sur un aliment contaminé avec deux doses virales (10^2 TCID₅₀ et 10^4 TCID₅₀). Quelle que soit la combinaison utilisée, aucun des animaux ayant consommés les aliments contaminés et traités n'a présenté de PEDV dans les fèces et le contenu caecal.

Des températures plus faibles de 37,8 et 46,1°C pendant 30 secondes n'ont pas permis de réduire l'infectiosité du virus. Ces résultats suggèrent qu'une granulation à des températures supérieures ou égales à 54,4°C peut permettre de réduire la quantité et l'infectiosité du PEDV dans l'aliment et prévenir ainsi la contamination des équipements de l'usine par les poussières produites lors du processus de fabrication. Il est cependant nécessaire de prévenir la recontamination de l'aliment après cette étape de granulation (contaminations croisées) (Cochrane et al., 2017). En effet, lors de l'utilisation de composants alimentaires contaminés par le PEDV, un fort risque de contamination de l'usine où sont produits les aliments et de ces machines est envisageable. Utiliser un protocole de désinfection pour assainir une usine ayant produit un aliment contaminé par le PEDV est donc à envisager. L'application consécutive répétée d'une solution d'ammonium quaternaire et de glutaraldéhyde ainsi qu'une solution assainissante d'hypochlorite de sodium associée à un traitement thermiquement (60°C) pendant 48h a permis de supprimer complètement les traces d'ARN viral (Huss et al., 2017).

4.2.2. Dans les lisiers

En se basant sur les résultats de survie et d'infectiosité du PEDV dans des lisiers contenus dans des fosses à lisiers extérieures à ciel ouvert, il a été déterminé que le PEDV pouvait y survivre plus de 9 mois. La persistance du PEDV dans ces fosses peut se prolonger si aucun traitement approprié n'est employé. Les facteurs environnementaux tels que les UV peuvent influencer la survie du virus dans les environnements contaminés. Une agitation fréquente des fosses pourrait donc permettre une exposition directe des virions infectés aux UV environnementaux et au soleil et ainsi réduire le nombre de virus infectieux ce qui pourrait probablement faire diminuer le risque d'infection récurrente dans les exploitations et la propagation du virus (Tun et al., 2016). La présence du PEDV dans les lisiers peut aussi être contrôlée avec l'utilisation de chaux hydratée. L'ajout de chaux jusqu'à l'obtention d'un pH de 10 permet de diminuer la présence du PEDV et de lui faire perdre son caractère infectieux (Stevens et al., 2018).

4.2.3. Dans les bâtiments d'élevage et les véhicules de transport d'animaux

Différents protocoles de désinfection et d'assainissement pour éliminer le PEDV sur différents types de surface ont été testés.

En élevage, les désinfectants sont communément utilisés pour éliminer les agents infectieux et prévenir leur transmission comme l'eau super-oxydée largement utilisée dans le domaine du médical (Landa-Solis et al., 2005). Ce désinfectant n'a jamais été utilisé en élevage porcin pour inactiver les virus circulant dans les exploitations. Cependant, une étude a été menée pour tester, *in vitro*, l'efficacité de ce désinfectant directement contre le PEDV avec différents temps d'application (Chen et al., 2017). Le génome viral du PEDV était toujours présent après plus de 10 minutes de contact avec l'eau super-oxydée mais aucun virus infectieux n'était détecté. En revanche, quand le temps de contact était inférieur à 10 minutes, le PEDV était seulement partiellement inactivé. L'eau super-oxydée peut donc inactiver efficacement le PEDV en dénaturant les protéines virales sans pour autant détruire le génome viral. Ce désinfectant permettrait donc de prévenir et contrôler efficacement les infections par le PEDV dans les exploitations porcines (Chen et al., 2017). Il faudrait cependant vérifier la faisabilité d'application de ce désinfectant sur du matériel d'élevage où certains restes importants de matières organiques peuvent subsister.

La désinfection des véhicules de transport d'animaux est aussi une problématique importante. Actuellement, la méthode industrielle standard de lavage, de désinfection et de séchage est la meilleure pour l'assainissement de camions de transport. A ce titre, suite à l'épizootie massive de PEDV aux Etats-Unis de véritables stations de lavage ont été équipées en tunnel de séchage, véritables « fours » assainissants pour les camions. Ce processus de désinfection nécessite un investissement important en termes de temps et de logistique et exige en plus des contraintes

d'aménagements spécifiques. Par conséquent, des porcs sont souvent transportés dans des camions qui ne suivent pas de mesures sanitaires et de procédures de décontaminations entre les différents voyages d'animaux (Baker et al., 2017). Le risque de propagation de pathogènes tel que le PEDV est donc considérablement augmenté. Afin de diminuer significativement le risque de transmission du PEDV via les véhicules de transport contaminés par le virus, des procédures sanitaires économiquement rentables doivent donc être développées. Ainsi l'efficacité du peroxyde d'hydrogène accéléré a été évaluée comme désinfectant pour inactiver le PEDV sur des surfaces métalliques contaminées par des fèces de porcs infectés par le PEDV. Ce désinfectant a été testé dans différentes conditions de dilution et de température. L'application de ce désinfectant dilué au 16^{ème} ou au 32^{ème} pendant 30 minutes sur des surfaces métalliques contaminées par des fèces positives pour le PEDV a été montrée comme étant suffisante pour inactiver le virus présent dans ces fèces (Holtkamp et al., 2017). Le peroxyde d'hydrogène accéléré a aussi été testé comme désinfectant pour inactiver le PEDV dans des fèces de porcs sur des surfaces métalliques dans des conditions de gel. La dilution au 1/16 et 1/32 à une température de -10°C et un temps de contact de 40 et 60 minutes ont permis d'inactiver le PEDV (Baker et al., 2017).

Pour limiter la propagation du PEDV au sein d'une exploitation porcine, des mesures drastiques de biosécurité interne doivent aussi être prises localement. Ces mesures incluent la désinfection ou le changement de l'équipement de protection du personnel (PPE), le nettoyage des zones du corps ayant été exposé au virus ou la prise d'une douche à la sortie d'une zone contaminée. Des changements de bottes et de vêtements des visiteurs ou du personnel avant leur entrée sur l'élevage ainsi que des contrôles des nuisibles présents sur l'élevage doivent être envisagés (Kim et al., 2017).

4.2.4. Réglementation mise en place afin de lutter contre PEDV

En 2014, au vu de la situation des Etats-Unis vis-à-vis de la DEP et de la diffusion de cette dernière au Canada et dans d'autres pays du monde, la France a mis en place un protocole de surveillance et de lutte contre le PEDV en cas d'émergence. La DEP a été premièrement catégorisée en danger sanitaire de première catégorie au titre de l'émergence (Ib) du fait de l'importance et de la rapidité de diffusion de la maladie (Ministère de l'agriculture, 2014a). Son statut a par la suite évolué en danger sanitaire de première catégorie pour les souches « S-non-InDel » et en danger sanitaire de deuxième catégorie pour les souches « S-InDel » moyennement virulente (Ministère de l'agriculture, 2017). Le protocole de surveillance et de lutte contre le PEDV mis en place est axé autour de plusieurs points clés. Les acteurs professionnels doivent être sensibilisés aux critères d'inclusion des cas cliniques dans le protocole de recherche du virus de la DEP afin d'éviter une sous-déclaration des cas suspects ainsi qu'aux mesures administratives à mettre en place en cas de suspicion. En cas de

suspicion, l'élevage concerné doit être mis sous APMS (arrêté préfectoral de mise sous surveillance). Une restriction de mouvements d'animaux ainsi que des mesures de biosécurité strictes doivent être appliquées. Si la suspicion est confirmée, un APDI (arrêté préfectoral portant déclaration d'infection) est pris dans les exploitations touchées. Les mesures à mettre en œuvre sur les élevages concernés sont ensuite prises au cas par cas. Ces mesures vont notamment dépendre de la densité des élevages porcins dans la région de la suspicion ainsi que du nombre de foyers de DEP répertorié (Ministère de l'agriculture, 2014b). A l'échelle européenne, le système de surveillance de la DEP mis en place est peu actif. Seulement quelques états membres rapportent les cas cliniques de DEP (EFSA, 2014).

Les recherches bibliographiques menées sur le PEDV ont fait l'objet d'une revue publiée en 2016 dans « Virologie » et présentée en Annexe 1. (Gallien S, Le Poder S, Rose N, Grasland B. Diarrhée épidémique porcine : le retour d'une « ancienne » maladie. Virologie 2016; 20(6) : 335-51 doi:10.1684/vir.2016.0673.)

Problématique et objectifs de la thèse



Les épizooties sévères de DEP apparues dans les années 2010-2012 sur le continent asiatique et en 2013 sur le continent américain sont toujours d'actualité. Les deux types de souches de PEDV isolées au cours de ces épizooties, les souches « S-InDel » et les souches « S-non-InDel », continuent de co-circuler sur ces territoires motivant une vigilance accrue à l'égard de la DEP en Europe où seules les souches « S-InDel » circulent. L'ampleur des épizooties sur les continents américain et asiatique contraste fortement avec les cas sporadiques décrits en Europe, ce qui amène des questions sur les capacités de transmission et de propagation de ces différents types de souches.

Une meilleure connaissance des capacités de transmission et de propagation des variants « S-InDel » et « S-non-InDel » permettrait de donner des éléments objectifs de maîtrise précis, à la fois, en cas d'infection par une nouvelle souche « S-InDel » ou en cas d'émergence de souches « S-non-InDel » en Europe et particulièrement en France. Actuellement, la transmission horizontale de ces deux types de souches n'a pas été évaluée d'un point de vue quantitatif et des incertitudes sur leur pathogénicité respective subsistent. De plus toutes les voies de transmission de ces souches n'ont pas été étudiées. Les possibilités d'excrétion du PEDV dans les semences et donc de transmissions vénériennes n'ont pas été évaluées par le passé. Ceci, bien qu'une virémie soit observée lors de l'infection virale et que des semences positives pour le PEDV aient aussi été détectées dans un centre d'insémination artificielle (CIA) canadien. Cependant, une contamination lors de la collecte ne peut pas être exclue. Malgré les incertitudes subsistant sur les pathogénicités de ces deux types de souches de PEDV, une différence de virulence marquée est tout de même décrite dans les différents rapports cliniques aux USA et en Europe. La possibilité pour ces deux types de souches de PEDV d'une virulence intrinsèque différente et d'une capacité à se propager dans une population porcine est aussi dépendante des interactions cellulaires et moléculaires mises en œuvre dans les tissus cibles et de la réponse immunitaire de l'hôte qui va être induite. Actuellement, les connaissances sur cette réponse immunitaire digestive mise en place lors de l'infection par l'un de ces deux types de souches ne permettent pas d'expliquer ces différences de virulence et de propagation.

Ce travail de thèse a pour but d'apporter des réponses aux différents éléments encore mal connus évoqués précédemment. Il s'est orienté autour de trois axes. Le premier axe de ce travail rapportera l'étude de la transmission horizontale *in vivo* d'une souche « S-InDel » et d'une souche « S-non-InDel » de PEDV ainsi que l'étude d'un cas de DEP survenu en France en 2014 avec le suivi de l'excrétion du virus dans l'élevage et les mesures de biosécurité mises en place. Le deuxième axe de la thèse sera orienté autour de l'étude *in vivo* de l'excrétion dans la semence d'une souche « S-InDel » et d'une souche « S-non-InDel » de PEDV. Un état de la circulation du virus en centre d'insémination artificielle français sur l'année 2015 a été réalisé préalablement à ce travail. Le troisième et dernier axe de ce travail de thèse a eu pour but de comparer *in vivo* l'immunité digestive

induite lors de l'infection par une souche « S-InDel » et par une souche « S-non-InDel » de PEDV. Les lésions intestinales provoquées par l'infection, l'interaction du virus avec la muqueuse intestinale ainsi que la mise en place de la réponse immunitaire digestive induite par l'infection ont été étudiées.

**Partie 1 : Suivi d'un élevage
français infecté par une
souche « S-InDel » de PEDV
et comparaison de la
transmission horizontale
d'une souche « S-InDel » et
d'une souche « S-non-
InDel » de PEDV**



En 2014, un cas de DEP a été déclaré dans un élevage porcin du nord de la France. La souche de PEDV circulant dans cet élevage s'est révélée être une souche de type « S-InDel ». Après l'apparition de ce cas, un plan de suivi de l'élevage a été mis en place. Dans cette partie, deux études distinctes sont présentées : la première étude porte sur le suivi de l'excrétion du virus dans l'élevage affecté par la DEP en décembre 2014 en France ainsi que sur les mesures d'assainissement mises en place et la survie du virus dans les lisiers. La deuxième étude vise à évaluer la transmission horizontale de la souche de PEDV « S-InDel » PEDV/FR/001/2014 (GB N°: [KR011756](#)), isolée dans cet élevage avec celle de la souche « S-non-InDel » PEDV/USA/2014/IOWA (GB N°: [MF37363](#)), isolée aux USA la même année.

En 2014, une suspicion de DEP a été notifiée dans un élevage naisseur-engraisseur du nord de la France. Les premiers signes cliniques de la maladie (diarrhées, signes d'anorexie, fièvre) ont été enregistrés dans un bâtiment de porcs en engraissement. De la diarrhée aqueuse et jaunâtre a par la suite été notée en maternité. Des taux de 50, 100 et 5% de morbidité ont été enregistrés respectivement chez les animaux en engraissement, les porcelets et les truies. Une semaine après l'apparition des signes cliniques, une surmortalité de 12% attribuable à la DEP chez les porcelets a pu être calculée (25% cumulé au total avant sevrage). Le foyer de DEP a été notifié par la DGAL le 1^{er} décembre 2014 et un suivi de l'élevage par l'ANSES de Ploufragan/Plouzané a été mis en place. Cinq porcelets appartenant à dix portées différentes ont été suivis ainsi que huit des mères de ces dix portées. En 2017, un nouveau contrôle (virologique et sérologique) a été effectué afin de vérifier si le PEDV circulait toujours dans cet élevage.

Soixante-six %, 31,9% et 4,3% des porcelets sous la mère excrétaient du PEDV dans leurs fèces à 9, 16 et 26 jours post-suspicion respectivement. A 9 et 16 jours post-suspicion, 100% et 57,1% des truies suivies excrétaient du virus. A 9 jours post-suspicion, le PEDV a aussi été détecté chez 6,6% des porcs en engraissement suivis individuellement et dans 30% des pools de fèces des porcs en engraissement dans les autres salles. Aucun porc testé en mars 2015, soit 6 mois post-suspicion et en 2017 (2 ans post-suspicion), ne s'est révélé positif en RT-qPCR pour le PEDV. Aucune séroconversion pour le PEDV n'a été enregistrée lors du dernier contrôle de 2017 démontrant l'absence de circulation de l'agent pathogène dans l'élevage après les mesures de biosécurité et d'assainissement mises en place début 2015.

Un suivi journalier de la quantité de virus présente dans le lisier ne pouvant pas être effectué, une estimation de l'efficacité du chaulage a été déterminée *in vitro* dans les laboratoires de l'ANSES.

L'ARN du virus avait complètement disparu du lisier après 24 heures de traitement à la chaux à pH 12 et après 72-96 heures de traitement à la chaux à pH9. Dans l'élevage, l'ARN du PEDV s'est avéré être détectable lorsque le temps de chaulage était inférieur à 3 jours. Le traitement par chaulage s'est donc montré efficace pour éliminer le PEDV contenu dans les lisiers.

La deuxième étude a été menée dans les installations expérimentales de l'ANSES. Quatre animaleries contenant chacune 2 parcs de 5 porcs, adjacents mais séparés de 40 cm ont été utilisées. Dans chaque animalerie, un porc d'un des deux parcs a été inoculé par voie oro-gastrique avec la souche PEDV/FR/001/2014 ou la souche PEDV/USA/2014/IOWA. Le porc inoculé était en contact direct avec 4 porcs et en contact indirect avec 5 porcs. Le génome viral a été quantifié par RT-qPCR dans le sang, les fèces et dans de l'air ambiant. La séroconversion a été déterminée par un test ELISA spécifique du PEDV.

Les signes cliniques de la DEP ont été observés chez tous les porcs à l'exception des porcs en contact indirect pour la souche « S-InDel » PEDV avec des signes cliniques plus sévères pour la souche « S-non-InDel ». Un impact sur le gain moyen de poids quotidien a aussi été noté pour les deux souches chez tous les porcs à l'exception des porcs en contact indirect pour la souche « S-InDel » (non affectés cliniquement). Cet impact s'est révélé être plus important avec la souche « S-InDel » qu'avec la souche « S-non-InDel ». Pour la souche « S-non-InDel », les porcs inoculés et en contact direct ont excrété du virus dans les fèces entre 24h et 53 jours post-inoculation (JPI), et entre 48h et 49 JPI pour la souche « S-InDel ». Les porcs en contact indirect ont excrété le virus dans les fèces seulement dans le groupe « S-non-InDel ». Pour les deux souches, une durée d'excrétion moyenne de 26 jours a été estimée. Une virémie très transitoire et difficilement détectable a été notée pour quelques porcs pour les deux types de souches virales. Une séroconversion vis-à-vis du PEDV de tous les porcs à l'exception des porcs en contact indirect pour la souche « S-InDel » et d'un porc en contact direct pour la souche « S-non-InDel » a été observée. Le PEDV a été détecté dans l'air des quatre animaleries: de 1 à 71 JPI avec la souche « S-non-InDel » et de 2 à 35 JPI avec la souche « S-InDel ». L'estimation des paramètres de transmission a mis en évidence un taux de transmission direct deux fois plus important pour la souche « S-non-InDel » $\beta_w = 2,95 \text{ j}^{-1}$ (1,33; 5,23) vs $\beta_w = 1,36 \text{ j}^{-1}$ (0,6; 5,6) et un taux de latence beaucoup plus faible en cas d'infection par cette même souche $1/\delta = 0,003 \text{ jours}$ (0,001; 0,15) vs $1/\delta = 2,0$ (1,2; 3,6). La transmission indirecte, est un facteur important de diffusion du virus pour la souche « non-InDel » avec un taux de transmission β_b estimé à $0,5 \text{ j}^{-1}$ (0,1; 1,3).

Les résultats de cette étude mettent en évidence que la souche « S-InDel » se transmet moins efficacement que la souche « S-non-InDel ». En effet, dans les conditions expérimentales testées, le contact direct est la voie principale de transmission pour la souche « S-InDel » alors que la souche « S-non-InDel » peut se transmettre à la fois par contact direct et par voie aérienne. La quantification de la transmission souligne un taux de propagation plus important avec la souche « S-non-InDel » qu'avec la souche « S-InDel ».

Publication n°1

Les résultats de la première étude ont fait l'objet d'un article qui sera soumis au deuxième semestre 2018 dans « Veterinary Microbiology » et présenté ci-après. (Gallien, S., Fablet, C., Bigault, L., Bernard, C., Toulouse, O., Berri, M., Blanchard, Y., Rose, N., Grasland, B., 2018: Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: Descriptive epidemiology and control measures implemented. Veterinary Microbiology, 226, 9-14.)

Publication n°2

Les résultats de la deuxième étude ont fait l'objet d'un article accepté en juin 2018 dans la revue « Transboundary and Emerging Disease » et présenté ci-après. (Gallien, S., Andraud, M., Moro, A., Lediguerher, G., Morin, N., Gauger, P.C. , Bigault, L., Paboeuf, F., Berri, M., Rose, N., Grasland, B., 2018: Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus. Transbound Emerg Dis. DOI: 10.1111/tbed.12945)

**Article 1: Lessons learnt
from a porcine epidemic
diarrhea (PED) case in
France in 2014:
descriptive epidemiology
and control measures
implemented**

Accepted Manuscript

Title: Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: descriptive epidemiology and control measures implemented

Authors: Sarah Gallien, Christelle Fablet, Lionel Bigault, Cécilia Bernard, Olivier Toulouse, Mustapha Berri, Yannick Blanchard, Nicolas Rose, Béatrice Grasland



PII: S0378-1135(18)30890-3
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.023>
Reference: VETMIC 8085

To appear in: *VETMIC*

Received date: 26-7-2018
Revised date: 25-9-2018
Accepted date: 25-9-2018

Please cite this article as: Gallien S, Fablet C, Bigault L, Bernard C, Toulouse O, Berri M, Blanchard Y, Rose N, Grasland B, Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: descriptive epidemiology and control measures implemented, *Veterinary Microbiology* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.023>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: descriptive epidemiology and control measures implemented

Sarah Gallien^{1,2}, Christelle Fablet^{1,2}, Lionel Bigault^{1,2}, Cécilia Bernard^{1,2}, Olivier Toulouse³, Mustapha Berri⁴, Yannick Blanchard^{1,2}, Nicolas Rose^{1,2}, Béatrice Grasland^{1,2*}

¹Anses, Laboratory of Ploufragan/Plouzané, BP53, 22440 Ploufragan, FRANCE;

²Université Bretagne Loire, Cité internationale, 1 place Paul Ricoeur CS 54417, 35044 Rennes, FRANCE

³Clinique VET Flandres, 5 bis rue de Dunkerque, 59190 Hazebrouck, FRANCE;

⁴INRA ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly, FRANCE

*Corresponding author: Beatrice Grasland, beatrice.grasland@anses.fr

Highlights

In this article, we reported:

- the first case of a PED outbreak in December 2014 in the North of France after a long absence of the disease
- the monitoring of the excretion and the control measure implementation.

The conclusion of that work was:

- the isolated strain in France in December 2014 was a PEDV “S-InDel” strain was close to the “S-InDel” German PEDV strain isolated in May 2014
- using strict biosecurity measures, direct shipment of infected fatteners to the slaughterhouse, strict decontamination protocols avoided the spread to other herds

Abstract

An acute epidemic of porcine epidemic diarrhea (PED) has affected the USA since 2013 and spread all around the world. In France, the immune status of the pig population against PED virus (PEDV) was expected to be low due to the absence of circulation of the virus since the 80's and a compulsory notification of PED was set up in 2014. Here, we reported the first case of a PED outbreak in December 2014 in the North of France after a long absence of the disease, the monitoring of the excretion and the control measure implementation. The isolated strain in France in December 2014 was a PEDV "S-InDel" strain which was close to the "S-InDel" German PEDV strain isolated in May 2014. The individual shedding duration of PEDV in feces was estimated around 20 days for pigs of different ages. Biosecurity measures implemented allowed the limitation of PEDV spread to fattening and farrowing rooms without dissemination to the nursery block. Using strict biosecurity measures, direct shipment of infected fatteners to the slaughterhouse, strict decontamination protocols with a quarantine of 6 weeks for replacement gilts without voluntary contamination helped PEDV fade out within the herd and avoided the spread to other herds. PEDV presence in manure was investigated as well as the inactivation treatment of the virus present in the liquid manure. An increase to a pH 12 of liquid manure by liming led to the absence of PEDV detection by RT-PCR after seven days.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea, epidemiology, biosecurity, on-farm control

1) Introduction

First cases of porcine epidemic diarrhea (PED) were described in the 70's in England. Other PED cases were observed in other European countries such as Belgium, Germany, France, Netherlands and Switzerland between 1970 and 1980. The disease is characterized by

severe watery diarrhea with vomiting and dehydration. The causal agent is an enveloped *alphacoronavirus* with a positive single-stranded RNA genome of 28kb named porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) which was isolated for the first time in Belgium in 1977 and provided the reference strain called CV777 (Grasland et al., 2015a; Jung and Saif, 2015; Pensaert and de Bouk, 1978; Song and Park, 2012).

PEDV was also identified as the cause of severe epidemics in Asia in 1982 (Sung et al., 2015). After the 80's, some sporadic cases of PED were described in Europe but PEDV continued to propagate and to persist as endemic disease in the swine population of several countries. In 2005-2006, some PED cases were described in Italy and affected pigs of all ages (sows, suckling piglets and fattening pigs). Morbidity rate ranged from 20 to 80% and a mortality rate in suckling piglets greater than 34% was reported (Martelli et al., 2008). Other sporadic cases of PED were also registered between 2008 and 2014 in Italy (Grasland et al., 2015a). Between 2010 and 2012, severe PED cases were reported in China despite the frequent use of vaccines with morbidity rates up to 100% and mortality rate of suckling piglets ranging between 80% and 100% (Sun et al., 2012). Two types of strains were isolated in China at that time with differences in their S1 nucleotide sequences (insertions/deletions). They were called "S-InDel" and "S-non-InDel" PEDV strains and are still circulating currently (Wang et al., 2013). Thereafter, from 2013, those same PED strains were introduced in the United States of America (USA) for the first time. From the clinical reports, it came out that cases due to "S-non-InDel" strains were generally more severe and were extremely difficult to control at the farm level. One year after the first case, a loss of 10% of the swine population i.e. seven millions of piglets was recorded (Jung and Saif, 2015). The first "S-non-InDel" PEDV strains isolated in USA, in April 2013, present 99.5% of nucleotide identity with a Chinese strain, China/AH2012 isolated in 2012 (Figure 1) (Huang et al., 2013; Stevenson et al., 2013). In January 2014, the first characterized US "S-InDel" strain named

OH851, has been described (Wang et al., 2014). Another PEDV “S-InDel” variant named USA/Indiana 12.83/2013 has been detected as soon as June 2013 suggesting that the two types of PEDV strains were introduced at the same time in USA (Vlasova et al., 2014). New cases of PED were then detected in Europe in 2014 in Germany, Spain, in Slovenia, in Belgium, in Austria, in Portugal and in the Netherlands. In Germany, in May 2014, a PED case was reported in a fattening farm. The strain isolated showed 99.5% and 97.5% of nucleotide identity with an “S-InDel” strain isolated in 2014 in the USA, the strain OH851, and the strain CV777 respectively (Stadler et al., 2015).

One PED case was reported in France in December 2014 in the North part of the country and the isolate PEDV/FR/001/2014 was similar to the German isolate previously characterized (Grasland et al., 2015b). The objective of this report was to decipher the lessons learnt from the description of this French PED case regarding the epidemiology, the follow up of the within-herd virus persistence and control measures implemented to get rid of the infection.

2) Material and methods

Case report

The outbreak occurred in a farrow-to-finish herd located in the North of France with 240 sows managed as four batches of 60 sows weaning approximately 700 piglets every five weeks. The herd was composed of 3 separate buildings on the same site with approximately 15-20 m distance between them (farrowing, nursery and fattening). The fattening building was divided in three blocks: block 1, 2 and 3 (each large room housing 680 pigs on average). The first clinical signs appeared in the block 1 which was close to the loading area for fatteners. Fever and cough were detected on November 22nd, 2014 in block 1 and anorexia on November 25th and 29th in blocks 2 and 3. For each block, the diarrhea (liquid and profuse) appeared two days after the first clinical signs. The morbidity rate was evaluated around 50%

and the overall mortality rate ranged between 3.3% and 5.5% in the three rooms of the fattening building. In the farrowing building, yellow and watery diarrhea started on November 30th in young piglets born the same week (3 litters affected) and one day later, morbidity rate was closed to 100% for piglets and 5% for the sows (vomiting, anorexia and diarrhea for some of them). The mortality rate in piglets reached 12% after one week and raised 25% at weaning time. Gilts showed also signs of diarrhea (5 to 10% of morbidity). No clinical signs were reported in the last herd building (nursery) throughout the outbreak. PED was suspected by the farm vet on December 1st 2014 and the outbreak was notified the same day to the French Directorate General for Food (DGAI) of the French Ministry of Agriculture. On December 2nd, 2014, jejunum from three affected animals were collected as well as feces from affected animals: one pool of five feces from affected sows, one pool of five feces from affected suckling piglets and one pool of five feces from affected fatteners. All samples were sent to the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety laboratory (Anses) of Ploufragan for PED diagnosis.

A retrospective epidemiological survey was carried out by the vet officers and the farm vet to identify the most likely sources of introduction and the risk of further spread to other farms. To this aim a retrospective chronology of the events was systematically recorded. Possible direct or indirect contact chains between the case farms and other farms were also traced.

Monitoring of PEDV excretion in feces

After confirmation of PED, a monitoring of viral excretion in feces of pigs of different ages was carried out in the herd. Five piglets per litter were selected from 10 litters and were individually identified and monitored as well as the corresponding sows (8/10). The three blocks of the fattening building were also followed with individual sampling of 30 identified pigs in block 1 and in addition ten pools of five pigs for each block (blocks 1, 2 and 3). The samples from the suckling piglets and the fatteners were taken at 12, 19 and 29 days post-

clinical expression and at 12 and 19 days post-clinical expression for the sows. An additional control of the PED status of the farm was done in March 2015, i.e. 97 days post clinical outbreak, by sampling feces and blood from 20 fatteners which were suckling piglets at the moment of the PED outbreak. Pools of feces from other fattener pigs were also taken (eight pools).

Sample preparation and RNA extraction

Homogenates of the feces and the pools of feces were done before total RNA extractions. The homogenates were prepared with 1 ml of the sample homogenized with 9 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (Dulbecco's PBS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The homogenate was then centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C . Homogenates of jejunum were done at 20% (w/v) in Dulbecco's PBS using a bead mill (Retsch, Haan, Germany). The suspensions were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C . The blood samples were centrifuged at $1,200 \times g$ for 10 min at 4°C and the sera were aliquoted. All the homogenates and sera were stored at -80°C . Total RNAs were extracted from the homogenates using TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for the samples taken on December 2nd, 2014 for official diagnosis (Blanchard et al., 2006). For the others homogenates (fecal homogenates taken after the day of suspicion and liquid manure homogenates), total RNAs were extracted using the Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Quantification of PEDV genomes and PEDV serology

Five μl of RNA elution were used as templates for PEDV RT-qPCR. RNA extraction controls, every five samples to check for any PEDV contamination, were carried out by replacing sample with RNase free water. Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) targeting the N gene was performed on the different total RNAs extracted to quantify the genomic load expressed as genomic equivalent copy (GEC) according to a previous published method with

slight modifications. The number of PEDV GEC was assessed with a Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step kit on a 7500 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions as previously described (Gallien et al., 2018b).

Sera were tested for PEDV antibodies using a commercial ELISA test, ID Screen® PEDV Indirect (ID Vet, Grabels, France). For each sample, the sample-to-positive ratio (S/P ratio) was calculated. Samples with S/P ratio equal or higher than 60% were considered positive for PEDV antibodies.

Characterization of the PEDV strain

In parallel of the quantification of GEC, a next-generation sequencing and data analysis were performed on total RNAs extracted from the 3 jejunum samples taken on suspicion day for official diagnosis in order to obtain the full-length genome sequence. Trimmomatic and tmap were used for cleaning and aligning reads (Bolger et al., 2012) and samtools to create consensus sequence (Li, 2011). Alignment was realized using progressive Mauve (Darling et al., 2010) and phylogenetic analysis was performed using PhyML (Guindon et al., 2010). The PEDV genome sequences obtained from jejunum samples were named PEDV/FR/001/2014 (GenBank number: [KR011756](#)) to PEDV/FR/003/2014.

Biosecurity measure implementation

After the declaration of this PED case, biosecurity and control measures were implemented for the management system of the farm and the transport of contaminated animals. Shipment of infected fatteners to the slaughterhouse was delayed for a week after the clinical outbreak. Specific measures were taken for the transport of the animals to the slaughterhouse: a single route without stop was scheduled and the truck used for the transport of infected animals was cleaned and disinfected after the movement of the animals. In fattening and farrowing blocks, a two days strict program of cleaning, disinfecting, liming and

thermal fogging was put in place after the transfer of infected animals. A disinfection or use of block-specific personal protective equipment between the different buildings was also put in place. A quarantine of six weeks for gilts before their transfer to the service room was implemented. The voluntary contamination of gilts with PED infected feces was not performed.

Manure treatment

A reflecting back on different ways of manure treatment in a PEDV infected pig holding has then been done and *in vitro* tests have been put in place too. Different ways of treatment have been considered such as a thermic treatment, slurry storage for a while or the decrease/increase of pH. The option of increasing the pH with lime was chosen because it was already demonstrated that PEDV was unstable at a pH above about 9 or 7.5 according to the temperatures of storage (Pospischil et al., 2002).

In vitro, lime was added into naturally-infected liquid manure (5.2g and 7.2 g of lime respectively added to 200mL of infected manure) to obtain a pH of 9 or 12 at room temperature. Before and after one hour of agitation, one mL of liquid manure was sampled daily during one week. The presence of PEDV genome was then assessed in each sample by RT-qPCR.

3) Results

PEDV genome load quantification and characterization of the PEDV strain

The amounts of genomic loads found in jejunum collected from the three dead suckling piglets were higher than the amounts in feces (1.93×10^9 , 1.54×10^6 and 1.75×10^{10} GEC/g of tissue).

The next-generation sequencing and the data analysis of the strains isolated from the three jejunum samples of dead piglets from this farm showed that no single nucleotide variant was observed between the three obtained sequences. The strain isolated was called

FR/001/2014. A phylogenetic tree was built using 28 PEDV complete genomes (Figure 1). PEDV FR/001/2014 was genetically related to the German strains PEDV GER/L00719/2014 (99.9% of identity) isolated in May 2014 (Hanke et al., 2015) and with the PEDV USA/Indiana12.83/2013 (99.8% of identity), an US strain detected in June 2013 (Vlasova et al., 2014). The USA/OH851/2014 strain shared 99.4% of identity with the German and French isolates (Hanke et al., 2015). Twenty-four nucleotides differed between the French and German strain with 10 out of 24 located in the S gene leading to 5 amino acid substitutions. FR/001/2014 and USA/Indiana12.83/2013 PEDV isolates presented 91 differences in nucleotides with 19 in the S gene leading to 6 amino acid substitutions (Table 1).

Outcome of the epidemiological investigation

The retrospective assessment of the events revealed that only few animal movements occurred on the farm before the outbreak: one introduction of gilts from an external herd far from the case herd and without any record of PEDV-like symptoms and one shipment of fatteners by a German truck a few days before (November 17th, 2014). The truck was not clean and contained residual litter according to the farmer's testimony and in addition he made a stop on the farm site for one night. Three shipments were recorded for rendering with no outbreak following the tracing of the trucks. Four unloading of feed ingredients were also recorded but only of vegetal or mineral origin with a low risk of contamination. None of the farms located within a 1 km radius around the case farm experienced a PEDV outbreak. It came out from the investigation that the most likely source was the unclean truck which loaded part of the fatteners housed in the block 1 of the fattening building where the first signs appeared on November 22nd.

Monitoring of PEDV shedding in infected piglets

During the monitoring period, shedding in feces could be observed at 12, 19 and 29 days post-suspicion for the suckling piglets. Sixty-six per-cent, 31.9% and 4.3% of the

suckling piglets were still shedding PEDV in their feces at 12, 19 and 29 days post-suspicion respectively. At 12 days post-clinical signs, only piglets from one of the ten litters were no more shedding the virus in feces (Table 2). However, PEDV was detected for two suckling piglets of this litter at 19 days post-suspicion. At 12 days post-clinical signs, all the monitored sows were shedding PEDV in their feces and it decreased to 57.1% of the monitored sows at 19 days post-clinical signs (Table 2).

After 20 days post-clinical signs, only few fattener pigs were still shedding PEDV in feces in bloc 1 and half of them in block 3 (Table 3). However, as soon as 24 and 27 days post-clinical signs, the viral genome was no more detected.

No pig was infected in the nursery building after the outbreak.

In March 2015, i.e. 97 days post clinical outbreak, 66.6% of the suckling piglets monitored at the beginning of the outbreak were tested and found negative for PEDV in feces. Only three of them were found PEDV seropositive. The other fatteners tested at the same time were also negative for PEDV. The control of the farm in 2017 revealed that no PEDV RNA was detected in feces from all sampled animals (n=15 sows, 15 lactating piglets, 15 piglets in nursery, 15 fatteners) and that all animals were seronegative for PEDV.

Impact of liming treatment on manure

At the beginning of the *in vitro* assay, before the addition of lime, the amounts of PEDV genomic copies were 6.9×10^6 and 7.45×10^6 GEC/mL of slurry in each recipient. The first recipient was put at a pH of 9 and the second one at a pH of 12. One hour after the addition of lime, the amount of PEDV RNA detected in slurry was ten times higher at pH 9 than at pH 12 (3.82×10^6 vs 2.15×10^5 GEC/mL respectively) (Figure 2). At pH 9, virus RNA could be recovered until 72 and 96 hours post-treatment (HPT) according to treatment (mixing and no premixing before sampling respectively). Three or four extra days were

necessary at pH 9 for the lack of viral genome detection in liquid manure (Figure 2). At pH 12, no PEDV RNA could be detected as soon as 24 HPT and throughout the experiment.

4) Discussion

A PED case was confirmed in the North of France in December 2014. Full-length genome sequence of the French isolate and the phylogenetic analysis revealed the high similarity with the German isolate GER/L00719/2014 detected shortly before in May 2014 and with the USA/Indiana12.83/2013 PEDV strain sampled in June 2013. The French isolate presented mild pathogenic characteristics as other “S-InDel” PEDV strains.

This case of PED in France in 2014 showed that pigs of all ages could be affected by PED including fatteners and even adults sows. The mortality rate was more important for suckling piglets than for the rest of the swine population of the farm. Consistently, other historical clinical outbreaks involving an “S-InDel” strain also affected pigs of all ages with a higher mortality in suckling piglets (Martelli et al., 2008). PEDV could be detected until 20 days post-clinical signs for fatteners and until 29 days post-clinical signs for one suckling piglet. This is in agreement with the duration of excretion observed with the same strain in experimental conditions on piglets of 3 weeks of age (Gallien et al., 2018a). Four months after this outbreak, no more PEDV was detected in feces from pigs of all ages.

The absence of propagation of the virus in the nursery building during the outbreak in 2014 and the absence of detection of PEDV in feces and PEDV antibodies in sera revealed that within-farm biosecurity measures put in place in this herd were effective. It is known that to decrease the transmission of PEDV within and between farms, it is important to disinfect footwear, breeding materials, transport trucks, to change clothes between blocks/buildings and to control the entry in farm of pests such as insects or rodents. Kim and al. (2017), have highlighted the importance of changing personal protective equipment and washing skin areas exposed to the virus before the change of blocks or buildings to decrease the risk of PEDV

indirect transmission (Kim et al., 2017). Recent studies on the efficacy of disinfection against PEDV revealed that phenol, quaternary ammonium and quaternary ammonium/glutaraldehyde combination can allow PEDV elimination (Bowman et al., 2015). The choice of the disinfectant used on cleaned surfaces is important to control the sanitary condition of the farm.

The absence of transmission from the fattening unit to the nursery block (less than 20 meters in between) despite huge viral loads shed by the infected fatteners, suggests that the virus was not able to spread by the airborne route on this short distance. This is consistent with our observations in experimental conditions with the “S-InDel” strain (Gallien et al., 2018a) and seems to be a main difference with the “S-non-InDel” strains (Alonso et al., 2014).

A possible transmission of virus by the environment has already been shown (Goyal, 2013). This virus is able to survive during 14 days at room temperature and up to 28 days between -20°C and 4°C in inoculated slurry manure (Goyal, 2013). A recent study showed that PEDV could also survive up to 9 months in infected earthen manure storage under temperature range from -30°C to 23°C (Tun et al., 2016). PEDV is stable to variations in pH in the range from 5 to 9 (Hofmann and Wyler, 1989). Our *in vitro* study revealed that at pH 12 no more PEDV RNA could be detected at 24 HPT. The liming treatment had allowed eliminating the presence of PEDV after 7 days. In addition to the elevation in pH, the storage duration influenced the efficacy of the treatment too. It is therefore pivotal to have the adapted storage capacity after liming and to proceed also with frequent agitation of infected manure that could allow direct exposure of infectious viruses to environmental UV hence reducing the quantity of infectious virus (Tun et al., 2016). When liming need to be implemented on farms, it should be kept in mind that due to heat produced by the reaction between lime and water, the practice should be taken in an appropriate well ventilated place with protective equipment for the humans (gloves, glasses and mask).

To conclude, this PEDV case teaches us that the “S-InDel” PEDV strain isolated doesn’t spread over long distances in pig holdings. The transmission of the virus between compartments is mainly due to mechanic carriage of the virus. Effective biosecurity measures can considerably slow down the viral propagation in the pig holdings. Combined to cleaning procedures, disinfection and treatment of manure by liming, drastic biosecurity measures could clean up an “S-InDel” PEDV contaminated pig holding. External biosecurity measures are also essential to prevent the introduction of “S-InDel” PEDV strain in a PEDV-free pig holdings.

Author contributions

SG wrote the manuscript. CF, BG, NR and MB supervised the study. All the co-authors revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgements

We would like to thank the French Directorate General for Food (DGAl) for the financial support and also the “Direction départementale de la protection des populations du Nord” and the pig farmer for their assistance in sample collection.

References

- Alonso, C., Goede, D.P., Morrison, R.B., Davies, P.R., Rovira, A., Marthaler, D.G., Torremorell, M., 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary research* 45, 73.
- Blanchard, Y., Le Meur, N., Le Cunff, M., Blanchard, P., Leger, J., Jestin, A., 2006. Cellular gene expression survey of PseudoRabies Virus (PRV) infected Human Embryonic Kidney cells (HEK-293). *Vet Res* 37, 705-723.
- Bolger, A.M., Lohse, M., B., U., 2012. Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- Bowman, A.S., Nolting, J.M., Nelson, S.W., Bliss, N., Stull, J.W., Wang, Q., Premanandan, C., 2015. Effects of disinfection on the molecular detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary microbiology* 179, 213-218.
- Darling, A.E., Mau, B., Perna, N.T., 2010. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS one* 5, 11147.
- Gallien, S., Andraud, M., Moro, A., Lediguerher, G., Morin, N., Gauger, P.C., Bigault, L., Paboeuf, F., Berri, M., Rose, N., Grasland, B., 2018a. Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *Transboundary Emerging Diseases*.
- Gallien, S., Moro, A., Lediguerher, G., Catinot, V., Paboeuf, F., Bigault, L., Berri, M., Gauger, P.C., Pozzi, N., Authie, E., Rose, N., Grasland, B., 2018b. Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. *Veterinary research* 49, 7.
- Goyal, S. 2013. Environmental Stability of PEDV. Available at: <http://www.pork.org/pedv-333-2013-research> (accessed September 12 2017).

- Grasland, B., Bigault, L., Bernard, C., Andraud, M., Blanchard, Y., Rose, N., 2015a. La diarrhée épidémique porcine: quel risque en France? Comment s'y préparer? *Journées Recherche Porcine* 47, 259-264.
- Grasland, B., Bigault, L., Bernard, C., Quenault, H., Toulouse, O., Fablet, C., Rose, N., Touzain, F., Blanchard, Y., 2015b. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014. *Genome announcements* 3.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 59, 307-321.
- Hanke, D., Jenckel, M., Petrov, A., Ritzmann, T., Stadler, J., Akimkin, V., Blome, S., Pohlmann, A., Schirrmeyer, H., Beer, M., Höper, D., 2015. Comparison of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses from Germany and the United States, 2014 *Emerging infectious diseases* 21.
- Hofmann, M., Wyler, R., 1989. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Veterinary microbiology* 20, 131-142.
- Huang, Y.W., Dickerman, A.W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., Meng, X.J., 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* 4, e00737-00713.
- Jung, K., Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinay Journal* 204, 134-143.
- Kim, Y., Yang, M., Goyal, S.M., Cheeran, M.C., Torremorell, M., 2017. Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus. *BMC Veterinary Research* 13, 89.

- Li, H., 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27, 2987-2993.
- Martelli, P., Lavazza, A., Nigreli, A., Merialdi, G., Alborali, L., Pensaert, M., 2008. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Record* 162, 307-310.
- Pensaert, M.B., de Bouk, P., 1978. A new coronavirus-like particule associated with diarrhea in swine. *Archives of virology* 58.
- Pospischil, A., Stuedli, A., Kiupel, M., 2002. Update on porcine epidemic diarrhea. *Journal of swine health and production* 10, 81-85.
- Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167-175.
- Stadler, J., Zoels, S., Fux, R., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., Weissenböck, H., Weissenbacher-Lang, C., Ritzmann, M., Ladinig, A., 2015. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Veterinary Research* 11, 142.
- Stevenson, G.W., Hoang, H., Schwartz, K.J., Burrough, E.R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V.L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B.J., Koster, L.G., Killian, M.L., Yoon, K.J., 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 25, 649-654.
- Sun, R.Q., Cai, R.J., Chen, Y.Q., Liang, P.S., Chen, D.K., Song, C.X., 2012. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerging Infectious Diseases* 18, 161-163.

- Sung, M.H., Deng, M.C., Chung, Y.H., Huang, Y.L., Chang, C.Y., Lan, Y.C., Chou, H.L., Chao, D.Y., 2015. Evolutionary characterization of the emerging porcine epidemic diarrhea virus worldwide and 2014 epidemic in Taiwan. *Infection Genetics and Evolution* 36, 108-115.
- Tun, H.M., Cai, Z., Khafipour, E., 2016. Monitoring Survivability and Infectivity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDv) in the Infected On-Farm Earthen Manure Storages (EMS). *Frontiers in Microbiology* 7, 265.
- 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. *Emerging infectious diseases* 20, 1620-1628.
- Wang, L., Byrum, B., Zhang, Y., 2014. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerging infectious diseases* 20, 917-919.
- Wang, X.M., Niu, B.B., Yan, H., Gao, D.S., Yang, X., Chen, L., Chang, H.T., Zhao, J., Wang, C.Q., 2013. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010. *Archives of Virology* 158, 2487-2494.

Figure 1: Phylogenetic analysis of 28 PEDV complete genomes.

The French isolate sequence named FR/001/2014 (in red) was compared to “InDel” strains from Germany (GER/L00719/2014), USA (USA/Ind12.83, USA/Min52, USA/OH851 and USA/Iowa23.57) and South Korea (South Korea/KNU-1406-1/2014), and also to highly pathogenic strains from China (China/AH2012), USA (USA/Col/2013, USA/IA1/2013, USA/MN/2013, USA/IA2/2013, PEDV/USA/Indiana) and South Korea (Korea/KNU-1305/2013). The phylogenetic tree was constructed using PhyML (Guindon et al., 2010). The numbers represent bootstrap values at key nodes and the scale bar nucleotide substitutions per site.

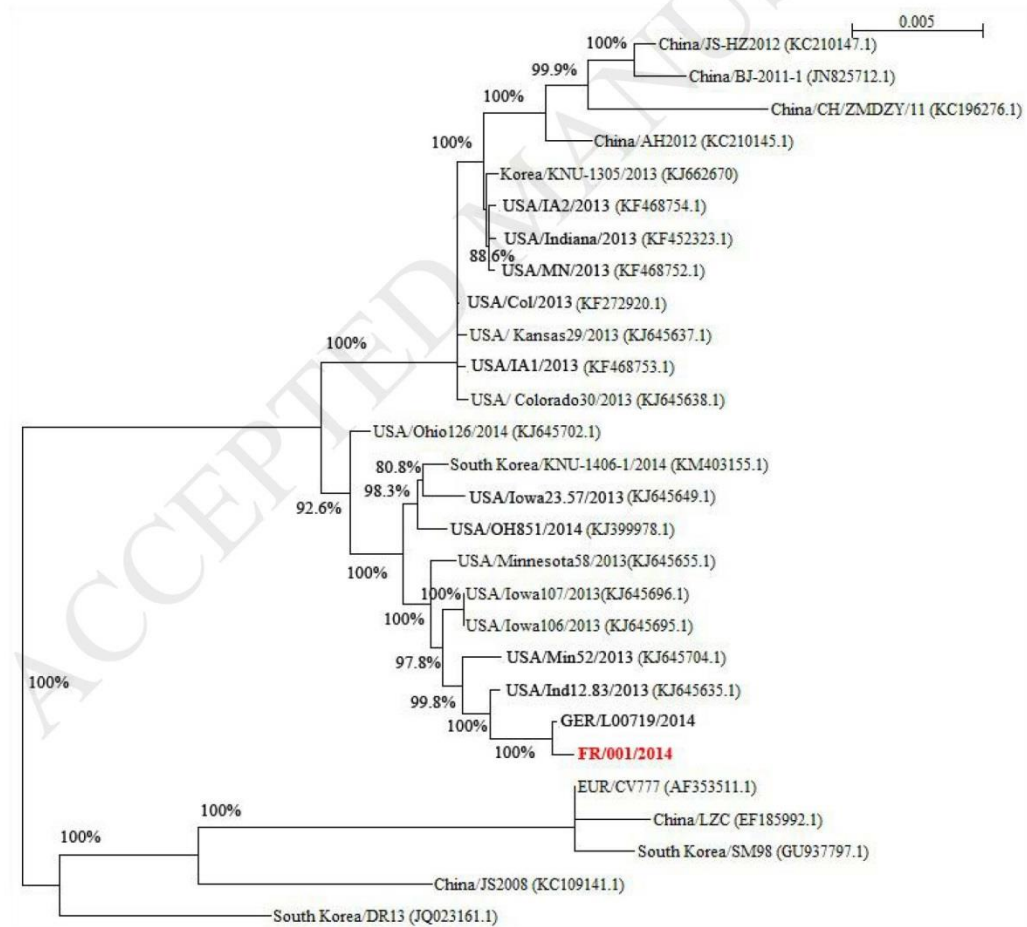


Figure 2: Average number of PEDV genome equivalent copies/mL of liquid manure in function of time after liming. *Black continuous line: pH 9, sampling after mixing; black dash line: pH9, sampling without pre-mixing; grey line: pH12 with or without pre-mixing.*

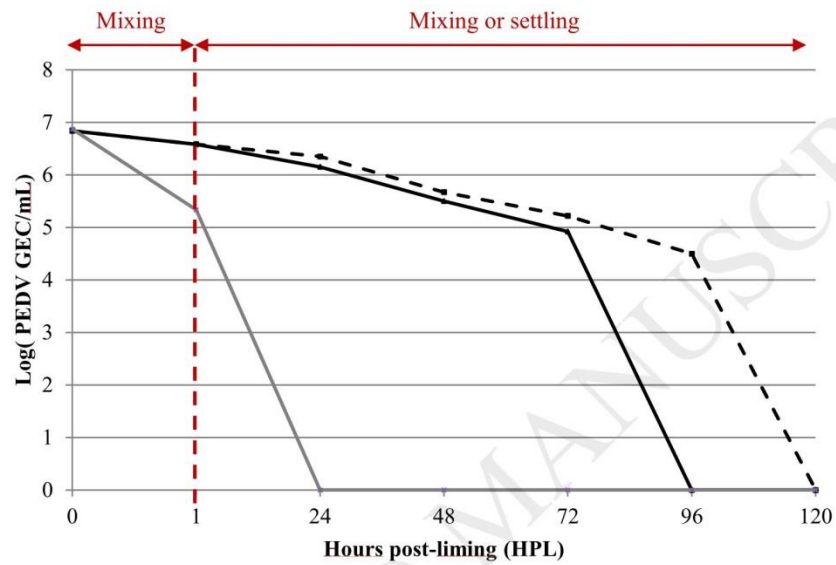


Table 1: Comparison of amino acid differences in S protein between the PEDV “InDel” strains.

Table 1

Amino acid position in S protein	Amino acid in		
	FR/001/2014	GER/L000719/2014	USA/Indiana 12.83/2013
83	A	S	A
126	N	N	D
128	K	N	K
156	E	G	G
236	V	A	A
358	T	T	A
1158	G	G	S
1161	I	V	V

Table 2: Average number of PED genome copies per mL of feces for sows and suckling piglets (10 litters, 5 piglets per litter, one herd). *nd: not determined, *GEC: Genome equivalent copies*

Table 2

			<i>Days post-clinical signs</i>		
			12	19	29
<i>Litter 1</i>	<i>Sow</i>	<i>GEC*</i>	3.16×10^6	nd	nd
	<i>Suckling piglets</i>	<i>Number of PEDV shedding piglets</i>	5/5	1/5	0/5
		<i>Average GEC</i>	1.13×10^9	3.89×10^5	0
<i>Litter 2</i>	<i>Sow</i>	<i>GEC</i>	1.10×10^7	2.04×10^5	nd
	<i>Suckling piglets</i>	<i>Number of PEDV shedding piglets</i>	2/5	1/5	1/5
		<i>Average GEC</i>	4.50×10^6	4.55×10^4	1.97×10^4
<i>Litter 3</i>	<i>Sow</i>	<i>GEC</i>	1.11×10^8	0	nd
	<i>Suckling piglets</i>	<i>Number of PEDV shedding piglets</i>	5/5	1/5	0/5
		<i>Average GEC</i>	1.61×10^7	6.00×10^4	0

Litter 4	Sow	GEC	3.70×10^4	2.19×10^5	nd
	Suckling piglets	Number of PEDV shedding piglets	4/5	3/5	1/5
		Average GEC	3.62×10^8	7.17×10^8	8.23×10^5
Litter 5	Sow	GEC	4.71×10^6	8.50×10^3	nd
	Suckling piglets	Number of PEDV shedding piglets	5/5	2/3	1/5
		Average GEC	2.92×10^7	7.88×10^4	3.67×10^4
Litter 6	Sow	GEC	2.51×10^5	2.85×10^4	nd
	Suckling piglets	Number of PEDV shedding piglets	4/5	2/5	0/5
		Average GEC	5.92×10^7	4.35×10^4	0
Litter 7	Sow	GEC	1.68×10^7	0	nd
	Suckling piglets	Number of PEDV shedding piglets	3/5	2/5	0/3
		Average GEC	2.84×10^8	2.95×10^8	0
Litter 8	Sow	GEC	1.05×10^6	0	nd
	Suckling piglets	Number of PEDV shedding piglets	3/5	0/4	0/5
		Average GEC	1.49×10^8	0	0
Litter 9	Sow	GEC	nd	nd	nd
	Suckling piglets	Number of PEDV shedding piglets	2/5	1/5	0/5
		Average GEC	1.97×10^8	2.23×10^5	0
Litter 10	Sow	GEC	nd	nd	nd
	Suckling piglets	Number of PEDV shedding piglets	0/5	2/5	0/4
		Average GEC	0	1.09×10^5	0

nd: not determined, *GEC: Genome equivalent copies

Table 3: Average number of PEDV genome copies per mL of feces for fatteners after appearance of clinical signs in three fattening blocks. *nd: not determined, *GEC: Genome*

Table 3

		<i>Days post-clinical signs</i>		
		<i>20</i>	<i>27</i>	<i>37</i>
<i>Block 1</i>	<i>Number of PEDVshedding pigs</i>	2/30	0/30	0/30
	<i>Average GEC*</i>	4.83×10⁴	0	0
	<i>Number of PEDV positive pools of feces</i>	1/10	nd	nd
	<i>Average GEC</i>	6.30×10⁴	nd	nd
		<i>17</i>	<i>24</i>	<i>34</i>
<i>Block 2</i>	<i>Number of PEDV positive pools of feces</i>	2/10	0/10	0/10
	<i>Average GEC</i>	2.70×10⁴	0	0
		<i>13</i>	<i>20</i>	<i>30</i>
<i>Block 3</i>	<i>Number of PEDV positive pools of feces</i>	6/10	5/10	0/10
	<i>Average GEC</i>	3.16×10⁴	3.33×10⁴	0


*nd: not determined, *GEC: Genome equivalent copies*

**Article 2: Better
horizontal transmission of
a US « S-non-InDel » strain
compared to a French « S-
InDel » strain of porcine
epidemic diarrhea virus**

Received: 5 March 2018 | Accepted: 1 June 2018

DOI: 10.1111/tbed.12945

ORIGINAL ARTICLE

WILEY  Transboundary and Emerging Diseases

Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus

Sarah Gallien^{1,2,3}  | Mathieu Andraud^{1,2} | Angélique Moro^{1,2} | Gérald Lediguerher^{1,2} | Nadège Morin^{1,2} | Phillip C. Gauger⁴ | Lionel Bigault^{1,2} | Frédéric Paboeuf^{1,2} | Mustapha Berri³ | Nicolas Rose^{1,2} | Béatrice Grasland^{1,2}

¹Laboratoire de Ploufragan, ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Ploufragan, France

²Université Bretagne Loire, Rennes, France

³ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, Nouzilly, France

⁴Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, Iowa State University College of Veterinary Medicine, Ames, Iowa

Correspondence

Sarah Gallien, ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Ploufragan, Ploufragan, France.
Email: sarah.gallien@anses.fr

Funding information

Institut National de la Recherche Agronomique; Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail; INAPORC

Abstract

From the severe porcine epidemic diarrhoea (PED) epidemics that struck in 2013 in the United States of America and other countries of North and South America, two types of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) were isolated, namely the InDel and the non-InDel strains. They are differentiated by insertions/deletions in the S1 nucleotide sequence of the S gene, and differences in virulence were observed from the clinical cases. In 2014, a PED outbreak occurred in a pig farm in France, from which an InDel strain was isolated. This study aimed at comparing, under experimental conditions, the pathogenicity and the direct and indirect transmissions between a non-InDel strain isolated from a PED-affected piglet in 2014 in the USA and the French InDel strain. All infected pigs showed clinical signs with the non-InDel strain although only the inoculated and direct contact pigs showed clinical signs in the InDel strain group. Although viral RNA was detected in air samples with both strains, the indirect contact pigs remained free from infection with the InDel strain in contrast to the non-InDel group in which airborne transmission occurred in the indirect contact pigs. All infected pigs shed virus in faeces regardless of PEDV strain with 9 of 30 pigs showing intermittent faecal shedding. The transmission rate by direct contact was found to be 2.17-fold higher than the non-InDel strain compared with the InDel. In conclusion, the InDel strain was less pathogenic than the non-InDel strain in our experimental conditions. The transmission route differed between the two strains. Direct contact was the main transmission route for the InDel strain, although the non-InDel strain was transmitted through direct contact and indirectly through the air.

KEYWORDS

epidemiology, InDel strain, non-InDel strain, pathology, porcine epidemic diarrhoea virus, transmission

1 | INTRODUCTION

Porcine epidemic diarrhoea (PED) was described for the first time in England in 1971, and some PED cases have been identified

thereafter in other European countries (Jung & Saif, 2015; Song & Park, 2012). This disease, characterized by a severe, profuse watery diarrhoea with or without vomiting and dehydration, is caused by a positive sense, single-stranded RNA enveloped coronavirus of 28 kb

called the porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) (Jung & Saif, 2015). PEDV reference strain, CV777, was isolated in Belgium in 1977 (Pensaert & de Bouk, 1978). After several outbreaks in the 70s, PED has been persisting in Europe with sporadic cases until the late 1990s (Jung & Saif, 2015). Outbreaks of PED were also described in Asia in the 1980s and then between 2010 and 2012 (Jung & Saif, 2015; Wang et al., 2013). A new type of strain, genetically different from the reference strain, was isolated during those recent outbreaks, inducing a strong mortality despite the frequent uses of vaccines based on CV777 strain in Asia (Li et al., 2012; Wang et al., 2013). In 2013, swine producers in the United States of America were hit by PED although the country had previously been free from the disease. The PED disease spread rapidly throughout the country and in neighbouring countries of North and South America such as Canada and Mexico. Two genetically distant PEDV strains were isolated in the USA, namely the non-InDel strains, genetically similar to the aforementioned Asian strains, and the InDel strains, showing insertions–deletions in the S1 part of the S gene (Jung & Saif, 2015; Vlasova et al., 2014). From clinical reports, these two strains seemed to behave differently in terms of morbidity and mortality: The non-InDel strains were associated with more severe clinical cases and higher case fatality rate compared with the InDel strains (Vlasova et al., 2014; Wang, Byrum, & Zhang, 2014). In contrast with non-InDel strains, exclusively reported in America and Asia, InDel strains were also identified in Europe since 2014 (EFSA, 2016; Stadler et al., 2015; Vlasova et al., 2014). To date, PEDV circulates in America, Asia and Europe with different patterns in terms of epidemiological behaviour and persistence of the virus in the pig population.

Several studies focusing on the different types of PEDV strains allowed for a better understanding of PEDV epidemiology and pathogenicity. Because of a very low infectious dose (Thomas et al., 2015), PEDV can be transmitted by contact with contaminated equipment, the staff or contaminated vehicles used for animal transport (Bowman, Krogwold, Price, Davis, & Moeller, 2015; Jung & Saif, 2015; Lowe et al., 2014), but oro-faecal transmission is the main transmission route. PEDV is shed in faeces favouring a rapid transmission to susceptible pigs sharing the same environment as infected animals (Jung & Saif, 2015). Airborne transmission was evidenced over relatively long distances for non-InDel strains (Alonso et al., 2014), but still needs to be investigated as a potential transmission route for InDel PEDV strains.

Although rapid transmission is commonly recognized, the transmission was not quantitatively assessed for any PEDV strain and uncertainties remain about the pathogenicity, transmission efficiency and further consequences of a potential introduction of non-InDel PEDV strains into European pig populations. Therefore, the objective of this study was to compare the pathogenicity and quantify the level of PEDV during transmission through different routes of strains that represent the two types of PEDV isolated in 2014, an American non-InDel strain (PEDV/USA/2014/IOWA) and a French InDel strain (PEDV/FR/001/2014) under experimental conditions in a naïve pig population.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Inocula

Two inocula were used during the experimental trials. They resulted from the homogenization of a jejunum sample (20%w/v) collected from pigs affected by PED. The PEDV InDel strain, PEDV/FR/001/2014 strain (GB No: KR011756), was amplified on a 3-week-old SPF pig inoculated with homogenate of jejunum collected from PED-affected pigs belonging to a farm located in the north of France in 2014. The inoculum was prepared from the jejunum of the SPF PED-affected pig. For the PEDV non-InDel strain, PEDV/USA/2014/IOWA strain (GB No: MF37363), jejunum samples were collected from pigs from one herd affected by a non-InDel PEDV strain in the state of Iowa (USA) in 2014 and homogenized in phosphate-buffered saline. The two homogenates were centrifuged at 10,000x g for 10 min at 4°C, and supernatants were passed through a 0.45-µm filter. Next-generation sequencing (NGS) was performed on each inoculum to obtain the PEDV complete genome sequence and to ensure the absence of other RNA viral sequences. The inocula were also negative for porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). These absences were assessed by the absence of seroconversion against PCV2 and PRRSV after inoculation.

2.2 | Animals and experimental design

The experiments were carried out in the level-3 biosecurity, air-filtered facilities of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) in accordance with European and French regulations on animal experiments. The experimental design was approved by the ethics committee on animal experiments registered under number #16 by the French Ministry of Research (referral no. 16-032). For each strain, twenty large-white specific pathogen-free (SPF) weaned pigs, 28 days old, were equally distributed into two separate rooms (A and B) containing two separate pens (10 pigs per room) (Figure 1). Three additional SPF weaned piglets were housed in a third room C and used as negative control. In each room A and B, a seeder pig was placed in pen A in direct contact with four other pigs. In pen B, five naïve pigs were placed in indirect contact with pen A. The pens A and B were 40 cm apart and separated by a solid partition between the two pens to prevent any direct transfer of faecal material. The same design was used for the American non-InDel strain. The control animals were sampled first. Strict biosecurity measures were used during this two experiments to avoid any sample contamination. The outside portion of pen A and pen B was washed before every stage of sampling, and a footbath was set up before the entry of each pen. Individuals entering pens washed their boots and wading boots before passing through the footbath. The animals in pen B were also sampled before those of pen A. The manipulator also showered and changed clothes between each room of the two repetitions.

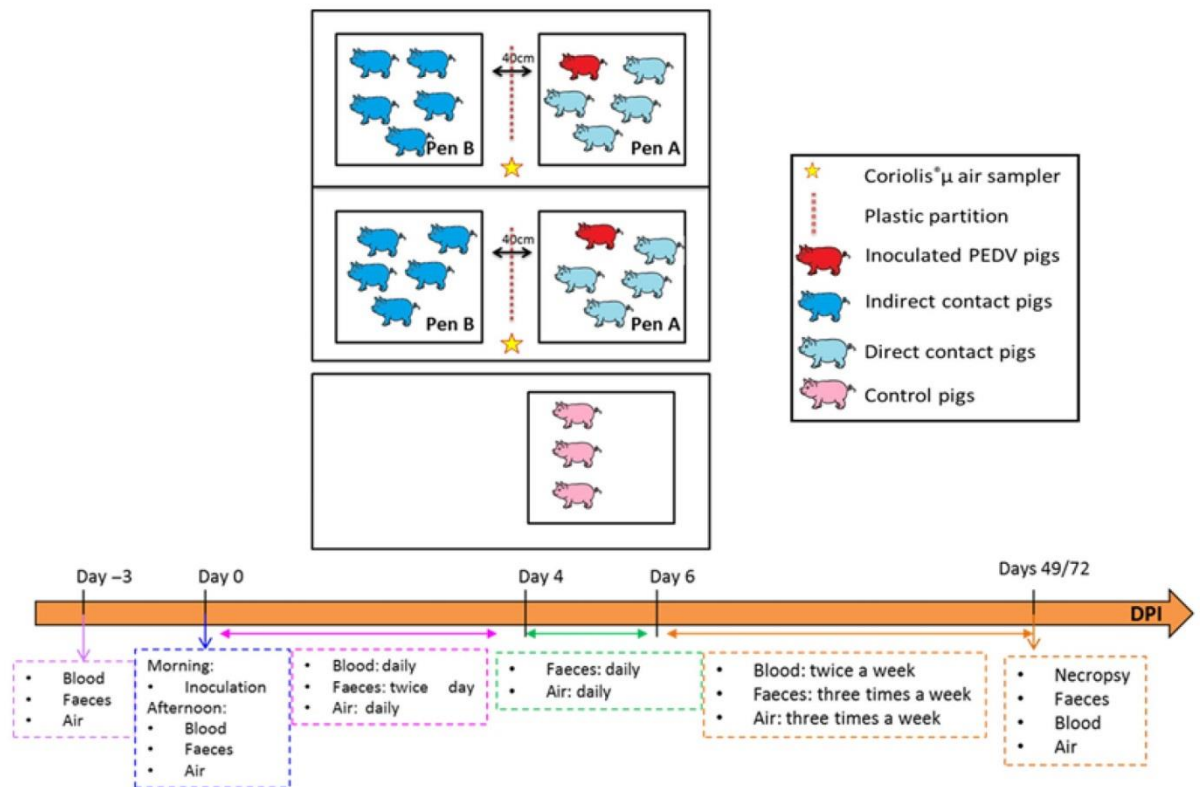


FIGURE 1 Design of the experimental trials

On day 0 (D0), each seeder pig of the infected groups was orally inoculated with 5 ml of a PEDV inoculum titrating 10^8 copies of viral genome/ml (estimated to $\approx 10^5$ TCID₅₀/ml) for each strain. The InDel and the non-InDel trials lasted 49 and 72 days postinoculation (dpi), respectively, when pigs were euthanized including anaesthesia (Zoletil[®], Virbac, Carros, France, 15 mg/kg) followed by bleeding before necropsy.

2.3 | Clinical assessment

Individual body weights were recorded on a weekly basis from D0, prior to inoculation, until the end of the experiment to assess the average daily weight gain (ADWG). Rectal temperatures were monitored daily for each pig from D0 until the end of the trial. The pigs were also scored daily for faecal consistency using the following criteria: (0) absence of faeces, (1) normal, (2) semi-liquid without a formed consistency and (3) liquid/watery contents. In addition, because of the severe impact of the non-InDel strain, the appearance, behaviour, vivacity and respiration of every pig were recorded the first week of the experiment.

2.4 | Biological samples and necropsy

Faecal samples were collected from all the pigs prior to inoculation and then the afternoon of the inoculation (0.5 dpi), twice a day

from 1 to 4 dpi, daily at 5 and 6 dpi and three times a week at 7 dpi until the end of the trial (Figure 1). One gram of faeces (or one ml of liquid faeces in case of diarrhoea) was homogenized with 9 ml of Dulbecco's phosphate-buffered saline (Sigma, Saint Louis, United States of America) and centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and stored at -80°C until use.

Blood was sampled prior to inoculation (0 dpi), the afternoon after inoculation (0.5 dpi) and then once a day the first week after inoculation (1-4 dpi) and twice a week until the end of the trial. Blood samples were centrifuged at $1,200 \times g$ for 10 min at 4°C, and sera were stored at -80°C until use.

After euthanasia, at 49 and 72 dpi for the InDel and the non-InDel trial, respectively, necropsies were performed and macroscopic lesions were evaluated. During necropsy, the following organs were collected and stored at -80°C in RNA later tissue storage reagent (Sigma, Saint Louis, USA): duodenum, jejunum, ileum, colon, spleen, liver, mesenteric and inguinal lymph nodes, psoas muscle and lungs.

Air samples were also collected using a Coriolis[®] air sampler (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) placed between the two pens (Figure 1) prior to inoculation (0 dpi) and then the afternoon after inoculation (0.5 dpi), once a day the first week after inoculation (1-6 dpi) and three times a week until the end of the trial. The

Coriolis® μ air sampler technology is based on a cyclonic technology, which is combined with a high air flow rate. The collection of the virus was performed in 0.005% Triton X-100 milliQ water solution with a flow rate of 300 L/min for 10 min. After collection, the samples were concentrated with the Amicon® Ultra-2 30K device (Merck, Darmstadt, Germany) and stored at -80°C until use.

2.5 | PEDV genome quantification

Viral RNAs were extracted from the faecal homogenates, the sera and the air samples using the Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Five μl of eluted RNA was used as templates for PEDV RT-qPCR. RNA extraction controls were performed, every five samples to check for any PEDV contamination, by replacing sample with RNase-free water. RNA extracted from faeces with the RNeasy Mini kit was diluted to 1:10 to avoid any PCR inhibition.

The number of PEDV genome copies was assessed by real-time PCR using Power SYBR® Green RNA-to-Ct™ 1-step kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States of America) on an Applied Biosystems® 7500 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States of America). The PCR conditions were a holding stage of two steps, one-first step at 48°C for 30 min and a second one at 95°C for 10 min, followed by 40 repeated cycles with two steps, a first step of 15 s at 95°C and a second of 1 min at 60°C . At last, a melt curve stage composed of four steps, a first step of 1 min at 95°C , a second step of 1 min at 60°C , a third step with a gradual increase in temperature with 0.35°C for 0.3 s to obtain a temperature of 95°C and a fourth step of 15 s at 60°C . The primers used were described in Gallien et al. (2018) and were designed from the conserved regions of the PEDV nucleocapsid gene for universal detection of both strains (forward, 5'-CGCAAAGACTGAACCCAC TAA-3'; reverse, 5'-TTGCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT-3'). The copy numbers were quantified using a range of PEDV N RNA from 10^1 to 10^8 copies/5 μl .

For each PCR run, a positive control containing PEDV RNA extract from a PEDV cell culture supernatant was included. Two negative controls were also included in the plate; the RNA samples were replaced by RNase-free water. One negative control was placed close to the positive control and the second one at the end of the plate. All samples were processed in duplicate.

2.6 | PEDV serology

Sera were tested for PEDV antibodies using a commercial ELISA test, ID Screen® PEDV Indirect (ID Vet, Grabels, France). The ELISA test is validated if the mean value of the positive control optical density (OD) is greater than 0.350 and if the ratio of the mean values of the positive and negative controls is greater than 3. Then, for each sample, the S/P (sample-to-positive) ratio was calculated. Samples with S/P ratio equal or higher than 60% were considered as positive for PEDV antibodies.

2.7 | Estimation of epidemiological parameters

2.7.1 | Shedding periods and time to seroconversion

The duration of the shedding period was characterized as the time interval between the first and the last PCR-positive faecal sample for each animal. Survival analysis was used to assess whether differences exist between the two challenge strains (Cox proportional hazard model; R software: function `coxph`) and to estimate the distributions of the shedding period (parametric survival model assuming a Weibull distribution; R software: function `survreg`).

2.7.2 | Transmission parameters and latency period

PEDV transmission process was fitted to a SEIR model. Each individual was classified as susceptible, exposed, infectious or recovered on the basis of their virological results. Pigs were considered as susceptible (S) during the time window from exposure (day 0 postinoculation) and the time they were effectively infected (t_{inf}). At that time, the animals turn into the exposed class (E) for a duration δ_E , during which they are infected, but do not shed viral particles, being unable to infect other pigs. $t_{\text{sh}} = t_{\text{inf}} + \delta_E$ represents the actual first shedding time, from which time the animals are infectious (I), and stands between the times of the last PCR-negative (t_{neg}) and the first PCR-positive faecal samples (t_{pos}) for each animal ($t_{\text{neg}} < t_{\text{sh}} < t_{\text{pos}}$). Furthermore, the infectious process is initiated by the inoculated seeder pig in each room, and all infection events in contact individuals occurred only once the seeders became infectious, that is, $t_{\text{inf}} > \delta_E^{\text{seeder}}$ for each contact pig. One can notice here that for seeder pigs, inoculated at t_0 , the shedding time is equivalent to the duration of the latency period ($\delta_E^{\text{seeder}} = t_{\text{sh}}^{\text{seeder}}$). At last, pigs were considered as recovered (R) after their last PCR-positive faecal sample, when they did not play any role in the infectious process anymore.

Two transmission routes were considered to represent the observed infectious process: transmission by direct contact between penmates and by indirect contact with animals in neighbouring pens. Let β_w and β_b denote the within- and between-pen transmission rates. The force of infection exerted on a typical susceptible individual (i) at time t is defined by $\lambda(t) = \beta_w \frac{I_w(t)}{n-1} + \beta_b \frac{I_b(t)}{n}$, where I_w and I_b represent the number of infected animals in the same pen as individual i and in the neighbouring pen, respectively; n is the total number of pigs in each pen. With these notations, the probability p_i for an individual i to get infected at time $T_{\text{inf}}^{(i)}$ is given by $p_i = 1 - \exp(-\lambda(T_{\text{inf}}^{(i)}))$ while having escaped infection on the time interval $[0, T_{\text{inf}}^{(i)}]$ with the probability $q_i = 1 - \int_0^{T_{\text{inf}}^{(i)}} \lambda(\tau) d\tau$.

Assuming a gamma distribution for the duration of the latency period δ_E , with shape and scale parameters α and κ , the likelihood of the data is expressed by:

$$\begin{aligned}
 &L(T_{\text{Neg}}, T_{\text{Pos}}, I_w, I_b | \beta, \beta_b, T_E, T_{\text{inf}}, \alpha, \kappa) \\
 &= \prod_{i \in \text{contact-infected}} e^{-\int_0^{T_{\text{inf}}^{(i)}} \lambda(\tau) d\tau} \\
 &\quad * \left(1 - e^{-\lambda(T_{\text{inf}}^{(i)})}\right) * \gamma\left(T_E^{(i)}, \alpha, \kappa\right) \\
 &\quad * \prod_{i \in \text{contact-noninfected}} e^{-\int_0^{t_{\text{obs}}^{\text{max}}} \lambda(\tau) d\tau} \\
 &\quad * \prod_{i \in \text{inoculated}} \gamma\left(T_E^{(i)}, \alpha, \kappa\right)
 \end{aligned}$$

The first term of the likelihood corresponds to the probability of occurrence of observed infections; the second term represents the probability of observed infection failure whenever some individual would remain susceptible throughout the experiment; and the third term accounts for the distribution of latency period in seeder pigs. Bayesian inference was performed using Monte Carlo Markov Chains. The individual values for the shedding time and latency duration were, respectively, drawn within their plausible range, *that is*, $T_{\text{sh}} \sim U(T_{\text{neg}}, T_{\text{pos}})$ and $\Delta E \sim U(0, T_{\text{sh}} - \delta_E^{\text{(seeder)}}$). Uniform prior distributions were assumed for the parameters governing the latency duration distribution with a relatively large variation range ($\alpha \sim U(1,15)$, $\kappa \sim U(0,5)$), and normal distributions were used as prior for the log-transformed transmission rates ($\log(\beta_w) \sim N(0,2)$ and $\log(\beta_b) \sim N(0,5)$). Parameters were sequentially updated using Metropolis–Hastings algorithm. Three independent chains were run with initial values of parameters randomly drawn in the prior distribution, and 30000 iterations were run for each chain (10% were discarded as burn-in iterations). Convergence was assessed through visual inspection of parameter outputs and classical diagnostic tests (Heidelberger, Geweke and Gelman-Rubin diagnostics) (Hu, Gonzales, & Gubbins, 2017).

2.8 | Statistical analysis

The normality of all the data was checked with a Shapiro test. If the data followed a normal law, the homogeneity of the variances was checked with a Levene test. Then, if the variances were homogeneous, an ANOVA test was carried out to compare the mean between groups. If the data did not follow a normal law or if the variances were not homogeneous, a Kruskal–Wallis test was used to compare the mean between groups. *p*-values less than 0.05 were considered significant. Statistical analyses of data were carried out with the statistical software R version 3.2.5. (Team, 2014).

3 | RESULTS

3.1 | Clinical assessment and zootechnical data

No clinical signs were observed in any pigs prior to the beginning of the trials and in control pigs throughout the experiment.

In the groups challenged with the InDel strain, only the inoculated and the direct contacts pigs showed clinical signs. However, diarrhoea was observed in only 25% of these direct contact pigs simultaneously. In fact, diarrhoea was occasionally observed between

4 and 25 dpi. Vomiting was sporadically observed between 1 and 49 dpi (at 1, 7, 21, 37, 42, 44, 46 and 49 dpi). The inoculated and direct contact pigs also showed signs of lethargy and anorexia the first week after inoculation.

In the non-InDel strain groups, all animals involved in the experiment showed clinical signs (including indirect contact pigs), with more severe clinical signs compared to the InDel inoculated groups. Diarrhoea started on days 1 and 2 postinoculation for the inoculated and contact pigs (direct and indirect contacts), respectively, with 80% of the indirect contact pigs and 75% of the direct contact pigs with diarrhoea on 2 dpi. After 2 dpi, occasional diarrhoea was noticed in the direct contact pigs (5 dpi) and indirect contact pigs (at 3 and 6 dpi). Occasional vomiting was also noticed for the inoculated and the direct contact pigs at 1 and 31 dpi and for the indirect contact pigs at 11, 31 and 46 dpi. All the pigs were lethargic from 2.5 to 3 dpi and showed signs of dehydration and anorexia, the first week of the trial. No hyperthermia was observed during the experiments.

A reduction in growth performance was also observed in the InDel groups during the first 3 weeks of the trial for the inoculated pigs and the second and the third week of the trial for the direct contact pigs (Figure 2a). Growth performance was not impacted after 22 dpi. A significant reduction in growth performance was observed during the first week postinoculation (direct contacts, indirect contacts and inoculated pigs) of the non-InDel groups, reaching the control group level thereafter (Figure 2b). The non-InDel strain showed a greater impact on the ADWG the first week after inoculation than the InDel strain. After this first week, a greater impact on ADWG was observed in the InDel groups until 22 dpi. Indeed, the InDel direct contact pigs gained on average 205.4 g more per day than the non-InDel direct contact pigs, the first week postinoculation. After this first week, the non-InDel direct contact pigs gained on average 150 g more per day than the InDel direct contact pigs until 22 dpi (Figure 2).

3.2 | PEDV faecal shedding

Prior to inoculation, all the pigs were negative for PEDV RNA in faeces. All the control pigs remained negative for PEDV in faeces until the end of the trials (49 and 72 dpi, respectively).

In the InDel groups, the inoculated pigs began to shed virus in their faeces 1 ± 0.5 days after the non-InDel inoculated pigs (Table 1). For direct contact pigs, faecal samples from InDel groups were found positive 4 days later at 5 dpi for 2 pigs, compared with the non-InDel pigs (Table 1). None of the InDel indirect contact pigs shed PEDV in their faeces (Table 1).

In the non-InDel groups, PEDV RNA was first detected in the faeces of the inoculated pigs and one of the contact group pigs at 1 dpi. The two inoculated pigs shed 4.80×10^{10} and 1.20×10^8 genomic copies/ml of faeces, respectively. Faecal samples collected from pigs in the direct contact group were RT-qPCR positive at 1.5 and 2 dpi, in two and five pigs, respectively. The faeces of the 10 indirect contact pigs tested positive for PEDV at 2 dpi (Table 1).

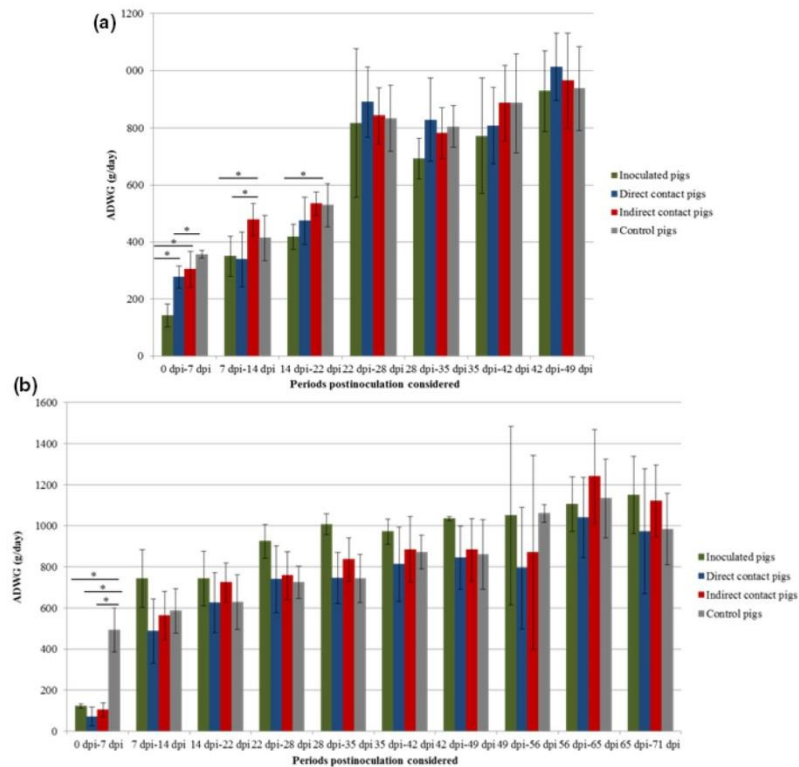


FIGURE 2 Average daily weight gain (ADWG) (gram per day) according to the status for InDel strain (a) and non-InDel strain (b). Differences between strains were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***)

3.3 | Viremia and seroconversion

Prior to inoculation, no PEDV RNA was detected in serum and no pig tested seropositive for PEDV antibody. For the two trials, viremia was highly transient and barely detectable (Table 2). All non-InDel inoculated and direct contact pigs seroconverted except one of the direct contact pigs. All non-InDel indirect contact pigs showed also a serological response. However, 7 of 19 animals of the non-InDel group, which exhibited a serological response, demonstrated PEDV antibodies for a short period of time and were seronegative by the end of the experiment. The delays between infection and seroconversion for the two strains were significantly different. The average delay between infection and seroconversion was twice as long for the non-InDel strain than for the InDel strain (24.8 vs 12.5 days on average) (Figure 3).

3.4 | PEDV detection in air samples

No PEDV RNA was detected in the air before inoculation of pigs either with the InDel or the non-InDel strain.

In the InDel groups, PEDV genome was detected in the air at low levels at 2 dpi and then from 5 to 35 dpi (Figure 4). The onset of the PEDV RNA detection in the air sample matched or overlapped with the first detection of the virus in faeces. The viral load detected in the air reached a maximum of 1.78×10^4 genomic copies/L of air on day 14 postinoculation. In spite of the presence of PEDV RNA in the air, no indirect contact pigs were infected by the virus.

In the non-InDel groups, PEDV genome was detected in the air earlier compared with the InDel trial. Indeed, PEDV RNA was detected from 1 to 35 dpi. Low quantity of PEDV RNA was further recovered at 65 dpi. The number of genomic copies in the air reached a value of 2.11×10^5 genomic copies/L of air at 4 dpi. From 2 dpi, the number of genomic copies in the air was already higher (5.74×10^4 genomic copies/L of air) than the maximum genomic copies detected in air collected from the InDel groups (Figure 4). For the InDel strain, a correlation of 0.83 was found between the number of pigs which shed virus and the number of copies of PEDV genome in the air.

3.5 | Estimation of epidemiological parameters

No significant difference in the duration of shedding period according to the challenge strains could be evidenced in our experimental settings (Cox proportional hazard model, p -value). Based on this result, shedding periods for both groups were aggregated and analysed using a parametric survival model assuming a Weibull distribution. The average shedding duration was estimated to 26 days [21; 32] (Figure 3). During this period, intermittent shedding was observed for three and for six animals infected with the InDel and non-InDel strains, respectively (Table 1). In contrast, transmission parameters were strongly related to the challenge strain. The estimated transmission rate by direct contact was twice as high for the non-InDel strain ($\beta_w = 2.96$; 95% CI: [1.33; 5.23]) compared to the InDel strain ($\beta_w = 1.36$; 95% CI: [0.6; 5.6]) (Table 3). Furthermore,

TABLE 1 Individual virological data: PEDV RNA in faeces (log(PEDV genome copies/ml)) in controls, inoculated, direct and indirect contact pigs

GROUP	PIG	DPI STATUS	-3	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	6	7	14	21	28	35	42	49	56	65	72		
ROOM 0 INDEL	5826	Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5840	Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5846	Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
ROOM 1 INDEL	5820	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.58	5.42	5.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5836	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.33	4.99	5.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5874	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.26	9.32	8.61	5.53	7.10	6.11	7.13	4.97	5.75	0.00	0.00	0.00	†	
PEN A	5857	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.87	8.28	7.95	7.99	8.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5851	Inoculated	0.00	0.00	0.00	0.00	9.06	9.06	9.77	9.58	10.19	10.09	7.50	5.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†
	5818	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
PEN B	5835	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5843	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5873	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
ROOM 2 INDEL	5860	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5813	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.83	5.93	0.00	5.05	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5838	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.03	8.32	5.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
PEN B	5875	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.92	5.97	6.57	8.43	0.00	5.44	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5859	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5849	Inoculated	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.28	8.73	8.41	8.88	9.08	9.44	9.72	8.26	4.97	5.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†
ROOM 1 INDEL	5822	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	
	5834	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	†	

(Continues)

Article 2: Better horizontal transmission of a US « S-non-InDel » strain compared to a French « S-InDel» strain of porcine epidemic diarrhea virus

TABLE 1 (Continued)

GROUP	PIG	DPI STATUS	-3	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	6	7	14	21	28	35	42	49	56	65	72	
ROOM 0 NON-INDEL	5847	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5864	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	5861	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ROOM 1 NON-INDEL	6054	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6052	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6069	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ROOM 2 NON-INDEL	6077	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6078	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6063	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ROOM 0 NON-INDEL	6058	Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6067	Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6074	Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ROOM 1 NON-INDEL	6071	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6083	Inoculated	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6055	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ROOM 2 NON-INDEL	6072	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6059	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6082	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ROOM 0 NON-INDEL	6068	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6070	Direct contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6086	Inoculated	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ROOM 1 NON-INDEL	6060	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6075	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6081	Indirect contact	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

GROUP	DPI	STATUS	3	2.5	2	1.5	1	0.5	-3	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	6	7	14	21	28	35	42	49	56	65	72		
6080	Indirect contact		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.65	9.69	9.11	11.42	10.51	10.34	9.54	10.20	9.73	6.87	8.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.25	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.68	10.58	9.44	9.87	9.71	10.04	9.76	9.95	9.84	0.00	0.00	7.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6064	Indirect contact		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.75	9.90	10.99	10.84	10.41	10.65	10.61	11.01	9.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.20	9.74	10.62	11.42	11.13	10.70	11.02	10.66	10.14	9.09	0.00	7.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6076	Indirect contact		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.20	9.74	10.62	11.42	11.13	10.70	11.02	10.66	10.14	9.09	0.00	7.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.20	9.74	10.62	11.42	11.13	10.70	11.02	10.66	10.14	9.09	0.00	7.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Light grey boxes: viral genome load between 104 and 106 copies/ml; medium grey boxes: between 106 and 108 copies/ml; dark grey: between 108 and 1010 copies/ml and black: > 1010 copies/ml. ³Dead.

the spread of the non-InDel strain by indirect contact was quantified with a transmission rate estimated to 0.5 ([0.1; 1.3]), whereas the InDel strain was not transmitted to the pigs in the neighbouring pen. The average latency period was estimated to 2 days [1.2; 3.6] for the InDel strain but was almost negligible for the non-InDel strain (estimated to 0 [0.0; 0.2]) (Table 3).

4 | DISCUSSION

The severity of porcine epidemic diarrhoea can be linked to several parameters such as the animal age, the infectious dose, the susceptibility of pigs, the environmental conditions or the viral strain (Shibata et al., 2000). The objective of this study was to compare the pathogenicity and transmissibility of an American non-InDel strain considered highly pathogenic and an InDel strain isolated in France in 2014 in experimental conditions. In case of infection with a non-InDel and an InDel strain, 100% of morbidity (except for the InDel indirect contact pigs) was observed, but clinical signs were not apparent at the same time among the two types of PEDV-infected groups. As early as 1 dpi, the first clinical signs were observed for the non-InDel strain, although the InDel strain induced the first clinical signs only at 5 dpi. These results are in agreement with previous experimental studies involving the non-InDel strain reporting the occurrence of diarrhoea and occasional vomiting from 2 to 10 days after inoculation (Crawford et al., 2015; Madson et al., 2014; Niederwerder et al., 2016; Shibata et al., 2000) and also with previous studies involving InDel strains reporting the appearance of clinical signs within 1 week after infection (Hanke et al., 2015; Mesquita et al., 2015; Stadler et al., 2015). Intermittent clinical signs were also noticed with the two strains after the occurrence of the first clinical signs; InDel-infected pigs showed clinical signs (occasional diarrhoea, vomiting and despondency) from 8 to 49 dpi, and non-InDel-infected pigs showed clinical signs from 3 to 46 dpi. PEDV replicates in the enterocytes and leads to a significant reduction in both the intestinal epithelial cells, as well as the digestive enzyme activity (Jung, Ahn, & Chae, 2006). However, the regeneration of intestinal enterocytes was shown possible between 2 and 4 days after damage (Moon, 1971), which might explain the intermittent clinical signs observed in the InDel and non-InDel trials. The clinical signs were more pronounced for the non-InDel trial pigs in our study. It has already been shown that differences in severity of clinical signs could be linked to the different strains; the InDel strain leads to less severe clinical signs compared with the non-InDel strain (Chen et al., 2016). The development of the disease was responsible for weight loss, which depended on the strain used. All the non-InDel pigs had more severe weight loss during the first week after inoculation compared to the InDel pigs. As in our study, Madson et al. (2014) detected a significant alteration in ADWG during the first week postinoculation for non-InDel-infected pigs (Madson et al., 2014). Regarding the InDel pigs, growth retardation was observed the second and the third week after inoculation. After the first 3 weeks of the trial, no difference in ADWG

Article 2: Better horizontal transmission of a US « S-non-InDel » strain compared to a French « S-InDel» strain of porcine epidemic diarrhea virus

10

WILEY-Transboundary and Emerging Diseases

GALLIEN ET AL.

TABLE 2 Average genome load (number of copies/ml of serum) and number of viremic pigs during the InDel and non-InDel trials for the inoculated, direct contact and indirect contact pigs

Status	Strain		Days postinoculation							
			-3	0	1	2	3	4	7	11
Inoculated pigs	InDel	Number of PEDV viremic pigs	0/2	0/2	*1/2	1/2	0/2	*1/2	0/2	0/2
		Average genome load			4.12×10^3	8.83×10^2		3.34×10^3		
Inoculated pigs	Non-InDel	Number of PEDV viremic pigs	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
		Average genome load			1.79×10^3					
Direct contact pigs	InDel	Number of PEDV viremic pigs	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	0/8
		Average genome load							3.94×10^3	
Direct contact pigs	Non-InDel	Number of PEDV viremic pigs	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	*1/8	*1/8	0/8
		Average genome load					1.07×10^2	1.36×10^3	2.61×10^2	
Indirect contact pigs	InDel	Number of PEDV viremic pigs	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
		Average genome load								
Indirect contact pigs	Non-InDel	Number of PEDV viremic pigs	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	2/10	1/10	0/10
		Average genome load				3.48×10^3		5.05×10^2	7.72×10^1	

Bold values indicated that PEDV equivalent genome copies were detected. The grey boxes indicated that no PEDV equivalent genome copies were detected. *Same pig.

was observed between controls and infected pigs within the non-InDel group.

A trend between viral shedding and growth impact was observed for all the non-InDel trial pigs. As seen previously, all the inoculated, direct and indirect contact pigs showed a significant difference of ADWG compared with the control pigs, the first week postinoculation. This period corresponded to the highest levels of virus shedding in this group. After that, the average amount of genomic copies of PEDV declined for the inoculated, the direct and indirect contact pigs and the pigs recovered normal growth performance.

PEDV RNA was detected in the faeces of all pigs of the InDel and non-InDel trial except for the InDel indirect contact pigs. The PEDV RNA was detected earlier in faeces of the non-InDel trial pigs at 1 dpi compared to 2 ± 0.5 dpi in faeces of InDel inoculated pigs, that is, 1 ± 0.5 days earlier for the non-InDel pigs. Similar results were observed from faeces of direct contact pigs where PEDV RNA was detected in faeces of non-InDel direct contact pigs between 1 and 2 dpi and between 4.5 and 14 dpi in faeces of InDel direct contact pigs, that is, on average 7 days earlier for the non-InDel direct contact pigs. These results suggest the non-InDel PEDV strain replicates more quickly in the target cells and/or demonstrates the ability to propagate to higher levels more quickly in a pig population. The shedding periods were

similar for the InDel (except for the indirect contact pigs) and non-InDel strains. The shedding periods for the non-InDel and InDel strains were close to previous observations from other studies which reported shedding periods of 17–23 or 18–20 days on average for the non-InDel (Madson et al., 2014; Thomas et al., 2015) and for the InDel strain, respectively (Leidenberger et al., 2017; Lohse et al., 2017). Two others studies on PEDV InDel strains revealed that pigs inoculated with an InDel strain began to shed virus earlier than in our experimental conditions, that is, shedding began at 1 dpi, and the presence of PEDV RNA in faeces was detected until the pigs were necropsied at 7 dpi (Chen et al., 2016; Yamamoto, Soma, Nakanishi, Yamaguchi, & Niinuma, 2015). In accordance with the results of other studies (Chen et al., 2016), the amount of genomic copies in faeces was more important in infected pigs by the non-InDel strain than for those that were infected by the InDel strain whatever the pig status (inoculated, direct contact, indirect contact) in our experimental conditions.

Two phases of PEDV shedding in faeces were noticed for some pigs in our study without the presence of any clinical signs. The same phenomenon had already been described recently (Crawford et al., 2015). During the second phase of PEDV shedding in faeces, no clinical signs were observed. The presence of PEDV RNA in faeces

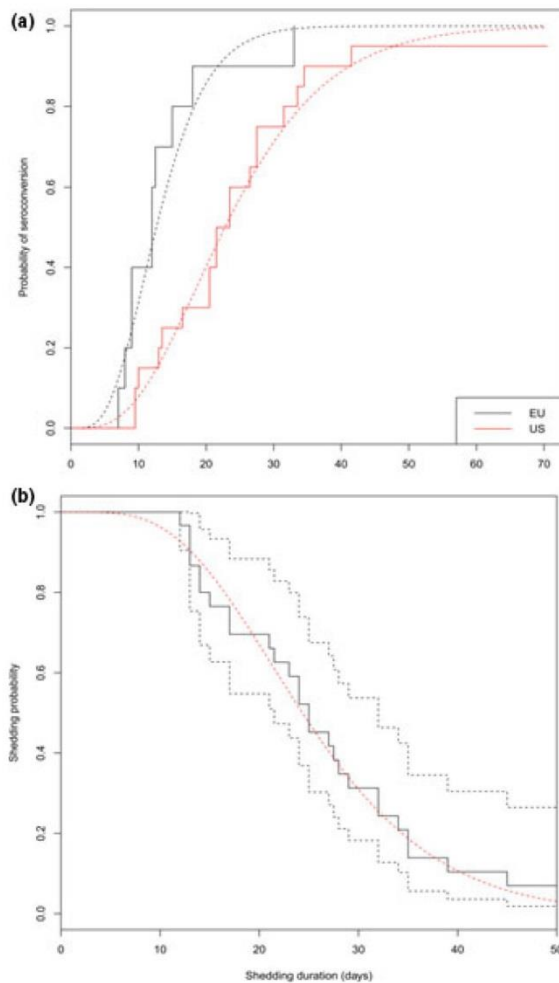


FIGURE 3 Delays between infection and seroconversion (a) and the probability of shedding (b) for the InDel strain indicated in black and the non-InDel strain indicated in red. In (a), the solid lines represent the raw data and the dotted lines represent the probability of seroconversion after shedding. In (b), the black solid line represents the raw data, the black dotted lines represent the confidence interval, and the red dotted line represents the probability of shedding

in spite of the absence of clinical signs could raise problems in terms of occasional transmission of the disease by asymptomatic pigs that remain unknown to the producer.

Several studies revealed the occurrence of PEDV RNA in air samples and their infectivity (Alonso, Raynor, Davies, & Torremorell, 2015; Alonso et al., 2014; Beam et al., 2015). Results of our study confirmed the detection of non-InDel and InDel PEDV RNA in air samples. The duration of detection of PEDV RNA in the air was similar for the InDel and for the non-InDel strains (30 vs 34 days on average). Although the viral genome was detected in the air, airborne transmission to pigs in indirect contact was only effective for the non-InDel strain under our experimental conditions. The

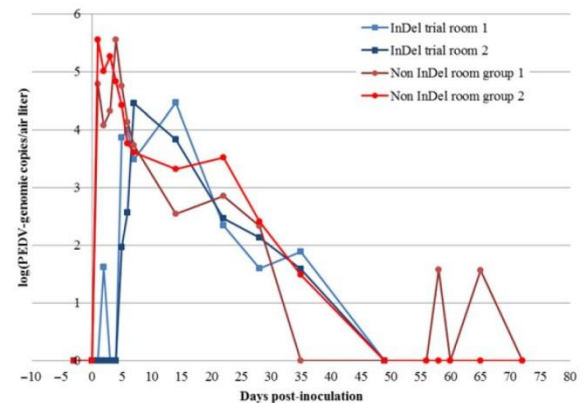


FIGURE 4 Average PEDV viral genome load in air expressed in log(PEDV genome copies per L of air) for the InDel and non-InDel trials

TABLE 3 Estimation of epidemiological parameters for the InDel and the non-InDel strain

Epidemiological parameters	InDel strain	Non-InDel strain
β_w	1.36 (0.6; 5.6)	2.95 (1.33; 5.23)
β_b	0 (0.0; 0.2)	0.5 (0.1;1.3)
Average duration of the latency period (days)	2.0 (1.2; 3.6)	0.003 (0.001; 0.15)
Average shedding duration (days)	26 (21; 32)	

Numbers between brackets correspond to the confidence interval of 95%.

β_w : direct transmission rate; β_b : indirect transmission rate.

amount of PEDV genomic copies in air was higher for the non-InDel than for the InDel strain. Thus, we could hypothesize that the amount of PEDV genomic copies in air with the InDel strain was too low to infect pigs by airborne transmission (10^4 genome copies/L). The infectious capacity of PEDV by the air could also be linked to the strain. In fact, in a recent study using a different non-InDel strain from ours, airborne transmission to pigs in indirect contact was not effective even when PEDV RNA was detected in nasal swabs of infected pigs but at low levels (Niederwerder et al., 2016).

The transmission characteristics of the two strains were significantly different in our experimental conditions. Indeed, the direct transmission rate quantified in our experimental conditions was more than twofold higher for the non-InDel strain than for the InDel strain. An indirect transmission rate could only be calculated for the non-InDel strain ($\beta_w = 0.5$). A lower duration of latency for the non-InDel strain was also observed which is in agreement with the faster replication observed from the virological data. From our experimental results, a faster transmission in case of non-InDel strain should be expected in a pig population. This faster transmission could be linked to higher virulence and faster replication of the PEDV non-InDel strain in the epithelial cells. The comparison of the transmission

parameters calculated for the two PEDV strains with those estimated for other porcine viruses revealed a transmission rate seven-fold higher than those obtained for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (β_w PRRS = 0.24) (Rose et al., 2015) or the porcine circovirus type 2b (β_w PCV2b = 0.28) (Andraud et al., 2009; Rose et al., 2015). However, these parameters were comparable to those obtained recently for swine influenza viruses (Cador, Andraud, Willem, & Rose, 2017). Considering the high transmission rate for both strains and the duration of shedding of approximately 20 days, those viruses are expected to persist easily within the population. Differences in terms of indirect transmission suggest that InDel strains of PEDV could be more easily controlled by strict segregation of infected animals.

All pigs seroconverted during the trials except some pigs infected by the non-InDel strain. The seroconversion appeared for the first time at 14 dpi for both strains. A seroconversion at 14 dpi was already obtained with non-InDel strain in other studies (de Arriba, Carvajal, Pozo, & Rubio, 2002; Thomas et al., 2015). The absence of seroconversion for some pigs could be linked to the sensitivity of the ID Vet ELISA test which could be too low (Tignon et al., 2017). The ELISA test used in our study is based on the PEDV N protein as an antigen, and the PEDV N antibodies might not persist as long as the antibodies directed against the PEDV S protein.

To conclude, in our experimental settings, the InDel strain was less pathogenic than the non-InDel strain. The InDel strain could only be transmitted to direct contact pigs although the non-InDel strain could be transmitted to direct contact and indirect contact pigs with a faster direct transmission. These data should be considered when developing control strategies for InDel or non-InDel PEDV to reduce the probability of introduction in a pig population.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to ANSES, INRA and INAPORC for their financial support. We also would like to thank Phillip Gauger from Iowa State University who provided the US non-InDel strain, all the team members at the experimental laboratory for their contribution and the members of the unit of viral genetic of ANSES.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have noncompeting interests.

ORCID

Sarah Gallien  <http://orcid.org/0000-0002-5634-1360>

REFERENCES

Alonso, C., Goede, D. P., Morrison, R. B., Davies, P. R., Rovira, A., Marthaler, D. G., & Torremorell, M. (2014). Evidence of infectivity of

airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary research*, 45, 73. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0073-z>

Alonso, C., Raynor, P. C., Davies, P. R., & Torremorell, M. (2015). Concentration, size distribution, and infectivity of airborne particles carrying swine viruses. *PLoS ONE*, 10, e0135675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135675>

Andraud, M., Rose, N., Grasland, B., Pierre, J. S., Jestin, A., & Madec, F. (2009). Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: A modelling approach. *Preventive Veterinary Medicine*, 92, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.07.009>

de Arriba, M. L., Carvajal, A., Pozo, J., & Rubio, P. (2002). Isotype-specific antibody-secreting cells in systemic and mucosal associated lymphoid tissues and antibody responses in serum of conventional pigs inoculated with PEDV. *Veterinary immunology and immunopathology*, 84, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00386-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00386-5)

Beam, A., Goede, D., Fox, A., McCool, M. J., Wall, G., Haley, C., & Morrison, R. (2015). A porcine epidemic diarrhea virus outbreak in one geographic region of the United States: Descriptive epidemiology and investigation of the possibility of airborne virus spread. *PLoS ONE*, 10, e0144818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144818>

Bowman, A. S., Krogwold, R. A., Price, T., Davis, M., & Moeller, S. J. (2015). Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. *BMC Veterinary Research*, 11, 38. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0348-2>

Cador, C., Andraud, M., Willem, L., & Rose, N. (2017). Control of endemic swine flu persistence in farrow-to-finish pig farms: A stochastic metapopulation modeling assessment. *Veterinary research*, 48, 58. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0462-1>

Chen, Q., Gauger, P. C., Stafne, M. R., Thomas, J. T., Madson, D. M., Huang, H., ... Zhang, J. (2016). Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhoea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. *Journal of General Virology*, 97, 1107–1121. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000419>

Crawford, K., Lager, K., Miller, L., Opriessnig, T., Gerber, P., & Hesse, R. (2015). Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Veterinary research*, 46, 49. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0180-5>

EFSA. (2016). Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. *EFSA Journal*, 14, 4375.

Gallien, S., Moro, A., Lediguerher, G., Catinot, V., Paboeuf, F., Bigault, L., ... Grasland, B. (2018). Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. *Veterinary Research*, 49, 7.

Hanke, D., Jenckel, M., Petrov, A., Ritzmann, M., Stadler, J., Akimkin, V., ... Hoper, D. (2015). Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21, 493–496. <https://doi.org/10.3201/eid2103.141165>

Hu, B., Gonzales, J. L., & Gubbins, S. (2017). Bayesian inference of epidemiological parameters from transmission experiments. *Scientific Reports*, 7, 16774. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17174-8>

Jung, K., Ahn, K., & Chae, C. (2006). Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Research in Veterinary Science*, 81, 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.03.005>

Jung, K., & Saif, L. J. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Veterinary Journal*, 204, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.017>

Leidenberger, S., Schroder, C., Zani, L., Auste, A., Pinette, M., Ambagala, A., ... Blome, S. (2017). Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies. *Scientific Reports*, 7, 10825. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11160-w>

- Li, W., Li, H., Liu, Y., Pan, Y., Deng, F., Song, Y., ... He, Q. (2012). New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 1350–1353. <https://doi.org/10.3201/eid1803.120002>
- Lohse, L., Krog, J. S., Strandbygaard, B., Rasmussen, T. B., Kjaer, J., Belsham, G. J., & Botner, A. (2017). Experimental infection of young pigs with an early european strain of porcine epidemic diarrhoea virus and a recent US strain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, 1380–1386. <https://doi.org/10.1111/tbed.12509>
- Lowe, J., Gauger, P., Harmon, K., Zhang, J., Connor, J., Yeske, P., ... Main, R. (2014). Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 872–874. <https://doi.org/10.3201/eid2005.131628>
- Madson, D. M., Magstadt, D. R., Arruda, P. H., Hoang, H., Sun, D., Bower, L. P., ... Yoon, K. J. (2014). Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Veterinary microbiology*, 174, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.002>
- Mesquita, J. R., Hakze-van der Honing, R., Almeida, A., Lourenço, M., van der Poel, W. H., & Nascimento, M. S. (2015). Outbreak of porcine epidemic diarrhea virus in Portugal, 2015. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62, 586–588. <https://doi.org/10.1111/tbed.12409>
- Moon, H. W. (1971). Epithelial cell migration in the alimentary mucosa of the suckling pig. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 137, 151–154. <https://doi.org/10.3181/00379727-137-35533>
- Niederwerder, M. C., Nietfeld, J. C., Bai, J., Peddireddi, L., Breazeale, B., Anderson, J., ... Hesse, R. A. (2016). Tissue localization, shedding, virus carriage, antibody response, and aerosol transmission of Porcine epidemic diarrhea virus following inoculation of 4-week-old feeder pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28, 671–678. <https://doi.org/10.1177/1040638716663251>
- Pensaert, M. B., & de Bouk, P. (1978). A new corona virus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of virology*, 58, 243–247. <https://doi.org/10.1007/BF01317606>
- Rose, N., Renson, P., Andraud, M., Paboeuf, F., Le Potier, M. F., & Bourry, O. (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions. *Vaccine*, 33, 2493–2499. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.040>
- Shibata, I., Tsuda, T., Mori, M., Ono, M., Sueyoshi, M., & Uruno, K. (2000). Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Veterinary microbiology*, 72, 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00199-6)
- Song, D., & Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: A comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44, 167–175. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0713-1>
- Stadler, J., Zoels, S., Fux, R., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., ... Ladnig, A. (2015). Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Veterinary Research*, 11, 142. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0454-1>
- Team, R. C. (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Thomas, J. T., Chen, Q., Gauger, P. C., Giménez-Lirola, L. G., Sinha, A., Harmon, K. M., ... Zhang, J. (2015). Effect of porcine epidemic diarrhea virus infectious doses on infection outcomes in Naive conventional neonatal and weaned pigs. *PLoS ONE*, 10, e0139266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139266>
- Tignon, M., Christiaens, I., Redant, V., Nauwynck, H., Ojckic, D., Nelson, E., & Cay, A. B. (2017). Comparative study of serological methods for diagnosis of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) infection. European Symposium Of Porcine Health Management. Prague, Czech Republic.
- Vlasova, A. N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M. R., Rossow, K. D., Rovira, A., ... Saif, L. J. (2014). Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 1620–1628.
- Wang, L., Byrum, B., & Zhang, Y. (2014). New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 917–919. <https://doi.org/10.3201/eid2005.140195>
- Wang, J., Zhao, P., Guo, L., Liu, Y., Du, Y., Ren, S., ... Wu, J. (2013). Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 2048–2049. <https://doi.org/10.3201/eid1912.121088>
- Yamamoto, R., Soma, J., Nakanishi, M., Yamaguchi, R., & Niinuma, S. (2015). Isolation and experimental inoculation of an S INDEL strain of porcine epidemic diarrhea virus in Japan. *Research in Veterinary Science*, 103, 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.024>

How to cite this article: Gallien S, Andraud M, Moro A, et al. Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *Transbound Emerg Dis*. 2018;00:1–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.12945>

**Partie 2 : Evaluation de la
circulation du PEDV en
centre d'insémination
artificielle sur l'année 2015
et de l'excrétion d'une
souche « S-InDel » française
et d'une souche « S-non-
InDel » américaine de PEDV
dans la semence**



En 2013, la diarrhée épidémique porcine (DEP) a été identifiée aux Etats-Unis en tant que nouvelle maladie émergente. L'agent responsable de cette maladie, le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV), s'est propagé rapidement aux Etats-Unis mais aussi au Canada et en Amérique du Sud. L'infection par le PEDV provoque d'importantes diarrhées aqueuses et entraîne une mortalité approchant les 100% chez les porcelets sous la mère, en particulier en cas d'infection par une souche « S-non-InDel » de PEDV comme celles circulant notamment aux Etats-Unis et réputées hyper-pathogènes. Le PEDV est principalement transmis par voie oro-fécale, cependant, la transmission par voie vénérienne a déjà été suspectée pour ce virus mais n'a jamais été étudiée.

Dans cette partie, une première étude a été réalisée pour avoir une image globale du statut des reproducteurs en centre d'insémination artificielle (CIA) en France vis-à-vis du PEDV au commencement du travail de thèse. Les importations et exportations de reproducteurs ou de semences porcines fraîches étant en augmentation croissante, les probabilités de propagation des pathogènes viraux potentiellement véhiculés par la semence tels que le PEDV augmentent elles aussi fortement. Ce premier travail a consisté en une étude sérologique menée au cours de l'année 2015. Elle a permis d'amorcer nos études sur l'évaluation de l'excrétion par voie vénérienne du PEDV présentées par la suite en nous apportant des connaissances quant à la possible circulation du PEDV dans les CIA français. Cette analyse a été conduite sur une population de 120 verrats répartis sur 6 CIA différents représentant 18,6% de la population totale de reproducteurs en CIA en France. Tous les verrats testés se sont révélés séronégatifs pour le PEDV lors de notre étude. Ces résultats nous indiquent que les contrôles sanitaires des verrats avant leurs entrées en CIA en France semblent avoir prévenu de l'introduction du PEDV sur ces sites sur l'année 2015.

Suite à ce premier travail, trois autres études ont été réalisées pour explorer l'hypothèse d'une transmission par voie vénérienne du PEDV. Ces travaux portent sur l'étude de l'excrétion du PEDV dans les semences après une infection de verrats exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) avec une souche « S-non-InDel » américaine de PEDV, la souche PEDV/USA/2014/IOWA (GB N°: [MF37363](#)) et avec une souche « S-InDel » française de PEDV, la souche PEDV/FR/001/2014 (GB N°: [KR011756](#)). L'infectiosité des semences positives pour le PEDV pour chacune des souches a été évaluée dans un deuxième temps. L'ensemble des expérimentations animales réalisées lors de ces trois études a été mené en accord avec les réglementations européennes et françaises dans les animaleries de l'Anses Ploufragan équipées d'un niveau 3 de biosécurité.

Afin de savoir si le PEDV peut se transmettre par voie vénérienne, il a tout d'abord fallu évaluer si l'excrétion du virus dans les semences était possible. Pour cela, deux verrats EOPS ont été inoculés par voie orale avec une souche « S-non-InDel » de PEDV américaine ou une souche « S-InDel » de PEDV française. Suite à l'inoculation, des prélèvements de semences et de fèces ont été réalisés. A la fin des essais, une autopsie a été pratiquée sur les verrats inoculés et les organes de

l'appareil digestif et de l'appareil reproducteur ont été prélevés. La présence du PEDV a ensuite été quantifiée par RT-qPCR dans la fraction riche en spermatozoïdes et dans la fraction séminale de la semence ainsi que dans la sécrétion gélatineuse dite « tapioca », dans les fèces et dans les organes prélevés. La séroconversion des animaux a aussi été évaluée avec un test ELISA spécifique du PEDV. Tous les verrats ont présenté les symptômes de la maladie. Le PEDV était excrété dans les fèces dès 2 ± 1 JPI (jours post-infection) pour les deux souches. Les animaux avaient tous séroconverti vis-à-vis du PEDV à la fin des essais. En cas d'infection avec la souche « S-non-InDel » de PEDV, une présence transitoire du génome viral a été détectée dans la fraction séminale de la semence ($5,06 \times 10^2$ à $2,44 \times 10^3$ copies génomique/ml entre 0,5 et 35 JPI) et dans la fraction riche en spermatozoïdes ($5,64 \times 10^2$ à $3,40 \times 10^4$ copies génomique /ml entre 0,5 et 49 JPI). Les maximums d'excrétion dans les deux fractions ont été atteints pour chaque verrat à 2 et 28 JPI et à 6 et 21 JPI respectivement pour chaque fraction avec cependant une excrétion dans la fraction riche en spermatozoïdes plus longue que dans la fraction séminale. En cas d'infection avec la souche « S-InDel » de PEDV, le génome viral a été détecté dans la fraction riche en spermatozoïdes pour les deux verrats à 7 JPI ($6,94 \times 10^3$ et $4,73 \times 10^3$ copies génomique/ml). Tous les organes reproducteurs prélevés ont été testés négatifs pour le PEDV.

Les résultats de ces deux études mettent en évidence la présence du PEDV quel que soit le type de souche (« S-non-InDel » et « S-InDel ») dans nos conditions expérimentales. L'excrétion du PEDV peut être observée dans les fractions riche en spermatozoïdes et séminale de la semence avec la souche « S-non-InDel » de PEDV et seulement dans la fraction riche en spermatozoïdes avec la souche « S-InDel » de PEDV. Sous condition de confirmer la nature infectieuse du PEDV détectée dans la semence, cette mise en évidence de la présence du génome du PEDV dans la semence soulève déjà de nouvelles questions telles que la propagation potentielle de la maladie dans la population porcine *via* l'utilisation de semences pouvant être contaminées.

Suite à ces études, un essai portant sur l'infectiosité des semences positives pour le PEDV, pour chacune des deux souches, a été réalisée. Deux et quatre porcs EOPS âgés de 28 jours ont été inoculés par voie oro-gastrique avec des semences positives pour le PEDV souche « S-InDel » et souche « S-non-InDel » respectivement. Suite à l'inoculation, des prélèvements réguliers de fèces et de sang ont été réalisés jusqu'à la fin de l'essai soit 18 jours post-inoculation. A 18 jours post-inoculation, les animaux ont été abattus et les organes digestifs ont été prélevés pour analyse. L'analyse des organes digestifs par RT-qPCR a révélé la présence du PEDV pour les deux porcs inoculés avec les semences contaminées avec la souche « S-InDel » et pour trois des quatre porcs inoculés avec les semences contaminées avec la souche « S-non-InDel ». Cependant aucune excrétion fécale n'a pu être mise en évidence pendant les 18 jours de suivi par RT-PCR. Des incertitudes subsistent donc sur la nature infectieuse du matériel génétique détecté dans les

semences trouvées positives. Il est possible que la très faible quantité de virions infectieux ait entraîné un processus infectieux beaucoup plus long à ce mettre en place non observable sur les 18 jours de suivi. D'autres travaux semblent donc nécessaires pour confirmer si les semences contaminées avec le PEDV sont bien infectieuses et pourraient contribuer à la transmission du virus via l'utilisation de semences PEDV positives lors d'inséminations artificielles.

Publication n°3

Les résultats de la première étude portant sur l'enquête sérologique réalisée en CIA sur l'année 2015 ont fait l'objet d'un article soumis en 2018 à la revue « Porcine Health Management » et présenté ci-après. (Gallien, S., Catinot, V., Pozzi, N., Berri, M., Authié, E., Rose, N., Grasland, B., No evidence of PEDV infection in French artificial insemination centers in 2015)

Publication n°4

Les résultats de la deuxième étude portant sur la mise en évidence de l'excrétion d'une souche « S-non-InDel » de PEDV dans la semence de verrats EOPS en conditions expérimentales ont fait l'objet d'un article soumis et accepté en 2017 à la revue « Veterinary Research » et présenté ci-après. (Gallien, S., A. Moro, G. Lediguerher, V. Catinot, F. Paboeuf, L. Bigault, M. Berri, P. C. Gauger, N. Pozzi, E. Authie, N. Rose and B. Grasland, 2018: Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. Veterinary research, 49, 7. DOI: 10.1186/s13567-018-0505-2)

Publication n°5

Les résultats de la troisième étude portant sur la mise en évidence de l'excrétion d'une souche « S-InDel » de PEDV dans la semence de verrats EOPS en conditions expérimentales ainsi que l'étude pour évaluer l'infectiosité des semences positives pour les deux souches de PEDV ont fait l'objet d'un article soumis en 2018 à la revue « Veterinary Microbiology » et présenté ci-après. (Gallien, S., Moro, A., Lediguerher, G., Catinot, V., Paboeuf, F., Bigault, L., Gauger, P.C., Pozzi, N., Berri, M., Authié, E., Rose, N., Grasland, B., 2018: Limited shedding of an S-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in semen and questions regarding the infectivity of the detected virus. Veterinary Microbiology.)

Article 3: No evidence of PEDV infection in French artificial insemination centers in 2015

Porcine Health Management

No evidence of PEDV infection in French artificial insemination centers in 2015

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PHMJ-D-18-00033	
Full Title:	No evidence of PEDV infection in French artificial insemination centers in 2015	
Article Type:	Short communication	
Funding Information:	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (32000726)	Not applicable
	Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (17-0076)	Not applicable
Abstract:	<p>Pigs infected by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) are affected by severe diarrhea, vomiting and dehydration. The severity of clinical signs depends on the virus strain. Two genetically different PEDV strains are known to infect pigs, the PEDV S-InDel strains which circulate on all continents and the highly virulent PEDV S-non-InDel strains found in Asia and in America. We have previously demonstrated the presence of PEDV RNA in semen from boars experimentally infected with an S-non-InDel PEDV strain. If naturally infected boars may shed PEDV in semen, this would have important consequences for the breeding sector. Thus we sought to determine whether PEDV has been circulating in populations of breeding boars from French artificial insemination (AI) centers. The current study reports on a serological survey conducted on one hundred and twenty boars from six AI centers, representing 18.6% of the total population of breeding boars in French AI centers in 2015. All of them were found negative for PEDV antibodies, showing no evidence of PEDV circulation in French AI centers at that time.</p>	
Corresponding Author:	Sarah Gallien ANSES Laboratoire Ploufragan/Plouzané Ploufragan, France FRANCE	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	ANSES Laboratoire Ploufragan/Plouzané	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Sarah Gallien	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Sarah Gallien Viginie Catinot Nathalie Pozzi Mustapha Berri Edith Authié Nicolas Rose Béatrice Grasland	
Order of Authors Secondary Information:		
Opposed Reviewers:		
Additional Information:		
Question	Response	
Is this study a clinical	No	

trial?<hr><i>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</i>

1 **No evidence of PEDV infection in French artificial insemination centers in**
2 **2015**

3 S.Gallien^{1,2,3*}, V. Catinot⁴, N. Pozzi⁴, M. Berri³, E. Authié⁴, N. Rose^{1,2}, B. Grasland^{1,2}

4 **Author details:**

5
6 ¹*ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Ploufragan, B.P.53, 22440*
7 *Ploufragan, France*

8 sarah.gallien@anses.fr, nicolas.rose@anses.fr, beatrice.grasland@anses.fr

9
10 ² *Université Bretagne Loire, 35000 Rennes, France*

11 ³ *ISP, INRA, Université François Rabelais de Tours, UMR 1282, 37380 Nouzilly, France*

12 el-mostapha.berri@inra.fr

13 ⁴ *Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (LNCR), 94700 Maisons-Alfort,*
14 *France*

15 virginie.catinot@lncr.org, nathalie.pozzi@lncr.org, edith.authie@agriculture.gouv.fr

16 *Corresponding author. Tel : +332 96 01 62 14.

17 E-mail address: sarah.gallien@anses.fr

18 **Abstract**

1
2
3 19 Pigs infected by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) are affected by severe
4
5 20 diarrhea, vomiting and dehydration. The severity of clinical signs depends on the virus strain.
6
7
8 21 Two genetically different PEDV strains are known to infect pigs, the PEDV S-InDel strains
9
10 22 which circulate on all continents and the highly virulent PEDV S-non-InDel strains found in
11
12 23 Asia and in America. We have previously demonstrated the presence of PEDV RNA in semen
13
14 24 from boars experimentally infected with an S-non-InDel PEDV strain. If naturally infected
15
16 25 boars may shed PEDV in semen, this would have important consequences for the breeding
17
18 26 sector. Thus we sought to determine whether PEDV has been circulating in populations of
19
20 27 breeding boars from French artificial insemination (AI) centers. The current study reports on a
21
22 28 serological survey conducted on one hundred and twenty boars from six AI centers,
23
24 29 representing 18.6% of the total population of breeding boars in French AI centers in 2015. All
25
26 30 of them were found negative for PEDV antibodies, showing no evidence of PEDV circulation
27
28 31 in French AI centers at that time.
29
30
31
32
33

34 32

35
36
37 33 **Keywords:** Porcine epidemic diarrhea virus, boars, French artificial insemination centers,
38
39 34 serology
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The first case of porcine epidemic diarrhea (PED) was reported in the 1970s in Europe. The disease is caused by an enveloped positive single-stranded RNA *alphacoronavirus* called porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). Clinically, the disease is characterized by a severe profuse diarrhea with or without vomiting and dehydration, resulting in high morbidity and mortality, particularly in suckling piglets' populations. The economic losses due to PED can thus be very important. Nowadays, PEDV circulates on the Asian, American and European continents (1). Different strains have been described in these continents which can be clustered according to the nucleotide sequence of the S gene. Highly virulent strains named PEDV S-non-InDel strains have been reported on the Asian and American continents since 2010 and 2013, respectively (1-3). In North America, those strains were responsible for large epidemics and are currently endemic in the US pig population.

So far, only one case of PEDV S-non-InDel strain has been reported in Europe, in Ukraine, in 2014 (4). The PEDV S-InDel strains which are responsible of less severe clinical cases than the PEDV S-non-InDel strains circulate on all three continents (2, 3, 5). The major route of transmission of this virus is the fecal-oral route through direct and indirect contacts with infected pigs or contaminated feces. Staff from infected farms, as well as contaminated equipment, including trailers can carry the virus. Airborne transmission is also possible (1). Finally the presence of PEDV genome in semen has been shown in boars from boar studs in the US and Canada (6) and we have demonstrated that the genome of a PEDV S-non-Indel strain could be shed for several days in semen by experimentally infected boars after oral inoculation (7). Worldwide, the commercial trade of breeding boars and semen is important and the risk of propagation of infectious diseases by this route has to be considered (8). If infectious PEDV may be shed in semen from naturally infected boars, this would have important consequences for the breeding sector.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
59 Thus we sought to determine if PEDV has been circulating in breeding boars from
60 French artificial insemination (AI) centers. To this aim we conducted a serological survey on
61 120 boars from 6 AI centers, representing 18.6% of the total population of breeding boars in
62 French AI centers in 2015. Four of the 6 AI centers were located in Brittany where the pig
63 production is the most densely populated. The two remaining AI centers were located near the
64 border with countries where several PED cases were declared at the end of 2014 and in 2015
65 (Figure 1). Blood samples were collected every four months from 48 boars, every three
66 months from 69 boars, twice a year for two boars and once a year for one boar. Blood samples
67 were centrifuged at $12\ 000 \times g$ for 10 min and the sera were stored at -20°C . Sera were tested
68 for PEDV N antibodies using a commercial ELISA test, ID Screen® PEDV Indirect (ID Vet,
69 Grabels, France) based on the N protein. According to the manufacturer's recommendation,
70 the ELISA test is considered valid if the mean OD (optical density) value obtained with the
71 positive control is greater than 0.350 and if the ratio of the mean values given by the positive
72 and negative controls is greater than 3. For each sample to test, the S/P (sample-to-positive)
73 ratio was calculated. Samples with S/P ratio equal or higher than 60% were considered
74 positive for PEDV antibodies. The specificity and the sensitivity of this ELISA test are 0.99
75 and 0.8 respectively (9).

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
76 All the ELISA tests performed were validated using manufacturer criteria. None of the
77 tested boars were found positive for PEDV antibodies with a 95% confidence interval ranging
78 from 0 to 1.4% (accounting for the sample size and the sampling fraction from the whole
79 population). These results suggest that, as the end of 2015, PEDV has not been circulating in
80 the populations of breeding pigs from the French IA centers tested in this study.

53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
81 Breeding boars and porcine semen are currently imported from various countries in the
82 world to improve pig genetics. There may be importations from countries where PEDV non-
83 InDel and/or PEDV InDel strains have been circulating and thus the risk of spreading this

1 84 pathogen has to be considered. In France, the marketed semen are not subjected to systematic
2
3 85 testing for the presence of PEDV, but the import of boars from countries where PEDV non-
4
5 86 InDel strains are circulating is regulated. A systematic control of boars introduced from other
6
7 87 countries has been recently implemented by the French pig breeding sector. Prior to
8
9 88 movements, a veterinary certificate has to be issued for each boar, attesting the absence,
10
11 89 during the previous year, of clinical signs of PED, seroconversion and virus detection in the
12
13 90 farm from which the boars are originating. Upon arrival in France, imported boars are
14
15 91 quarantined for a period of 30 days. A second quarantine of 30 days may be applied before
16
17 92 entry into semen collection centers. In semen collection centers boars are routinely tested for
18
19 93 Classical Swine Fever, Brucellosis and Aujeszky's disease as a regulatory requirement (10).
20
21
22 94 In addition, a diagnostic test for PEDV is frequently performed at the breeding sector's
23
24 95 initiative.
25
26
27
28

29 96 Our results indicate that the sanitary controls of boars prior their departure from the
30
31 97 holding of origin and before their entry into semen collection centers may have prevented
32
33 98 PEDV introduction into French AI centers till 2015. Nevertheless, there remain some
34
35 99 uncertainties on the PEDV status of imported boars. A recent study revealed that clinically
36
37 100 healthy boars experimentally infected with PEDV (absence of diarrhea, vomiting and
38
39 101 shedding in feces) could shed intermittently PEDV in semen in the absence of seroconversion
40
41 102 (7). The veterinary certificate delivered prior to departure of the breeding boars might
42
43 103 therefore not provide absolute certitude of safe semen. It might be advisable to carry out PCR
44
45 104 on semen samples for artificial insemination.
46
47
48
49

50 105 To our knowledge, there is no report from other countries on the serological status of
51
52 106 boars in AI centers. Our study indicates that PEDV has most likely not circulated in the
53
54 107 French AI centers included in the study, at least till 2015. Nevertheless it might be advisable,
55
56 108 in order to ensure safe trade and safe AI, to recommend semen testing for PEDV. AI centers
57
58
59
60
61
62
63
64
65

109 in France have adopted for a long time good practices in routine work and thus have reached a
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

110 high level of biosecurity. It is essential that this is maintained and possibly reinforced in order
111 to prevent introduction of emerging pathogens such as PEDV.

112 **References**

- 1
2 113 1. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology,
3
4 114 pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal*. 2015;204(2):134-43.
5
6
7 115 2. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, et al.
8
9 116 Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-
10
11 117 February 2014. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(10):1620-8.
12
13
14 118 3. Wang J, Zhao P, Guo L, Liu Y, Du Y, Ren S, et al. Porcine epidemic diarrhea virus
15
16 119 variants with high pathogenicity, China. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(12):2048-9.
17
18
19 120 4. Carr J, Zakharchenko Y, Chipenko I, Besarab J, Konovalov I, Bekh O. Clinical signs
20
21 121 of Porcine Epidemic Diarrhoea in the Ukraine in 2014 associated with a Chinese/USA PED
22
23 122 Virus. 2015:8.
24
25
26 123 5. EFSA. Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine
27
28 124 epidemic diarrhoea. *EFSA Journal*. 2016;14(2):4375.
29
30
31 125 6. Dufresne L, Robbins R. Field experience with porcine epidemic diarrhea. *American*
32
33 126 *Association of Swine Veterinarians*. 2014:613-6.
34
35
36 127 7. Gallien S, Moro A, Lediguerher G, Catinot V, Paboeuf F, Bigault L, et al. Evidence of
37
38 128 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-
39
40 129 free boars. *Veterinary research*. 2018;49(1):7.
41
42
43 130 8. Maes D, Van Soom A, Appeltant R, Arsenakis I, Nauwynck H. Porcine semen as a
44
45 131 vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology*. 2016;85(1):27-38.
46
47
48 132 9. Gerber PF, Lelli D, Zhang J, Strandbygaard B, Moreno A, Lavazza A, et al.
49
50 133 Diagnostic evaluation of assays for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea
51
52 134 virus (PEDV) in pigs exposed to different PEDV strains. *Prev Vet Med*. 2016;135:87-94.
53
54
55 135 10. Ministère de l'agriculture. Note de service DGAL/SDSPA/N200468134 2014 [35].
56
57 136 Available from: agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/documents/dgaln20048134.pdf.
58
59
60
61
62
63
64
65

138 **List of abbreviations**

- 1
2 139 AI: Artificial Insemination
3
4
5 140 ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
6
7 141 PCR: polymerase chain reaction
8
9
10 142 PED: Porcine Epidemic Diarrhea
11
12 143 PEDV: Porcine Epidemic Diarrhea Virus
13
14 144 OD: Optical Density
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

145 **Declarations**
1
2
3 146 **Ethic approval and consent to participate**
4
5 147 Not applicable
6
7 148 **Consent for publication**
8
9
10 149 Not applicable
11
12 150 **Availability of data and material**
13
14 151 Not applicable
15
16
17 152 **Competing interests**
18
19 153 The authors declare that they have no competing interests.
20
21
22 154 **Funding**
23
24 155 The authors are grateful to ANSES, INRA and LNCR for their financial support.
25
26
27 156 **Authors' contributions**
28
29 157 All the authors carried out the study. SG analyzed the data and wrote the manuscript. BG, NR
30
31 158 and MB supervised the project. All the co-authors revised the manuscript. All authors read
32
33 159 and approved the final manuscript.
34
35
36
37 160 **Acknowledgments**
38
39 161 The authors are grateful to ANSES, INRA and LNCR for their financial support. We also
40
41 162 would like to thank the French AI centers which provided all the boars serum sample tested in
42
43 163 this study.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

164 **Figure legend**

1
2
3
4
5
6

165 **Figure 1:** Repartition of boars sampled and number of blood samples for each boar in France
166 during the year 2015

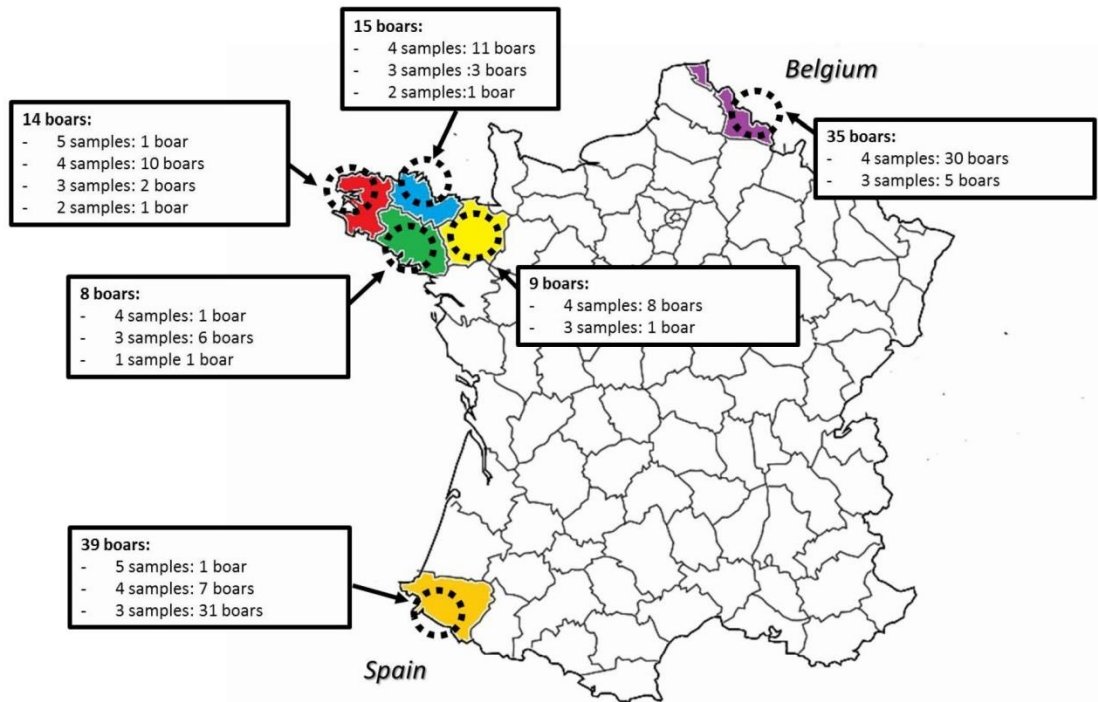


Figure 1


**Article 4: Evidence of
porcine epidemic
diarrhea virus (PEDV)
shedding in semen from
infected specific
pathogen-free boars**

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars

Sarah Gallien^{1,2,3*} , Angélique Moro^{1,2}, Gérald Lediguerher^{1,2}, Virginie Catinot⁴, Frédéric Paboeuf^{1,2}, Lionel Bigault^{1,2}, Mustapha Berri³, Phillip C. Gauger⁵, Nathalie Pozzi⁴, Edith Authié⁴, Nicolas Rose^{1,2} and Béatrice Grasland^{1,2}

Abstract

In 2013, PED emerged for the first time in the United States (US). The porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) spread quickly throughout North America. Infection with PEDV causes watery diarrhea and up to 100% mortality in piglets, particularly for highly pathogenic non-InDel strains circulating in the US. PEDV is mainly transmitted by the fecal–oral route. Transmission via the venereal route has been suspected but not previously investigated. The aim of the study was to determine if PEDV could be detected in semen from infected specific pathogen-free (SPF) boars inoculated with a PEDV US non-InDel strain suggesting venereal transmission may occur. Two boars orally inoculated with PEDV showed clinical signs and virus shedding in feces. Transient presence of the PEDV genome was detected by RT-qPCR in the seminal (5.06×10^2 to 2.44×10^3 genomic copies/mL) and sperm-rich fraction of semen (5.64×10^2 to 3.40×10^4 genomic copies/mL) and a longer duration of viral shedding was observed in the sperm-rich fraction. The evidence of PEDV shedding in semen raises new questions in term of disease spread within the pig population with the use of potentially contaminated semen.

Introduction

Porcine epidemic diarrhea (PED) emerged for the first time in Europe during the 1970s [1]. The virus responsible for this disease is an *alphacoronavirus* known as porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The PEDV has a single-stranded, positive-sense RNA genome. An infection with PEDV in pigs leads to severe liquid diarrhea, vomiting and dehydration. In suckling piglets population, PEDV causes high mortality [2]. In older animals, morbidity may approach 100%, but mortality remains low between 1 and 3% [3]. Economic losses due to this virus are significant [2, 4–7]. Currently, PEDV is present on the Asian, American and European continents. In 2013, 40 years after the first cases of PED in Europe, the disease emerged in the United States (US), in the Midwestern

state of Iowa, and ultimately affected the swine population of the entire country; until this date, the US had been free from PED [8]. The virus spread rapidly causing a major impact on pig production including mortality of 10% of the total US swine production or approximately 7 million piglets in less than 1 year [9]. Two genetically strains of PEDV have been identified in the USA, namely, the “non-InDel” strain, close to the aforementioned Asian strains, and the “InDel” strain, showing insertion-deletion in the S1 part of the S gene. Currently, PEDV is endemic in the US with periodic waves of infection occurring mostly during winter. The virus also spread to others countries in North and South America, such as Canada and Mexico [2, 10, 11]. In Europe, PED cases associated with the InDel strains have been detected since 2014 [10, 12–14].

Different PEDV transmission routes have been identified. The major mode of transmission is the fecal–oral route through direct or indirect contact with infected pigs or contaminated feces [2, 15]. Transmission of PEDV

*Correspondence: sarah.gallien@anses.fr

¹ Anses, Laboratory of Ploufragan/Plouzané, BP53, 22440 Ploufragan, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

also occurs through contact with contaminated equipment, contaminated vehicles used for animal transport, or farm employees [2, 16, 17]. Experimental studies have shown that airborne samples containing PEDV can be infectious for pigs so PEDV could be spread through aerosols [18]. In addition, PEDV has been transmitted vertically through contaminated milk from the sow to its piglets [5]. PEDV transmission through semen has also been a concern due to a viremia that occurs during the acute phase of infection during which the virus may be recovered in blood and sexual organs [10]. Contamination of semen by PEDV during processing may also occur. A recent study demonstrated PEDV nucleic acid detection in infected boars' semen; however, the authors were not able to rule out external contamination by fecal material during collection and/or preparation of the semen [19]. The PEDV genome has also been detected in the semen of healthy boars from three different farms in China. The quantity of detected PEDV genome ranged from $10^{1.46}$ to $10^{3.65}$ genome copies/mL of semen [20]. It is known that some viruses such as porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine parvovirus (PPV), African swine fever virus (ASFV), classical swine fever virus (CSFV), foot and mouth disease virus (FMDV), Japanese B encephalitis virus (JBEV) and porcine circovirus type 2 (PCV2) are shed in semen [21]. However, PEDV detection in and transmission via semen has not been previously studied in experimentally infected boars. Contamination of semen by different porcine viruses via contaminated feces or aerosols could be possible [22]. In France, non-InDel strains of PED are classified in the first category of regulated animal health hazards (Order Number: AGRG1410808A). In order to maintain the PEDV free status for non-InDel strains in France and in Europe, importing boars and boar semen from countries where non-InDel strains are endemic is strictly controlled. Therefore, it is important to know if PEDV can be shed in semen from infected boars in order to determine appropriate biosecurity measures necessary to prevent transmission of the virus. The objective of this study was to determine if PEDV can be shed in semen from specific pathogen-free (SPF) boars infected by a US non-InDel strain of PEDV.

Materials and methods

Animals and experimental design

The experiment was carried out in the air-filtered level 3 biosecurity facilities of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) in accordance with the European and French regulations on animal welfare. The protocol for this experiment was approved by the Ethics Committee registered under number #16 by the French Ministry of Research (Referral

No.16-083). Four Large White specific pathogen free (SPF) boars were included in the experimental trial, with two inoculated boars housed in the same room (Room 1: boars F1 and F2). The room contained two separate pens with one boar in each. The two remaining boars C1 and C2 (two and a half years-old) used as negative controls were housed in the ANSES SPF herd. The two boars in room 1 F1 and F2 (two and a half years-old and one and a half year-old respectively) were orally inoculated in the morning of day 0 with a 5 mL homogenate of a non-InDel strain, PEDV/USA/2014/IOWA (GenBank Number: MF373643). The inoculum was prepared by homogenizing the jejunums (20% w/v) collected from PEDV infected pigs from a herd in the state of Iowa (USA) in 2014. The homogenate was centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4 °C and the supernatant filtered through a 0.45 µm filter. The complete genome of the PEDV/USA/2014/IOWA strain was sequenced by next-generation sequencing (NGS) according the protocol already described [23] and no additional RNA viral sequences were identified. The absence of PCV2 and PRSSV in the inoculum was assessed by absence of seroconversion against PCV2 and PRSSV after inoculation. The inoculum contained 10^8 genomic copies/mL based on a quantitative real-time reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) assay. The experiment lasted for 52 days post-inoculation (dpi). Clinical signs (lethargy, outward appearance, behavior, breathing, and diarrhea) were recorded daily. A scoring system was used for the consistency of the feces (0: absence of feces, 1: normal, 2: semi-liquid without a formed consistency, and 3: liquid/watery contents). PEDV shedding was assessed in fecal samples collected daily from the inoculated boars the first week after infection, and then three times a week until 52 dpi, using a RT-qPCR. Semen was collected before inoculation and every day during the first week post-infection and twice weekly thereafter. Serum was collected prior to inoculation and at 29 dpi in order to evaluate seroconversion. All samples were stored at -80 °C. At 52 dpi, on necropsy, the following tissue samples were collected and stored at -80 °C in RNA later tissue storage reagent (Sigma, Saint Louis, USA): duodenum, jejunum, ileum, colon, spleen, liver, mesenteric and inguinal lymph nodes, Peyer's patches (jejunum and ileum), psoas muscle, lungs, vas deferens (right and left), testicles (right and left: apical pole, distal pole, median axis), epididymis (right and left: head, body, tail), prostate, Cowper's glands (right and left), seminal vesicles (right and left: apical pole and distal pole) and spermatic cords (right and left). Macroscopic lesions were also evaluated on necropsy. The boars C1 and C2 were not necropsied at the end of the study.

Semen

In order to prevent any contamination of the semen from feces or aerosols, the belly and the sheath of the boars were cleaned with cleaning wipes prior to sample collection. A swab of the prepuce was also sampled before each collection to rule out the possibility of external contamination of semen. The semen samples were collected, manually, using a collection dummy without sexual stimulation. The gelatin plug was also collected at the end of the semen ejaculate. After each collection, the fresh semen was centrifuged at $8000 \times g$ for 20 min at 4°C [24]. Through this centrifugation step, the sperm-rich fraction and the seminal fraction were separated. The two fractions were stored separately at -80°C .

Feces and tissue homogenization

Fecal homogenates were prepared with 1 mL or 1 g of feces homogenized with 9 mL of Dulbecco's phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The homogenates were then centrifuged at $15\,000 \times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatants were stored at -80°C .

A homogenate of each tissue was prepared at 20% (w/v) in PBS (phosphate buffer saline) using a bead mill (Retsch, Haan, Germany). Subsequently, the suspensions were centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4°C and the supernatants were stored at -80°C .

Quantification of PEDV genomes

RNAs were extracted from the feces, tissue homogenate and from the prepuce swab supernatants using a Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNAs were also extracted from the sperm-rich fraction, the seminal fractions and from the gelatin plugs using TRIzol[®] assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A total of 750 μL of TRIzol were added to 250 μL of sample and homogenized by hand. Next, 200 μL of chloroform were added and mixed by hand during 15 s and incubated at room temperature for 15 min. The tubes were centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 min at 4°C . After centrifugation, the upper aqueous layer containing RNA was transferred to other tubes and 300 μL of TRIzol was added. The tubes were homogenized by hand for 15 s and were incubated at room temperature for 5 min. Then, 60 μL of chloroform were added and mixed by hand for 15 s. A new incubation step at room temperature for 15 min and a centrifugation at $12\,000 \times g$ for 15 min at 4°C were conducted. The upper aqueous layers were transferred to new tubes and 150 μL of isopropanol and 1 μL of glycogen were added. The tubes were incubated at -20°C for 15 min and then centrifuged at $12\,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was discarded and

1 mL of 75% ethanol was added twice and centrifuged at $7500 \times g$ for 5 min at 4°C . This step was repeated twice. After the centrifugation step, the ethanol was discarded and the tubes were air-dried to remove any traces of ethanol. Then, the RNA pellet was suspended in 50 μL of nuclease free water and 5 μL of extracted RNA was used as template for PEDV RT-qPCR. RNA extraction controls were included between every five samples to check for any PEDV contamination by replacing the sample with RNase-free water.

The number of PEDV genomic copies was assessed with a SYBR Green real-time PCR using a Power SYBR[®] Green RNA-to-Ct[™] 1-step kit on a 7500 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RT-qPCR conditions used were a holding stage of two steps, which included a first step at 48°C for 30 min, and a second at 95°C for 10 min. The cycling stage included 40 repeated cycles of two steps, a first step of 15 s at 95°C and a second step of 1 min at 60°C . The melt curve stage was composed of four steps, a first step of 1 min at 95°C , a second step of 1 min at 60°C , a third step with a gradual increase in temperature with 0.35°C for 0.3 s to obtain a temperature of 95°C and a fourth step of 15 s at 60°C . The primers used for the PCR were designed from the conserved regions of the PEDV nucleocapsid gene for universal detection of the strain used for inoculation (forward, 5'-CGCAAAGACTGAACCCACTAA-3'; reverse, 5'-TTGCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT-3') [25]. The copy numbers were quantified using a range from 10^1 to 10^8 copies/5 μL .

For each PCR run, a positive control containing PEDV RNA extract from a PEDV cell culture supernatant was included. Two negative controls were also included in the plate where the RNA template was replaced by RNase-free water. One negative control was placed close to the positive control and the second at the end of the plate. All the samples were processed in duplicate. Prior to performing the PCR reactions, RNA extracted with the RNeasy Mini Kit was diluted 1:10 to avoid any PCR inhibition.

PEDV serology

Serum samples were tested for PEDV antibodies using a commercial ELISA test, ID Screen[®] PEDV Indirect (ID Vet, Grabels, France). The ELISA test is validated if the mean value of the positive control optical density (OD) is greater than 0.350 and if the ratio of the mean values of the positive and negative controls is greater than 3. A sample-to-positive (S/P) ratio was calculated. Samples with an S/P ratio equal to or greater than 60% were considered positive for PEDV antibodies.

Results

Boar infection

The boars inoculated with the PEDV strain demonstrated clinical signs with diarrhea observed during two periods: from 2 to 5 dpi and then again from 25 to 28 dpi. Vomiting was also observed in the infected boars at 2 dpi and again at 11 dpi. Both inoculated boars demonstrated a reduction in feed intake during the first 9 dpi. Boar F1, aged of two and a half years old, lost 8 kg and boar F2, aged of one and a half years old, gained only 21 kg during the experiment. None of the two control boars demonstrated clinical signs during the trial. All the boars were seronegative at -7 dpi. The two inoculated boars were positive for PEDV antibodies at 29 dpi. The two control boars remained seronegative at 31 dpi (Table 1).

PEDV fecal shedding in boars

Prior to inoculation, all boars were RT-qPCR negative for PEDV in feces. The two control boars remained PEDV negative in feces throughout the trial. PEDV nucleic acid was detected in feces starting at 2 dpi with 1.62×10^8 genomic copies/g and 2.53×10^9 genomic copies/g for boars F1 and F2 respectively. Maximum shedding was detected between 3 and 4 dpi at 6.76×10^8 genomic copies/g for boar F1 at 4 dpi, and 5.73×10^9 genomic copies/g for boar F2 at 3.5 dpi. Continuous PEDV shedding was detected in boars F1 and F2 for 19 and 16 days, respectively. All feces analyzed by RT-qPCR remained under the limit of detection after 21 dpi for boar F1 and after 30 dpi for boar F2 (Figure 1).

PEDV detection in semen and in gelatin plug

No PEDV RNA was detected in the semen fractions or in the gelatin plug collected 5 days before inoculation. The semen fractions and the gelatin plug collected from the control boars at 28 and 49 dpi were negative for PEDV RNA. Semen of the two PEDV inoculated boars contained PEDV RNA in both fractions. PEDV RNA was also detected in the gelatin plug of the two boars. PEDV RNA was detected for the first time in boars F1 and F2 in the sperm-rich fraction at 0.5 and 2 dpi, respectively,

and in the seminal fraction at 2 and 0.5 dpi, respectively. PEDV RNA was detected in the gelatin plug from both inoculated boars at 18 dpi (Figure 2).

The detection of PEDV RNA in the seminal fraction was transient: the PEDV RNA was detected only at 2 dpi (2.44×10^3 PEDV genomic copies/mL) and at 35 dpi (5.06×10^2 PEDV genomic copies/mL) for boar F1, and in the afternoon the day after inoculation (1.69×10^3 PEDV genomic copies/mL) and at 28 dpi (2.37×10^3 PEDV genomic copies/mL) for boar F2 (Figure 2). PEDV RNA was detected for longer periods in the sperm-rich fractions than in the seminal fractions. For boar F1, PEDV shedding in sperm-rich fraction was continuous during the first 4 days post-inoculation. Two other shedding phases were observed between 9 and 25 dpi and between 42 and 49 dpi for boar F1.

In the sperm-rich fraction of boar F2, the presence of PEDV RNA was only demonstrated at 2 dpi (2.44×10^3 PEDV genomic copies/mL). The presence of PEDV RNA in this fraction was detected daily until 4 dpi becoming transient with two other phases of excretion observed similar to boar F1 (between 9 and 14 dpi, and 25 and 28 dpi).

The swabs of the prepuce were negative for PEDV RNA at the same time PEDV RNA was detected in semen. PEDV RNA was also detected in the gelatin plug at 18 dpi (9.24×10^3 genomic copies/mL for boar F1 and 4.54×10^4 genome copies/mL for boar F2), at 42 dpi (4.34×10^4 genome copies/mL for boar F1 and 1.58×10^5 genome copies/mL for boar F2) and at 49 dpi for the boar F1 (1.47×10^4 genomic copies/mL).

PEDV detection in organs

Following necropsy, in all the analyzed organs, PEDV RNA was detected only in the jejunum Peyer's patches (2.85×10^7 genomic copies/g for boar F1, 1.07×10^7 genomic copies/g for boar F2), the ileum Peyer's patches (3.88×10^6 genomic copies/g for boar F1, 8.70×10^5 genomic copies/g for boar F2) and the mesenteric lymph nodes (2.41×10^5 genomic copies/g for boar F1, 5.72×10^4 genomic copies/g for boar F2) (Table 2). PEDV RNA was also detected in the ileum of boar F1 (1.65×10^6). No PEDV RNA was detected in the sexual organs (Table 2). No lesions were observed in the gastrointestinal or reproductive tract.

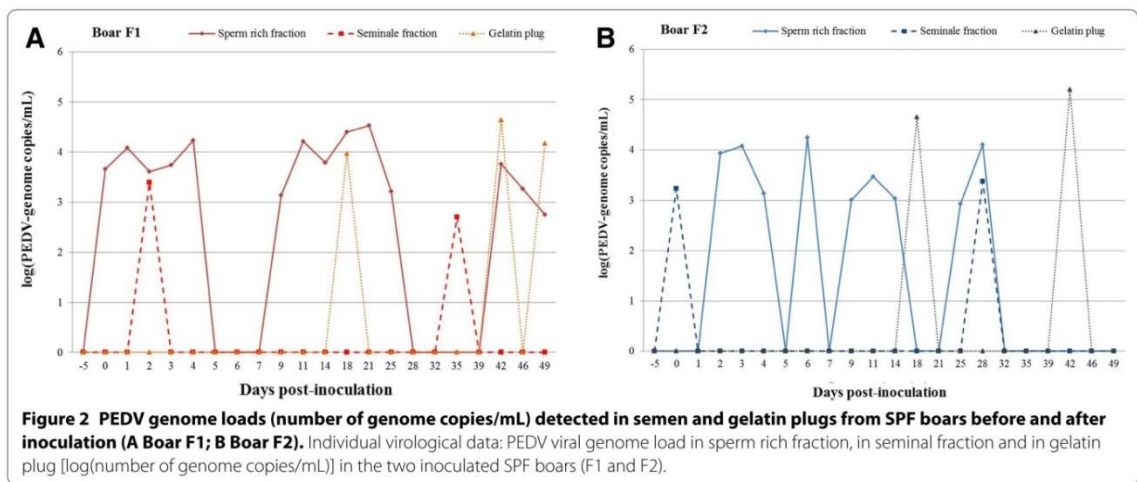
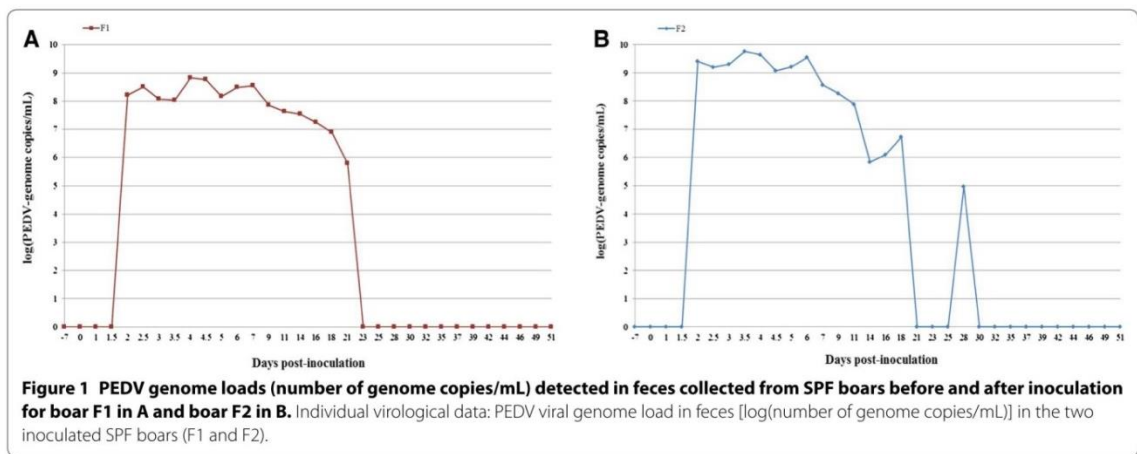
Discussion

The clinical signs observed in boars infected with a non-InDel US strain of PEDV in this study were more pronounced than expected. So far, it has been reported that adults, such as boars and sows, show less severe clinical signs than new-born and weaned piglets [5]. In the study reported here, boars demonstrated similar clinical signs

Table 1 Sample-to-positive (S/P) ratios (%) detected in the sera collected from SPF boars before and after inoculation

Boar	Status	Days post-inoculation	
		-7 (%)	30 ± 1 (%)
F1	PEDV non-InDel strain inoculated	1	60
F2	PEDV non-InDel strain inoculated	1	80
C1	Control	0	0
C2	Control	0	1

Results in italic characters are positive.



(diarrhea, vomiting, and anorexia) compared to what has been described previously in PEDV-infected post-weaning pigs [26]. The duration of virus shedding in boars' feces determined in our study (16 and 19 days) was also close to values reported for weaned piglets infected with a non-InDel strain, i.e. 17 days [27]. Based on our data from this report, we conclude that boars, irrespective of age, can also show similar clinical signs as young piglets in response to infection with a non-InDel PEDV strain that should not be considered systematically as subclinical in this age.

To the best of our knowledge, the presence of PEDV RNA in semen has never been evaluated previously in experimentally inoculated boars, although sows infected by PEDV may demonstrate reproductive disorders [28]. If sows can be infected by contaminated semen, these

data suggested that the trade or dispersion of contaminated semen may lead to a risk of spreading the disease to breeding/gestation and farrowing farms [21, 28]. Several publications emphasized the importance of monitoring semen because of to the large increase in the use of artificial insemination throughout the world. In fact, 90% of sows in Europe, North America and Latin American countries as well as 70% of sows in Thailand and in Taiwan are bred through artificial insemination [21].

Here, we showed the presence of PEDV RNA in the semen of infected specific pathogen-free boars inoculated with a non-InDel strain of PEDV as early as 0.5 dpi. The swabs of the prepuce were negative for PEDV RNA at the same time PEDV nucleic acid was detected in semen. Therefore, it is unlikely that the semen was cross-contaminated with PEDV infected feces during collection of the

Article 4: Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars

Table 2 PEDV genome loads (number of genome copies/g of tissue) detected in the tissues collected from SPF boars following necropsy

Boar	Status	Jejunum Peyer's patches	Ileum Peyer's patches	Mesenteric nodes	Ileum	Duode-num	Jeju-num	Colon	Ingui-nal nodes	Spleen	Liver	Lung	Psoas muscle	Epididymis		
														Right	Left	
F1	PEDV inoculated	2.85×10^7	3.88×10^6	2.41×10^5	1.65×10^6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	PEDV inoculated	1.07×10^7	8.70×10^5	5.72×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Boar	Testicle	Seminal vesicle				Prostate		Cowper's glands		Vas deferens		Spermat cord	
		Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left
F1	Distal pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F1	Central axis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F1	Apical pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F1	Distal pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F1	Apical pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	Distal pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	Central axis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	Apical pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	Distal pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F2	Apical pole	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

boars. PEDV RNA was present in both fractions of semen although larger amounts of PEDV were more consistently detected in the sperm-rich fraction which contains sperm and non-sperm cells (spermatozoa, leucocytes, immature germ cells, etc.). In these sperm-rich fractions, the maximum PEDV genomic load reached 3.40×10^4 genomic copies/mL for one boar and 1.75×10^4 genomic copies/mL for the second one. Interestingly, viral excretion in the seminal fractions was transient. Viral shedding in the sperm-rich fraction could be due to viremia or due to irrigation of the genital tract by infected blood cells. Viral shedding in this fraction has already been reported for other porcine viruses such as PCV2 and PRRSV, the latter belonging to the same order, *Nidovirales*, as PEDV [29–31]. For PRRSV, there is currently no consensus among scientists regarding the mechanism of viral shedding in this fraction. One hypothesis is that the virus could be transported by non-sperm cells, such as mononuclear cells or granulocytes. Infected monocytes or macrophages could disseminate the virus through the bloodstream or via the lymph fluid in the genital tract and to semen, without viral replication in the reproductive tissues [30–32]. Another hypothesis for the presence of PRRSV in the sperm-rich fraction is that the virus is directly associated with sperm cells. A previous study showed that PRRSV can infect spermatogenic epithelium and can also infect testicular germ cells of pigs and replicate in these cells. In addition, an association of this virus with macrophages was demonstrated, which is consistent with the previous hypothesis [33]. Both hypotheses mentioned above can be put forward to explain the PEDV shedding in the sperm-rich fraction of infected boars demonstrated in our study. The virus may be associated with non-sperm cells and migrate in the genital tract and in semen, or may be associated with actual sperm cells. Regarding the results of our study, the second hypothesis seems less likely. Following necropsy, no PEDV RNA was found in genital tract tissues. However, RNA degradation during necropsy could not be excluded and would explain a lack of PEDV detection in these tissues. Unfortunately, semen samples were not collected the day of necropsy. These samples would possibly have been negative, consistent with the absence of PEDV RNA detected in sexual organs. We can also hypothesize that infection of genital tract tissues may depend on individual susceptibility with a high degree of variability between animals, and that the number of animals infected with PEDV in our study was too low (2) to consistently detect PEDV RNA in genital tract tissues. As a comparison, in the case of the PRRSV, the virus was found in reproductive organs for few infected boars: in the head of the epididymis (37.5% of boars), in the body of the epididymis (20% of boars), in the tail of the epididymis (12.5% of boars), in

the testicles (2.5% of boars), in Cowper's glands (7.5% of boars), in the seminal vesicles (5% of boars), and in the prostate for 12.5% of boars [34]. The individual variability observed when detecting PRRSV in the reproductive tract is important for the virus pathogenesis and transmission suggesting that PEDV variable detection in reproductive tissues could explain the absence of detection in the two inoculated boars. On necropsy, PEDV RNA was only detected in lymphoid organs including the mesenteric lymph nodes and both jejunum and ileum Peyer's patches. The presence of extraneous RNA from other viruses of the *Nidovirales* order was already highlighted in lymphoid organs. For example, PRRSV RNA was recovered in lymph nodes from 74.3% of infected boars [34]. Lymphoid tissues contain a large panel of cell types such as innate immune response cells (dendritic cells, macrophages, monocytes or granulocytes) and cells of the adaptive immune response (B and T lymphocytes, primary and secondary lymphoid cells, etc.). We may postulate that PEDV might be associated with one of these cell types, similar to what has been described before for PRRSV and might migrate with these cells to the male genital tract. We can also hypothesize that PEDV replication could be possible in one of these cell types such as dendritic cells (DCs) for example. Interestingly, it has been demonstrated previously that viral replication in DCs is possible for other porcine viruses, including CSFV and PRRSV [35, 36]. This includes the ability of the viruses to use these cells with high migratory capacity to be transported to various sites of the host body. Further studies should be performed to evaluate whether PEDV could use DCs or other cells of lymphoid tissues for replication and/or transportation to the boar genital tract.

The quantity of PEDV genomic copies per milliliter of sperm-rich fraction described in our study was lower than the quantity of genomic copies per milliliter of sperm-rich fraction reported for other porcine viruses. The quantity of PEDV RNA in semen was 10–100 times lower than the quantity found in semen for PCV2 for example. The quantity of recovered PCV2 did not enable infection of the sow by artificial insemination [29]. As result, it could be debated whether artificial insemination could infect a sow considering the PEDV viral titers that were detected in boar semen in this experiment.

We also noted that shedding of PEDV in semen was intermittent. We can make two hypotheses in this regard: the first is that viral shedding is truly intermittent, and the second is that viral shedding in semen is continuous but that the quantity of PEDV RNA is sometimes too low to be detected by RT-qPCR. Intermittent shedding of porcine viruses has already been shown for PCV2, CSF and PRRSV [29, 37–40]. We also observed that shedding

of PEDV in semen appeared before shedding in feces and prior to the onset of the clinical signs. This is consistent with the data reported for other porcine viruses, such as CSFV and Aujeszky's disease virus, which showed viral excretion occurring in semen before the development of clinical signs [21]. Therefore, boars infected by PEDV may be detected after delivery of potentially infected semen. Consequently, specific control measures should be implemented for breeding pigs before semen or boars are imported. This may include the control of seroconversion and control of the absence of previous virus shedding in feces and reporting clinical signs. Implementing these types of measures is particularly important because we have demonstrated that PEDV RNA can be detected in semen even when the boars no longer shed virus in feces and do not show any clinical signs. It would also be beneficial to have more data regarding the prevalence of PEDV among boars used in boar studs.

To conclude, we have demonstrated the shedding of a non-InDel US PEDV strain in the semen (sperm-rich fraction and seminal fraction) of inoculated boars. Further studies are required to determine if the PEDV detected by RT-qPCR in infected semen is potentially infectious. It could be possible to challenge weaned piglets with contaminated semen and observe whether these pigs shed PEDV. If the semen is infectious, it would be necessary to assess whether it can be transmitted by artificial insemination to sows, and evaluate any reproductive disorders.

Abbreviations

ASFV: African swine fever virus; CSFV: classical swine fever virus; dpi: days post-inoculation; FMDV: foot and mouth disease virus; JBEV: Japanese B encephalitis virus; NGS: next-generation sequencing; PBS: phosphate buffer saline; PCR: polymerase chain reaction; PCV2: porcine circovirus type 2; PEDV: porcine epidemic diarrhea virus; PED: porcine epidemic diarrhea; PPV: porcine parvovirus; PRRSV: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; RNA: nucleic acid; RT-qPCR: real-time reverse transcriptase PCR; S/P: sample-to-positive; US: United States.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NR, BG, SG, AM, GL, FP, NP, EA, LB, MB, PCG and VC designed and carried out the experiments. SG analyzed the data and wrote the manuscript. NR and BG supervised the project. All the co-authors revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to ANSES, INRA and LNCr for their financial support. We also would like to thank Phillip Gauger from Iowa State University who provided the US non-InDel strain and all the team members at the experimental laboratory for their contribution.

Ethics approval and consent to participate

The experimental design was approved by the Ethics Committee registered under number #16 by the French Ministry of Research (Referral No.16-083).

Author details

¹ Anses, Laboratory of Ploufragan/Plouzané, BP53, 22440 Ploufragan, France. ² Université Bretagne Loire, 35000 Rennes, France. ³ Institut National de Recherche Agronomique (INRA), UMR 1282, Université François Rabelais, 37380 Nouzilly, France. ⁴ Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (LNCr), 94700 Maisons-Alfort, France. ⁵ Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 18 September 2017 Accepted: 21 December 2017

Published online: 24 January 2018

References

1. Pensaert MB, de Bouck P (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 58:243–247
2. Jung K, Saif LJ (2015) Porcine epidemic diarrhea virus infection: etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 204:134–143
3. Geiger J, Connor J (2013) Porcine epidemic diarrhea, diagnosis, and elimination <http://www.aasv.org/aasv%20website/Resources/Diseases/PEDV/13-05-29PEDWhitePaper.pdf>. Accessed 25 November 2016
4. Sung MH, Deng MC, Chung YH, Huang YL, Chang CY, Lan YC, Chou HL, Chao DY (2015) Evolutionary characterization of the emerging porcine epidemic diarrhea virus worldwide and 2014 epidemic in Taiwan. *Infect Genet Evol* 36:108–115
5. Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX (2012) Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis* 18:161–163
6. Kim YK, Lim SJ, Lim JA, Cho IS, Park EH, Le VP, Hien NB, Thach PN, Quynh DH, Vui TQ, Tien NT, An DJ (2015) A novel strain of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnamese pigs. *Arch Virol* 160:1573–1577
7. Lee S, Lee C (2014) Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis* 20:1223–1226
8. Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ (2013) Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest* 25:649–654
9. Cima G (2014) PED virus re-infecting U.S. herds. Virus estimated to have killed 7 million-plus pigs. *J Am Vet Med Assoc* 245:166–167
10. Gallien S, Le Poder S, Rose N, Grasland B (2016) Diarrhée épidémique porcine: le retour d'une "ancienne" maladie. *Virologie* 20:335–351 (in French)
11. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, Collins J, Saif LJ (2014) Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013–February 2014. *Emerg Infect Dis* 20:1620–1628
12. EFSA (2016) Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. *EFSA J* 14:4375
13. Martelli P, Lavazza A, Nigrelli A, Merialdi G, Alborali L, Pensaert M (2008) Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet Rec* 162:307–310
14. Pensaert MB, Martelli P (2016) Porcine epidemic diarrhea: a retrospect from Europe and matters of debate. *Virus Res* 226:1–6
15. Grasland B, Bigault L, Bernard C, Andraud M, Blanchard Y, Rose N (2015) La diarrhée épidémique porcine: quel risque en France? Comment s'y préparer? *Journées Recherche Porcine* 47:259–264 (in French)
16. Bowman AS, Krogwold RA, Price T, Davis M, Moeller SJ (2015) Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. *BMC Vet Res* 11:38
17. Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang J, Connor J, Yeske P, Loula T, Lewis I, Dufresne L, Main R (2014) Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis* 20:872–874

18. Alonso C, Goede DP, Morrison RB, Davies PR, Rovira A, Marthaler DG, Torremorell M (2014) Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet Res* 45:73
19. Dufresne L, Robbins R (2014) Field experience with porcine epidemic diarrhea. In: AASV 45th Annual Meeting, Dallas, USA, March 2014, pp 613–616
20. Sun R, Leng Z, Dekun C, Song C (2014) Multiple factors contribute to persistent porcine epidemic diarrhea infection in the field: an investigation on porcine epidemic diarrhea repeated outbreaks in the same herd. *J Anim Vet Adv* 13:410–415
21. Maes D, Van Soom A, Appeltant R, Arsenakis I, Nauwynck H (2016) Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology* 85:27–38
22. Opriessnig T, Giménez-Lirola LG, Halbur PG (2012) Artificial insemination and its role in transmission of swine viruses. In: Dr Carlos C Perez-Marin (ed) A bird's-eye view 256 of veterinary medicine, Intech, pp 255–280
23. 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 s gene indel strain isolated in France in December 2014. *Genome Announc* 3:e00535–e00615
24. Pal N, Huang YW, Madson DM, Kuster C, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T (2008) Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal control on porcine semen samples. *J Virol Methods* 149:217–225
25. Kim SH, Kim IJ, Pyo HM, Tark DS, Song JY, Hyun BH (2007) Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *J Virol Methods* 146:172–177
26. Coussemont W, Ducatelle R, Debouk P, Hoorens J (1982) Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets, histological and histochemical study. *Vet Pathol* 19:46–56
27. Thomas JT, Chen Q, Gauger PC, Giménez-Lirola LG, Sinha A, Harmon KM, Madson DM, Burrough ER, Magstadt DR, Salzbrenner HM, Welch MW, Yoon KJ, Zimmerman JJ, Zhang J (2015) Effect of porcine epidemic diarrhea virus infectious doses on infection outcomes in naïve conventional neonatal and weaned pigs. *PLoS One* 10:e0139266
28. Olanratmanee EO, Kunavongkrit A, Tummaruk P (2010) Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim Reprod Sci* 122:42–51
29. Grasland B, Blanchard P, Keranflec'h A, Bigault L, Oger A, Rose N, Madec F, Jestin A, Cariolet R (2013) Evaluation of the transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2) genogroups a and b with semen from infected specific-pathogen-free boars. *Vet Microbiol* 162:381–387
30. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CL, Yaeger MJ, Benfield DA (1995) Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7:456–464
31. Prieto C, Castro JM (2005) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63:1–16
32. Voicu IL, Silim A, Morin M, Elazhary MA (1994) Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet Rec* 134:422–423
33. Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, Osorio FA (1997) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol* 71:9170–9179
34. Prieto C, Garcia C, Simarro I, Castro JM (2003) Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. *Theriogenology* 60:1505–1514
35. Carrasco CP, Rigden RC, Vincent IE, Balmelli C, Ceppi M, Bauhofer O, Tache V, Hjertner B, McNeilly F, van Gennip HG, McCullough KC, Summerfield A (2004) Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *J Gen Virol* 85:1633–1641
36. Wang X, Eaton M, Mayer M, Li H, He D, Nelson E, Christopher-Hennings J (2007) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch Virol* 152:289–303
37. Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Evans LE, Landgraf JG, Wills RW, Sanderson TP, McGinley MJ, Brevik AK, Ciszewski DK, Frey ML (1994) Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J Am Vet Med Assoc* 204:1943–1948
38. Floegel G, Wehrend A, Depner KR, Fritzscheimer J, Waberski D, Moennig V (2000) Detection of classical swine fever virus in semen of infected boars. *Vet Microbiol* 77:109–116
39. Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B, Vyt P, de Kruijff A, Van Soom A (2008) Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 70:1337–1345
40. Madson DM, Ramamoorthy S, Kuster C, Pal N, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T (2009) Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Vet Res* 40:10

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



**Article 5: Limited
shedding of an «S-InDel»
strain of porcine epidemic
diarrhea virus (PEDV) in
semen and questions
regarding the infectivity
of the detected virus**

Accepted Manuscript

Title: Limited shedding of an S-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in semen and questions regarding the infectivity of the detected virus

Authors: Sarah Gallien, Angélique Moro, Gérald Lediguerher, Virginie Catinot, Frédéric Paboeuf, Lionel Bigault, Phillip C. Gauger, Nathalie Pozzi, Mustapha Berri, Edith Authié, Nicolas Rose, Béatrice Grasland



PII: S0378-1135(18)30896-4
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.025>
Reference: VETMIC 8087

To appear in: *VETMIC*

Received date: 26-7-2018
Revised date: 26-9-2018
Accepted date: 26-9-2018

Please cite this article as: Gallien S, Moro A, Lediguerher G, Catinot V, Paboeuf F, Bigault L, Gauger PC, Pozzi N, Berri M, Authié E, Rose N, Grasland B, Limited shedding of an S-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in semen and questions regarding the infectivity of the detected virus, *Veterinary Microbiology* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.025>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Limited shedding of an S-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in semen and questions regarding the infectivity of the detected virus

Sarah Gallien^{1,2,3}, Angélique Moro^{1,2}, Gérald Lediguerher^{1,2}, Virginie Catinot⁴, Frédéric Paboeuf^{1,2}, Lionel Bigault^{1,2}, Phillip C. Gauger⁵, Nathalie Pozzi⁴, Mustapha Berri³, Edith Authié⁴, Nicolas Rose^{1,2}, Béatrice Grasland^{1,2*}

¹ Anses, Laboratory of Ploufragan/Plouzané, BP53, 22440 Ploufragan, France;

² Université Bretagne Loire, 35000 Rennes, France ;

³ Institut National de Recherche Agronomique (INRA) Université François Rabelais UMR 1282 37380 Nouzilly, France ;

⁴ Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs (LNCR) 94700 Maisons-Alfort, France ;

⁵ Iowa State University College of Veterinary Medicine, Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, United States ;

* Corresponding author: beatrice.grasland@anses.fr

Highlights

The aim of this study was to determine if PEDV can be shed in semen from SPF (specific pathogens free) boars infected by a French «S-InDel» PEDV strain (PEDV/FR/001/2014) and in case of positive semen to determine the infectivity of that semen. Both infected boars had diarrhea after inoculation and shed virus in feces. In addition, PEDV genome was detected by RT-qPCR in the sperm-rich fraction of semen from the two boars infected with the «S-InDel» PEDV strain. The PEDV positive semen («S-non-InDel» and «S-InDel») sampled during a previous trial and in this boar trial were inoculated to six SPF weaned pigs. PEDV could be detected in intestinal tissues such as duodenum, jejunum and jejunum Peyer's patches by RT-qPCR except for one pig.

Abstract

PEDV is mainly transmitted by the oro-fecal route although PEDV shedding in semen has already been shown for an S-non-InDel PEDV strain infection. The aim of this study was to determine if PEDV can be shed in semen from SPF (specific pathogens free) boars infected by a French S-InDel PEDV strain (PEDV/FR/001/2014) and in case of positive semen to determine the infectivity of that semen. Both infected boars had diarrhea after inoculation and shed virus in feces. PEDV genome was also detected by RT-qPCR in the sperm-rich fraction of semen (6.94×10^3 and 4.73×10^3 genomic copies/mL) from the two boars infected with the S-InDel PEDV strain but only once at 7DPI. In addition, PEDV RNA in Peyer's patches and in mesenteric lymph nodes was also present for the two inoculated boars. The PEDV positive semen (S-non-InDel and S-InDel) sampled during a previous trial and in this boar trial were inoculated to six SPF weaned pigs. The inoculated piglets did not seroconvert and did not shed virus throughout the duration of the study except for one pig at 18 DPI. But, PEDV could be detected in intestinal tissues such as duodenum, jejunum and jejunum Peyer's

patches by RT-qPCR except for one pig. Even if PEDV genome has been detected in semen, experimental infection of piglets with positive semen failed to conclude to the infectivity of the detected PEDV.

Keywords: Porcine epidemic diarrhea virus, InDel strain, semen, boars

1. Introduction

Porcine epidemic diarrhea (PED) was described for the first time in Europe in the 1970s (Jung and Saif, 2015; Song and Park, 2012). This disease is characterized by a severe, profuse watery diarrhea with or without vomiting and dehydration and is caused by an etiologic agent called porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), a positive-sense, single-stranded RNA enveloped coronavirus of 28-kb (Jung and Saif, 2015). After several outbreaks in the 70's, PED has been persisting in Europe with sporadic cases until the late 1990's (Jung and Saif, 2015). Outbreaks of PED have also been described in Asia in the 1980s and from 2010 (Jung and Saif, 2015; Wang et al., 2013). Currently, two genotypes are circulating in several regions in the world, namely the S-non-InDel strains and the S-InDel strains, showing insertions-deletions in the S1 segment of the S gene (Jung and Saif, 2015; Vlasova et al., 2014). From clinical reports, these two types of strains seemed to be different in terms of morbidity and mortality with the S-non-InDel PEDV strains associated with more severe clinical cases and higher case-fatality rate compared to the others (Vlasova et al., 2014; Wang et al., 2014). In contrast to S-non-InDel PEDV strains, exclusively reported from America and Asia, S-InDel PEDV strains have also been identified in Europe since 2014 (EFSA, 2016; Stadler et al., 2015; Vlasova et al., 2014).

PEDV is transmitted mainly by the oro-fecal route, but also contact with contaminated equipment, vehicles used for pig transport or the staff (Bowman et al., 2015; Jung and Saif, 2015; Lowe et al., 2014). Airborne transmission of the virus was also shown for S-non-InDel strains (Alonso et al., 2014). PEDV transmission through contaminated milk from dam to piglets can also occur (Sun et al., 2012) but vertical transmission of PEDV through semen has never been shown. S-non-InDel PEDV strain shedding has recently been evidenced in the different fractions of semen (seminal and sperm-rich fractions) and in gelatin plug of specific pathogen free (SPF) boars experimentally inoculated (Gallien et al., 2018b). However, to the

best of our knowledge, the presence of PEDV RNA in semen of boars infected by an S-InDel PEDV strain has not been studied so far.

Thus, the aim of this study was to determine if PEDV can be shed in semen from SPF boars infected by an S-InDel French PEDV strain (PEDV/FR/001/2014). Subsequently, the infectivity of quantitative RT-PCR (RT-qPCR) positive semen was evaluated in an experimental infection of SPF weaned piglets.

2. Material and methods

2.1. Experimental designs

Two experimental trials were carried out in the air-filtered level 3 biosecurity facilities of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) in accordance with the European and the French regulations on animal welfare. Protocols used were approved by the Ethics Committee registered under number #16 by the French Ministry of Research (referral No.16-083 and No.18-028). The first trial (trial 1) was performed to evaluate PEDV shedding in semen from Large White SPF inoculated boars. Two boars (boars I1 and I2 aged 2 ½ and 1 ½ years-old) were housed in the same room but in two separate pens. The two other boars (boars C1 and C2), of similar age to boars I1 and I2, were used as negative controls and housed within the biosafety level-3, air filtrated ANSES SPF herd. This experiment lasted for 51 days post-inoculation (DPI). At 51 DPI, the inoculated boars were euthanized including anesthesia (Zoletil®, Virbac, Carros, France, 15 mg/kg) followed by bleeding before necropsy. The boars C1 and C2 were not necropsied.

The second trial (trial 2) was carried out for 18 days to assess the infectivity of RT-qPCR PEDV-positive semen. The positive semen fractions from two experiments were used and were collected from trial 1 with the S-InDel PEDV strain and from a previously described trial involving an S-non-InDel strain (Gallien et al., 2018b). Six SPF weaned pigs of three week-old were housed in the same room in two different pens separated by a plastic partition.

Two pigs of the same age housed in another room were used as controls. At 18 DPI, pigs were euthanized after anesthesia as already described and necropsied. Inoculation procedures

The two boars of the trial 1 received orally 5mL of a homogenate of the PEDV French S-InDel strain PEDV/FR/001/2014 (GenBank number: KR011756) titrating 10^8 viral genome copies/mL (equivalent to $\approx 10^5$ TCID₅₀/mL). The PEDV French S-InDel strain was amplified in a three-week-old SPF weaned pig inoculated with a homogenate of jejunum collected from PED-affected pigs belonging to a French farm in 2014. The inoculum was prepared from the jejunum of this SPF PEDV-inoculated pig by homogenization in Dulbecco's phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (20% w/v). The homogenate was centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min at 4°C and the supernatant filtered through a 0.45µm filter. Next-Generation Sequencing (NGS) was performed on the inoculum to obtain the PEDV complete genome sequence and to ensure the absence of other viral RNA sequences. The absence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRSSV) in the inoculum was assessed by the absence of seroconversion against PCV2 and PRSSV in the inoculated boars at the end of the trial.

The six SPF weaned pigs of trial 2 were orally inoculated with 10 mL of contaminated semen: pigs #1, #2, #3, #4 with the S-non-InDel and pigs #5, #6 with the S-InDel (Table 1). The semen samples inoculated were stored at -80°C until inoculation of the piglet. The semen were defrosted on ice just before the inoculation and reconstituted in cold Dulbecco's phosphate-buffered saline to avoid thermal shock.

2.2. Clinical observations and sample collections

For the two trials, clinical signs (lethargy, outward appearance, behavior, breathing, diarrhea and vomiting) were recorded daily. PEDV shedding in fecal samples was evaluated daily the first week after inoculation, and then three times a week until 51 DPI for trial 1 and

for trial 2, at 0.5 DPI, twice a day from 1 to 4 DPI, once at 5 and 6 DPI and then three times a week until the end of the trial.

PEDV shedding was also assessed in semen for trial 1. Semen was collected before inoculation and every day the first week post-inoculation and then twice a week until the end of the trial. The belly and the sheath of the boars were cleaned with cleaning wipes before sampling in order to avoid any contaminations of the semen with positive PEDV-feces/aerosols. A swab of the prepuce was also done before each collection to rule out the possibility of external contamination of semen. Semen was collected manually without sexual stimulation with support of a collection dummy. The gelatin plug was also collected at the end of the semen ejaculate.

Blood samples were also collected before inoculation and at the end of trials for the two trials, and at 21 DPI for trial 1 and once a week until the end of the trial for trial 2 to assess seroconversion and viremia by RT-qPCR.

During necropsy, organs of the digestive tract (duodenum, jejunum, ileum, colon, Peyer's patches (jejunum and ileum)), spleen, liver, mesenteric and inguinal lymph nodes, lungs, were collected and stored in RNA later tissue storage reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for the two trials. Organs of the reproductive tract were also collected for the trial 1 (vas deferens (right and left), testicles (right and left: apical pole, distal pole, median axis), epididymis (right and left: head, body, tail), prostate, Cowper's glands (right and left), seminal vesicles (right and left: apical and distal pole) and spermatic cords (right and left)) and stored in the same tissue storage reagent. Macroscopic lesions were also evaluated on necropsy for the two trials.

All samples collected during the two trials were stored at -80°C.

2.3. Semen, sera and feces/tissue homogenization

Fresh semen samples were centrifuged at 8,000×g for 20min at 4°C (Pal et al., 2008). This centrifugation step allowed separating the seminal fraction from the sperm-rich fraction of the semen. These two fractions and the gelatin plug were stored at -80°C.

Blood samples were centrifuged at 1,200×g for 10min at 4°C and then sera were stored at -80°C until use. One gram of feces (or 1mL of feces in case of liquid feces) was homogenized in 9mL of Dulbecco's phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The fecal homogenates were then centrifuged at 15,000×g for 10min at 4°C. Tissues were homogenized in Dulbecco's phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at 20% v/w using a bead mill (Retsc, Haan, Germany). These homogenates were centrifuged at 10,000×g for 10min at 4°C and the supernatants were stored at -80°C.

2.4. Quantification of PEDV genomes

Total RNAs were extracted from the fecal and tissue homogenates, from the preputial swabs and from sera using the Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Five µl of eluted RNA were used as templates for PEDV RT-qPCR. RNA extraction controls were performed for every five samples to check for any PEDV contamination by replacing sample with RNase free water. RNA extracted from feces with the RNeasy Mini kit was diluted 1:10 to avoid any PCR inhibition. Total RNAs were extracted from the two semen fractions (seminal and sperm-rich fractions) and the gelatin plug using TRIzol® assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Gallien et al., 2018b).

The number of PEDV genome copies was assessed by real-time RT-PCR using Power SYBR® Green RNA-to-Ct™ 1-step kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States of America) on an Applied Biosystems® 7500 real time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States of America) as already described (Gallien et al., 2018b; Kim et al., 2007). The primers used were designed from the conserved regions of the PEDV

nucleocapsid gene for universal detection of both strains (forward, 5'-CGCAAAGACTGAACCCACTAA-3'; reverse, 5'-TTGCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT-3'). For each PCR run, a positive control containing PEDV RNA extract from a PEDV cell culture supernatant was included. Two negative controls were also included on the plate, the RNA samples were replaced by RNase free water. One negative control was placed close to the positive control and the second one at the end of the plate. All samples were processed in duplicate.

2.5. PEDV serology

Sera were tested for PEDV antibodies using a commercial ELISA test, ID Screen® PEDV Indirect (ID Vet, Grabels, France). The ELISA test is validated if the mean value of the positive control optical density (OD) is greater than 0.350 and if the ratio of the mean values of the positive and negative controls is greater than 3. For each sample, the S/P (sample-to-positive) ratio was calculated. Samples with S/P ratios equal to or higher than 60% were considered positive for PEDV antibodies.

3. Results

3.1. Trial 1

3.1.1. Boar infection

Both inoculated boars demonstrated clinical signs. They were lethargic as soon as 2 DPI and until 6 DPI. A reduction of food intake was also observed for the two inoculated boars at 3 DPI and until 9 DPI. Diarrhea was also observed at 3 DPI. None of the control boars demonstrated clinical signs during the trial. The inoculated boars were PEDV seronegative before inoculation and became seropositive at 21 ± 1 DPI (S/P% I1= 62.68% and S/P% I2= 66.83%). Only boar I2 was still positive for PEDV antibodies at the end of the trial (S/P% I2=74.29%). The two control boars were seronegative before and at the middle of the trial.

3.1.2. PEDV fecal shedding in boars

All boars were RT-qPCR negative for PEDV in feces prior to inoculation. The two control boars remained PEDV negative in feces until the end of the trial.

However, PEDV RNA was first detected in the feces of boar I1 at 2 DPI (4.67×10^5 genome copies/mL of feces). At 3 DPI, boars I1 and I2 showed 6.02×10^8 and 3.47×10^7 genome copies/mL of feces, respectively. The viral genome was continuously detected until 14 DPI. Maximum shedding was detected between 4.5 and 6 DPI for the two boars (2.82×10^9 genome copies/mL for boar I2 at 4.5 DPI and 3.49×10^9 genome copies/mL for boar I1 at 6 DPI). PEDV RNA was then sporadically detected for the two boars (at 24 DPI for boar I1 and at 18 and 42 DPI for boar I2) (Figure 2).

3.1.3. PEDV detection in sperm-rich fraction of semen

No PEDV nucleic acid was detected in the seminal or the sperm-rich fractions of semen and in the gelatin plug collected from boars I1, I2, C1 and C2 before inoculation. The two control boars remained negative for PEDV RNA in all fractions of semen and in the gelatin plug throughout the trial. PEDV RNA was detected for both inoculated boars at 7 DPI in the sperm-rich fraction of semen with 6.94×10^3 and 4.73×10^3 genome copies/mL for boars I1 and I2, respectively. No PEDV RNA was detected by RT-qPCR thereafter in this fraction. The inoculated boars remained RT-qPCR negative for the seminal fraction and the gelatin plug throughout the trial. All swabs collected from the sheath tested negative for PEDV RNA, even when the virus was detected in the sperm-rich fraction (7 DPI).

3.1.4. PEDV detection in organs

PEDV RNAs were detected in the jejunum Peyer's patches (2.49×10^6 and 2.82×10^6 genome copies/mL for boars I1 and I2 respectively), in the ileum Peyer's patches (2.85×10^6 and 4.58×10^7 genome copies/mL for boars I1 and I2 respectively) and in the mesenteric lymph nodes (2.74×10^6 and 1.23×10^6 genome copies/mL for boars I1 and I2 respectively).

PEDV RNA was not detected from the organs of the reproductive tract. No lesions were observed in the gastrointestinal or reproductive tract.

3.2. Assessment of semen infectivity (Trial 2)

None of the inoculated piglets showed clinical signs throughout the trial. No seroconversion of these pigs was observed at 18 DPI. No PEDV nucleic acid was detected in feces of pigs #1, #2, #3, #4, #5 and #6 during the trial except for pig #5 at 18 DPI (8.94×10^4 genome copies/mL). Some digestive tissue samples were found positive for PEDV in RT-qPCR for pigs #2, #3, #4, #5 and #6 at 18 DPI (Table 2) but no lesion was observed in the gastrointestinal tract.

4. Discussion

Oral inoculation of mature boars by an S-InDel French PEDV strain demonstrated less severe clinical signs compared to those observed in boars inoculated with a S-non-InDel US PEDV strain (Gallien et al., 2018b). However, the infection induced profuse diarrhea and affected growth performances similarly to weaned pigs inoculated with this S-InDel French PEDV strain (Gallien et al., 2018a).

The duration of virus fecal shedding determined in our study (11 days) was shorter compared to weaned pigs inoculated with an S-InDel PEDV strain (18 to 20 days) (Leidenberger et al., 2017; Lohse et al., 2017) or for boars inoculated with an S-non-InDel PEDV strain (16 to 19 days) (Gallien et al., 2018b).

In this experimental challenge, the presence of PEDV RNA in the sperm-rich fraction of semen of both inoculated boars was detected at 7 DPI only, which is much more limited than in the sperm-rich fraction of semen from boars inoculated with an S-non-InDel PEDV strain (Gallien et al., 2018b). In the previous study, PEDV RNA could be detected for a longer period in the sperm-rich fraction of semen: i.e. transient detections of PEDV RNA during three distinct periods comprised between 3 and 16 days. PEDV RNA was also detected

in the seminal fraction of semen and in gelatin plug in S-non-InDel PEDV inoculated boars contrasting to the observations from the present study. This difference regarding PEDV RNA detection in semen could be linked to the viral strain used for inoculation and its virulence. Clinical signs induced with S-non-InDel PEDV were more severe compared to clinical signs observed in S-InDel PEDV challenged boars (Gallien et al., 2018b). Viral shedding in the sperm-rich fraction of semen has already been reported for PRRSV which belongs to the same order as PEDV, the *Nidovirales* order, and differences in terms of shedding in semen between genotype 1 and highly virulent genotype 2 PRRSV strains have already been shown (Christopher-Hennings et al., 1995; Prieto and Castro, 2005). PRRSV genotype 2 strains could be detected during longer periods in semen compared to genotype 1 strains. Hence, the duration of detection of highly virulent genotype 2 PRRSV strains in semen was reported between 25 to 92 days (Christopher-Hennings et al., 2001) while the presence of genotype 1 PRRSV strains in semen could be observed more sporadically: only at one point after infection, at 7 DPI (Prieto et al., 1996) or during shorter periods comprised between 10 and 40 days (Swenson et al., 1994).

Detection of S-InDel PEDV RNA in semen appeared sporadically after the occurrence of clinical signs and detection in feces in contrast to what we observed for an S-non-InDel PEDV strain. Moreover, no S-InDel PEDV RNA was detected in semen after cessation of clinical signs and fecal shedding in contrast to what was observed with the S-non-InDel strain (Gallien et al., 2018b). These data suggest that the risk of introduction of PEDV shedding boars via imports should be more predictable from clinical exams or fecal shedding assessment for S-InDel strains than for S-non-InDel.

Absence of detection of PEDV RNA in the genital tract has been shown in boars inoculated with S-InDel PEDV strain as well as in boars inoculated with an S-non-InDel strain at 51 DPI (Gallien et al., 2018b). Mc Carty and al., showed that PEDV RNA could be

detected in penis and testicle at 5 days post-infection (McCarty et al., 2015). That presence was noticed at infection peak when a viremia could be noticed too. That could explain the absence in reproductive tract of PEDV we noticed at 51 days post infection, a very late date compare to the infection peak.

During the second trial, no shedding was detected in feces of SPF weaned pigs inoculated with S-InDel and S-non-InDel RT-qPCR PEDV positive semen except for pig #5 at 18 DPI. The presence of low PEDV genomic loads could be noticed in different intestinal tissues. However, clinical signs and seroconversion were absent in all inoculated piglets. The results of the present study neither confirms nor denies if the RT-qPCR PEDV positive semen contained infectious virus. Additional trials with longer periods of observation, sequential slaughters or the use of a more sensitive model such as neonatal piglets should be conducted in order to determine if the PEDV RNA detected in the tissues were caused by PEDV infection. The use of neonatal piglets could have been in fact a most sensitive model to evaluate PEDV infectivity but to realize that kind of trial in our experimental facility, we should have infected two sows with their suckling piglets and for material reasons (place, cost, animal availability...), this option could not be selected. Moreover, with these results, it is impossible to speculate whether PEDV-positive semen could infect sows via natural insemination. In fact, it has already been shown for other porcine viral pathogens that contaminated semen could be infectious, but could not infect sows or gilts through artificial insemination. Weaned pigs inoculated with PCV2 positive semen, for example, presented a viremia and anti-PCV2 antibodies but the same PCV2 positive semen could not infect sows through artificial insemination (Madson et al., 2009). The amount of virus contained in semen could explain the impossibility of viral transmission through artificial insemination (Grasland et al., 2013; Madson et al., 2009). An impact of the amount of virus contained in semen on the capacity of the transmission of viral pathogens has also been shown for PRRSV. The PRRSV

can be transmitted through semen but only when it is present in this matrix at a given concentration. Under experimental conditions, PRRSV transmission was successful when semen contained 2×10^5 TCID₅₀/mL of virus i.e. on average 10^7 genome copies/mL. However, when the amount of virus contained in semen was approximately 2×10^3 TCID₅₀/mL (10^6 genome copies/mL on average), transmission through semen was limited. When the amounts were even lower (2×10^2 TCID₅₀/mL, 10^5 genome copies/mL on average), transmission was no longer effective (Prieto and Castro, 2005). A possible impact of the amount of genomic load of PEDV contained in semen on the capacity of the transmission of PEDV might be suspected in the present case.

To conclude, a very transient shedding of PEDV in semen was observed in case of infection by an S-InDel PEDV strain conversely to what was observed with S-non-InDel PEDV strain. However the infectivity of the virus present in PEDV S-InDel or S-non-InDel positive semen was not evidenced .

Author contributions

All the authors designed and carried out the experiments. SG analyzed the data and wrote the manuscript. BG, NR and MB supervised the project. All the co-authors revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgement

The authors are grateful to ANSES, INRA and LNCR for their financial support. We also would like to thank Phillip Gauger from Iowa State University who provided the US non-InDel strain and all the team members at the experimental laboratory for their contribution.

References

- Alonso, C., Goede, D.P., Morrison, R.B., Davies, P.R., Rovira, A., Marthaler, D.G., Torremorell, M., 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary research* 45, 73.
- Bowman, A.S., Krogwold, R.A., Price, T., Davis, M., Moeller, S.J., 2015. Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. *BMC Vet Res* 11, 38.
- Christopher-Hennings, J., Holler, L.D., Benfield, D.A., Nelson, E.A., 2001. Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest* 13, 133-142.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swenson, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.L., Yaeger, M.J., Benfield, D.A., 1995. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 7, 456-464.
- EFSA, 2016. Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. *EFSA Journal* 14, 4375.
- Gallien, S., Andraud, M., Moro, A., Lediguerher, G., Morin, N., Gauger, P.C., Bigault, L., Paboeuf, F., Berri, M., Rose, N., Grasland, B., 2018a. Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *Transboundary Emerging Diseases*.
- Gallien, S., Moro, A., Lediguerher, G., Catinot, V., Paboeuf, F., Bigault, L., Berri, M., Gauger, P.C., Pozzi, N., Authie, E., Rose, N., Grasland, B., 2018b. Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. *Veterinary research* 49, 7.
- Grasland, B., Blanchard, P., Keranflec'h, A., Bigault, L., Oger, A., Rose, N., Madec, F., Jestin, A., Cariolet, R., 2013. Evaluation of the transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2)

- genogroups a and b with semen from infected specific-pathogen-free boars. *Veterinary microbiology* 162, 381-387.
- Jung, K., Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinay Journal* 204, 134-143.
- Kim, S.H., Kim, I.J., Pyo, H.M., Tark, D.S., Song, J.Y., Hyun, B.H., 2007. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *J Virol Methods* 146, 172-177.
- Leidenberger, S., Schroder, C., Zani, L., Auste, A., Pinette, M., Ambagala, A., Nikolin, V., de Smit, H., Beer, M., Blome, S., 2017. Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies. *Sci Rep* 7, 10825.
- Lohse, L., Krog, J.S., Strandbygaard, B., Rasmussen, T.B., Kjaer, J., Belsham, G.J., Botner, A., 2017. Experimental Infection of Young Pigs with an Early European Strain of Porcine Epidemic Diarrhoea Virus and a Recent US Strain. *Transbound Emerg Dis* 64, 1380-1386.
- Lowe, J., Gauger, P., Harmon, K., Zhang, J., Connor, J., Yeske, P., Loula, T., Levis, I., Dufresne, L., Main, R., 2014. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis* 20, 872-874.
- Madson, D.M., Ramamoorthy, S., Kuster, C., Pal, N., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2009. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Veterinary research* 40, 10.
- McCarty, M., Petznick, T., Kuster, C., Bower, L., Zhang, J., Yoon, K.J., Madson, D., 2015. Case report describing the clinical course of porcine epidemic diarrhea in a commercial boar stud and return of the stud to service after whole-herd inoculation with porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod* 23, 264-271.
- Pal, N., Huang, Y.W., Madson, D.M., Kuster, C., Meng, X.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2008. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of porcine circovirus type 2 and an internal control on porcine semen samples. *J Virol Methods* 149, 217-225.

- Prieto, C., Castro, J.M., 2005. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63, 1-16.
- Prieto, C., Suarez, P., Bautista, J.M., Sanchez, R., Rillo, S.M., Simarro, I., Solana, A., Castro, J.M., 1996. Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 45, 383-395.
- Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167-175.
- Stadler, J., Zoels, S., Fux, R., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., Weissenböck, H., Weissenbacher-Lang, C., Ritzmann, M., Ladinig, A., 2015. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Veterinary Research* 11, 142.
- Sun, R.Q., Cai, R.J., Chen, Y.Q., Liang, P.S., Chen, D.K., Song, C.X., 2012. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerging Infectious Diseases* 18, 161-163.
- Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Evans, L.E., Landgraf, J.G., Wills, R.W., Sanderson, T.P., McGinley, M.J., Brevik, A.K., Ciszewski, D.K., et al., 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J Am Vet Med Assoc* 204, 1943-1948.
- 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 Infect Dis* 20, 1620-1628.
- Wang, J., Zhao, P., Guo, L., Liu, Y., Du, Y., Ren, S., Li, J., Zhang, Y., Fan, Y., Huang, B., Liu, S., Wu, J., 2013. Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China. *Emerg Infect Dis* 19, 2048-2049.
- Wang, L., Byrum, B., Zhang, Y., 2014. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 20, 917-919.

Figure 1: Designs of the experimental trials (trial 1 and trial 2)

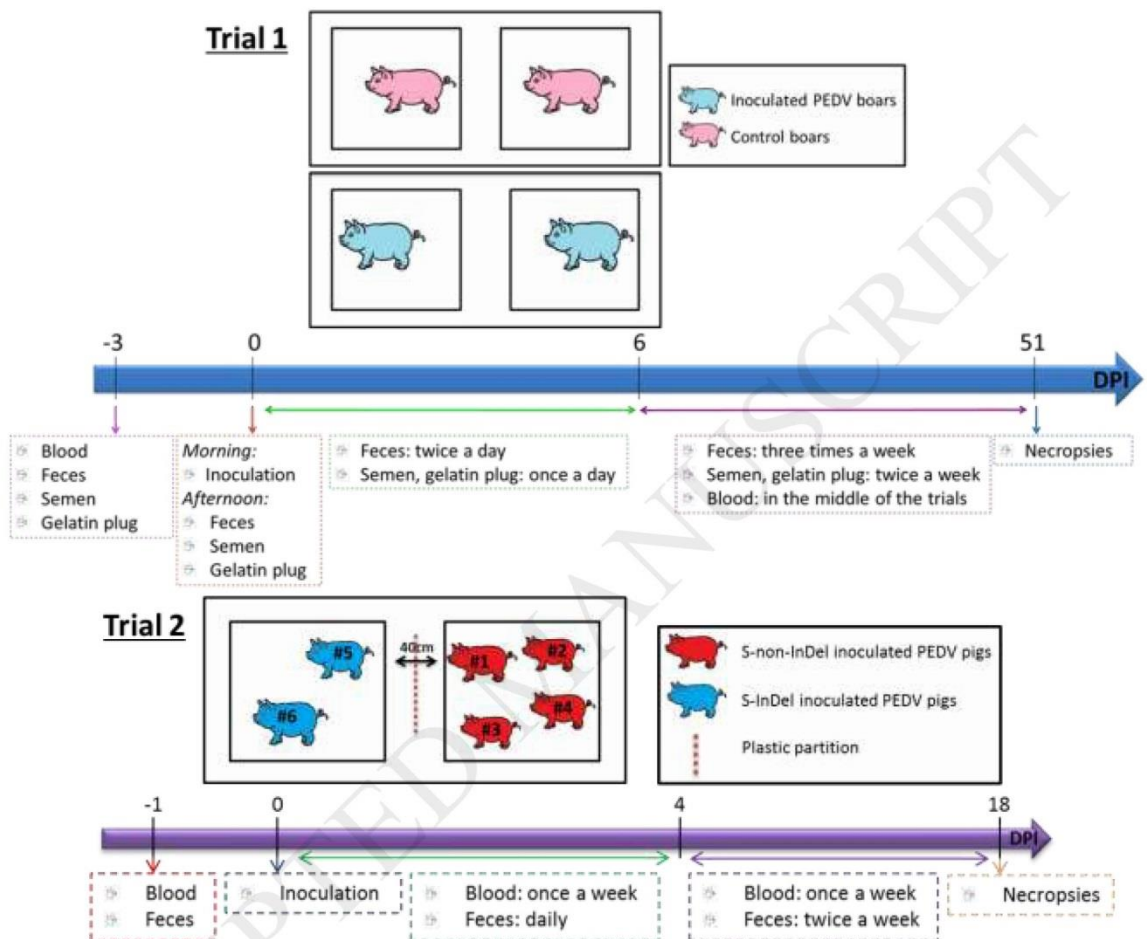


Figure 1

Figure 2: Fecal PEDV shedding detected from boar I1 and I2 (log(PEDV-genome copies/mL)) in trial 1

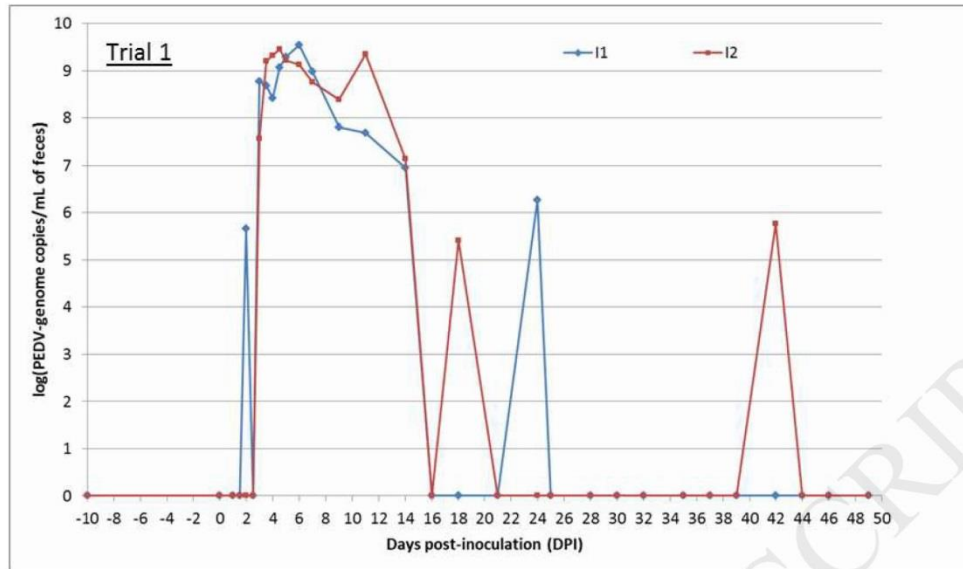


Figure 2

Table 1: Genomic load (genome copies/pig) detected in the semen inoculum administered to each SPF weaned pig in trial 2

Table 1

PEDV strain in semen inocula	SPF Pig	PEDV genome copies per weaned pig in inocula
S-non-InDel	#1	8.75×10^4
	#2	6.30×10^4
	#3	8.50×10^4
	#4	1.24×10^5
S-InDel	#5	3.70×10^4
	#6	2.36×10^4

Table 2: PEDV genome loads (genome copies/g) detected in the tissues collected at necropsy from SPF weaned pigs inoculated with PEDV RT-qPCR positive semen in trial 2

Table 2

Pigs	PEDV strain in semen inocula	Duodenum	Jejunum	Ileum	Colon	Jejunum Peyer's patches	Ileum Peyer's patches	Mesenteric lymph nodes
#1	S-non-InDel	0	0	0	0	0	0	0
#2		5.10×10^5	0	0	0	0	0	0
#3		1.27×10^6	0	0	0	3.81×10^5	0	0
#4		0	8.22×10^5	0	0	0	0	0
#5	S-InDel	0	5.37×10^5	0	0	1.23×10^6	0	0
#6		0	4.38×10^5	0	0	0	0	3.00×10^5

**Partie 3 : Comparaison de
la pathogénicité et de
l'immunité intestinale
induites chez des porcs
infectés par une souche « S-
InDel » française et d'une
souche « S-non-InDel »
américaine de PEDV**



Les porcs infectés par le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) sont affectés par d'importantes diarrhées liquides pouvant être accompagnées de vomissements, de signes de déshydratation et d'anorexie. Comme décrit précédemment, deux génotypes de souches de PEDV, les souches dites « S-InDel » et les souches dites « S-non-InDel », circulent actuellement et sont associées à des taux de mortalité et de morbidité différents, les souches « S-non-InDel » pouvant être décrites comme hautement pathogènes. Dans cette partie, une étude a été réalisée afin de comparer la pathogénicité et l'immunité intestinale induites chez des porcs infectés par une souche « S-InDel » française de PEDV isolée en 2014, PEDV/FR/001/2014 (GB N°: [KR011756](#)), et une souche « S-non-InDel » américaine de PEDV isolée dans l'Iowa également en 2014 PEDV/USA/2014/IOWA (GB N°: [MF37363](#)). Cette étude a été menée selon les réglementations européennes et françaises en vigueur dans les installations expérimentales de l'Anses Ploufragan équipées d'un niveau 3 de biosécurité. Deux groupes de neuf porcelets sevrés ont été inoculés par voie oro-gastrique avec 5×10^8 copies de génome viral/animal de la souche « S-InDel » ou de la souche « S-non-InDel ». Un troisième groupe de six porcelets a été utilisé comme lot témoin. Un abattage séquentiel à 3, 7 et 14 jours post-inoculation (JPI) de trois porcelets par groupe a été réalisé afin de suivre la mise en place de l'immunité intestinale et la pathogénicité au cours du temps. Tous les animaux inoculés ont présenté les signes cliniques de la maladie pour les deux souches (i.e. présence de diarrhées et de vomissements). La présence du PEDV dans les fèces est détectée pour les deux souches dès 3 JPI et jusqu'à 14JPI. A 3 JPI, une destruction des villosités de l'épithélium intestinal et du chorion a été observée dans le jéjunum, l'iléon et les plaques de Peyer jéjunales et iléales pour les deux souches de PEDV. Aucune lésion n'a pu être observée au microscope à 7 et 14 JPI. Pour les souches « S-InDel » et « S-non-InDel », l'étude immunohistologique a révélé la présence du PEDV dans les cellules épithéliales des villosités du jéjunum, de l'iléon, des plaques de Peyer jéjunales et iléales et dans les follicules des ganglions mésentériques à 3 JPI. La présence du PEDV a aussi été montrée dans le colon à 7 et 14 JPI pour la souche « S-InDel » et « S-non-InDel » respectivement. L'étude transcriptomique a révélé que les deux souches de PEDV affectaient de la même façon les voies de signalisation de l'inflammation (IL-8 et TNF α) et de la mise en place de la réponse immunoglobuline A (MAdCAM-1, α 4, BAFF, APRIL, TGF- β , SMAD2, NF- κ B, CCL28/CCR10, CCL25/CCR9). Une augmentation de la présence des immunoglobulines A ainsi qu'une diminution des immunoglobulines M ont été notés à partir de 7 JPI au niveau sérique. Aucune augmentation de la présence des immunoglobulines A n'a été notée au niveau intestinal.

En conclusion, dès 3 JPI, des dommages au niveau des villosités de l'épithélium intestinal ont pu être notés pour les deux types de souches testées. Ces deux souches semblent affecter de façon similaire la mise en place de la réponse IgA et de la réponse inflammatoire. Les différences d'importances de signes cliniques et de mortalités observées en cas d'infection par une souche « S-

non-InDel » ou une souche « S-InDel » ne pourraient donc pas s'expliquer par une différence au niveau de la mise en place de la réponse immunitaire immunoglobuline A locale. Ces différences pourraient par contre s'expliquer par le fait que les souches « S-non-InDel » se répliquent plus rapidement. Cette réplication plus rapide couplée au défaut de mise en place de la réponse immunitaire observée dans cette étude pourrait intervenir dans les différences de pathogénicité observées entre ces deux types de souches.

Publication n°6

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article soumis en 2018 à la revue « Veterinary Research » et présenté ci-après. (Gallien, S., Rossignol, C., Fleurot, I., Chevaleyre, C., Bernard, C., Gauger P.C., Moro, A., Lediguerher, G., Paboeuf, F., Rose, N., Grasland, B., Berri, M., Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in infected pigs with a French InDel and a US non-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus)

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French «S-InDel» or an US «S-non-InDel» strain of porcine epidemic diarrhea virus

Veterinary Research

Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French "S-InDel" or a US "S-non-InDel" strain of porcine epidemic diarrhea virus

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	VETR-D-18-00236	
Full Title:	Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French "S-InDel" or a US "S-non-InDel" strain of porcine epidemic diarrhea virus	
Article Type:	Research article	
Funding Information:	Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (FR), INRA (32000726)	Mrs Sarah Gallien
Abstract:	<p>In 2013, a severe PED epidemic struck the United States of America and two genotypes were isolated: "S-InDel" and "S-non-InDel" strains (insertion/deletion in the S gene) with different pathological outcomes in the field. The aim of this study was to compare the pathogenicity and intestinal immune response induced during the infection by a PEDV "S-InDel" strain isolated in France in 2014 and a PEDV "S-non-InDel" strain isolated in the USA the same year. At 3 days post-inoculation (DPI), a destruction of the villus epithelium and of the chorion in the jejunum, in the ileum and in the Peyer's patches was observed for the two strains. Immunostaining assay revealed the presence of PEDV in the epithelial cells of the villus in jejunum, ileum, and colon, as well as Peyer's patches and in both the afferent lymph and the follicles in the mesenteric lymph nodes. The transcriptomic analysis revealed that both PEDV strains impact signaling pathways of the inflammatory response (IL-8 and TNFα) and of the IgA immune response (MAdCAM-1, α4, BAFF, APRIL, TGF-β, SMAD2, NF-κB, CCL28/CCR10, CCL25/CCR9): under-expression of MAdCAM-1, α4, BAFF, APRIL, TGF-β, SMAD2, NF-κB, CCR10, CCL25/CCR9 and IL-8 and over-expression of CCL28 and TNF-α.</p>	
Corresponding Author:	Sarah Gallien Anses FRANCE	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Anses	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Sarah Gallien	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Sarah Gallien Christelle Rossignol Isabelle Fleurot Sandrine Melo Claire Chevalereyre Cécilia Bernard Phillip C. Gauger Angélique Moro Gérald Lediguerher Frédéric Paboeuf Nicolas Rose	

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

	Béatrice Grasland
	Mustapha Berri
Order of Authors Secondary Information:	
Suggested Reviewers:	Eric Cox University of Gent, Laboratory of immunology Eric.Cox@Ugent.be In the field
	Pedro Rubio Facultad de Veterinaria, Universidad de Leon p.rubio@unileon.es in the field
	Kwonil Jung Ohio State University jung.221@osu.edu in the field
Additional Information:	
Question	Response
Is this study a clinical trial?<hr><i>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</i>	No

1 **Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs**
2 **infected with a French “S-InDel” or a US “S-non-InDel” strain of porcine**
3 **epidemic diarrhea virus**

4 S. Gallien ^{1, 2, 3}, C. Rossignol ³, I. Fleurot ³, S. Melo ³, C. Chevaleyre ³, C. Bernard ^{1, 2}, P.C.
5 Gauger ⁴, A. Moro ^{1, 2}, G. Lediguerher ^{1, 2}, F. Paboeuf ^{1, 2}, N. Rose ^{1, 2}, B. Grasland ^{1, 2}, M.
6 Berri ³

7 **Author details:**

8 ¹ Anses, Laboratory of Ploufragan/Plouzané, BP53, 22440 Ploufragan, France;

9 sarah.gallien@anses.fr, angelique.moro@anses.fr, gerald.lediguerher@anses.fr,

10 frederic.paboeuf@anses.fr, nicolas.rose@anses.fr, beatrice.grasland@anses.fr,

11 cecilia.bernard@anses.fr

12 ² Université Bretagne Loire, 35000 Rennes, France ;

13 ³ Institut National de Recherche Agronomique (INRA) Université François Rabelais UMR
14 1282 37380 Nouzilly, France ;

15 el-mostapha.berri@inra.fr, christelle.rossignol@inra.fr, isabelle.fleurot@inra.fr,

16 claire.chevaleyre@inra.fr, sandrine.melo@inra.fr

17 ⁴Iowa State University College of Veterinary Medicine, Veterinary Diagnostic & Production
18 Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, United States ;

19 pcgauger@iastate.edu

20 **Corresponding author**

21 Mustapha Berri, Institut National de Recherche Agronomique (INRA) Université François
22 Rabelais UMR 1282 37380 Nouzilly, France

23 E-mail : el-mostapha.berri@inra.fr

24 Phone : +33 (0)247427319

25

26 **Abstract**

27 In 2013, a severe PED epidemic struck the United States of America and two genotypes were
28 isolated: “S-InDel” and “S-non-InDel” strains (insertion/deletion in the S gene) with different
29 pathological outcomes in the field. The aim of this study was to compare the pathogenicity
30 and intestinal immune response induced during the infection by a PEDV “S-InDel” strain
31 isolated in France in 2014 and a PEDV “S-non-InDel” strain isolated in the USA the same
32 year. At 3 days post-inoculation (DPI), a destruction of the villus epithelium and of the
33 chorion in the jejunum, in the ileum and in the Peyer’s patches was observed for the two
34 strains. Immunostaining assay revealed the presence of PEDV in the epithelial cells of the
35 villus in jejunum, ileum, and colon, as well as Peyer’s patches and in both the afferent lymph
36 and the follicles in the mesenteric lymph nodes. The transcriptomic analysis revealed that
37 both PEDV strains impact signaling pathways of the inflammatory response (IL-8 and TNF α)
38 and of the IgA immune response (MAdCAM-1, α 4, BAFF, APRIL, TGF- β , SMAD2, NF- κ B,
39 CCL28/CCR10, CCL25/CCR9): under-expression of MAdCAM-1, α 4, BAFF, APRIL, TGF-
40 β , SMAD2, NF- κ B, CCR10, CCL25/CCR9 and IL-8 and over-expression of CCL28 and
41 TNF- α .

42

43 **Keywords**

44 Intestinal immune response, PEDV, pathogenicity, histology, immunostaining assay

45

46 **1. Introduction**

47 Porcine epidemic diarrhea (PED) is characterized by severe diarrhea with or without
48 vomiting and dehydration. The virus responsible for the disease is a positive sense, single-
49 stranded RNA enveloped coronavirus of 28 kb called the porcine epidemic diarrhea virus
50 (PEDV). After the first PED cases reported in the early 70’s, the disease has been persisting
51 sporadically in Europe until the late 1990’s [1]. PED outbreaks have been described in Asia in
52 the 80’s and the 2010s [1, 2]. During the last Asian outbreaks, new strains emerged that were
53 genetically different from those known in the 70’s, inducing high mortality rates despite the
54 frequent use of vaccines based on the reference strain, CV777 [2, 3]. In 2013, the disease
55 emerged in the United-States and spread rapidly throughout the country, and in neighboring
56 countries of North and South America such as Canada and Mexico. Two genetically distinct
57 PEDV strains were isolated during these outbreaks, the “S-non-InDel” strains, genetically
58 similar to the Asian strains isolated in the 2010s, and the “S-InDel” strains, showing
59 insertions-deletions in the S1 segment of the S gene [1, 4, 5]. Mortality and morbidity
60 observed with the two strains were different, including more severe clinical cases and higher
61 mortality reported for the “S-non-InDel” compared to the “S-InDel” strains [4-7]. Currently,
62 “S-non-InDel” strains circulate exclusively in America and Asia while “S-InDel” strains are
63 present in all continents [1, 5, 6, 8].

64 Impacts on the adaptive immune response due to PEDV infection were already
65 reported but only in cases of infection by PEDV CV777 strain. This infection impacted
66 mucosal and systemic antibody immune responses. PEDV specific-IgA and IgG appeared at
67 21 days post-infection (DPI) in the intestinal lymphoid tissue. IgA antibody secreting cells
68 were detected constantly from 14 DPI [9]. Impacts on the adaptive immune response by
69 recent PEDV strains, “S-InDel” and “S-non-InDel”, that could explain the differences of
70 pathogenicity noticed between these two strains, had not been evaluated to date.

71 This study aimed at describing and comparing the kinetics of the intestinal IgA
72 response during infection by an “S-non InDel” PEDV strain isolated in the United-States in
73 2014 and an “S-InDel” strain isolated in France the same year. Different cytokines involved in
74 the establishment of this response were evaluated. Comparison of histopathological lesions in
75 the intestine and localization of PEDV in tissues based on PEDV strains was also performed.

76 **2. Materials and methods**

77 *2.1. Inocula*

78 The two inocula used during the experimental trials resulted from the homogenization
79 of jejunum of specific pathogen free (SPF) pigs challenged with PEDV in Dulbecco’s
80 Phosphate-Buffered Saline (Sigma, Saint Louis, MO, USA) (20%w/v). The PEDV “S-InDel”
81 strain, PEDV/FR/001/2014 strain (GB N°: [KR011756](#)), was amplified in a three-week-old
82 SPF pig inoculated with homogenate of jejunum collected from PED-affected pigs belonging
83 to a farm located in the north of France in 2014. The inoculum of the PEDV “S-non-InDel”
84 strain, PEDV/USA/2014/IOWA strain (GB N°: [MF37363](#)) resulted from the homogenization
85 of jejunums collected from pigs from one herd affected by an “S-non-InDel” PEDV strain
86 from the state of Iowa in the USA in 2014. The two homogenates were centrifuged at 10,000
87 × g for 10 min at 4°C and the supernatant was filtered at 0.45µm. Next-Generation
88 Sequencing (NGS) was performed with each inoculum to obtain the PEDV complete genome
89 sequence and to ensure the absence of other RNA viral sequences according the protocol
90 already described [10]. The inocula were also negative for porcine circovirus 2 (PCV2) and
91 PRRSV as seroconversion was not detected after challenging piglets with these two inocula.

92 *2.2. Animals and experimental design*

93 The experiments were carried out in a level-3 biosecurity, air-filtered facility of the
94 French Agency for food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) in
95 accordance with European and French regulations on animal experiments. The experimental

96 design was approved by the ethics committee on animal experiments registered under the
97 number #16 by the French Ministry of Research (referral n°16-032). For each PEDV strain
98 used in the study, nine large-white SPF weaned pigs approximately 28-days-old were housed
99 in one room containing two pens, one pen with six pigs and the second pen with 3 pigs (room
100 1: “S-InDel” trial; room 2: “S-non InDel” trial). Six large-white SPF weaned pigs of the same
101 age were housed in a third room and were used as negative controls (room 3: controls) (Figure
102 1). All pigs in room 1 and room 2 were orally inoculated on day 0 with 5mL of a tissue
103 homogenate of “S-InDel” or “S-non InDel” PEDV strain titrating 5×10^8 viral genome
104 copies/ml (equivalent to $\approx 10^5$ TCID₅₀/mL), respectively. The control pigs were orally
105 inoculated with 5mL of Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline (Sigma, Saint Louis, USA).
106 Rectal temperatures and clinical signs were daily monitored for each pig from day 0 until
107 euthanasia. At 3 days post-inoculation (DPI), 7 DPI and 14 DPI, three pigs pre-determined for
108 necropsy from rooms 1 and 2 and two pigs from room 3 were euthanized including anesthesia
109 (Zoletil®, Virbac, Carros, France, 15 mg/kg) followed by bleeding before necropsy.

110 *2.3. Biological samples and necropsy*

111 Fecal samples were collected for each pig prior to inoculation and before euthanasia.
112 One gram of feces (or one mL of liquid feces) was homogenized in 9 mL of Dulbecco’s
113 Phosphate-Buffered Saline (Sigma, Saint Louis, United States of America) and centrifuged at
114 $15,000 \times g$ for 10 min at 4°C. Supernatants were stored at -80°C until use.

115 Blood samples were also collected for all pigs prior to inoculation and before
116 euthanasia. Blood was collected from pigs for serological analysis and to assess blood cell
117 counts using an automated counter MS9 (Melet Schloesing Laboratoires, Osny, France) and
118 subsequently stored at -80°C.

119 Intestinal macroscopic lesions were evaluated at 3, 7 and 14 DPI necropsy.
120 Duodenum, jejunum, ileum, colon and jejunal and ileal Peyer’s patches were collected and

121 stored in RNA later (Sigma, Saint Louis, USA) at 4°C for 12 hours. These samples were
122 collected again in addition to Mesenteric lymph nodes and stored in 4% neutral buffered
123 formalin (MM France, Francheville, France) for histochemical analysis.

124 For transcriptomic analysis, RNA later was removed and the tissues were stored at -
125 80°C until use. A homogenate of each tissue was prepared at 33.33% (w/v) in lysis buffer in
126 the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using a bead mill (Retsch, Haan,
127 Germany). The suspensions were centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4°C and
128 supernatants were stored at -80°C.

129 *2.4. Quantification of PEDV genomes*

130 Viral RNAs were extracted from the fecal homogenates, sera and the organs using the
131 Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s
132 instructions. Five µl of eluate were used as template for PEDV RT-qPCR. RNA extraction
133 controls were placed every five samples to monitor PEDV contamination by replacing
134 template with RNase free water. RNA extracted from feces with the RNeasy Mini kit was
135 diluted 1:10 to avoid any PCR inhibition.

136 The number of PEDV genome copies was assessed by real-time PCR as previously
137 described [11] using Power SYBR® Green RNA-to-Ct™1-step kit (Thermo Fisher Scientific,
138 Waltham, United States of America) on a Applied Biosystems® 7500 real time PCR system
139 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

140 For each PCR run, a positive control containing PEDV RNA extract from a PEDV cell
141 culture supernatant was included. Two negative controls were also included on the plate with
142 RNA replaced by RNase free water. One negative control was placed close to the positive
143 control and the second one at the end of the plate. All samples were tested in duplicate.

144 *2.5. PEDV ELISA and IgA, IgM, IgG Antibody*

145 Sera were evaluated for PEDV N protein antibodies using a commercial ELISA test,
146 ID Screen® PEDV Indirect (ID Vet, Grabels, France). Samples with S/P ratios equal to or
147 greater than 60% were considered positive for PEDV antibodies.

148 In-house ELISA was developed for the detection of PEDV specific IgA, IgG and IgM
149 serum antibodies and PEDV specific IgA antibodies in ileal content. PEDV whole virus was
150 coated on Nunc Maxisorp® 96-well plates (ThermoFisher, Waltham, USA) in coating buffer
151 (bicarbonate buffer, pH 9.6) at 37°C overnight in even columns and the odd columns were
152 coated with coating buffer. The plates were washed three times with phosphate buffered
153 saline (PBS)-Tween (0.05%) and blocked with 5% milk diluted in PBS-Tween at 37°C for 1h
154 30m. After washing with PBS-Tween three times, sera and ileum contents diluted in 5% milk
155 in PBS-Tween (in sera: 1/4 for IgA, 1/200 for IgM and IgG; in ileum contents: 1/5) were
156 added to the wells and incubated at 37°C for 1h. Each sample was tested in duplicate i.e. two
157 wells coated with the virus and two wells coated with coating buffer for each sample. In each
158 plate, negative and positive controls were used in the same conditions as clinical samples to
159 validate the plate results. After incubation, the plates were washed three times with PBS-
160 Tween and Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated to anti-pig IgA (Bethyl Laboratories,
161 Hamburg, Germany), anti-pig IgG (Bio-Rad, Hercules, USA) or anti-pig IgM (Bio-Rad,
162 Hercules, USA) were added, and the plates were incubated at 37°C for 1h. The plates were
163 washed three times and Ortho-Phenylenediamine (OPD) substrate was added. The plates were
164 incubated for 5-6 minutes at 37°C in the dark. The reaction was stopped by adding sulfuric
165 acid (1N) and the plates were read at 490 nm. ELISA values for each sample were reported as
166 the difference between the optical density of even and odd columns divided by the difference
167 between the optical density of even and odd columns of the positive control minus the
168 negative control. The cut-off ELISA value and results were expressed as geometric mean
169 titers (GMT) according De Arriba et al., 2002 [12].

170 *2.6. Transcriptomic Analysis*

171 Total RNAs were extracted from tissue homogenates using the Qiagen RNeasy mini
172 kit with DNase digestion (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer’s
173 recommendations. RNA quality was assessed with the Agilent RNA 6000 Nano kit and the
174 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). The quantity of RNA
175 was evaluated with the QuBit RNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
176 and the absence of DNA after DNase digestion with the QuBit DNA HS assay. cDNAs were
177 synthesized using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) according to
178 the manufacturer’s instructions: 1µg of total RNA treated with DNase was mixed with 4µl of
179 5x iScript reaction mix, 1µl iScript reverse transcriptase in a final volume of 20µl. The
180 complete reaction mix was incubated for 5 minutes at 25°C, 30 minutes at 42°C, and finally 5
181 minutes at 85°C. The reverse transcription product was used for quantitative real time PCR
182 analysis using LightCycler® 480 Real-Time PCR system (Roche, Basel, Switzerland) for
183 relative expression evaluation. Two µl of cDNA were combined with 0.4µl of forward and
184 reverse primers and 5µl of Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP blue (Eurogentec,
185 Liège, Belgium). Each reaction was done in triplicate. All primers were used at a
186 concentration of 10µM and were designed using Primer-Blast on NCBI and are described in
187 Annex 1 [13]. The quantitative-PCR (qPCR) conditions were 95°C for 3 minutes followed by
188 40 amplification cycles of two steps with denaturation at 95°C for 10s and
189 annealing/elongation for 40s. The specificity of the qPCR reactions was assessed by the
190 analysis of the melting curves of the products and the size of the amplicons.

191 Samples were normalized internally using an average cycle quantification of three reference
192 genes in each tissue to avoid any variation in the target gene: glyceraldehyde-3-phosphate
193 dehydrogenase (GAPDH), Ribosomal Protein L19 (RPL-19) and beta-2-microglobulin
194 (B2Mi). These suitable housekeeping genes were selected amongst 10 well-known reference

195 genes using the geNorm application software [14] and relative gene expression level was
196 determined using $\Delta\Delta C_T$ methods [15].

197 *2.7. Histological and immunostaining assays*

198 Tissues (jejunum, ileum, colon, mesenteric lymph nodes and jejunal/ileal Peyer’s
199 patches) fixed in 4% neutral buffered formalin (MM France, Francheville, France) used for
200 immunostaining assays were cut into sections of 5 μm which were then deparaffinized and
201 rehydrated. Endogenous peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxide 1% in
202 methanol for 30m. Sections were incubated with sodium citrate buffer pH 6.0 for 30 min at
203 121°C in a pressure cooker. Sections were cooled down to room temperature for 20 min and
204 rinsed for 3 min in PBS buffer containing 0.05% Tween 20 and 1% BSA. Non-specific
205 binding sites were blocked with 20% goat serum and 30% fetal bovine serum for 20m at room
206 temperature. After drying, the sections were incubated with monoclonal antibodies specific to
207 porcine epidemic diarrhea virus (monoclonal 14H4 anti-N-PEDV, 5mg/ml, ID Vet, Grabels,
208 France) diluted 1:1000 in PBS containing 10% fetal bovine serum. Viruses were visualized
209 using the universal immune-peroxidase polymer complex, anti-Mouse (N-histofine, Nichirei
210 biosciences INC, Tokyo, Japan) and UltraVision Detection System (LabVision Corporation,
211 Thermofischer Scientific, Fremont, USA).

212 Five μm deparaffinized and rehydrated tissues sections were also used for histological
213 assay. Tissues sections were counterstained with hematoxylin and eosin (HE) solution and
214 mounted in Eukitt (Kindler GmbH & Co., Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Sections
215 stained with HE were visualized using a Nikon Eclipse 80i microscope with DS-Ri camera
216 controlled by NIS-Elements D software package (NIKON, Instruments Inc., Tokyo, Japan).
217 Influx of stained cells present in different tissue sections were observed and compared
218 between infected and non-infected pigs.

219 *2.8. Statistical analysis*

220 The normality of all the data was checked with a Shapiro test. If the data followed a
221 normal distribution, the homogeneity of the variances was checked with a Levene test. If the
222 homogeneity of variances was confirmed, an ANOVA test was used to compare the means
223 between groups. If the data did not follow a normal law or if the variances were not
224 homogeneous, a Kruskal-Wallis test was performed to compare the means between groups. *P*-
225 values less than 0.05 were considered significant. Statistical analyses of data were done with
226 the statistical software R version 3.2.5. [16].

227 **3. Results**

228 *3.1. Pig infection*

229 All inoculated pigs demonstrated clinical signs. The pigs inoculated with the “S-
230 InDel” PEDV strain showed signs of vomiting early during the infection at 2 and 3 DPI.
231 Diarrhea was observed at 3 and 4 DPI. Wasting was noticed at 5 and 6 DPI. Infection by the
232 “S-non-InDel” PEDV strain resulted also in similar clinical signs, which were observed at the
233 same time compared to the pigs inoculated by the “S-InDel” PEDV strain. However, diarrhea
234 was observed for longer periods, i.e. until 5 DPI. Signs of dehydration were also observed at 5
235 and 6 DPI in pigs infected with the “S-non-InDel” PEDV strain. None of the control pigs
236 demonstrated any clinical signs during the trial.

237 Prior to inoculation, all pigs were RT-qPCR negative for PEDV in feces. The six
238 control pigs remained PEDV negative in feces, organs and serum throughout the trial.
239 PEDV nucleic acid was detected in feces of all inoculated “S-InDel” and “S-non-InDel” pigs
240 at 3 DPI and remained positive until 7 and 14 DPI for the “S-InDel” and “S-non-InDel”
241 PEDV, respectively (Table 1). Prior to inoculation, no PEDV RNA was detected in serum.
242 Viremia was only detected for five “S-InDel” inoculated pigs at 3 DPI.

243 All collected tissues (duodenum, jejunum, ileum, colon and jejunum and ileum Peyer’s
244 patches) were RT-qPCR positive for PEDV at 3 and 7 DPI for “S-InDel” and “S-non-InDel-

245 PEDV inoculated pigs except the jejunum Peyer’s patches of one “S-non-InDel” pig at 7 DPI.
246 At 14 DPI, PEDV RNA was only detected in ileum, colon and Peyer’s patches of the pigs
247 inoculated with the “S-InDel” PEDV strain. Over time, the virus was detected in the distal
248 segment of the intestine for this strain. At 14 DPI, all tested intestinal segments were positive
249 for PEDV RNA for the “S-non-InDel” inoculated pigs except one animal demonstrating
250 PEDV RNA only in the distal portion (Table 2).

251 All pigs were seronegative before inoculation and the six control pigs remained
252 seronegative during the trial. Only two pigs inoculated with the “S-non-InDel” strain were
253 positive for PEDV antibodies in serum at 14 DPI.

254 3.2. *Histopathological lesions*

255 No histological lesion was observed in duodenum, jejunum, ileum, colon and jejunum
256 and ileum Peyer’s patches of the control pigs at 3, 7 and 14 DPI. However, at 3 DPI, the pigs
257 inoculated with the “S-InDel” or the “S-non-InDel” strain of PEDV showed histopathological
258 lesions in jejunum, ileum and both jejunum and ileum Peyer’s patches. Destruction of the
259 villus epithelium and of the chorion was also observed (Figure 2). At 7 and 14 DPI, no lesion
260 could be observed in duodenum, jejunum, ileum, colon and jejunum and ileum Peyer’s
261 patches of all inoculated pigs.

262 3.3. *PEDV interactions with intestinal mucosae*

263 No PEDV signals could be observed in control pigs throughout the trial. At 3 DPI for
264 PEDV “S-InDel” or “S-non-InDel” strain, staining was found in the epithelial cells of the
265 villus. No staining could be noticed in the colon regardless of the strain at 3 DPI while a low
266 level of staining was observed in the afferent lymph vessels and the follicles of the mesenteric
267 lymph node for both strains. At 7 DPI, PEDV antigen-positive cells appeared in colon of pigs
268 infected with the “S-InDel” PEDV strain and persisted only in the ileum Peyer’s patches. At
269 this date, immuno-labelling was observed in ileum and ileum Peyer’s patches from pigs

270 infected with the “S-non-InDel” PEDV strain. At 14 DPI, staining was observed in colon and
271 also in ileum and in ileum Peyer’s patches with less intensity for the two strains (Figure 3).
272 Low PEDV antigen-positive cells could also be noticed in the mesenteric lymph node of pigs
273 infected with “S-non-InDel” PEDV strain.

274 *3.4. Blood cells counts*

275 Blood cell analysis during the infection period showed a number of WBCs (White
276 blood cells) significantly lower at 3 DPI in infected pigs than in the controls. Unlike control
277 groups, monocyte number was low in pigs infected with both “S-InDel” and “S-non-InDel”
278 PEDV strains. Neutrophils/granulocytes levels were also low in pigs infected with virulent
279 “S-non-InDel” PEDV strains. However, the number of lymphocytes in blood for pigs
280 inoculated with both strains was higher compared to the controls at 3 DPI (Figure 4). At
281 7DPI, the blood cell count switched, with a higher number of neutrophils/granulocytes in pigs
282 infected with “S-non-InDel” PEDV strain compared to the controls.

283 *3.5. Transcriptomic analysis*

284 For the two strains, at 3 DPI, under-expression of MAdCAM-1 in jejunum, in ileum
285 and in colon could be observed (Figure 5). mRNAs of MAdCAM-1 were also under-
286 expressed in duodenum for the group challenged with the “S-non-InDel” strain. At 3 DPI,
287 under-expressions of APRIL and TGF- β were also observed in ileum and in colon for pigs
288 infected with both strains. This under-expression was also observed in jejunum for APRIL
289 and in duodenum, jejunum and ileum Peyer’s patches for TGF- β for the “S-non-InDel” strain.
290 mRNAs of CCL25 were under-expressed in duodenum and in jejunum and mRNAs of
291 CCR10 and CCR9 in duodenum for the two strains. An under-expression of CCL25 was also
292 observed in ileum but only in the group infected by an “S-non-InDel” strain including an
293 under-expression of CCR10 noticed in jejunum and in ileum. An impact on the expression of
294 CCL28 and CCR9 not observed with the “S-InDel” appeared with this “S-non-InDel” strain in

295 duodenum, in jejunum, in ileum and in ileum Peyer’s patches at 3 DPI: over-expressions of
296 CCL28 in duodenum and in jejunum and under-expressions of CCR9 in ileum and in ileum
297 Peyer’s patches.

298 The impact on the mucosal immune response in pigs infected with an “S-InDel” or an
299 “S-non-InDel” PEDV strain was less marked at 7 DPI compared to 3 DPI.

300 Comparison between mRNA in “S-InDel” and “S-non-InDel” PEDV inoculated pigs revealed
301 that an over-expression of CCL28 and CCL25 mRNAs was observed at 7 DPI in jejunum and
302 colon, respectively, for “S-InDel” PEDV inoculated pigs. The mild impact observed on the
303 mucosal immune response in “S-InDel” or an “S-non-InDel” PEDV inoculated pigs observed
304 at 7 DPI was even more pronounced at 14 DPI.

305 *3.6. Specific PEDV-IgA, IgG and IgM quantification in sera and specific PEDV-IgA in*
306 *ileum contents*

307 PEDV- specific IgA, IgM and IgG GMT’s did not increase in the serum collected
308 from the control pigs at 3, 7 and 14 DPI. However, peak GMT was noticed for seral specific
309 PEDV-IgM at 7 DPI for the “S-InDel” and “S-non-InDel” inoculated pigs. Similar to IgM
310 levels observed at 7 DPI, a low increase could also be observed for seral specific PEDV-IgG
311 and IgA. An increase in PEDV-IgA in serum was observed at 7 and 14 DPI. The IgA increase
312 was more pronounced for “S-non-InDel” inoculated pigs. No increase of seral specific PEDV-
313 IgG was noticed at 14 DPI (Figure 6).

314 The PEDV-IgA GMT in ileum contents did not increase at 3, 7 and 14 DPI for pigs
315 inoculated with “S-InDel” or “S-non-InDel” PEDV. No difference in the GMT at similar DPI
316 was observed when compared to the control pigs (data not shown).

317 **4. Discussion**

318 During the induction of the innate immune response following viral infections, WBCs
319 are recruited with cells found in greater numbers in blood and tissues. However, following

320 PEDV infection (“S-InDel” or “S-non-InDel” PEDV), a significant decrease of WBCs was
321 observed at 3 DPI under the conditions of this study, with levels returning to a similar range
322 compared to the control pigs at 7 DPI. Decreased numbers of WBCs were observed at 3 DPI
323 that may have been due to either a decrease of monocytes when pigs were infected with both
324 strains or to neutrophils and granulocytes when pigs were infected with “S-non-InDel” PEDV.
325 These variations in WBCs could affect the onset of the inflammatory response following
326 infection with PEDV. The decrease in WBCs may precede a decrease of TNF- α expression by
327 macrophages, and cells that are derived from monocytes as shown in the transcriptomic
328 analyses. However, this has to be proved first by evaluating the activation of monocytes into
329 macrophages. An over-expression of IL-8, a cytokine involved in the inflammatory response
330 such as TNF- α , was also noticed in pigs infected by either PEDV strains in several intestinal
331 tissues. These over-expressions could lead to an increase of the production of IL-8 and to cell
332 proliferation, cell differentiation and inflammatory responses. During our histological study,
333 we found that intestine lesions were only observed at 3 DPI. Therefore, it could be assumed
334 that the absence of intestine lesions after 3 DPI could be linked to a regeneration of the
335 intestine tissues due to the over-expressions of IL-8 [17].

336 Under-expressions of NF- κ B observed at 7 DPI in the colon with “S-InDel” or “S-non-
337 InDel” PEDV could also be linked to the under-expression of TLR3/4 observed at the same
338 DPI in that tissue [18]. In other studies, it has been found that *in vitro* PEDV infection could
339 inhibit the activity of NF- κ B [19] or suppress this activity through the action of the PEDV-N
340 protein *in vitro* [20]. In addition, it was demonstrated that PEDV infection triggered the
341 activation of NF- κ B pathway but at later times from inoculation [21, 22].

342 Transcriptomic analysis performed in our study showed an under expression of a large
343 panel of genes involved in the IgA humoral immune response in intestinal segment of pigs
344 infected with both strains compared to the controls. MAdCAM-1 was under-expressed in

345 several intestinal tissues at different times for both strains. These under-expressions could
346 lead to a decrease in production of MAdCAM1 in the intestinal tract and thus to a decrease of
347 the recruitment of naïve B cells. Because the expression of MAdCAM-1 is regulated by TNF-
348 α [23], the under-expressions of MAdCAM-1 observed with both PEDV strains could be
349 linked to the under-expressions of TNF- α observed in the same tissues at the same dates. The
350 decrease of the recruitment of naïve B cells could have consequences on the production of
351 antibody secreting cells (ASC) and thus on the production of IgM, IgA and IgG. Infection by
352 “S-InDel” or “S-non-InDel” PEDV induced an under-expression of TGF- β , APRIL as well as
353 BAFF, which might affect the IgA class switching. Kinetic analysis of specific Ig level in
354 serum revealed an increase of PEDV-IgM at 7 DPI and then a decrease at 14 DPI for both
355 PEDV strains. In contrast, a low and then a marked increase of PEDV-IgA was observed at 7
356 DPI and at 14 DPI respectively. These observations could indicate class switching from IgM
357 towards IgA between 7 and 14 DPI. However, no significant production of IgA at the
358 intestinal level was observed. The presence of PEDV-IgA in the serum was not representative
359 of the presence of IgA at the intestinal level, the site of infection. These results support our
360 transcriptomic analysis suggesting a potential disturbance of the mechanism of switching
361 from IgM towards IgA.

362 The secretion of IgA at the local level is normally promoted by IL-10 and TGF- β [24,
363 25] but under-expression of IL-10 and TGF- β with both strains at various DPI and in various
364 intestinal tissues was noticed. These under-expressions could lead to a decrease of the
365 production of IL-10 and TGF- β and thus to a decrease of the secretion of IgA. The observed
366 under-expressions of IL-10 could be linked to a failure of the TLR4 pathway. No stimulation
367 of the expression of TLR4 was observed during our experiments. The stimulation of the
368 expression of TLR4 is mediated by a type I interferon pathway [26] and several studies
369 demonstrated that infection with PEDV impacted the type I interferon pathway. *Zhang et al.,*

370 2016, showed that the production of IFN β was impacted by PEDV infection, eliminating
371 detection of this interferon after infection [27].

372 According to our observations, IgA class switching and secretion at the local level
373 appeared between 3 and 14 DPI for both strains, this may suggest that over this period the
374 production of IgA against PEDV is deficient in the intestine. However, a previous study
375 showed that IgA content appeared at 21 DPI at the mucosal level while the IgA antibodies
376 were observed at the serum level at 12 DPI [9]. These results are in accordance with the data
377 presented in our study. The under-expressions of the genes involved in the establishment of
378 the IgA at the mucosal level were present at 3 and 7 DPI.

379 Problems associated with inducing the mucosal IgA response were observed until 14
380 DPI as well as the impact of the infection observed on cells of the innate immune response
381 may explain the inability to control PEDV at the mucosal level during the first 14 DPI
382 regardless of PEDV strain. The PEDV replication cycle is less than 12h [19] and replication is
383 faster for “S-non-InDel” PEDV compared to “S-InDel” PEDV [28]. The impact of PEDV at
384 the physiological level in pigs is likely more important during infection with “S-non-InDel”
385 PEDV strain compared to infection by an “S-InDel” PEDV.

386

387

388 **Declarations**

389 **List of abbreviations**

- 390 APRIL: A proliferation-inducing ligand
- 391 B2Mi: beta-2-microglobulin i
- 392 BAFF: B-cell activating factor
- 393 CCL: C-C motif ligand
- 394 CCR : C-C motif receptor
- 395 DNA: desoxyribonucleic acid
- 396 DPI: days post-inoculation
- 397 ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
- 398 GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
- 399 GMT: geometric mean titter
- 400 HE: hematoxylin and eosin
- 401 HRP: horse radish peroxidase
- 402 IFN: interferon
- 403 Ig: immunoglobulin
- 404 IL: interleukine
- 405 MAdCAM-1: mucosal addressin cell adhesion molecule-1
- 406 NF- κ B : nuclear factor-kappa B
- 407 NGS: next-generation sequencing
- 408 OPD: ortho-phenylenediamine
- 409 PBS: phosphate buffered saline
- 410 PCR: polymerase chain reaction
- 411 PCV2: porcine circovirus 2
- 412 PED: porcine epidemic diarrhea

413 PEDV: porcine epidemic diarrhea virus

414 PRRSV: porcine reproductive and respiratory syndrome virus

415 RNA: nucleic acid

416 RPL-19: ribosomal protein L19

417 SPF: specific pathogen free

418 TGF- β : transforming growth factor beta

419 TLR : toll-like receptor

420 TNF- α : tumor necrosis factor alpha

421 WBC: white blood cell

422 **Ethics approval and consent to participate**

423 The experimental design was approved by the Ethics Committee registered under number #16

424 by the French Ministry of Research (referral No. 16-032).

425 **Competing interests**

426 The authors declare that they have non competing interests.

427 **Author contributions**

428 All the authors designed and carried out the experiments. SG analyzed the data and
429 wrote the manuscript. BG, NR and MB supervised the project. All the co-authors revised the
430 manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

431 **Acknowledgement**

432 The authors are grateful to ANSES and INRA for their financial support. We also would like
433 to thank Phillip Gauger from Iowa State University who provided the US non-InDel strain, all
434 the team members at the experimental laboratory for their contribution.

435 **References**

- 436 1. Jung K, Saif LJ (2015) Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology,
437 pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinay Journal* 204:134-143
- 438 2. Wang J, Zhao P, Guo L, Liu Y, Du Y, Ren S, Li J, Zhang Y, Fan Y, Huang B, Liu S, Wu J
439 (2013) Porcine epidemic diarrhea virus variants with high pathogenicity, China. *Emerg Infect*
440 *Dis* 19:2048-2049
- 441 3. Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, Tang X, He Q (2012) New variants of porcine
442 epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis* 18:1350-1353
- 443 4. Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, Culhane MR, Rossow KD, Rovira A, Collins J, Saif
444 LJ (2014) Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America,
445 May 2013-February 2014. *Emerg Infect Dis* 20:1620-1628
- 446 5. Gallien S, Le Poder S, Rose N, Grasland B (2016) Diarrhée épidémique porcine: le retour
447 d'une "ancienne" maladie. *Virologie* 20:335-351
- 448 6. Wang L, Byrum B, Zhang Y (2014) New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United
449 States, 2014. *Emerg Infect Dis* 20:917-919
- 450 7. Liu C, Tang J, Ma Y, Liang X, Yang Y, Peng G, Qi Q, Jiang S, Li J, Du L, Li F (2015)
451 Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *Journal of virology*
452 89:6121-6125
- 453 8. EFSA (2016) Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine
454 epidemic diarrhoea. *EFSA Journal* 14:4375
- 455 9. de Arriba ML, Carvajal A, Pozo J, Rubio P (2002) Isotype-specific antibody-secreting cells
456 in systemic and mucosal associated lymphoid tissues and antibody responses in serum of
457 conventional pigs inoculated with PEDV. *Veterinary immunology and immunopathology*
458 84:1-16

- 459 10. Grasland B, Bigault L, Bernard C, Quenault H, Toulouse O, Fablet C, Rose N, Touzain F,
460 Blanchard Y (2015) Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel
461 strain isolated in france in december 2014. *Genome announcements* 3
- 462 11. Gallien S, Moro A, Lediguerher G, Catinot V, Paboef F, Bigault L, Berri M, Gauger PC,
463 Pozzi N, Authie E, Rose N, Grasland B (2018) Evidence of porcine epidemic diarrhea virus
464 (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. *Veterinary research*
465 49:7
- 466 12. de Arriba ML, Carvajal A, Pozo J, Rubio P (2002) Mucosal and systemic isotype-specific
467 antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated
468 porcine epidemic diarrhoea virus. *Veterinary immunology and immunopathology* 85:85-97
- 469 13. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-
470 BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC*
471 *Bioinformatics* 13:134
- 472 14. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F
473 (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging
474 of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034
- 475 15. Dory D, Beven V, Torche AM, Bougeard S, Cariolet R, Jestin A (2005) CpG motif in
476 ATCGAT hexamer improves DNA-vaccine efficiency against lethal Pseudorabies virus
477 infection in pigs. *Vaccine* 23:4532-4540
- 478 16. Team RC, 2014, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation
479 for Statistical Computing, Vienna, Austria,
- 480 17. Kunsch C, Rosen CA (1993) NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8
481 promoter. *Mol Cell Biol* 13:6137-6146
- 482 18. Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*
483 13:460-469

- 484 19. Zhang Q, Ma J, Yoo D (2017) Inhibition of NF-kappaB activity by the porcine epidemic
485 diarrhea virus nonstructural protein 1 for innate immune evasion. *Virology* 510:111-126
- 486 20. Ding Z, Fang L, Jing H, Zeng S, Wang D, Liu L, Zhang H, Luo R, Chen H, Xiao S (2014)
487 Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production
488 by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *Journal of virology* 88:8936-8945
- 489 21. Cao L, Ge X, Gao Y, Ren Y, Ren X, Li G (2015) Porcine epidemic diarrhea virus
490 infection induces NF-κB activation through the TLR2, TLR3 and TLR9 pathways in porcine
491 intestinal epithelial cells. *J Gen Virol* 96:1757-1767
- 492 22. Xing Y, Chen J, Tu J, Zhang B, Chen X, Shi H, Baker SC, Feng L, Chen Z (2013) The
493 papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon
494 pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J Gen Virol* 94:1554-1567
- 495 23. Oshima T, Jordan P, Grisham MB, Alexander JS, Jennings M, Sasaki M, Manas K (2001)
496 TNF-alpha induced endothelial MAdCAM-1 expression is regulated by exogenous, not
497 endogenous nitric oxide. *BMC Gastroenterol* 1:5
- 498 24. Briere F, Bridon JM, Chevet D, Souillet G, Bienvenu F, Guret C, Martinez-Valdez H,
499 Banchereau J (1994) Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to
500 secrete IgA. *J Clin Invest* 94:97-104
- 501 25. Cerutti A (2008) The regulation of IgA class switching. *Nature reviews. Immunology*
502 8:421-434
- 503 26. Iyer SS, Cheng G (2012) Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation
504 and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 32:23-63
- 505 27. Zhang Q, Shi K, Yoo D (2016) Suppression of type I interferon production by porcine
506 epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nspl. *Virology*
507 489:252-268

508 28. Gallien S, Andraud M, Moro A, Lediguerher G, Morin N, Gauger PC, Bigault L, Paboeuf
509 F, Berri M, Rose N, Grasland B (2018) Better horizontal transmission of a US non-InDel
510 strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus.
511 Transboundary Emerging Diseases

512

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

513 **Table 1: PEDV log₁₀genome copies/ml detected by RT-qPCR in controls and inoculated**
 514 **pigs.**

	DPI	-1	3	7	14	515
GROUP	PIG					
INDEL	6469	0.00	10.49	9.02	9.13	516
	6479	0.00	9.73	8.92	7.26	
	6488	0.00	10.44	†	†	517
	6496	0.00	10.40	7.48	7.08	
	6474	0.00	9.91	†	†	
	6480	0.00	9.49	†	†	519
	6485	0.00	9.77	7.44	†	
	6489	0.00	9.18	7.64	†	520
	6493	0.00	8.45	7.57	†	
	NON INDEL	6470	0.00	9.98	†	†
6484		0.00	9.69	6.06	8.61	
6490		0.00	10.59	7.72	6.80	522
6495		0.00	9.93	8.76	6.21	
6468		0.00	8.78	8.69	†	523
6482		0.00	9.38	8.53	†	524
6486		0.00	8.89	†	†	
6491		0.00	11.20	7.61	†	525
6494		0.00	10.31	†	†	
CONTROL		6471	0.00	0.00	0.00	0.00
	6476	0.00	0.00	0.00	0.00	
	6477	0.00	0.00	†	†	527
	6483	0.00	0.00	0.00	0.00	
	6487	0.00	0.00	0.00	†	528
	6492	0.00	0.00	†	†	
	6497	0.00	0.00	0.00	†	529

530 *Light grey boxes: between 10⁶ and 10⁸ copies/ml; medium grey: between 10⁸ and 10¹⁰*
 531 *copies/ml and black: >10¹⁰ copies/ml. †: dead*

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

533

Table 2: PEDV log₁₀ genome copies/g detected in tissues collected from controls and inoculated pigs.

GROUP	PIG	STATUS	DUODENUM	JEJUNUM	ILEUM	COLON	JEJUNUM PEYER'S PATCHES	ILEUM PATCHES	PEYER'S PATCHES
NECROPSY at 3 DPI	6488	INDEL	11.86	11.65	12.37	11.45	11.98	12.17	
	6474		11.98	12.79	12.90	11.95	13.17	12.98	
	6480		12.04	13.11	13.21	10.91	12.69	13.01	
	6470	NON INDEL	12.77	13.23	12.98	11.62	12.91	12.98	
	6486		12.56	13.33	12.99	10.94	12.59	12.61	
	6494		12.87	12.71	12.61	11.68	12.60	12.58	
6477	CONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
6492		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
NECROPSY 2 at 7 DPI	6485	INDEL	7.72	8.40	9.09	10.76	9.42	9.23	
	6489		7.53	7.82	8.24	9.88	10.11	10.54	
	6493		10.03	8.70	9.38	12.18	10.04	10.11	
	6468	NON INDEL	5.88	7.10	11.29	9.89	0.00	10.45	
	6482		5.95	6.82	8.21	8.78	9.71	9.03	
	6491		8.24	7.67	10.99	10.70	9.77	10.55	
	6487	CONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6497		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
NECROPSY at 14 DPI	6469	INDEL	0.00	0.00	8.09	7.13	9.28	8.97	
	6479		0.00	0.00	10.48	10.00	8.61	10.35	
	6496		0.00	0.00	8.31	10.43	9.82	9.25	
	6484	NON INDEL	0.00	0.00	9.33	11.13	9.31	9.01	
	6490		8.07	8.76	8.96	7.90	8.44	8.72	
	6495		7.65	7.09	8.66	7.39	10.59	8.84	
	6471	CONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6476		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	6483		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

534
535
536

Light grey boxes: viral genome load between 10² and 10⁶ copies/ml; medium grey boxes: between 10⁶ and 10⁸ copies/g; dark grey: between 10⁸ and 10¹⁰ copies/g and black: >10¹⁰ copies/g

537 **Additional file 1: Primer sequences, annealing temperature (°C) of primer sets, expected**

538 **PCR products and NCBI accession number**

539 **Figure 1: Experimental Design**

540 **Figure 2: Histopathological lesions observed at 3 DPI in intestinal tissues for control, “S-**
541 **InDel” and “S-non-InDel” PEDV inoculated pigs**

542 **Figure 3: Immunolabelling in intestinal tissues at 3, 7 and 14 DPI from pigs inoculated**
543 **with a PEDV “S-InDel” or a PEDV “S-non-InDel”**

544 **Figure 4: Blood cell counts (A/ White cells, B/Lymphocytes, C/ Monocytes,**
545 **D/Neutrophils and Granulocytes) from controls, “S-InDel” and “S-non-InDel” PEDV**
546 **inoculated pigs at 3, 7 and 14 DPI (Differences between strains were considered significant**
547 **when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***))**

548 **Figure 5: Expression of mRNA induced after challenge with porcine epidemic diarrhea**
549 **virus (PEDV) “S-non-InDel” and “S-InDel” in gastrointestinal tissues at 3, 7 and 14 DPI**
550 **relative to controls. Bold line: controls, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.**

551 **Figure 6: Serum IgA, IgG and IgM geometric mean titers at 3, 7 and 14 DPI detected in**
552 **control, “S-InDel” and “S-non-InDel” PEDV inoculated pigs**

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

Figure

[Click here to download Figure Figure 1_SG.docx](#)

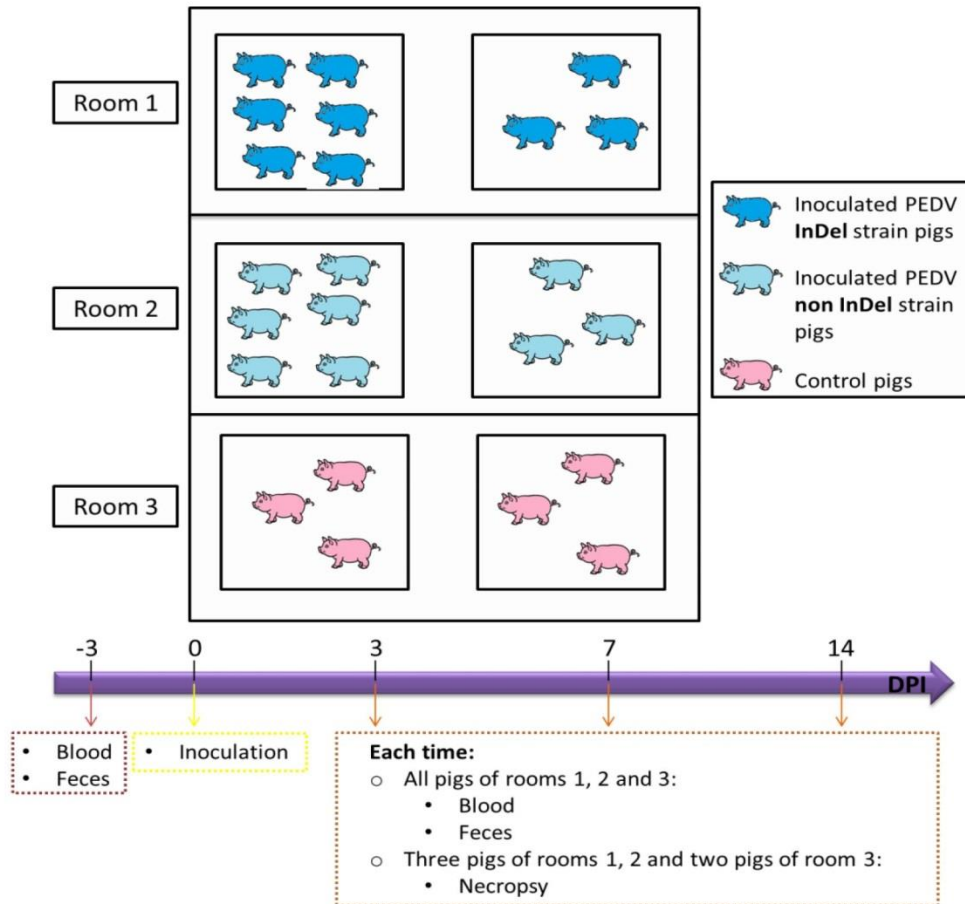


Figure 1

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

Figure

[Click here to download Figure Figure 2_SG.docx](#)

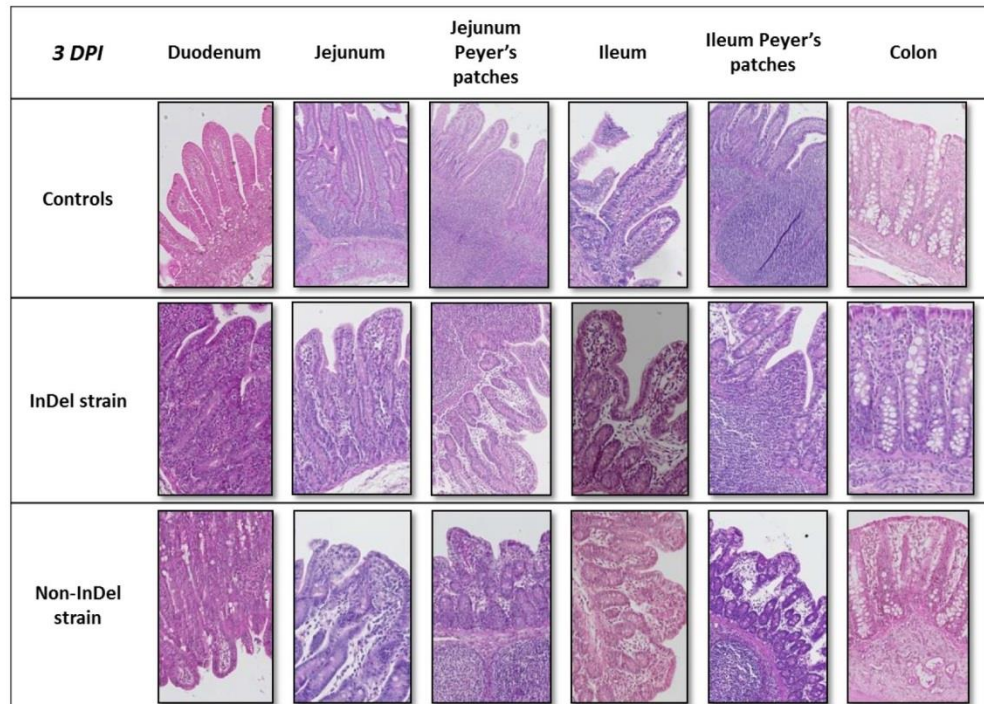


Figure 2

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

Figure

[Click here to download Figure Figure 3_SG.docx](#)

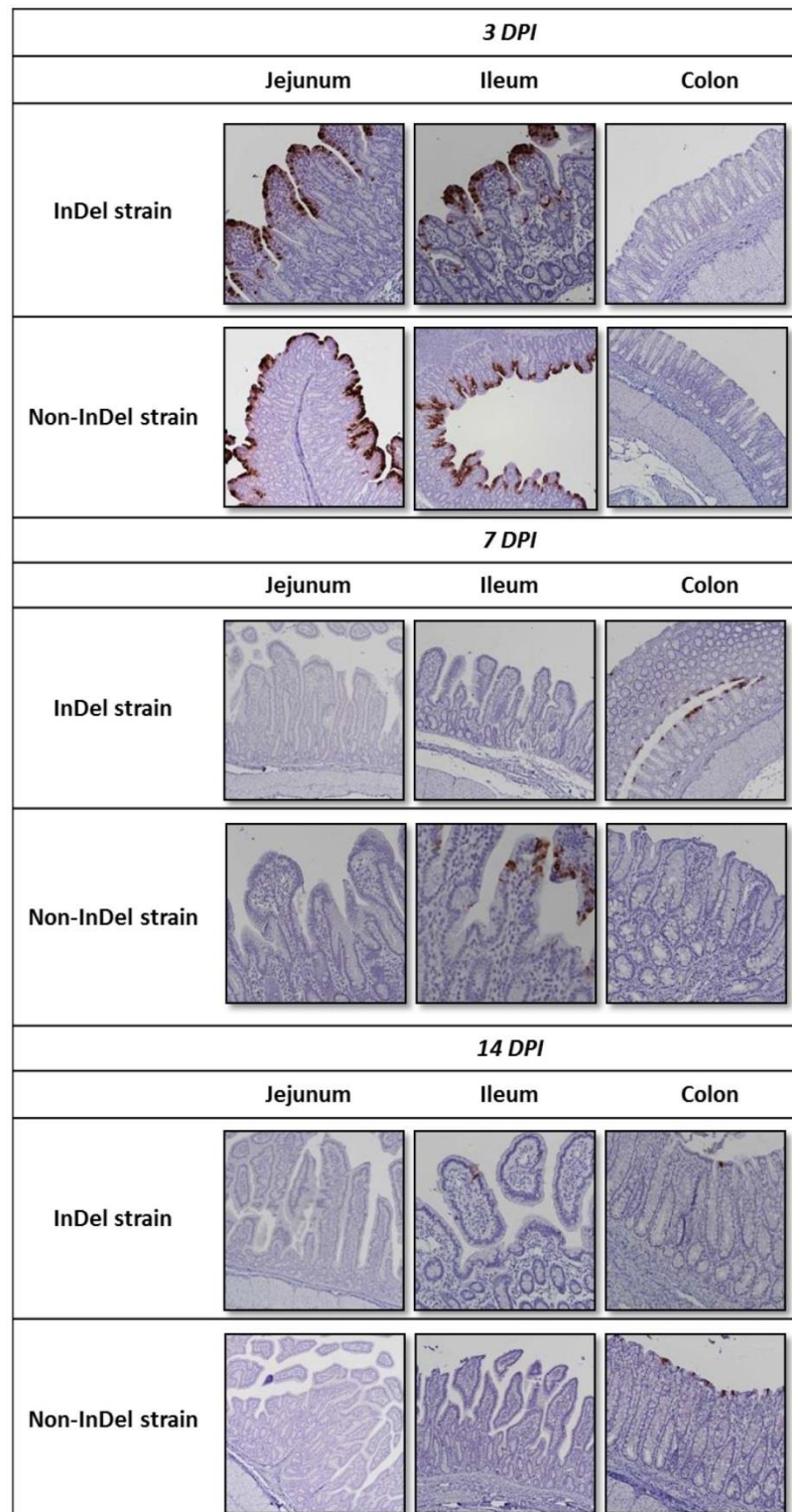


Figure 3

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

Figure

[Click here to download Figure Figure 4_SG.docx](#)

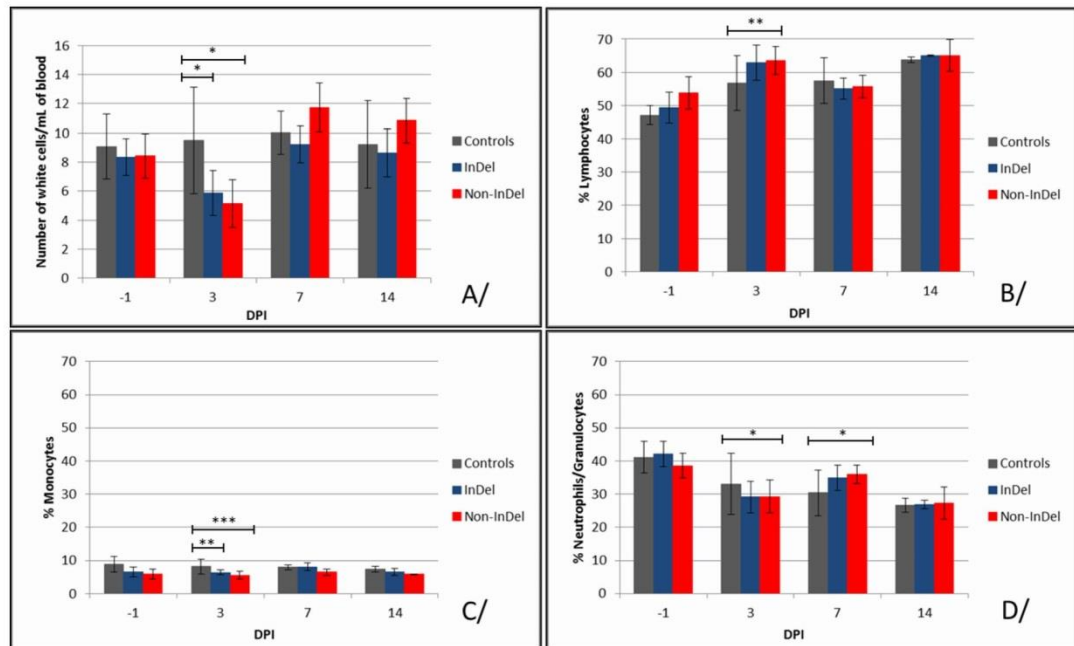


Figure 4

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

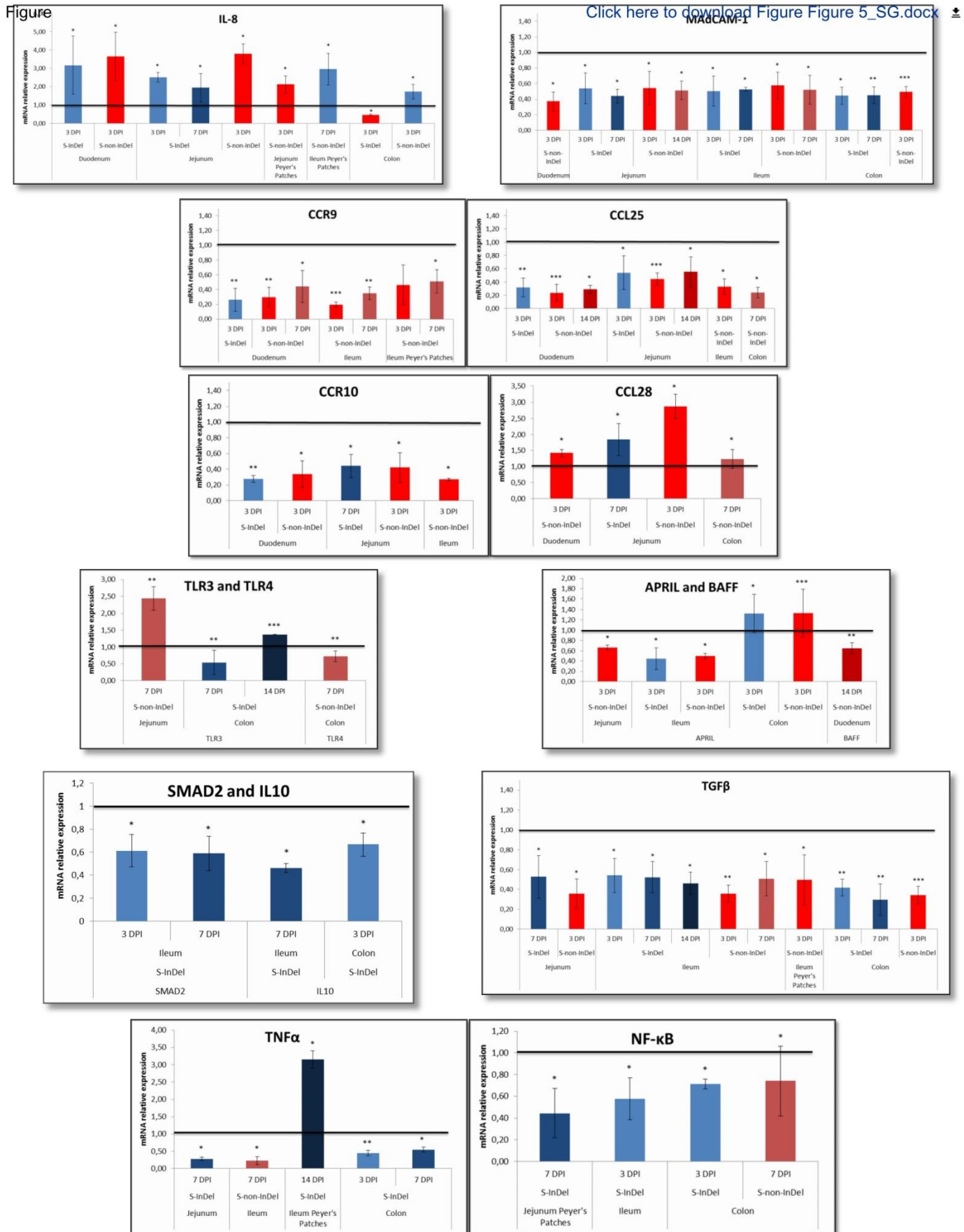


Figure 5

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

Figure

[Click here to download Figure Figure 6_SG.docx](#)

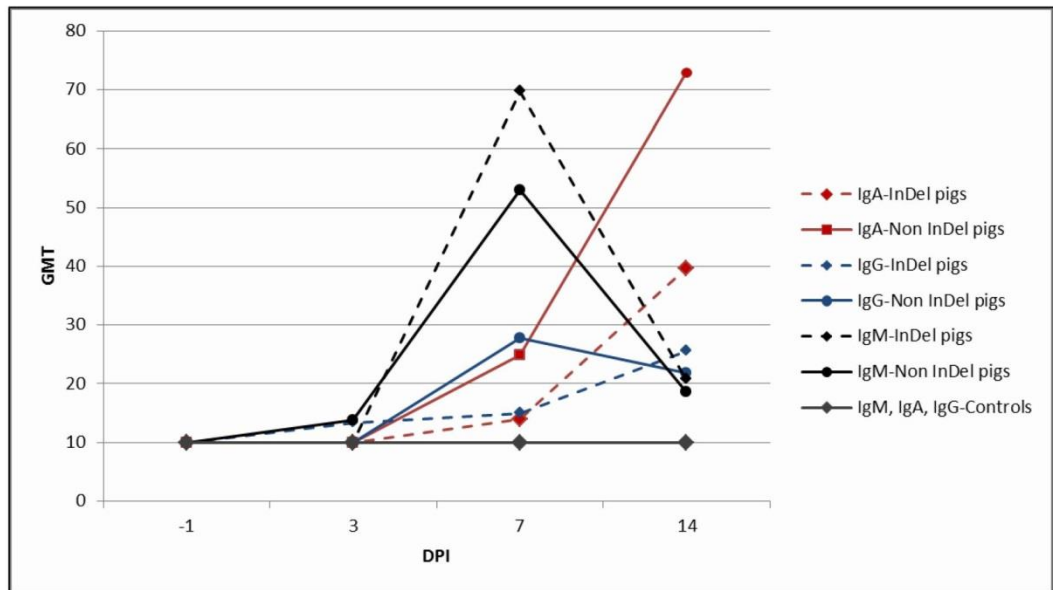


Figure 6

Article 6: Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with a French “S-InDel” or an US “S-non-InDel” strain of porcine epidemic diarrhea virus

Additional file 1

Gene interest	of Primer sequence	Annealing temperature (°C)	PCR product (bp)	NCBI Accession number
IL-8	(S) TGCAGAACTTCGATGCCAGT (AS) CACCCACTTTTCCTTGGGGT	60	169	XM_003361958.3
IL-10	(S) GGTTGCCAAGCCTTGTCAG (AS) AGGCACTCTTCACCTCCTC	60	202	NM_214041
TLR3	(S) CCTGCATTCCAGAAGTTGAG (AS) TGAGGTGGAGTATTGCAGAG	60	152	NM_001097444
TLR4	(S) TGTGCGTGTGAACACCAGAC (AS) AGGTGGCGTTCCTGAAACTC	62	136	NM_001113039
MAdCAM-1	(S) TACTGCGGGAAACGCTCTTT (AS) GGAGAAGACATCAGGGCGAG	60	159	NM_001037998
APrIL	(S) TGCTCACCCGTAAACAGAAG (AS) TAAACTCCAGCATCCCAGAC	60	172	EST BP170456
BAFF	(S)GGGTCCAGAAGAAACAGGATCT (AS) GATGTCCCATGGCGTAGGTC	60	167	NM_001145645
NF-κB1	(S) CCCTGAGACAGATGGGCTAC (AS) GAGCTCGTCTATTTGCTGCC	60	155	NM_001048232.1
α4	(S) GCTTTCCAGAGCCAAATCC (AS) ACCAGCCTTCCACATAACG	63	183	EST EW332552
CCL28	(S) GTGGCTCTTCATCACTCGGA (AS) GGATGACAGCAGCCAAGTCA	63	151	NM_001024695
CCL25	(S) ACA-TTA-AGT-GGC-GCC-TGC-TC (AS) TCA-TCC-CAA-ACT-GCA-CCC-AC	60	153	NM_001025214
CCR10	(S) CAGAGCAGGTTTCCTGGGG (AS) CAGCCACGGTCAAAGAGACA	63	141	DQ157761.1
CCR9	(S) ACAGAAGCCGCAAGTCTGAT (AS) TGCAAACCTGCCTGACATGGT	63	132	NM_001001624
TNF α	(S) CAAGCCACTCCAGGACCC (AS) TGCTCTCAGTGCTCATGGTG	63	159	X54859.1
TGFβ1	(S) CGTGCTAATGGTGGAAAGCG (AS) AGAGCAATACAGGTTCCGGC	60	122	NM_214015
SMAD2	(S) TGAGTGCCTAAGTGACAGTG (AS) CCAGAAGAGCAGCAAATTCC	60	143	DB812041.1
GAPDH	(S) CCTCAACGACCACTTCGTCAA (AS) TGGTCCAGGGGCTCTTACT	60	117	AF017079
RPL-19	(S) GTTCTTTTCCTTTCGCCGCTG (AS) GATCTGCTGACGGGAGTTGG	60	154	AF435591.1
B2Mi	(S) TCAACCACTTTTCACACCGC (AS) GGTGGCGTGAGTAAACCTGA	60	130	NM_213978.1

Discussion générale



Le virus de la diarrhée épidémique (PEDV) est à l'origine de troubles sanitaires importants lors de son introduction en élevage porcin naïf. Les animaux infectés par ce virus, quel que soit leur âge, sont sujets à d'importantes diarrhées aqueuses pouvant être accompagnées de vomissements et de signes de déshydratation et d'anorexie. Le taux de mortalité observé suite à l'infection est plus sévère chez les jeunes animaux (moins de 10 jours d'âge) et peut atteindre 100% en cas d'infection par une souche hypervirulente. Actuellement, deux génotypes de souches de PEDV circulent dans le monde, les souches « S-InDel » et les souches « S-non-InDel ». L'introduction des souches « S-non-InDel » sur le territoire européen entraînerait potentiellement des conséquences non négligeables sur la filière porcine du même ordre que celles observées lors de l'introduction de ces souches sur le territoire américain en 2013 (ANSES, 2014). En effet, lors de cette introduction en 2013, une perte de plus de 7 millions de porcelets avait été enregistrée après seulement une période épidémique d'un an, provoquant des pertes économiques considérables à la filière porcine américaine. Aujourd'hui la maladie s'est maintenue de manière enzootique aux USA ce qui souligne le fort potentiel de persistance de ce type de souche à l'échelle de la filière.

Ce travail de thèse avait, premièrement, pour but d'apporter une meilleure connaissance des capacités de transmission et de propagation des souches « S-InDel » et « S-non-InDel » afin de donner des éléments/outils de contrôle précis en cas d'infection par une souche « S-InDel » ou en cas d'introduction d'une souche « S-non-InDel » et de disposer également d'éléments quantitatifs pour alimenter un futur modèle épidémiologique de propagation permettant d'étudier le comportement de ces souches au sein d'une population porcine en Europe et en France en particulier. Le deuxième objectif de ce travail de thèse était aussi d'apporter des connaissances sur les possibilités d'excrétion du virus dans la semence dans la perspective de produire des connaissances pouvant être utilisées lors d'une analyse de risque de propagation du PEDV par cette voie. Enfin, afin de mieux comprendre les différences de pathogénicité et de transmission de ces deux types de souches, l'immunité induite au niveau local en cas d'infection par l'un ou l'autre type de souche a été explorée dans une troisième partie.

Les capacités de propagation des deux types de souches de PEDV étudiés se sont avérées être différentes dans nos conditions expérimentales. En effet, la souche « S-InDel » étudiée lors de ce travail de thèse n'a pu être transmise que par contact direct et non via l'air environnant alors que la souche « S-non-InDel » a pu être transmise à la fois par contact direct et par l'air, à l'échelle de l'animalerie. La transmission directe pour la souche « S-non-InDel » s'est aussi avérée être beaucoup plus importante ($\beta_w = 2,95 \text{ j}^{-1}$ (1,33; 5,23) vs $\beta_w = 1,36 \text{ j}^{-1}$ (0,6; 5,6)) et beaucoup plus rapide que celle de la souche « S-InDel ». Ces différences de délai, de quantité et de voie de transmission pour les deux souches suggèrent que les cas d'infection par des souches « S-InDel » pourraient être plus facilement maîtrisés via l'isolement des animaux infectés et l'utilisation de certaines mesures de biosécurité, de

désinfection et d'assainissement. L'isolement des animaux infectés par une souche « S-InDel » dans un bâtiment/une salle séparé(e) pourrait en effet être envisagé. Du fait d'une dose minimale infectante du PEDV faible, ces mesures d'isolement devraient être accompagnées de mesures de biosécurité strictes telles que le changement de vêtement ou le lavage des bottes et parties du corps non protégées par les vêtements entre les différents bâtiments ou entre les différentes salles d'élevage (Kim et al., 2017, Thomas et al., 2015). La mise en place de pédiluves pourrait aussi être envisagée avant l'entrée et à la sortie de chaque bâtiment ou de chaque salle d'élevage. La marche en avant déjà appliquée en élevage porcin devrait aussi être correctement respectée. Le virus entraînant des conséquences plus importantes sur les animaux en bas-âge, il serait important de bien respecter l'ordre de passage dans les différents ateliers d'élevage. La distribution des tâches sur l'élevage au personnel animalier devrait aussi être correctement sectorisée. La désinfection des matériaux utilisés dans le bâtiment/dans la salle d'élevage contenant les animaux infectés par le PEDV ainsi que des fosses à lisiers rattachées à ces bâtiments/salles devrait aussi être correctement réalisée. Le PEDV pouvant survivre sur de longues périodes dans les lisiers, il est aussi important de mettre en place un traitement de ces lisiers ainsi que des fosses à lisiers contaminées afin d'éviter une nouvelle contamination par cette voie. La persistance du PEDV dans ces fosses va être prolongée si aucun traitement approprié n'est employé. Les facteurs environnementaux tels que les UV peuvent diminuer la survie du virus dans les environnements contaminés. Un brassage fréquent des fosses permet une exposition directe du lisier infecté aux UV environnementaux et donc de réduire le risque d'infection récurrente dans les exploitations et la propagation du virus (Tun et al., 2016). Le chaulage des fosses à lisier peut aussi être utilisé dans la mesure où nous avons pu montrer *in vitro* au cours de ce travail l'action assainissante de l'augmentation du pH au-dessus de 9 associé à un temps de stockage suffisant du lisier traité.

La gestion d'un cas d'infection par une souche « S-non-InDel » dans une exploitation porcine, au vu de nos résultats, serait différente. Ces souches « S-non-InDel » peuvent être transmises via l'air au contraire des souches « S-InDel » et se propager beaucoup plus rapidement que ces dernières rendant la gestion de l'infection plus critique. L'isolement des animaux infectés par le PEDV permettrait de limiter l'avancée de l'infection dans un premier temps. Compte tenu d'une propagation attendue très importante en cas de souche « S-non-InDel », les mesures mises en place par le gestionnaire de risque pourrait s'apparenter à ce qui est mis en place dans le cadre d'autres maladies de catégorie 1 soit une limitation des mouvements d'animaux, la constitution de zones de protections et de zones de surveillance ainsi qu'à une éventuelle gestion des foyers par élimination des sources infectieuses nécessitant potentiellement l'abattage de troupeaux. Une fois les animaux évacués de l'élevage, la mise en place des mêmes mesures de désinfections et d'assainissement des lisiers/fosses à lisiers et matériaux/bâtiments/salles d'élevage pourraient être mises en place.

La persistance du PEDV chez les animaux infectés mais survivant à l'infection pourrait être également un élément à intégrer pour la gestion des animaux infectés PEDV. En effet, la présence du génome du PEDV a été détectée dans les plaques de Peyer iléales et jéjunales ainsi que dans les ganglions mésentériques des verrats inoculés avec la souche « S-InDel » ou avec la souche « S-non-InDel » de PEDV lors de ce travail de thèse. Lorsque ces organes ont été prélevés, ces animaux n'étaient plus excréteurs du virus depuis un mois environ. Ces éléments laissent penser que les souches « S-InDel » et « S-non-InDel » de PEDV pourraient persister au niveau du tractus intestinal et plus précisément au niveau des plaques de Peyer jéjunales/iléales ou des ganglions mésentériques expliquant ainsi les points d'excrétions sporadiques du virus ayant pu être observés dans les essais expérimentaux sur la transmission horizontale pour les deux souches. La persistance des coronavirus au niveau du tractus intestinal a déjà été démontrée. Chez les veaux infectés par le coronavirus bovin (BCoV), il a été montré que le virus pouvait persister dans les cryptes et dans les plaques de Peyer pendant plus de trois semaines après infection (Kapil et al., 1990). Le FIPV (virus de la péritonite infectieuse féline) peut aussi persister dans la partie basse du tractus intestinal, majoritairement dans le côlon. Cette persistance est la source probable des excrétions virales récurrentes observées en cas d'infection par ce virus (Herrewegh et al., 1997, Kipar et al., 2010). En cas de persistance du PEDV au niveau du tractus intestinal, des risques d'excrétions virales récurrentes chez les porcs infectés par le passé par le PEDV pourraient être envisagés. Il pourrait en découler une persistance du PEDV au sein d'un élevage qui a été infecté par le passé et une augmentation du risque de propagation de celui-ci. La preuve de la persistance du PEDV compliquerait la gestion des cas d'infections par le PEDV. Cependant, l'étude du cas d'infection de DEP dans l'élevage du Nord montre qu'il y a bien eu assainissement.

La présence du génome viral du PEDV démontrée dans le sperme, dans la fraction riche en spermatozoïdes et séminale pour la souche « S-non-InDel » et dans la fraction riche en spermatozoïdes pour la souche « S-InDel », soulève de nouvelles questions sur la capacité de propagation du virus dans la population porcine via l'utilisation de semences pouvant être contaminées. Le virus de la DEP pourrait être transmis aux truies ou aux cochettes via l'insémination artificielle de semences contaminées par ce dernier et se propager dans des populations indemnes. D'autres études ont montré que la semence pouvait être une voie de propagation de certains pathogènes viraux. En effet, le virus du syndrome dysgénésique respiratoire porcin (PRRSV), qui comme le PEDV appartient à la famille des *Nidovirus*, pouvait être transmis à des truies/cochettes via l'utilisation de semences contaminées lors d'inséminations artificielles (Prieto and Castro, 2005, Prieto et al., 1997). Par ailleurs, la transmission du virus de la peste porcine classique (CSFV), du virus responsable de la maladie d'Aujesky ainsi que celle du virus de l'encéphalite japonaise sont aussi effectives via l'utilisation de semences contaminées lors d'inséminations artificielles (Maes et al.,

2008, Maes et al., 2016). La transmission de pathogènes viraux via la semence aux truies lors d'inséminations artificielles peut être dépendante de la quantité de virus présente dans la semence comme pour le PRSSV et le PCV2 (Prieto and Castro, 2005, Madson et al., 2009, Grasland et al., 2013). La transmission du PEDV via la semence pourrait être elle aussi dose virale dépendante. Les centres d'inséminations artificielles doivent donc être très vigilants en termes de biosécurité externe pour ne pas introduire le virus au sein des CIA. Des programmes de surveillance précis doivent être mis en place car les différentes analyses pratiquées avant l'entrée des animaux dans les centres d'insémination peuvent générer des informations partielles ne permettant pas de s'assurer à 100% que les animaux ne sont pas porteurs au moment de leur introduction. En effet, les prélèvements de sang et de semences testés doivent être interprétés en fonction du moment où le prélèvement a été effectué, du test de diagnostic utilisé, du nombre d'animaux testé et de l'interprétation qu'il est possible de faire des résultats (Knox, 2016). Il pourrait en être de même avec le PEDV. Au cours de notre étude, il a en effet été mis en évidence que le virus pouvait être présent dans la semence d'animaux exempts de signes cliniques, ne présentant pas d'excrétion virale dans les fèces et n'ayant pas encore séroconverti (Gallien et al., 2018). Une simple garantie sur la base d'un examen clinique ne semble donc pas suffisante. Une vigilance extrême sur l'origine des animaux importés, sur les antécédents en termes d'infection des élevages d'origine des animaux ainsi que sur les conditions de transport et de stockage de ces derniers doit donc être de rigueur.

L'infection par une souche « S-InDel » ou une souche « S-non-InDel » de PEDV provoque une perturbation de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative et de la réponse inflammatoire. Ces deux types de souches affectent de façon similaire la mise place de la réponse immunoglobuline A et de la réponse inflammatoire IL-8 et TNF α . Les sous-expressions identiques observées des gènes étudiés impliqués dans la mise en place de cette réponse immunoglobuline A pour les deux types de souches ainsi que l'absence d'immunoglobulines A dirigées spécifiquement contre le PEDV sur le lieu de l'infection pour les deux types de souches ne semble donc pas constituer des éléments explicatifs des différences de pathogénicité observées des souches « S-InDel » et « S-non-InDel ». Ces différences seraient donc liées à d'autres facteurs, elles pourraient par exemple être liées à des différences relatives aux voies d'entrée au niveau tissulaire des deux souches de PEDV. Ces voies d'entrée pourraient être étudiées via des études d'immuno-marquage ou au microscope confocal. Lors de notre étude de la transmission horizontale pour ces deux souches, il est apparu que la réplication de la souche « S-non-InDel » semblait plus rapide que pour la souche « S-InDel ». Cette réplication plus rapide couplée au défaut de mise en place de la réponse immunitaire immunoglobuline A observée permettrait d'expliquer cette différence de pathogénicité entre les souches et les mortalités plus sévères en cas d'infection par une souche « S-non-InDel ».

Lors de ce travail, des différences de transmission importantes entre les souches « S-InDel » et « S-non-InDel » sont apparues. Cependant les faibles différences en terme de réponse immunitaires différentielles selon les souches ne permettent pas d'expliquer totalement la sévérité plus importante observée sur le plan clinique en cas d'infection par une souche « S-non-InDel ». D'autres études sur la mise en place de la réponse immunitaire innée et adaptative seraient nécessaires afin de mieux comprendre cette différence de pathogénicité entre les deux types de souches de PEDV. Des études portant sur la mise en place de la réponse lymphocytes T pourraient par exemple être envisagées.

Sur le plan épidémiologique les différences de propagation observées pour les deux types de souches permettent de mieux comprendre la moindre diffusion des souches « S-InDel » entre les élevages lors des cas sporadiques détectés en France en 2014 puis en 2017. En effet, pour ces quatre cas détectés (Nord, Finistère, Landes, Yonne), aucun cas secondaire d'élevage n'a pu être recensé et ce jusqu'à l'assainissement de chacun d'entre eux. Ceci semble indiquer un comportement très différent à l'échelle de la population porcine de celui observé pour les souches de type « S-non-InDel » présentes en Asie et aux Etats-Unis et ayant un comportement typiquement épizootique. Les paramètres de transmission estimés dans ce travail pourraient être utilisés pour paramétrer précisément des modèles épidémiologiques spatio-temporels permettant d'étudier de manière différentielle le comportement de ces deux types de souches à l'échelle de la population des élevages de porcs français. Ces modèles permettront d'évaluer différentes stratégies de luttés selon la localisation du cas index (plus ou moins grande densité porcine) mais aussi le type d'élevage dans lequel le virus est introduit et sa position dans le réseau d'échanges d'animaux à l'échelle de la filière.

Des études pourraient être envisagées pour évaluer la capacité de transmission et de propagation ainsi que les différentes voies de transmission de nouveaux coronavirus porcins émergents afin de prévenir leur introduction sur le territoire européen et particulièrement en France. De nouveaux coronavirus porcins encore absents sur le territoire européen provoquant des signes cliniques proches de ceux provoqués par le PEDV ont émergé dans différente partie du monde à partir des années 2010. Un autre virus provoquant les mêmes signes cliniques que PEDV a notamment été identifié aux USA. Les animaux étaient affectés de diarrhée et de vomissements. Des échantillons provenant de ces porcs ont été testés, ils se sont révélés positifs pour les coronavirus mais négatif pour le PEDV et le TEGV (EFSA, 2014). Le séquençage a révélé la présence du deltacoronavirus porcine (PDCoV) (Li et al., 2014a). Le PDCoV, coronavirus enveloppé à ARN simple brin et à polarité positive de 25,4 à 26,6 kb, a été identifié pour la première fois à Hong Kong en 2012 lors d'une enquête de surveillance des coronavirus. D'après cette enquête, le PDCoV est présent en Chine depuis 2009 (Woo et al., 2012). Sa présence sur le territoire américain a été annoncée en février 2014 par le gouverneur de l'Ohio (Marthaler et al., 2014, Li et al., 2014a). En août 2015, le

virus était présent dans 19 états aux USA d'après le ministère de l'agriculture des Etats Unis (USDA, 2015). Les co-infections PDCoV et PEDV sont aujourd'hui assez communes aux Etats-Unis. PDCoV a, cependant, un impact moins important que PEDV. Actuellement, PDCoV a été détecté dans des échantillons de fèces, d'intestin et d'aliments. Il n'y a pas d'information sur la présence de PDCoV dans les semences, les embryons, le sang, les composants alimentaires dérivés du porc et l'air. Aucune infection n'a été détectée après mise en relation de porcs sains et de matériaux contaminés par ce virus (EFSA, 2014). En 2016, en Chine, un nouveau coronavirus porcin a aussi été identifié, le coronavirus du syndrome aigu de diarrhée (SADS-CoV). Ce virus tout comme le PDCoV provoque les mêmes signes cliniques que le PEDV. La mortalité enregistrée chez les porcelets sous la mère âgés de moins de 5 jours était très élevée (proche des 90%) (Zhou et al., 2018). Peu de données sont disponibles sur les voies de transmissions de ce nouveau coronavirus. En cas d'introduction du PDCoV ou du SADS-CoV, en Europe ou en France, des mesures sanitaires et de biosécurité telles que celles évoquées dans ce travail pour la gestion du PEDV pourraient être mises en place pour enrayer l'infection et la propagation du virus à l'échelle de l'élevage et du territoire.

Références



- 2014: Ambassade de France au Japon Service économique régional Note situation PEDV au Japon. <http://www.tresor.economie.gouv.fr/pays/japon>, 1-3.
- Alonso, C., D. P. Goede, R. B. Morrison, P. R. Davies, A. Rovira, D. G. Marthaler and M. Torremorell, 2014: Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Veterinary research*, 45, 73.
- Alonso, C., P. C. Raynor, P. R. Davies and M. Torremorell, 2015: Concentration, Size Distribution, and Infectivity of Airborne Particles Carrying Swine Viruses. *PLoS One*, 10, e0135675.
- Andraud, M., B. Grasland, B. Durand, R. Cariolet, A. Jestin, F. Madec and N. Rose, 2008: Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) within- and between-pen transmission in pigs. *Veterinary research*, 39, 43.
- Annamalai, T., L. J. Saif, Z. Lu and K. Jung, 2015: Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Veterinary immunology and immunopathology*.
- ANSES, 2014: Avis de l'Anses Saisine 2014-SA-0087. www.anses.fr.
- Baker, K. L., P. R. Thomas, L. A. Karriker, A. Ramirez, J. Zhang, C. Wang and D. J. Holtkamp, 2017: Evaluation of an accelerated hydrogen peroxide disinfectant to inactivate porcine epidemic diarrhea virus in swine feces on aluminum surfaces under freezing conditions. *BMC Vet Res*, 13, 372.
- Bowman, A. S., R. A. Krogwold, T. Price, M. Davis and S. J. Moeller, 2015: Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. *BMC Vet Res*, 11, 38.
- Cador, C., N. Rose, L. Willem and M. Andraud, 2016: Maternally Derived Immunity Extends Swine Influenza A Virus Persistence within Farrow-to-Finish Pig Farms: Insights from a Stochastic Event-Driven Metapopulation Model. *PLoS One*, 11, e0163672.
- Campbell, K. S. and J. Hasegawa, 2013: Natural killer cell biology: an update and future directions. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 132, 536-544.
- Cao, L., X. Ge, Y. Gao, G. Herrler, Y. Ren, X. Ren and G. Li, 2015a: Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon- β production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway. *Virology journal*, 12, 127.
- Cao, L., X. Ge, Y. Gao, Y. Ren, X. Ren and G. Li, 2015b: Porcine epidemic diarrhea virus infection induces NF- κ B activation through the TLR2, TLR3 and TLR9 pathways in porcine intestinal epithelial cells. *J Gen Virol*, 96, 1757-1767.
- Carr, J., Y. Zakharchenko, I. Chipenko, J. Besarab, I. Konovalov and O. Bekh, 2015: Clinical signs of Porcine Epidemic Diarrhoea in the Ukraine in 2014 associated with a Chinese/USA PED Virus. 8.

- Carvajal, A., I. Lanza, R. Diego, P. Rubio and P. Cármenes, 1995: Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J Vet Diagn Invest*, 7, 60-64.
- Cerutti, A., 2008a: Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal immunology*, 1, 8-10.
- Cerutti, A., 2008b: The regulation of IgA class switching. *Nature reviews. Immunology*, 8, 421-434.
- Chasey, D. and S. Cartwright, 1978: Virus-like particules associated with porcine epidemic diarrhoea. *Research in veterinary science*, 25, 255-256.
- Chen, J., C. Zhang, Y. Liu and G. Liu, 2017: Super-oxidized water inactivates major viruses circulating in swine farms. *J Virol Methods*, 242, 27-29.
- Choi, J. C., K. K. Lee, J. H. Pi, S. Y. Park, C. S. Song, I. S. Choi, J. B. Lee, D. H. Lee and S. W. Lee, 2014: Comparative genome analysis and molecular epidemiology of the reemerging porcine epidemic diarrhea virus strains isolated in Korea. *Infect Genet Evol*, 26, 348-351.
- Choisy, M., 2010: 3. Modélisation mathématique en épidémiologie. In: D. Boek (ed), *Changements environnementaux et santé*, pp. 159-182.
- Christiaens, I., N. Conceição-Neto, S. Theuns, M. Zeller, L. Desmarests, I. Roukaerts, E. Heylen and H. Nauwynch, August 31st-September 3rd 2015: Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus strains isolated from novel outbreaks in the European Union, Belgium. In: *Xth International Congress for Veterinary Virology-9th Annual Meeting of EPIZONE-Changing Virus in a Changing World, Montpellier, France*.
- Cochrane, R. A., L. L. Schumacher, S. S. Dritz, J. C. Woodworth, A. R. Huss, C. R. Stark, J. M. DeRouchey, M. D. Tokach, R. D. Goodband, J. Bia, Q. Chen, J. Zhang, P. C. Gauger, R. J. Derscheid, D. R. Magstadt, R. G. Main and C. K. Jones, 2017: Effect of pelleting on survival of porcine epidemic diarrhea virus-contaminated feed. *J Anim Sci*, 95, 1170-1178.
- Coussement, W., R. Ducatelle, P. Debouk and J. Hoorens, 1982: Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets, Histological and histochemical study. *Vet Path*, 19, 46-56.
- Crawford, K., K. Lager, L. Miller, T. Opriessnig, P. Gerber and R. Hesse, 2015: Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Veterinary research*, 46, 49.
- de Arriba, M. L., A. Carvajal, J. Pozo and P. Rubio, 2002a: Isotype-specific antibody-secreting cells in systemic and mucosal associated lymphoid tissues and antibody responses in serum of conventional pigs inoculated with PEDV. *Veterinary immunology and immunopathology*, 84, 1-16.

- de Arriba, M. L., A. Carvajal, J. Pozo and P. Rubio, 2002b: Lymphoproliferative responses and protection in conventional piglets inoculated orally with virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus. *J Virol Methods*, 105, 37-47.
- Dee, S., T. Clement, A. Schelkopf, J. Nerem, D. Knudsen, J. Christopher-Hennings and E. Nelson, 2014a: An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naïve pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept. *BMC Vet Res*, 10, 176.
- Dee, S., C. Neill, T. Clement, J. Christopher-Hennings and E. Nelson, 2014b: An evaluation of a liquid antimicrobial (Sal CURB®) for reducing the risk of porcine epidemic diarrhea virus infection of naïve pigs during consumption of contaminated feed. *BMC Vet Res*, 10, 220.
- Dee, S., C. Neill, T. Clement, A. Singrey, J. Christopher-Hennings and E. Nelson, 2015: An evaluation of porcine epidemic diarrhea virus survival in individual feed ingredients in the presence or absence of a liquid antimicrobial. *Porcine Health Manag*, 1, 9.
- Diep, N. V., M. Sueyoshi, U. Izzati, N. Fuke, A. P. P. Teh, N. T. Lan and R. Yamaguchi, 2018: Appearance of US-like porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) strains before US outbreaks and genetic heterogeneity of PEDVs collected in Northern Vietnam during 2012-2015. *Transbound Emerg Dis*, 65, e83-e93.
- Ding, Z., L. Fang, H. Jing, S. Zeng, D. Wang, L. Liu, H. Zhang, R. Luo, H. Chen and S. Xiao, 2014: Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *Journal of virology*, 88, 8936-8945.
- Do, T. D., T. T. Nguyen, P. Suphasawatt and T. Roogroje, 2011: Genetic Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Isolates from Southern Vietnam during 2009-2010. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41, 55-64.
- Dortmans, J. C. F. M., W. Li, P. J. van der Wolf, G. J. Buter, P. J. M. Franssen, G. van Schaik, M. Houben and B. J. Bosch, 2018: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) introduction into a naïve Dutch pig population in 2014. *Veterinary microbiology*, 221, 13-18.
- Ducatelle, R., W. Coussement, P. Debouck and J. Hoorens, 1982: Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets II. Electron microscopic study. *Vet Path*, 19.
- Ducatelle, R., W. Coussement, M. Pensaert, P. Debouck and J. Hoorens, 1981: In vivo morphogenesis of a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Archives of virology*, 68.
- Dufresne, L. and R. Robbins, 2014: Field experience with porcine epidemic diarrhea. *American Association of Swine Veterinarians*, 613-616.
- EFSA, 2014: Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus. *EFSA Journal*, 12, 3877.

- EFSA, 2016: Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. *EFSA Journal*, 14, 4375.
- Ferreira, A. S., F. F. Barbosa, M. D. Tokach and M. Santos, 2009: Spray dried plasma for pigs weaned at different ages. *Recent Pat Food Nutr Agric*, 1, 231-235.
- Fischer, F., C. F. Stegen, P. S. Masters and W. A. Samsonoff, 1998: Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *Journal of virology*, 72, 7885-7894.
- Fu, F., L. Li, L. Shan, B. Yang, H. Shi, J. Zhang, H. Wang, L. Feng and P. Liu, 2017: A spike-specific whole-porcine antibody isolated from a porcine B cell that neutralizes both genogroup 1 and 2 PEDV strains. *Veterinary microbiology*, 205, 99-105.
- Gallien, S., S. Le Poder, N. Rose and B. Grasland, 2016: Diarrhée épidémique porcine: le retour d'une "ancienne" maladie. *Virologie*, 20, 335-351.
- Gallien, S., A. Moro, G. Lediguerher, V. Catinot, F. Paboeuf, L. Bigault, M. Berri, P. C. Gauger, N. Pozzi, E. Authie, N. Rose and B. Grasland, 2018: Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. *Vet Res*, 49, 7.
- Geiger, J. and J. Connor, 2013: Porcine Epidemic Diarrhea, Diagnosis, and Elimination. 4.
- Gerber, P. F., D. Lelli, J. Zhang, B. Strandbygaard, A. Moreno, A. Lavazza, S. Perulli, A. Botner, L. Comtet, M. Roche, P. Pourquier, C. Wang and T. Opriessnig, 2016: Diagnostic evaluation of assays for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in pigs exposed to different PEDV strains. *Prev Vet Med*, 135, 87-94.
- Gerdtts, V. and A. Zakhartchouk, 2017: Vaccines for porcine epidemic diarrhea virus and other swine coronaviruses. *Vet Microbiol*, 206, 45-51.
- Giordano, M., M. Gallieni, A. Samii, C. Di Rocco and M. Samii, 2018: Surgical management of cerebellopontine angle arachnoid cysts associated with hearing deficit in pediatric patients. *J Neurosurg Pediatr*, 21, 119-123.
- Goyal, S., 2014: Interventions to control PEDV in feed and feed ingredients. Available at: www.pork.org/wp-content/.../2014/05/Goyal-14-157-main4.pdf (accessed 13 February 2018).
- Grasland, B., L. Bigault, C. Bernard, M. Andraud, Y. Blanchard and N. Rose, 2015a: La diarrhée épidémique porcine: quel risque en France? Comment s'y préparer? *Journées Recherche Porcine*, 47, 259-264.
- Grasland, B., L. Bigault, C. Bernard, H. Quenault, O. Toulouse, C. Fablet, N. Rose, F. Touzain and Y. Blanchard, 2015b: Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in France in December 2014. *Genome announcements*, 3.

- Grasland, B., P. Blanchard, A. Keranflec'h, L. Bigault, A. Oger, N. Rose, F. Madec, A. Jestin and R. Cariolet, 2013: Evaluation of the transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2) genogroups a and b with semen from infected specific-pathogen-free boars. *Veterinary microbiology*, 162, 381-387.
- Guo, X., H. Hu, F. Chen, Z. Li, S. Ye, S. Cheng, M. Zhang and Q. He, 2015: iTRAQ-based comparative proteomic analysis of Vero cells infected with virulent and CV777 vaccine strain-like strains of porcine epidemic diarrhea virus. *J Proteomics*.
- Guo, X., M. Zhang, X. Zhang, X. Tan, H. Guo, W. Zeng, G. Yan, A. M. Memon, Z. Li, Y. Zhu, B. Zhang, X. Ku, M. Wu, S. Fan and Q. He, 2017: Porcine Epidemic Diarrhea Virus Induces Autophagy to Benefit Its Replication. *Viruses*, 9.
- Habtezion, A., L. P. Nguyen, H. Hadeiba and E. C. Butcher, 2016: Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology*, 150, 340-354.
- Hanke, D., M. Jenckel, A. Petrov, M. Ritzmann, J. Stadler, V. Akimkin, S. Blome, A. Pohlmann, H. Schirrmeier, M. Beer and D. Hoper, 2015a: Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis*, 21, 493-496.
- Hanke, D., M. Jenckel, A. Petrov, M. Ritzmann, J. Stadler, V. Akimkin, S. Blome, A. Pohlmann, H. Schirrmeier, M. Beer and D. Höper, 2015b: Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21, 493-496.
- Hanke, D., A. Pohlmann, C. Sauter-Louis, D. Hoper, J. Stadler, M. Ritzmann, A. Steinrigl, B. A. Schwarz, V. Akimkin, R. Fux, S. Blome and M. Beer, 2017: Porcine Epidemic Diarrhea in Europe: In-Depth Analyses of Disease Dynamics and Molecular Epidemiology. *Viruses*, 9.
- Hernandez, P. P., T. Mahlakoiv, I. Yang, V. Schwierzeck, N. Nguyen, F. Guendel, K. Gronke, B. Ryffel, C. Hoelscher, L. Dumoutier, J. C. Renaud, S. Suerbaum, P. Staeheli and A. Diefenbach, 2015: Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nature immunology*, 16, 698-707.
- Herrewegh, A. A., M. Mahler, H. J. Hedrich, B. L. Haagmans, H. F. Egberink, M. C. Horzinek, P. J. Rottier and R. J. de Groot, 1997: Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology*, 234, 349-363.
- Holtkamp, D. J., J. Myers, P. R. Thomas, L. A. Karriker, A. Ramirez, J. Zhang and C. Wang, 2017: Efficacy of an accelerated hydrogen peroxide disinfectant to inactivate porcine epidemic diarrhea virus in swine feces on metal surfaces. *Can J Vet Res*, 81, 100-107.
- Huan, C. C., Y. Wang, B. Ni, R. Wang, L. Huang, X. F. Ren, G. Z. Tong, C. Ding, H. J. Fan and X. Mao, 2015: Porcine epidemic diarrhea virus uses cell-surface heparan sulfate as an attachment factor. *Arch Virol*, 160, 1621-1628.

- Huss, A. R., L. L. Schumacher, R. A. Cochrane, E. Poulsen, J. Bai, J. C. Woodworth, S. S. Dritz, C. R. Stark and C. K. Jones, 2017: Elimination of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in an Animal Feed Manufacturing Facility. *PLoS One*, 12, e0169612.
- Jung, K. and L. J. Saif, 2015: Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J*, 204, 134-143.
- Jung, K. and L. J. Saif, 2017: Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Res Vet Sci*, 110, 12-15.
- Kamau, A. N., J. E. Park, E. S. Park, J. E. Yu, J. Rho and H. J. Shin, 2017: Porcine amino peptidase N domain VII has critical role in binding and entry of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res*, 227, 150-157.
- Kapil, S., A. M. Trent and S. M. Goyal, 1990: Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Arch Virol*, 115, 127-132.
- Kim, Y. and C. Lee, 2014: Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology*, 460-461, 180-193.
- Kim, Y., M. Yang, S. M. Goyal, M. C. Cheeran and M. Torremorell, 2017: Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus. *BMC Vet Res*, 13, 89.
- Kim, Y. K., Y. Y. Cho, B. H. An, S. I. Lim, J. A. Lim, I. S. Cho, V. P. Le and D. J. An, 2016: Molecular characterization of the spike and ORF3 genes of porcine epidemic diarrhea virus in the Philippines. *Arch Virol*, 161, 1323-1328.
- Kipar, A., M. L. Meli, K. E. Baptiste, L. J. Bowker and H. Lutz, 2010: Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. *J Gen Virol*, 91, 1698-1707.
- Knox, R. V., 2016: Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85, 83-93.
- Kotenko, S. V., G. Gallagher, V. V. Baurin, A. Lewis-Antes, M. Shen, N. K. Shah, J. A. Langer, F. Sheikh, H. Dickensheets and R. P. Donnelly, 2003: IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature immunology*, 4, 69-77.
- Kweon, C. H., B. J. Kwon, T. S. Jung, Y. J. Kee, D. H. Hur, E. K. Hwang, J. C. Rhee and S. H. An, 1993: Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*, 33, 249-254.
- Landa-Solis, C., D. Gonzalez-Espinosa, B. Guzman-Soriano, M. Snyder, G. Reyes-Teran, K. Torres and A. A. Gutierrez, 2005: Microcyn: a novel super-oxidized water with neutral pH and disinfectant activity. *J Hosp Infect*, 61, 291-299.
- Laude, H., D. Rasschaert, B. Delmas and J. F. Eleouët, 1998: Le coronavirus respiratoire porcin PRCV : un virus émergent pas comme les autres. *Virologie*, 2, 305-316.

- Lawrence, P. K., E. Bumgardner, R. F. Bey, D. Stine and R. E. Bumgarner, 2014: Genome sequences of porcine epidemic diarrhea virus: in vivo and in vitro phenotypes. *Genome announcements*, 2.
- Lee, C., 2015: Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology journal*, 12, 193.
- Lee, D. U., T. Kwon, S. H. Je, S. J. Yoo, S. W. Seo, S. Y. Sunwoo and Y. S. Lyoo, 2016: Wild boars harboring porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) may play an important role as a PEDV reservoir. *Veterinary microbiology*, 192, 90-94.
- Lee, S. and C. Lee, 2014: Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis*, 20, 1223-1226.
- Lee, S., G. S. Park, J. H. Shin and C. Lee, 2014: Full-genome sequence analysis of a variant strain of porcine epidemic diarrhea virus in South Korea. *Genome announcements*, 2.
- Li, G., Q. Chen, K. M. Harmon, K. J. Yoon, K. J. Schwartz, M. J. Hoogland, P. C. Gauger, R. G. Main and J. Zhang, 2014a: Full-Length Genome Sequence of Porcine Deltacoronavirus Strain USA/IA/2014/8734. *Genome announcements*, 2.
- Li, L., F. Fu, M. Xue, W. Chen, J. Liu, H. Shi, J. Chen, Z. Bu, L. Feng and P. Liu, 2017: IFN-lambda preferably inhibits PEDV infection of porcine intestinal epithelial cells compared with IFN-alpha. *Antiviral Res*, 140, 76-82.
- Li, R., S. Qiao, Y. Yang, Y. Su, P. Zhao, E. Zhou and G. Zhang, 2014b: Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in central China based on the ORF3 gene and the main neutralization epitopes. *Arch Virol*, 159, 1057-1065.
- Lin, C. M., X. Gao, T. Oka, A. N. Vlasova, M. A. Esseili, Q. Wang and L. J. Saif, 2015: Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains. *Journal of virology*, 89, 3332-3342.
- Lin, C. N., W. B. Chung, S. W. Chang, C. C. Wen, H. Liu, C. H. Chien and M. T. Chiou, 2014: US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014. *J Vet Med Sci*, 76, 1297-1299.
- Liu, C., J. Tang, Y. Ma, X. Liang, Y. Yang, G. Peng, Q. Qi, S. Jiang, J. Li, L. Du and F. Li, 2015: Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *Journal of virology*, 89, 6121-6125.
- Lowe, J., P. Gauger, K. Harmon, J. Zhang, J. Connor, P. Yeske, T. Loula, I. Levis, L. Dufresne and R. Main, 2014: Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis*, 20, 872-874.
- Luo, X., L. Guo, J. Zhang, Y. Xu, W. Gu, L. Feng and Y. Wang, 2017: Tight Junction Protein Occludin Is a Porcine Epidemic Diarrhea Virus Entry Factor. *Journal of virology*, 91.

- Madson, D. M., D. R. Magstadt, P. H. Arruda, H. Hoang, D. Sun, L. P. Bower, M. Bhandari, E. R. Burrough, P. C. Gauger, A. E. Pillatzki, G. W. Stevenson, B. L. Wilberts, J. Brodie, K. M. Harmon, C. Wang, R. G. Main, J. Zhang and K. J. Yoon, 2014: Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Veterinary microbiology*, 174, 60-68.
- Madson, D. M., S. Ramamoorthy, C. Kuster, N. Pal, X. J. Meng, P. G. Halbur and T. Opriessnig, 2009: Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Veterinary research*, 40, 10.
- Maes, D., H. Nauwynck, T. Rijsselaere, B. Mateusen, P. Vyt, A. de Kruif and A. Van Soom, 2008: Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology*, 70, 1337-1345.
- Maes, D., A. Van Soom, R. Appeltant, I. Arsenakis and H. Nauwynck, 2016: Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology*, 85, 27-38.
- Martelli, P., A. Lavazza, A. Nigrelli, G. Merialdi, L. Alborali and M. Pensaert, 2008: Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Veterinary Record*, 162, 307-310.
- Marthaler, D., Y. Jiang, J. Collins and K. Rossow, 2014: Complete Genome Sequence of Strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a Porcine Deltacoronavirus from the United States. *Genome announcements*, 2.
- Marthaler, D., Y. Jiang, T. Otterson, S. Goyal, K. Rossow and J. Collins, 2013: Complete Genome Sequence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain USA/Colorado/2013 from the United States. *Genome announcements*, 1.
- Masters P and Perlman S, 2013: Coronavirinae. In: Knipe D and Howley P (eds), *Fields Virology*, pp. 852-858. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Masters, P. S., 2006: The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 66, 193-292.
- McCauley, H. A. and G. Guasch, 2015: Three cheers for the goblet cell: maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends Mol Med*, 21, 492-503.
- Mesquita, J. R., R. Hakze-van der Honing, A. Almeida, M. Lourenço, W. H. van der Poel and M. S. Nascimento, 2015: Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015. *Transbound Emerg Dis*.
- Ministère de l'agriculture, 2014a: Arrêté du 12 mai 2014 modifiant l'arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
- Ministère de l'agriculture, 2014b: Note de service DGAL/SDSPA/2014-708.

- Ministère de l'agriculture, 2017: Arrêté du 4 mai 2017 modifiant l'arrêté ministériel du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
- Mora, J. R. and U. H. von Andrian, 2008: Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal immunology*, 1, 96-109.
- Mou, J., H. Fang, F. Jing, Q. Wang, Y. Liu, H. Zhu, L. Shang, X. Wang and W. Xu, 2009: Design, synthesis and primary activity evaluation of L-arginine derivatives as amino-peptidase N/CD13 inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 17, 4666-4673.
- Nam, E. and C. Lee, 2010: Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Veterinary microbiology*, 144, 41-50.
- OIE, Fiche technique de l'OIE : infection par le virus de la diarrhée épidémique porcine. www.oie.int, 4.
- Olanratmanee, E. O., A. Kunavongkrit and P. Tummaruk, 2010: Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim Reprod Sci*, 122, 42-51.
- Park, S. J., D. S. Song and B. K. Park, 2013: Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch Virol*, 158, 1533-1541.
- Pasick, J., Y. Berhane, D. Ojkic, G. Maxie, C. Embury-Hyatt, K. Swekla, K. Handel, J. Fairles and S. Alexandersen, 2014: Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transbound Emerg Dis*, 61, 397-410.
- Peace, R., J. Campbell, J. Polo, J. Crenshaw, L. Russell and A. Moeser, 2011: Spray-dried porcine plasma influences intestinal barrier function, inflammation, and diarrhea in weaned pigs. *J. Nutr.*, 141, 1312-1317.
- Pensaert, M. B. and P. de Bouk, 1978: A new coronavirus-like particule associated with diarrhea in swine. *Archives of virology*, 58.
- Pettigrew, J., 2006: Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 1. *Anim. Biotechnol.*, 17, 207-215.
- Prieto, C. and J. M. Castro, 2005: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology*, 63, 1-16.
- Prieto, C., P. Suarez, I. Simarro, C. Garcia, S. Martin-Rillo and J. M. Castro, 1997: Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 47, 647-654.

- Pujols, J. and J. Segalés, 2014: Survivability of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in bovine plasma submitted to spray drying processing and held at different time by temperature storage conditions. *Veterinary microbiology*, 174, 427-432.
- Puranaveja, S., P. Poolperm, P. Lertwatcharasarakul, S. Kesdaengsakonwut, A. Boonsoongnern, K. Urairong, P. Kitikoon, P. Choojai, R. Kedkovid, K. Teankum and R. Thanawongnuwech, 2009: Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 15, 1112-1115.
- Rose, N., S. Herve, E. Eveno, N. Barbier, F. Eono, V. Dorenlor, M. Andraud, C. Camsusou, F. Madec and G. Simon, 2013: Dynamics of influenza A virus infections in permanently infected pig farms: evidence of recurrent infections, circulation of several swine influenza viruses and reassortment events. *Veterinary research*, 44, 72.
- Rose, N., P. Renson, M. Andraud, F. Paboeuf, M. F. Le Potier and O. Bourry, 2015: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions. *Vaccine*, 33, 2493-2499.
- Sasaki, Y., J. Alvarez, S. Sekiguchi, M. Sueyoshi, S. Otake and A. Perez, 2016: Epidemiological factors associated to spread of porcine epidemic diarrhea in Japan. *Prev Vet Med*, 123, 161-167.
- Sasaki, Y., H. Toyomaki, S. Sekiguchi, M. Sueyoshi, K. Makita, S. Otake, A. Perez and J. Alvarez, 2017: Spatial dynamics of porcine epidemic diarrhea (PED) spread in the southern Kyushu, Japan. *Prev Vet Med*, 144, 81-88.
- Schindler, C., D. E. Levy and T. Decker, 2007: JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *The Journal of biological chemistry*, 282, 20059-20063.
- Schumacher, L., J. C. Woodworth, J. Zhang, P. C. Gauger, Q. Chen, M. Welch, H. Salzebrenner, J. Thomas, R. Main, S. S. Dritz, R. A. Cochrane and C. K. Jones, 2015: Determining the minimum infectious dose of PEDV in a feed matrix. *Midwest Animal Science Conference*. Des Moines, Iowa, USA.
- Schutysse, E., S. Struyf and J. Van Damme, 2003: The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & growth factor reviews*, 14, 409-426.
- Shan, Z., J. Yin, Z. Wang, P. Chen, Y. Li and L. Tang, 2015: Identification of the functional domain of the porcine epidemic diarrhoea virus receptor. *J Gen Virol*, 96, 2656-2660.
- Shekhar, S. and X. Yang, 2015: Natural killer cells in host defense against veterinary pathogens. *Veterinary immunology and immunopathology*, 168, 30-34.
- Shi, Y., Y. Lei, G. Ye, L. Sun, L. Fang, S. Xiao, Z. F. Fu, P. Yin, Y. Song and G. Peng, 2018: Identification of two antiviral inhibitors targeting 3C-like serine/3C-like protease of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary microbiology*, 213, 114-122.

- Sjostrom, H., O. Noren and J. Olsen, 2000: Structure and function of aminopeptidase N. *Advances in experimental medicine and biology*, 477, 25-34.
- Song, D., H. Moon and B. Kang, 2015: Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*, 4, 166-176.
- Song, D. and B. Park, 2012: Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44, 167-175.
- Stevens, E. E., D. N. Miller, A. Brittenham, S. J. Vitosh-Sillman, B. W. Brodersen, V. L. Jin, J. D. Loy and A. M. Schmidt, 2018: Alkaline stabilization of manure slurry inactivates porcine epidemic diarrhea virus. Available at: <https://www.aasv.org/shap/issues/v26n2/v26n2p95.pdf> (accessed 26/06/2018 2018).
- Stevenson, G. W., H. Hoang, K. J. Schwartz, E. R. Burrough, D. Sun, D. Madson, V. L. Cooper, A. Pillatzki, P. Gauger, B. J. Schmitt, L. G. Koster, M. L. Killian and K. J. Yoon, 2013: Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest*, 25, 649-654.
- Strandbygaard, B., A. Lavazza, D. Lelli, Y. Blanchard, B. Grasland, S. L. Poder, N. Rose, F. Steinbach, W. H. M. van der Poel, F. Widen, G. J. Belsham and A. Botner, 2016: Inter-laboratory study to characterize the detection of serum antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus. *Veterinary microbiology*, 197, 151-160.
- Sun, R. Q., R. J. Cai, Y. Q. Chen, P. S. Liang, D. K. Chen and C. X. Song, 2012: Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis*, 18, 161-163.
- Takahashi, K., K. Okada and K. Ohshima, 1983: An outbreak of swine diarrhoea of a new type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 45, 829-832.
- Temeeyasen, G., A. Sinha, L. G. Gimenez-Lirola, J. Q. Zhang and P. E. Pineyro, 2017: Differential gene modulation of pattern-recognition receptor TLR and RIG-I-like and downstream mediators on intestinal mucosa of pigs infected with PEDV non S-INDEL and PEDV S-INDEL strains. *Virology*.
- Thomas, J. T., Q. Chen, P. C. Gauger, L. G. Giménez-Lirola, A. Sinha, K. M. Harmon, D. M. Madson, E. R. Burrough, D. R. Magstadt, H. M. Salzbrenner, M. W. Welch, K. J. Yoon, J. J. Zimmerman and J. Zhang, 2015: Effect of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infectious Doses on Infection Outcomes in Naïve Conventional Neonatal and Weaned Pigs. *PLoS One*, 10, e0139266.
- Thompson, A. J. and S. A. Locarnini, 2007: Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunology and cell biology*, 85, 435-445.
- Toplak, I., M. Ipavec, U. Kuhar, D. Kusar, B. Papic, S. Koren and N. Toplak, 2016: Complete Genome Sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain SLO/JH-11/2015. *Genome announcements*, 4.

- Trujillo-Ortega, M. E., R. Beltran-Figueroa, M. E. Garcia-Hernandez, M. Juarez-Ramirez, A. Sotomayor-Gonzalez, E. N. Hernandez-Villegas, J. F. Becerra-Hernandez and R. E. Sarmiento-Silva, 2016: Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with the 2014 disease outbreak in Mexico: case report. *BMC Vet Res*, 12, 132.
- Tun, H. M., Z. Cai and E. Khafipour, 2016: Monitoring Survivability and Infectivity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDv) in the Infected On-Farm Earthen Manure Storages (EMS). *Front Microbiol*, 7, 265.
- USDA, 2015: Swine Enteric Coronavirus Diseases (SECD), including Porcine Epidemic Diarrhea virus (PEDv). <http://www.aphis.usda.gov/animal-health/secd>.
- Utiger, A., A. Frei, A. Carvajal and M. Ackermann, 1995: Studies on the in vitro and in vivo host range of porcine epidemic diarrhoea virus. *Advances in experimental medicine and biology*, 380, 131-133.
- Van Dijk, A., H. Everts, M. Nabuurs, R. Margry and A. Beynen, 2001: Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 68, 263–274.
- Van Reeth, K. and M. Pensaert, 1994: Prevalence of infections with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. *Vet Rec*, 135, 594-597.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer and S. Ugolini, 2008: Functions of natural killer cells. *Nature immunology*, 9, 503-510.
- Vlasova, A. N., D. Marthaler, Q. Wang, M. R. Culhane, K. D. Rossow, A. Rovira, J. Collins and L. J. Saif, 2014: Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg Infect Dis*, 20, 1620-1628.
- Wales, A., I. McLaren, A. Rabie, R. J. Gosling, F. Martelli, R. Sayers and R. Davies, 2013: Assessment of the anti-Salmonella activity of commercial formulations of organic acid products. *Avian Pathol*, 42, 268-275.
- Wales, A. D., V. M. Allen and R. H. Davies, 2010: Chemical treatment of animal feed and water for the control of Salmonella. *Foodborne Pathog Dis*, 7, 3-15.
- Wang, K., W. Lu, J. Chen, S. Xie, H. Shi, H. Hsu, W. Yu, K. Xu, C. Bian, W. B. Fischer, W. Schwarz, L. Feng and B. Sun, 2012a: PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett*, 586, 384-391.
- Wang, R., J. J. Jaw, N. C. Stutzman, Z. Zou and P. D. Sun, 2012b: Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *Journal of leukocyte biology*, 91, 299-309.
- Wicht, O., W. Li, L. Willems, T. J. Meuleman, R. W. Wubbolts, F. J. van Kuppeveld, P. J. Rottier and B. J. Bosch, 2014: Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture. *Journal of virology*, 88, 7952-7961.

- Wilson, H. L. and M. R. Obradovic, 2015: Evidence for a common mucosal immune system in the pig. *Molecular immunology*, 66, 22-34.
- Woo, P. C., S. K. Lau, C. S. Lam, C. C. Lau, A. K. Tsang, J. H. Lau, R. Bai, J. L. Teng, C. C. Tsang, M. Wang, B. J. Zheng, K. H. Chan and K. Y. Yuen, 2012: Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of virology*, 86, 3995-4008.
- Wood, E. N., 1977: An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet Rec*, 100, 243-244.
- Xie, X., Y. Li, A. Chwang, P. Ho and W. Seto, 2007: How far droplets can move in indoor environments—revisiting the Wells evaporation-falling curve. *Indoor Air*, 17, 211–225.
- Xing, Y., J. Chen, J. Tu, B. Zhang, X. Chen, H. Shi, S. C. Baker, L. Feng and Z. Chen, 2013: The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J Gen Virol*, 94, 1554-1567.
- Xu, X., H. Zhang, Q. Zhang, J. Dong, Y. Liang, Y. Huang, H. J. Liu and D. Tong, 2013a: Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression. *Virology journal*, 10, 26.
- Xu, X., H. Zhang, Q. Zhang, Y. Huang, J. Dong, Y. Liang, H. J. Liu and D. Tong, 2013b: Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression. *Veterinary microbiology*, 164, 212-221.
- Xue, X., H. Yu, H. Yang, F. Xue, Z. Wu, W. Shen, J. Li, Z. Zhou, Y. Ding, Q. Zhao, X. C. Zhang, M. Liao, M. Bartlam and Z. Rao, 2008: Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design. *Journal of virology*, 82, 2515-2527.
- Zhang, Q., X. Liu, Y. Fang, P. Zhou, Y. Wang and Y. Zhang, 2017a: Detection and phylogenetic analyses of spike genes in porcine epidemic diarrhea virus strains circulating in China in 2016-2017. *Virology journal*, 14, 194.
- Zhang, Q., J. Ma and D. Yoo, 2017b: Inhibition of NF-kappaB activity by the porcine epidemic diarrhea virus nonstructural protein 1 for innate immune evasion. *Virology*, 510, 111-126.
- Zhang, Q., K. Shi and D. Yoo, 2016: Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology*, 489, 252-268.
- Zhang, Y., Y. Tian, S. L. Lin, S. F. Sun, J. Chen, G. S. Wang, F. L. Tian and S. J. Jiang, 2017c: Two Distinct Genotypes of Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in Vaccinated Pig Flocks in Shandong Province of China, 2012-2015. *Transbound Emerg Dis*, 64, 1549-1556.
- Zhao, J., A. Harper, M. Estienne, K. Webb Jr., A. McElroy and D. Denbow, 2007: Growth performance and intestinal morphology responses in early weaned pigs to supplementation of antibiotic-

- free diets with an organic copper complex and spray-dried plasma protein in sanitary and nonsanitary environments. *J.Anim.Sci*, 85, 1302–1310.
- Zhao, S., J. Gao, L. Zhu and Q. Yang, 2014: Transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus infection induces dramatic changes in the tight junctions and microfilaments of polarized IPEC-J2 cells. *Virus Res*, 192, 34-45.
- Zhou, P., H. Fan, T. Lan, X. L. Yang, W. F. Shi, W. Zhang, Y. Zhu, Y. W. Zhang, Q. M. Xie, S. Mani, X. S. Zheng, B. Li, J. M. Li, H. Guo, G. Q. Pei, X. P. An, J. W. Chen, L. Zhou, K. J. Mai, Z. X. Wu, D. Li, D. E. Anderson, L. B. Zhang, S. Y. Li, Z. Q. Mi, T. T. He, F. Cong, P. J. Guo, R. Huang, Y. Luo, X. L. Liu, J. Chen, Y. Huang, Q. Sun, X. L. Zhang, Y. Y. Wang, S. Z. Xing, Y. S. Chen, Y. Sun, J. Li, P. Daszak, L. F. Wang, Z. L. Shi, Y. G. Tong and J. Y. Ma, 2018: Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*, 556, 255-258.

Annexe 1 : Plan Management Qualité





Plan management qualité de thèse

Sarah GALLIEN

« Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection »

Ansés – Laboratoire de PLOUFRAGAN-PLOUZANE
 Laboratoire d'Etudes et de Recherches Avicole, Porcine et Piscicole
 Unité Génétique Virale et Biosécurité (U GVB)

Directeur de thèse : B. Grasland
 Co-directeurs de thèse : N.Rose, M.Berri

Date d'application : 07/05/2018

Rédigé par : Sarah Gallien Date : 26/04/2018 Visa : 	Approuvé par : B. Grasland Date : 26/04/2018 Visa : 	Approuvé par : N.Rose Date : 26/04/18 Visa : 	Approuvé par : M.Berri Date : 27/04/18 Visa : 	Validé par : E.Chorin Date : 07/05/2018 Visa : 
---	---	--	---	--

1.	Introduction.....	2
2.	Le champ d’application du plan qualité	2
3.	La politique de management qualité des laboratoires et des unités d’accueil.....	2
3.1.	Anses	2
3.1.1.	Laboratoire Ploufragan-Plouzané.....	3
3.1.2.	Unité de Génétique Virale et Biosécurité.....	3
3.1.3.	Unité Epidémiologie et bien-être porcin.....	3
3.1.4.	SPPAE.....	3
3.2.	INRA et l’Unité Infectiologie et Santé publique	4
4.	Les acteurs du projet.....	4
4.1.	La directrice de thèse	4
4.2.	Les co-directeurs de thèse.....	4
4.3.	Le SPPAE	4
4.4.	Le LNCR.....	4
4.5.	Le chef de projet.....	5
4.6.	Le comité de pilotage	5
	Le comité de pilotage de thèse sera composé de la directrice de thèse, Béatrice Grasland, des deux co-directeurs de thèse, Mustapha Berri et Nicolas Rose, d’un représentant du LNCR, de deux extérieurs, François Meurens et de Sophie Le Poder et d’un représentant de l’école doctoral VAS, Erwan Watrin.....	5
	Le comité de thèse assure une analyse critique de l’avancée du projet et conseillera la directrice de thèse et le doctorant sur la suite du projet.....	5
4.7.	Le doctorant	5
4.8.	Les ressources humaines du laboratoire de l’Anses Ploufragan-Plouzané	5
5.	La conduite du projet de thèse	5
5.1.	Un projet formalisé	5
5.2.	Des étapes de revues	6
5.3.	La traçabilité du projet au sein de l’UGVB.....	6
	Toutes les données relatives au projet de thèse sont enregistrées, dans la mesure du possible, dans une version informatique et archivées sous P://Thèse DEP.....	7
5.4.	La traçabilité du projet au sein de l’unité ISP	7
5.5.	Des revues du système management qualité	7
5.6.	Contrôle pour la qualité du résultat final.....	7
5.7.	Processus de management des risques	7

5.8.	La clôture du projet de thèse	8
6.	La gestion des ressources.....	8
6.1.	Au sein de l'UGVB.....	8
6.1.1.	Les équipements.....	8
6.1.2.	Les consommables	9
6.1.3.	Les locaux	10
6.2.	Au sein de l'unité ISP	10
7.	La gestion des écarts	10
7.1.	Les non-conformités.....	10
7.2.	Les non-confirmations.....	11
7.3.	Les points critiques.....	11
7.4.	Les réunions de travail.....	11
7.5.	Les échanges d'informations.....	12
7.6.	La diffusion des résultats.....	12
	Annexe 1 : Organigramme de thèse.....	13
	Annexe 2 : Dossier sujet-Thèse d'université cofinancée Anses-Inra, Sujet de thèse : Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection	14
	Annexe 3 : Répartition des micropipettes et des postes de travail dans les différentes salles de l'UGVB.....	20

1. Introduction

L'assurance qualité est définie comme une partie du management visant à donner confiance en ce que les exigences pour la qualité seront satisfaites (norme ISO9000 version 2005). Elle permet de garantir au client que les exigences sont respectées à tous les stades d'un processus. La politique de management qualité de l'Anses, définie le 1^{er} Juillet 2010 par le directeur général, établit la finalité et les enjeux poursuivis par l'Anses en pérennisant l'ensemble des démarches engagées. La politique de management qualité s'étend aujourd'hui aux thèses de troisième cycle considérées comme projets à part entière. Ainsi, depuis la décision prise à la revue de direction de février 2005, un plan management qualité est défini et appliqué pour chacun des projets de thèse réalisés sur le site de Ploufragan de l'ANSES.

Le présent document est le plan management qualité (PMQ) du projet de thèse intitulé: "*Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection*". La gestion de ce projet sous assurance qualité permettra de s'assurer de son bon déroulement par la planification, l'organisation, le suivi, la maîtrise et les rapports des différents aspects du projet.

Le management qualité de ce projet de thèse s'appuiera sur les normes suivantes:

- ✓ ISO 10006: "Système de management de la qualité – Lignes directrices pour le management de la qualité des projets" pour l'établissement et la mise en œuvre du plan management qualité,
- ✓ ISO 17025: "Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais" pour la gestion des ressources.

Mots clés : confiance, traçabilité, gestion des écarts, révision.

2. Le champ d'application du plan qualité

Ce plan management qualité s'étend sur la totalité du projet de thèse. Il prend en compte l'élaboration du projet scientifique, la conduite de ce projet, la valorisation des résultats obtenus lors de ce dernier ainsi que sa clôture.

Le plan management qualité concerne les différents acteurs de ce travail de thèse. Il concerne tout d'abord l'Unité de Génétique Virale et Biosécurité (UGVB), laboratoire d'accueil de l'Anses, l'Unité Epidémiologie et Bien-Etre Porcin (UEBEP), unité collaboratrice de l'Anses, le Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation (SPPAE), animalerie de l'Anses, ainsi que l'Unité Infectiologie et Santé Publique (ISP), laboratoire d'accueil de l'Inra.

3. La politique de management qualité des laboratoires et des unités d'accueil

3.1. Anses

Les activités principales de l'Anses étant notamment l'expertise, l'évaluation des risques, la conduite de travaux de recherches, la formation et l'information, il est nécessaire que l'agence mette en œuvre des moyens pour assurer la fiabilité de ses travaux. Cette dernière

organise donc son fonctionnement en s'appuyant sur un système de management de la qualité.

3.1.1. Laboratoire Ploufragan-Plouzané

Le laboratoire est dans une dynamique d'amélioration continue de l'efficacité du management qualité depuis l'application de la version 2005 de la norme ISO 17025. Afin de mener à bien cette politique de qualité, le laboratoire a mis en place un responsable qualité responsable du Service Management Qualité (SMQ) constitué d'une responsable qualité adjointe, d'un responsable métrologie et d'une secrétaire. Ce responsable qualité s'assure de la prise en compte pertinente des différents référentiels nécessaires au management qualité du laboratoire. Le SMQ assure une tutelle technique avec les correspondants qualité et les correspondants métrologie des différentes unités et services du laboratoire et est en lien étroit avec le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) et avec le directeur via le responsable qualité.

Le laboratoire possède huit unités de recherche et d'appui scientifique, sept sur le site de Ploufragan et une sur le site de Plouzané. Parmi ces huit unités, cinq sont accréditées par le COFRAC (Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins ; Unité Mycoplasmiologie-Bactériologie ; Unité Virologie, Immunologie, Parasitologie Aviaires et Cunicoles ; Unité Virologie, Immunologie Porcines ; Unité de Pathologie Virale des Poissons).

3.1.2. Unité de Génétique Virale et Biosécurité

Depuis 2004, l'UGVB est engagée dans une démarche qualité s'appuyant à la fois sur les normes ISO 17025 et 10006. Pour cela, le chef d'unité a nommé un correspondant qualité chargé d'élaborer et de réviser le Plan Qualité de l'unité ainsi que les procédures et les modes opératoires spécifiques au fonctionnement de l'unité. La conduite de cette thèse au sein de l'unité fait partie intégrante de la démarche qualité développée par l'unité. Elle s'appuie sur son Plan Qualité ainsi que sur certaines procédures et sur certains modes opératoires s'y rattachant.

3.1.3. Unité Epidémiologie et bien-être porcin

L'unité Epidémiologie et bien-être porcin n'est pas sous management qualité.

3.1.4. SPPAE

Le SPPAE est sous management qualité pour la production des porcs EOPS et depuis 2001 a entamé une mise sous management qualité pour la partie expérimentation animale. La démarche qualité du SPPAE poursuit un double objectif :

- ✓ maîtriser la production d'animaux (en quantité et qualité) mis à disposition des scientifiques de l'Anses
- ✓ assurer la mise en place et la conduite des expérimentations commandées par les scientifiques de l'agence et en garantir la répétabilité.

La conduite de l'expérimentation animale au sein de la thèse fait partie intégrante de la démarche qualité développée par le SPPAE. Elle s'appuie sur le Plan Qualité en expérimentation animale « Secteur porcs » et sur le Plan Qualité « Production de porcs EOPS ».

3.2. INRA et l'Unité Infectiologie et Santé publique

L'INRA est engagée dans une démarche qualité depuis la fin des années 1990. En 2000, la première politique qualité s'est mise en place avec pour objectifs la fiabilité des résultats mesurables et la traçabilité des travaux de recherches. L'Inra a par la suite créé un référentiel qualité pour les équipes de recherche et d'expérimentation avec un outil d'auto-évaluation. L'INRA a redéfini sa politique qualité pour les années 2012-2016. La politique qualité est définie par le chef d'unité, il définit les orientations et priorités en cohérence avec celles de l'Institut, de son ou ses département(s) de recherche de tutelle, de son centre de recherche et, pour les UMR, de ses autres tutelles. Le chef d'unité désigne un animateur et une cellule qualité chargés de l'organisation et de la coordination de la mise en œuvre de la démarche qualité de l'unité. Il organise aussi la prise en charge de la fonction métrologie. Le support de la politique qualité est géré en tant qu'enregistrement.

L'UMR ISP s'inscrit dans la démarche qualité de l'INRA et suit le Référentiel Qualité INRA version 2 (parue en mars 2013).

4. Les acteurs du projet

Les différents acteurs ainsi que leur rôle respectif doivent être présentés dans ce plan management qualité de thèse. Le projet de thèse d'une durée de trois ans (2015-2017) est réalisé en co-tutelle. Le doctorant est encadré par une directrice de thèse et par les co-directeurs de thèse. Les relations entre les différents acteurs du projet de thèse sont définies dans l'organigramme de thèse (Annexe 1).

4.1. La directrice de thèse

Madame Béatrice Grasland de l'unité génétique virale et biosécurité du laboratoire de l'Anses de Ploufragan-Plouzané est la directrice de thèse. Elle doit s'assurer du bon déroulement de la thèse et de l'apprentissage du doctorant à travers cette thèse. Son rôle est aussi d'apprécier régulièrement la qualité des travaux conduits.

4.2. Les co-directeurs de thèse

Monsieur Mustapha Berri de l'unité mixte de recherche 1282 Infectiologie et santé publique de l'Inra de Nouzilly et monsieur Nicolas Rose de l'unité épidémiologie et bien-être porcine du laboratoire de l'Anses de Ploufragan-Plouzané sont les deux co-directeurs de thèse. Ils doivent avec la directrice de thèse s'assurer du bon déroulement de la thèse et de l'apprentissage du doctorant par la recherche. Leur rôle est aussi d'apprécier régulièrement la qualité des travaux conduits.

4.3. Le SPPAE

Le service de production de porcs assainis et d'expérimentation, SPPAE, vient appuyer le travail de thèse par sa production de porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) et par ses unités expérimentales confinées nécessaires au bon déroulement de la thèse.

4.4. Le LNCR

Le LNCR, Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs, sera un partenaire de la thèse pour l'étude de la transmission du virus de la diarrhée épidémique porcine par les semences. Il apportera aussi un soutien financier au projet de thèse. Les résultats et outils

de diagnostic obtenus pendant la thèse sur les semences au laboratoire de l'Anses Ploufragan-Plouzané lui permettront de mettre en place la détection du virus dans les semences à partir de prélèvements terrains.

4.5. Le chef de projet

La directrice de thèse a aussi le rôle de chef de projet. Elle possède une autorité et des responsabilités définies pour diriger le projet de thèse selon la norme ISO 10006. Elle doit aussi s'assurer que le système de management de la qualité du projet est établi, mis en œuvre et entretenu.

4.6. Le comité de pilotage

Le comité de pilotage de thèse sera composé de la directrice de thèse, Béatrice Grasland, des deux co-directeurs de thèse, Mustapha Berri et Nicolas Rose, d'un représentant du LNCR, de deux extérieurs, François Meurens et de Sophie Le Poder et d'un représentant de l'école doctorale VAS, Erwan Watrin.

Le comité de thèse assure une analyse critique de l'avancée du projet et conseillera la directrice de thèse et le doctorant sur la suite du projet.

4.7. Le doctorant

Le doctorant a été recruté pour réaliser les différentes activités liées au projet de thèse. Le doctorant suivra tout d'abord les orientations et consignes de sa directrice de thèse et de ses co-directeurs de thèse. Il adoptera par la suite une position plus critique sur le travail de thèse afin d'acquérir son autonomie pour devenir un chercheur opérationnel et autonome.

Le doctorant s'engage aussi à suivre certaines formations, enseignements, conférences et séminaires proposés par l'école doctorale de rattachement VAS (Vie-Agro-Santé).

4.8. Les ressources humaines du laboratoire de l'Anses Ploufragan-Plouzané

Le troisième principe du management qualité, norme ISO9000, définit le rôle du personnel. Le personnel du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané est sensibilisé à l'assurance qualité et reconnu compétent dans leurs activités. Les agents remplissent tous les ans une fiche de formation tout comme les doctorants. Une fiche personnelle, co-signée par l'intéressé et son supérieur hiérarchique, décrit les responsabilités et compétences de chacun. Elle est renseignée et actualisée régulièrement. Cela permet d'impliquer chacun des agents dans le système qualité de l'unité.

Enfin, le directeur de l'Anses Laboratoire de Ploufragan-Plouzané a nommé Michel Morin responsable qualité, afin d'aider à la formalisation du plan de management qualité de la thèse et de vérifier l'application de ses dispositions. Il est secondé au sein même de l'unité par une correspondante qualité ainsi que par un correspondant métrologie afin de veiller au respect des dispositions prises.

5. La conduite du projet de thèse

5.1. Un projet formalisé

Le projet scientifique de thèse est formalisé selon la fiche de définition du projet intitulé « Dossier sujet-Thèse d'université cofinancée Anses-Inra, Sujet de thèse : Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection » (Annexe 2).

L'objectif de ce projet est d'étudier la transmission horizontale de deux souches de virus de la diarrhée épidémique porcine (vDEP) par contact direct et indirect, d'étudier la transmission du vDEP par les semences, et d'étudier l'interaction du virus avec l'épithélium intestinal ainsi que la réponse immunitaire intestinale induite par l'infection pour comprendre la pathogénicité des souches de vDEP.

Les trois étapes établies et révisables si besoin au cours du projet sont les suivantes :

- ✓ Etude de la transmission horizontale de deux souches de vDEP
- ✓ Etude de la transmission de vDEP par les semences
- ✓ Etude et comparaison de l'immunité intestinale induite, *in vivo*, par l'infection des deux souches de vDEP

La documentation spécifique et technique du projet est disponible dans les laboratoires et unités d'accueil pour l'ensemble des différents acteurs du projet. Les différentes méthodes utilisées au cours du projet, standardisées ou non, sont consignées dans les cahiers de laboratoire spécifiques au projet de thèse.

5.2. Des étapes de revues

Le planning de déroulement de la thèse (le contenu et/ou les objectifs scientifiques, plan management qualité) sont révisables si nécessaire. Le rôle du doctorant est aussi de proposer des évolutions du projet de thèse. Celui-ci doit s'affirmer par des étapes de révision au cours de l'avancement de la thèse.

Deux étapes de révisions sont envisagées :

- ✓ Les audits internes de la thèse, à un an et deux ans après le début de cette thèse, permettront d'évaluer le respect des dispositions décrites dans le Plan Management Qualité. Si un écart existe avec ces dispositions, le projet pourra être révisé.
- ✓ Les réunions de travail pourront donner lieu à des révisions du projet.

Des étapes de revues sont aussi déterminées au début du projet afin de discuter de l'avancement du projet et des directions à prendre concernant chaque étape du planning. Ces revus sont réalisées à la fin de chaque étapes scientifiques du projet et/ou au cours de deux réunions avec le comité de pilotage de thèse. A l'issue de chaque comité un compte-rendu sera réalisé par le doctorant. Il sera ensuite diffusé à chacun des acteurs et archivé.

Les propositions de modifications faites par le doctorant sont discutées avec la directrice de thèse. En dernière instance, la directrice de thèse décide des modifications à apporter au projet de thèse. En cas de désaccord persistant, le comité de pilotage arbitrera la décision.

5.3. La traçabilité du projet au sein de l'UGVB

La traçabilité des différents travaux réalisés tout au long du projet est assurée par le cahier de laboratoire tenu quotidiennement par le doctorant et qui est propriété de l'unité. Le cahier de laboratoire contient :

- ✓ Date et intitulé des travaux,
- ✓ Description précise des travaux, au fur et à mesure de leur avancement,
- ✓ Numéros de lots des consommables critiques, cf. paragraphe VI,
- ✓ Toute nouvelle hypothèse de travail,

- ✓ Interprétations, critiques et commentaires sur les manipulations effectuées et sur les résultats obtenus,
- ✓ Réflexions visant à modifier les manipulations et/ou à améliorer les résultats constatés,
- ✓ Référencement des documents associés qui ne peuvent être intégrés au cahier comme les données informatiques,
- ✓ Compte-rendus concis des réunions avec le co-directeur et/ou le directeur. La prise de note pendant toutes les réunions est réalisée sur un cahier de réunion personnel.

Toutes les données relatives au projet de thèse sont enregistrées, dans la mesure du possible, dans une version informatique et archivées sous **P://Thèse DEP**.

Les variables matériels, locaux et consommables sont maîtrisées. Les équipements sont spécifiques d'une salle dont l'emplacement est spécifié dans le plan qualité de l'unité. Ainsi il n'est pas nécessaire d'indiquer le numéro d'inventaire de l'équipement utilisé sauf en cas de changement.

Dans le cas des micropipettes, elles sont présentes en un exemplaire unique par salle commune. Les micropipettes utilisées dans les pièces **F06202**, **F06203**, **F06204** et **F06205** sont répertoriées sur un plan de l'unité et ce document est associé au Plan Management Qualité (Annexe 3).

5.4. La traçabilité du projet au sein de l'unité ISP

La traçabilité du projet au sein de l'unité ISP est aussi réalisée via l'utilisation d'un cahier de laboratoire. Son utilisation se base sur la procédure 1282-PR-0015.

5.5. Des revues du système management qualité

D'après la norme ISO/CEI 17000 de 2004, un audit est un processus systématique, indépendant et documenté, permettant d'obtenir des enregistrements, des énoncés de faits ou d'autres informations pertinentes, et de les évaluer de manière objective pour déterminer dans quelle mesure les exigences sont respectées.

Deux audits internes sur les engagements Plan Management Qualité de thèse sont réalisés par le Responsable Qualité. Ils sont réalisés selon la procédure du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané. Le premier audit aura lieu à la fin de la première année de travail et le second à l'issue de la deuxième année de travail. Ces audits sont permettant d'examiner les processus de management en lien avec les différents acteurs, vérifier leur efficacité et rechercher des améliorations potentielles. Ils donnent lieu à des rapports d'audit qui sont communiqués aux différents membres du comité de thèse.

5.6. Contrôle pour la qualité du résultat final

Le plan management qualité de la thèse est appliqué dans le but d'obtenir des résultats fiables. Par soucis permanent de qualité des résultats, des témoins contrôles positifs ou négatifs seront utilisés.

5.7. Processus de management des risques

La notion de point critique prend en compte les incertitudes, qu'elles soient scientifiques et/ou techniques, qui pourraient être rencontrées lors des étapes de validation d'une hypothèse scientifique.

Dans notre cas, la notion de point critique est spécifiquement appliquée au projet scientifique de la thèse. Les points critiques de ce projet de thèse sont liés à la partie expérimentation animale, c'est-à-dire, à la disponibilité en porcs EOPS et en animaleries protégées.

Chaque nouveau point critique constaté est consigné dans une fiche de point critique donnant lieu à des actions curatives, correctives et/ou préventives, et récapitulant les intervenants impliqués et les éléments mis en jeu pour pallier ce point critique.

Un listing des points critiques sera établi, lorsque de nouveaux points critiques seront rencontrés. Ils seront classés avec les fiches de points critiques et une copie sera jointe en annexe de la fiche de projet de recherche de thèse.

De plus, s'il s'avère qu'un point critique ne puisse être résolu, ceci pourra conduire à une revue du projet de thèse et à une réorientation du projet selon les besoins.

Ce dispositif permettra ainsi de suivre l'évolution du projet.

5.8. La clôture du projet de thèse

Lors de la clôture du projet, une revue complète des résultats de ce dernier est entreprise. Les différents acteurs du projet interviendront pour prendre en compte les enregistrements pertinents.

Le projet de thèse se clôture par la rédaction du manuscrit de thèse et par la soutenance devant un jury amené à valider les résultats et le manuscrit. Un bilan du management qualité de la thèse sera rédigé pour les membres du jury par le responsable qualité.

Les enregistrements préparés à partir de cette revue permettront de faire ressortir les expériences susceptibles d'être réutilisées pour d'autres projets et pour l'amélioration continue.

6. La gestion des ressources

6.1. Au sein de l'UGVB

6.1.1. Les équipements

Les équipements de l'unité sont gérés selon le plan qualité de l'unité en référence à la norme ISO 17025. La procédure P.PQ9.MAT.G1 détaille les dispositions spécifiques de la gestion des équipements dans l'unité GVB qui sont appliquées en complément des dispositions communes à l'Anses Ploufragan/Plouzané. Les équipements sont inventoriés, identifiés et possèdent un dossier de vie. Une personne de l'unité est responsable de la gestion du matériel, elle est désignée comme « gestionnaire de matériel ». Cette personne est responsable de l'attribution d'un numéro d'inventaire lors de la mise en service d'un nouveau matériel, de l'inscription de ce nouveau matériel dans la liste d'inventaire et de la constitution de son dossier de vie.

Un correspondant métrologie est chargé d'assurer le suivi des vérifications de matériel. La fonction métrologie a pour but de maîtriser en permanence l'aptitude à l'emploi des moyens de mesure ou d'essais du laboratoire.

L'unité GVB a mis au point deux types de vérification périodique pour les équipements, une de type interne et une de type externe. Dans le cas de la vérification périodique interne, les agents de l'unité effectuent les vérifications des matériels soumis à un contrôle

métrologique (micropipettes, balances et pH-mètre), en collaboration avec le correspondant métrologie de l'unité (cf. Plan Qualité 9 « Démarche Qualité en Recherche »). Une centrale de mesure des températures enregistre les variations de température des enceintes thermostatées de l'Anses Ploufragan (étuves, réfrigérateurs, congélateurs et surgélateurs). Pour ce qui est de la vérification de type externe, des prestataires de service font des opérations de maintenance sur certaines catégories d'équipement (cf. procédure P.MAT.G16) ou de réparations et de vérifications métrologiques. Ces opérations sont réalisées dans le cadre d'un contrat d'entretien et visent à prévenir des dysfonctionnements éventuels.

6.1.2. Les consommables

La gestion des consommables est répertoriée dans le plan qualité de l'unité et fait référence à la norme ISO 17025. Deux types de produits consommables existent :

- ✓ les produits acquis à l'extérieur comme les antibiotiques, les additifs, les produits chimiques, les colorants, les milieux de culture, le matériel plastique à usage unique, les produits spécifiques à la biologie moléculaire ou encore les produits biologiques
- ✓ les produits fabriqués dans l'unité.

Les procédures P.PQ9.CON.G1 et P.PQ9.CON.G2 détaillent respectivement la gestion des consommables communs au sein de l'UGVB, consommables qui ont été préalablement gérés par le magasin central ou par l'UGVB dans le cas des consommables spécifiques. La procédure P.PQ9.CON.G1 décrit les modalités de commande de réception, d'identification, de stockage et de gestion des consommables communs dans l'unité. Et la procédure P.PQ9.CON.G2 explique comment rechercher un consommable spécifique, les lieux de stockage, la gestion d'un article, la gestion des stocks, la gestion des consommables spécifiques préparés dans l'unité. La qualité des consommables est évaluée à leur arrivée par le personnel présent à la réception.

Tous les consommables ont un numéro de lot. Dans le cas du projet, seuls les consommables critiques sont tracés au fur et à mesure de leur utilisation sur le cahier de laboratoire. Les consommables critiques sont les consommables chimiques et/ou biologiques qui peuvent avoir une influence sur la qualité du résultat. Les contenants et accessoires ne sont pas tracés.

La procédure de P.MAT.G1 correspond au choix des fournisseurs de matériels et la procédure P.CON.G3, à celui des fournisseurs de consommable. Ces deux procédures indiquent les règles de mise en concurrence des fournisseurs qui ont été décidées dans le cadre de la délégation de responsabilité des marchés. Les prestations des fournisseurs de matériels et de consommables doivent être évaluées afin de valider l'aptitude de ceux-ci à fournir un matériel et/ou un produit conforme aux exigences de l'Anses. La procédure P.MAT.G5, permet l'évaluation des fournisseurs de matériels. P.CON.G5 permet, quant à elle, l'évaluation des fournisseurs de consommable. Le résultat des évaluations des fournisseurs de matériels et de consommables est utilisé comme critère pertinent pour la sélection de ces fournisseurs.

6.1.3. Les locaux

L'identification des bâtiments et des salles de l'UGVB (Annexe 3) est établie selon une numérotation commune de l'Anses site Ploufragan/Plouzané décrite dans le Manuel d'Assurance Qualité. Le bâtiment de l'UGVB se trouve sur le site des Croix de l'Anses de Ploufragan/Plouzané et correspond au bâtiment F06. L'accès à ce bâtiment se fait par le bâtiment F15 correspondant à l'accueil du site des Croix. Cet accès est contrôlé via un digicode situé sur les portes d'accès extérieures et via un registre pour les visiteurs autorisés à pénétrer dans les locaux.

L'accès au laboratoire UGVB nécessite de retirer les vêtements et chaussures de l'extérieur dans un premier vestiaire. Les vêtements de travail sont récupérés dans un deuxième vestiaire après passage par un sas.

Le bâtiment est en dépression par rapport à l'extérieur et possède une climatisation ainsi qu'un système de filtration de l'air sur filtres à haute efficacité ($0,22\mu$ au soufflage et à la reprise d'air). L'unité est aménagée de manière à disposer de salles spécifiques à des activités qui sont soit en dépression soit en surpression par rapport au couloir.

Au cours de la thèse les manipulations sont réalisées majoritairement dans la salle F06205, correspondant à la salle de laboratoire de l'équipe circovirus émergents. Les techniques plus spécifiques sont réalisées dans les salles prévues à cet effet (Annexe 3).

Le site des Croix de l'Anses Ploufragan-Plouzané respecte l'environnement lors de l'élimination des déchets et des effluents. Chaque unité a formalisé cette gestion des déchets. Dans le cas de l'unité GVB, les déchets non biologiques sont conditionnés en sacs plastiques et placés dans la poubelle présente dans le SAS F06121a. Les déchets biologiques sont également conditionnés en sacs plastiques puis autoclavés au laboratoire avant incinération dans un centre agréé. Les déchets chimiques liquides sont placés dans un bidon présent dans le SAS F06121a (Procédure P.PQ9.SE.D1). L'ensemble des effluents est traité par la chaleur dans une station de traitement.

6.2. Au sein de l'unité ISP

Un suivi métrologique des équipements est réalisé : les masses, les volumes et les températures sont vérifiés. Chaque balance est vérifiée en interne par le responsable métrologie des masses. La vérification des pipettes est réalisée via deux systèmes : un système colorimétrie pour les volumes nominaux inférieurs ou égaux à $100\mu\text{l}$ et un système gravimétrique pour les volumes nominaux supérieurs à $100\mu\text{l}$. Cette vérification est faite par le responsable métrologie des volumes. Des thermomètres étalons d'unité sont disponibles et étalonnés dans chaque unité.

7. La gestion des écarts

7.1. Les non-conformités

Une non-conformité est une non-satisfaction d'une exigence du Système Qualité et/ou d'exigences convenues avec le Client (Norme ISO9000, 2005).

La non-conformité constatée est consignée sur une fiche de progrès qui donne lieu à des actions curatives, correctives et/ou préventives. Celle-ci est gérée selon la procédure générale P.ACT.A1 qui spécifie la gestion des non-conformités détectées en rapport avec les consommables ou avec tout autre type de ressources.

Dans notre cas, les non-conformités regroupent surtout les problèmes techniques, comme le dysfonctionnement de matériel et/ou la mauvaise qualité des produits utilisés.

7.2. Les non-confirmations

Le terme de non-confirmation est spécifique à l'Anses. Les non-confirmations incluent les hypothèses invalidées et les résultats non confirmés par d'autres expériences, voire non reproductibles.

La gestion de ces cas est consignée dans le cahier de laboratoire et discutée avec le directeur de thèse et les co-directeurs de thèse.

Une non-confirmation peut provoquer une revue de projet suivant les besoins.

7.3. Les points critiques

Les points critiques de ce projet de thèse sont liés à la partie expérimentation animale, c'est-à-dire, à la disponibilité en porcs EOPS et en animaleries protégées.

7.4. Les réunions de travail

Les réunions de travail ont pour but d'informer les différents acteurs de la thèse du travail réalisé et de discuter de l'avancement du projet de thèse, des résultats, des hypothèses et des écarts s'il en existe.

Plusieurs réunions seront organisées pendant la durée de la thèse, et auront chacune un objectif prédéfini :

- Des réunions d'avancement entre la directrice de thèse et le doctorant pendant lesquelles un suivi des manipulations et des bilans préliminaires seront discutés. Ces réunions auront lieu en moyenne une fois par semaine dans la mesure du possible, ou si l'une des personnes est absente, dès son retour. Elles se clôtureront par la signature du cahier de laboratoire par les deux acteurs du projet, ce qui se traduit par un accord des deux parties pour le bilan et les nouvelles hypothèses discutées. Des comptes rendus concis seront consignés à la suite dans le cahier de laboratoire.
- Les réunions qualité hebdomadaires sont organisées en présence de tous les membres de l'équipe afin de discuter de la gestion du système qualité et du bon fonctionnement du laboratoire.
- Des réunions occasionnelles avec la directrice de projet et les co-directeurs de thèse seront l'occasion de faire un bilan complet du projet.
- Les réunions scientifiques mensuelles de l'unité permettent au doctorant d'échanger de façon brève ou détaillé sur ses travaux de recherche avec tous les membres de l'unité.
- Les réunions scientifiques de site, mensuelles, sont organisées par roulement entre les équipes du site pour leur permettre de présenter leurs travaux et résultats, de s'informer sur les travaux en cours dans les autres équipes et d'obtenir un avis extérieur sur la conduite de son projet.
- Des réunions supplémentaires pourront être organisées entre le doctorant et les responsables du projet, chef de projet et/ou directeur de thèse, et/ou les membres du comité de pilotage si besoin est.

Toutes réflexions conduisant à de nouvelles hypothèses de travail ou réorientations du projet discutées lors d'une de ces réunions seront consignées par un compte-rendu concis dans le cahier de laboratoire.

7.5. Les échanges d'informations

La communication au sein de l'unité et entre les différentes unités se fait par messagerie électronique, par téléphone et par réunion.

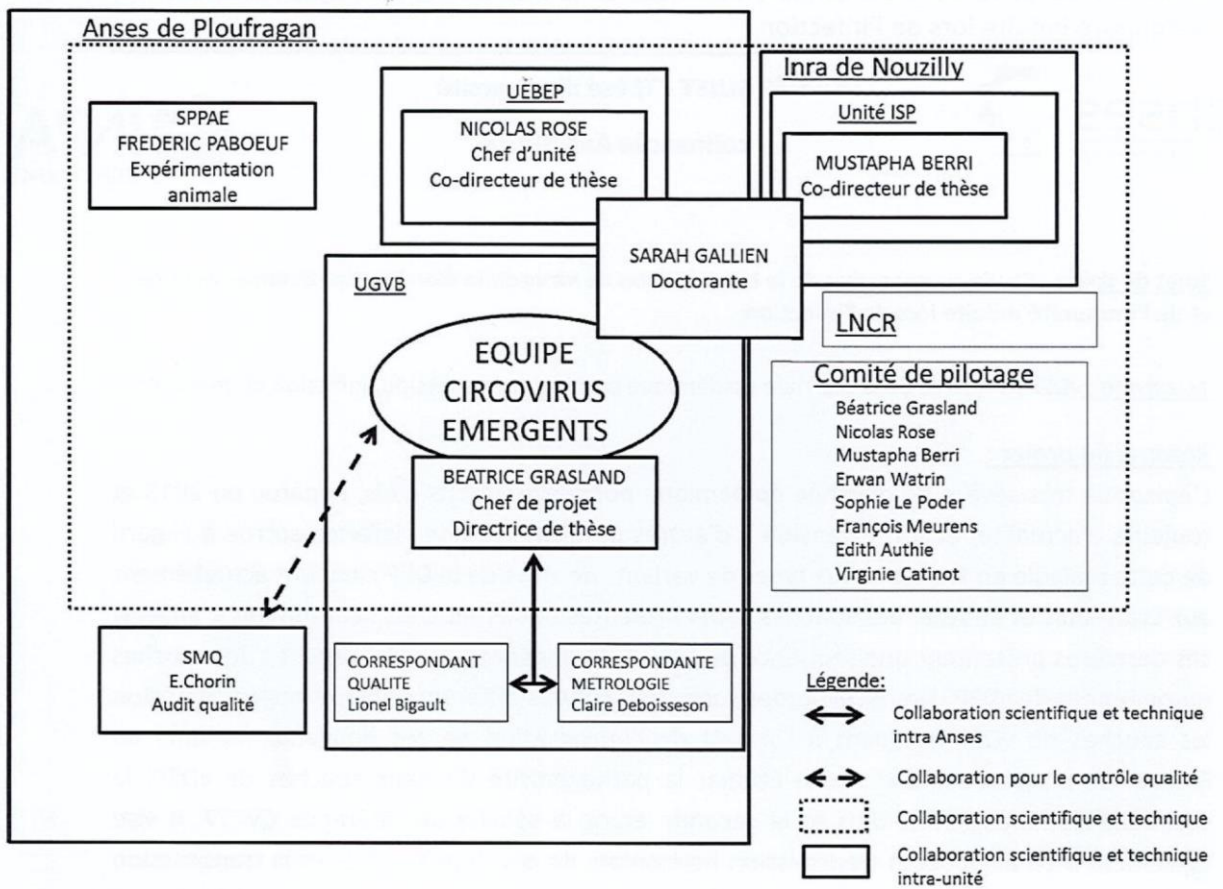
La transmission d'information aux autres parties impliquées dans le travail de thèse est gérée par des échanges de mails. Ces mails seront par la suite archivés dans un fichier d'archivage des documents qualité. Ce fichier d'archivage se trouve sous p://thèse DEP-Qualité-Archives. Il décrit les documents qualité, leurs codifications, la liste de diffusion, les rédacteurs, la date de mise en œuvre et le lieu d'archivage de chacun des documents qualité.

7.6. La diffusion des résultats

Le doctorant réalisera des synthèses bibliographiques partielles, sur les sujets de bibliographie qu'il aura étudiés, dans un premier temps.

D'autre part, le projet de thèse aboutira à la réalisation de contributions scientifiques. Elles peuvent se faire de plusieurs manières : participations à des colloques, présentation de posters, une ou plusieurs publications, et le manuscrit de la thèse réalisé à la fin du projet. Pour tous travaux réalisés par le doctorant portant sur le projet de thèse, le nom du doctorant figurera en premier auteur.

Annexe 1 : Organigramme de thèse



Annexe 2 : Dossier sujet-Thèse d'université cofinancée Anses-Inra, Sujet de thèse : Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection



DOSSIER SUJET - Thèse d'université
cofinancée Anses-Inra



Sujet de thèse : Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection

Acronyme : vDEPTII (Virus de la diarrhée épidémique porcine : transmission, infection et immunité)

Résumé du projet :

L'épizootie très sévère de diarrhée épidémique porcine aux Etats-Unis, apparue en 2013 et toujours d'actualité, et son extension à d'autres pays motive une vigilance accrue à l'égard de cette maladie en France. Deux types de variants de virus de la DEP circulent actuellement aux Etats-Unis et en Asie, des souches hypervirulentes et des souches dénommées « InDel », ces dernières présentant une séquence du gène S phylogénétiquement proches des souches européennes de vDEP. Des incertitudes subsistent sur des différences de pathogénicité selon les souches de vDEP et quant à l'impact de l'introduction de ces nouveaux variants en France. Le projet de thèse vise à étudier la pathogénicité de deux souches de vDEP, la première isolée aux Etats-Unis et la seconde étant la souche de référence CV777. Il vise également à caractériser la transmission horizontale de ces deux souches et la transmission vénérienne du vDEP par les semences. Enfin la dernière partie de ce projet sera d'étudier et comparer l'immunité intestinale induite, *in vivo*, par l'infection des deux souches de vDEP. Ce projet de thèse en trois parties permettra de mieux comprendre les différences de pathogénie entre les souches en apportant des éléments objectifs sur le plan clinique, sur la capacité des souches à se propager au sein des populations porcines *via* la transmission horizontale mais aussi verticale et sur la mise en place de la réponse immunitaire digestive.

Mots clés : diarrhée, transmission, immunité digestive, porc, vDEP

Contexte :

Depuis 2013, une épizootie sévère de diarrhée épidémique porcine (DEP) affecte les Etats-Unis et s'étend aujourd'hui à plusieurs pays dans le monde. Les signes cliniques sont une diarrhée aqueuse pouvant être accompagnée de vomissements. Les porcelets sous la mère sont les animaux principalement affectés et les taux de mortalité observés chez cette catégorie d'animaux lors de cette épizootie atteignent 95-100%. Les animaux adultes peuvent être touchés mais le taux de mortalité est au maximum de 5%. La maladie est causée par un alphacoronavirus appelé virus de la DEP (vDEP) et qui ne présente pas de caractère zoonotique. L'épizootie majeure de DEP qui sévit actuellement dans plusieurs parties du monde (Amérique, Asie) témoigne de la pathogénicité élevée de nouveaux variants de vDEP isolés en Chine et en Amérique du Nord ainsi que de l'efficacité et de la rapidité de leur transmission. En France, la DEP a été ajoutée à la liste des dangers sanitaires de première catégorie rendant obligatoire la déclaration de tous cas de DEP. Les données physio-pathologiques sur les nouveaux variants de vDEP mettent en évidence une pathogénicité beaucoup plus importante que les virus de DEP circulant en Europe dans les années 1980 et que les souches « InDel » isolées ultérieurement aux USA (Grasland and Rose, 2014).

Les données épidémiologiques mettent en évidence, qu'au-delà des animaux vivants infectés, le vDEP peut être propagé efficacement par l'activité humaine lors d'intervention dans les élevages (transport mécanique), ou par l'intermédiaire de matériel contaminé. La transmission du virus par voie vénérienne n'est pas connue à l'heure actuelle. Elle est néanmoins possible puisqu'une phase de virémie est observée au moins lors de primo-infection. La durée de cette virémie n'est cependant pas connue. Cette hypothèse est également supportée par la détection de génome viral dans les semences provenant de verrats infectés présents dans un centre d'insémination artificielle affecté par la DEP (Dufresne and Robbins, 2014). L'ARN du virus de la DEP a également été détecté dans la semence de verrats en bonne santé et issus de 3 élevages différents en Chine, avec un nombre de copies de génome allant de $10^{1.46}$ à $10^{3.65}$ /ml (Sun et al., 2014). Cependant la possibilité d'une contamination croisée par des fèces lors de la collecte ou la préparation de la semence ne peut être exclue.

Depuis l'épizootie qui touche les Etats-Unis, la situation Européenne à l'égard de cette maladie est une question récurrente. En Allemagne et en Italie, des cas de DEP ont été rapportés en 2014. Les séquences des souches isolées indiquent que ces souches se regroupent dans les deux pays avec les souches américaines moins virulents de type « InDel ». En outre, une étude sérologique réalisée en 2014 en Italie montre des résultats positifs DEP dans 11 des 21 élevages testés avec des séroprévalences intra-élevage allant de 7 à 52% (Sozzi et al., 2014). En France, 300 sérums de truies prélevés en 2014 ont été testés pour la présence d'anticorps anti-vDEP. La fréquence de truies séropositives est de 3,6% au niveau individuel (Grasland et al., 2014). Au Danemark, tous les sérums testés de 2000 à 2006 (± 2500 sérums/an) sont négatifs de même qu'en Belgique (n=460 sérums, 2014). Au Royaume-Uni, une étude sur un échantillon représentatif de la population des porcs

charcutiers abattus dans le pays (n=558, 2013) a mis en évidence 9,0% de sérums positifs. Il ressort ainsi que la situation en Europe est très inégale avec des niveaux de séroprévalence et de circulation du virus vraisemblablement très différents selon les pays. En outre, même en présence d'une certaine immunité de population, la protection croisée entre les souches n'est pas garantie. Ainsi aux Etats-Unis, un cas d'infections consécutives dans un élevage par le variant « InDel » puis par une souche hypervirulente 6 semaines après, a été rapporté avec une clinique atténuée mais une absence de protection totale conférée par l'infection préalable.

De plus l'ampleur de l'épizootie aux Etats-Unis contraste fortement avec les cas sporadiques décrits en Europe. Ces différences ne sont pas expliquées pour le moment. Elles peuvent reposer sur des différences de pathogénie intrinsèques aux souches conférant une aptitude plus ou moins importante à se propager au sein de la population. Par ailleurs, la capacité des différentes souches du virus vDEP à induire une pathogénie et à se propager dans une population dépend aussi des interactions cellulaires et moléculaires mises en œuvre avec le tissu cible et la réponse immunitaire de l'hôte.

Objectifs :

Les objectifs de ce projet de thèse sont :

1. Etudier la transmission horizontale de deux souches de vDEP (souche européenne CV777 et souche hypervirulente isolée aux USA) par contact direct et indirect
2. Etudier la transmission du vDEP par les semences
3. Etudier l'interaction du virus vDEP avec l'épithélium intestinal ainsi que la réponse immunitaire intestinale induite par l'infection pour comprendre les différences possibles de transmission

Avancées attendues par rapport à l'état de l'art :

Les travaux réalisés au cours de cette thèse permettront de mieux comprendre les différences de pathogénie entre les souches en apportant des éléments objectifs sur le plan clinique mais aussi des éléments quantitatifs sur l'aptitude de ces souches à se propager au sein des populations porcines *via* la transmission horizontale (estimation du taux de reproduction de base) mais aussi verticale. Les données obtenues permettront aussi d'améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires et cellulaires mises en œuvre par ces deux types de souches à infecter son hôte, induire une réponse immunitaire et se propager dans une population. En effet, élucider les mécanismes d'adaptation de l'hôte aux virus en général et au vDEP en particulier devrait avoir des implications majeures pour la compréhension de l'émergence de nouveaux variants et le développement de stratégies prophylactiques efficaces pour éviter la propagation du virus et augmenter la résistance et la protection des animaux.

Intérêt de la collaboration entre les deux organismes :

INRA ISP : Expertise dans le domaine de l'immunité digestive et respiratoire du porc, disponibilité des anticorps spécifiques de l'immunité porcine et une batterie d'amorces pour amplifier un large panel de médiateurs de l'immunité (Delgado-Ortega et al., 2014).

Anses Laboratoire de Ploufragan/Plouzané : Expertise sur l'étude de la transmission de pathogènes du porc (cf études précédentes sur le circovirus porcin de type 2), expertise sur le virus vDEP (outils de détection, protocole d'infection, évaluation de la réplication), animaleries de niveau de biosécurité 3 pour la réalisation de bio-essais.

Description détaillée du travail :

1. Etude de la transmission horizontale de deux souches de vDEP

1.1. Deux bio-essais sur porcelets EOPS âgés de 3 semaines seront réalisés avec une souche hypervirulente de vDEP isolée aux USA et avec la souche de référence Européenne CV777 avec mise en contact soit direct soit indirect avec un groupe d'animaux infectés par l'une ou l'autre des souches de vDEP. Un groupe de porcelets témoins inoculés avec du milieu de culture uniquement sera présent dans chaque essai. Les doses utilisées permettront d'obtenir une infection virale et une réponse immunitaire sans causer de mortalité animale. Le protocole suivra un protocole expérimental déjà utilisé pour évaluer cette transmission pour un autre pathogène (Andraud et al., 2008). Les signes cliniques seront examinés tous les jours. Des prélèvements de fèces seront réalisés tous les jours la première semaine post-inoculation puis deux fois par semaine pour évaluer l'excrétion virale dans les fèces. Des prélèvements sanguins seront effectués deux fois par semaines jusqu'à la fin de l'expérimentation pour vérifier l'existence d'une virémie et sa durée et déterminer le moment de la séroconversion. Des porcelets infectés et contrôles seront euthanasiés à 4 et 35 jours post-inoculation. Des prélèvements d'organes dont le duodénum, jéjunum, iléon, colon et ganglion mésentérique seront effectués pour l'étude de la réponse immunitaire digestive.

Ces deux bio-essais permettront :

1.2. La caractérisation de l'infection *in vivo* par une souche hypervirulente vDEP et par la souche de référence CV777.

1.3. L'étude de la transmission horizontale des deux souches par contact direct et par contact indirect

1.4. La détermination des paramètres de transmission des deux souches de vDEP

2. Etude de la transmission du vDEP par les semences

2.1. Evaluation de la présence du vDEP dans des semences

Des semences collectées sur des verrats de centre d'insémination artificielle par le Laboratoire national du contrôle des reproducteurs seront testées pour déterminer la présence d'ARN viral.

2.2. Evaluation de la transmission du vDEP par les semences en conditions expérimentales

Un bio-essai sera réalisé afin de déterminer si le vDEP est excrété dans les semences de porcs après une infection de verrats par voie orale avec une souche hypervirulente de vDEP selon un protocole expérimental déjà utilisé pour évaluer cette transmission vénérienne pour un autre pathogène (Grasland et al., 2013). Les différentes fractions (fraction séminale, fraction riche en spermatozoïdes) du sperme seront testées pour évaluer la présence et la charge génomique du virus pendant plusieurs semaines post-inoculation.

Si des semences s'avèrent positives pour la présence de génome viral, le pouvoir infectieux du virus présent dans les semences sera d'abord évalué *in vitro* sur culture cellulaire de cellules VERO puis par inoculation des semences positives à des porcelets EOPS par voie intra-péritonéale.

3. Etude et comparaison de l'immunité intestinale induite, *in vivo*, par l'infection de deux souches de vDEP

Une analyse sérique des différentes classes d'anticorps (IgM, IgA et IgG) sera réalisée sur les prélèvements effectués lors des deux premiers bio-essais. Le tissu épithélial intestinal cible, le tropisme cellulaire, le pouvoir d'adhésion et d'invasion ainsi que les différentes voies d'entrée des deux souches seront analysés par microscopie confocale ou par microscopie électronique. Le pouvoir d'adhésion et d'invasion pourra aussi être évalué sur des explants de tissu pour les temps courts d'infection. Les différents paramètres impliqués dans le recrutement et l'activation des populations de cellules immunitaires nécessaires à la réponse protectrice cellulaire ou humorale et notamment les plasmocytes à IgA seront évalués.

- Analyse des populations lymphocytaires (Lymphocytes B, T et des cellules dendritiques) par Immunohistochimie ou par FACS

-Analyse de l'activation de ces différentes populations cellulaires en évaluant leur capacité à produire des cytokines

- Analyse de la production locale des IgA par ELISA et par immunohistochimie et la capacité des plasmocytes à produire à IgA par la technique d'ELISPOT

- Analyse, par RT-qPCR, de l'expression des cytokines TGF β et IL-10, les chimiokines CCL20, CCL25, CCL28, l'adressine vasculaire MAdCAM-1 et leurs récepteurs respectifs CCR6, CCR9, CCR10 et α 4b7 impliqués dans la domiciliation des plasmocytes à IgA (Levast et al., 2010).

Résultats attendus et stratégie d'exploitation et de valorisation des résultats :

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse vont nous permettre :

i) d'évaluer et de comprendre les différences de pathogénie entre les souches de vDEP en comparant notamment l'aptitude de ces souches à se propager au sein des populations porcines *via* la transmission horizontale (estimation du taux de reproduction de base) mais aussi verticale

ii) d'évaluer la réponse immunitaire intestinale locale en relation avec la virulence de la souche

Ces résultats seront valorisés au minimum par une publication internationale à comité de lecture et par des présentations lors de congrès nationaux et internationaux.

Collaborations nationales ou internationales sur le sujet :

Le laboratoire national de contrôle des reproducteurs (LNCR) sera partenaire de ce projet de thèse pour l'étude de la transmission du vDEP par les semences. Il pourra mettre en place la détection du virus dans les semences à partir de prélèvements terrains après transfert des outils de diagnostic de l'Anses Ploufragan vers le LNCR.

Collaboration internationale entre 5 instituts européens (DTU-Vet, CVI, SVA, AHVLA, Anses) dans le cadre d'un projet CoVetLab sur la détection et la caractérisation de coronavirus porcin dont le vDEP.

Calendrier prévisionnel du travail et livrables :

Livrables	Planning (en semestres)					
	1	2	3	4	5	6
(1) Connaissance et prise en main du projet (bibliographie, techniques)	■					
(2) Réalisation d'un bio-essai avec la souche européenne CV777 avec des animaux contact direct et indirect	■					
(3) Caractérisation de l'infection <i>in vivo</i> par la souche de référence CV777.	■	■				
(4) Caractérisation des paramètres de transmission horizontale de la souche CV777		■	■			
(5) Réalisation d'un bio-essai avec une souche hypervirulente avec des animaux contact direct et indirect			■			
(6) Caractérisation de l'infection <i>in vivo</i> par une souche hypervirulente			■	■		
(7) Caractérisation des paramètres de transmission horizontale par une souche hypervirulente				■		
(8) Evaluation de la présence du vDEP dans des semences	■	■	■			
(9) Evaluation de la transmission du vDEP dans des semences				■	■	
(11) Etude et comparaison de l'immunité digestive induite par l'infection <i>in vivo</i> de deux souches de vDEP			■	■	■	
(12) Rédaction (articles, manuscrit thèse)						■

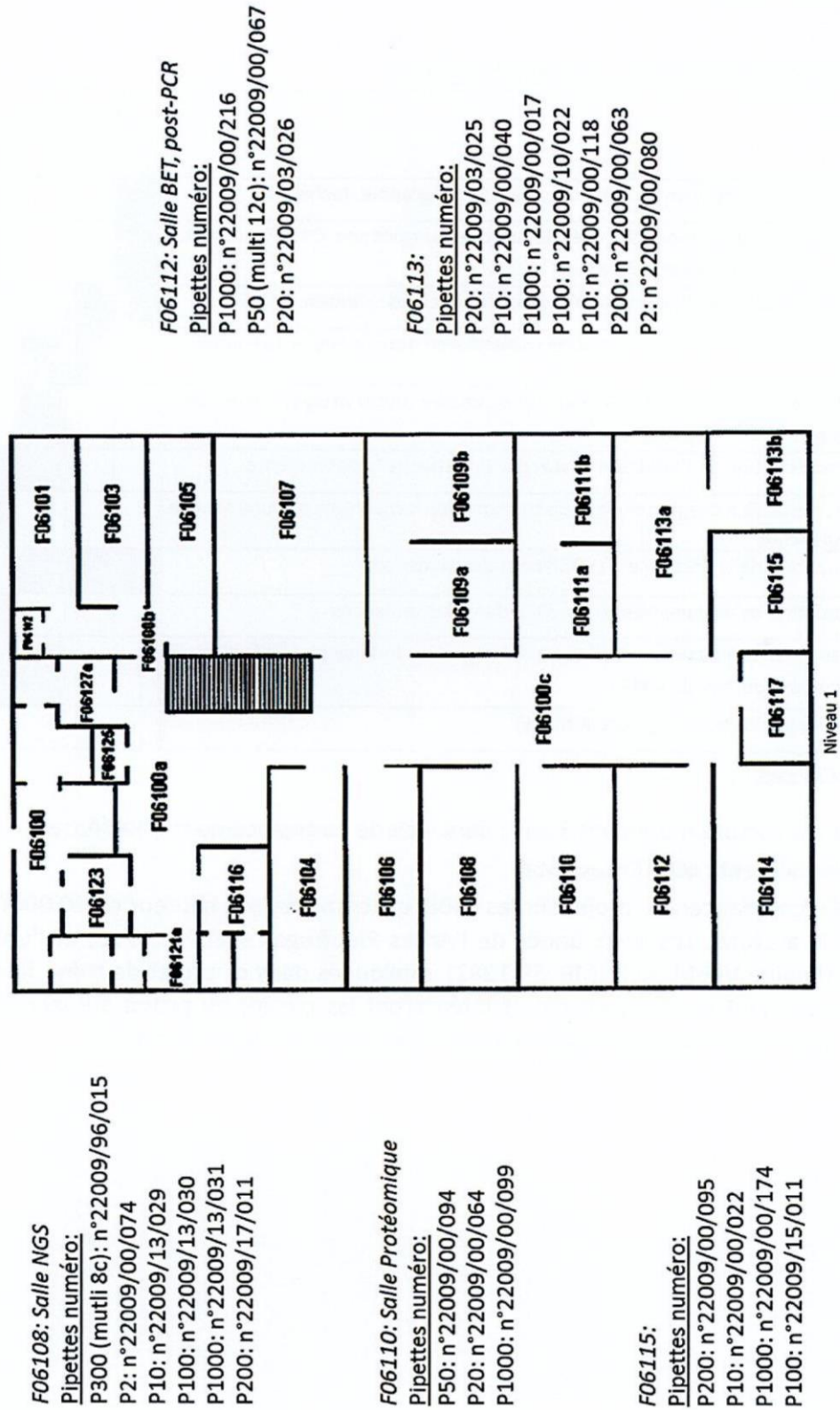
Coût du projet :

Salaire du doctorant pendant 3 ans : demande de co-financement INRA/Anses

Fonctionnement : 60 000€ au total

Le LNCR co-financera le projet sur les coûts expérimentaux à hauteur de 10 000€ par an soit 30 000€ au total. Les deux unités de l'Anses Ploufragan (EBEP et GVB) et l'unité INRA de Tours (Equipe VIRIM de l'UMR ISP 1282) impliquées dans ce projet de thèse financeront en partie ce projet sur fond propre et intégreront les parties du projet qui leur sont propres dans des projets répondant à des appels à projets sur un mode compétitif.

Annexe 3 : Répartition des micropipettes et des postes de travail dans les différentes salles de l'UGVB



F06202: Laboratoire protéomique

- Pipettes numéro:
 P10: n°22009/00/089
 P20: n°22009/00/082
 P1000: n°22009/00/087
 P50 (multi 8c): n°22009/00/501
 P40: n°22009/00/075
 P200: n°22009/00/173
 P100: n°22009/17/014
 P10: n°22009/17/015
 P2: n°22009/17/016
 P200: n°22009/17/018
 P1000: n°22009/17/019
 P200: n°22009/00/096

F06218: Salle culture cellulaire

- Pipettes numéro:
 P200: n°22009/00/068
 P20: n°22009/00/069
 P1000: n°22009/00/032
 P300 (multi 12c): n°22009/00/506

F06209: Salle PCR1

- Pipettes numéro:
 P20: n°22009/00/073
 P2: n°22009/15/002
 P10: n°22009/03/023
 P200: n°22009/00/039

F06203: Laboratoire génomique

- Pipettes numéro:
 P50: n°22009/00/028
 P10: n°22009/00/029
 P200: n°22009/00/030
 P1000: n°22009/00/081
 P1000: n°22009/00/086
 P10: n°22009/09/009
 P200: n°22009/00/078
 P20: n°22009/00/120
 P200: n°22009/03/027
 P1000: n°22009/03/028
 P50 (multi 8c): n°22009/00/502
 P300 (multi 8c): n°22009/99/011
 P100: n°22009/00/005
 P2: n°22009/00/079
 P10 (multi 8c): n°22009/13/019

F06213: Salle séquenceur

- Pipettes numéro:
 P20: n°22009/00/035
 P200: n°22009/00/119
 P10: n°22009/00/121
 P2: n°22009/10/025
 P50 (multi 8c): n°22009/96/014
 P300 (multi 8c): n°22009/00/127
 P50 (multi 12c): n°22009/00/066
 P10 (multi 8c): n°22009/00/128
 P100: n°22009/09/012

F06204: Laboratoire équipe ADN nu

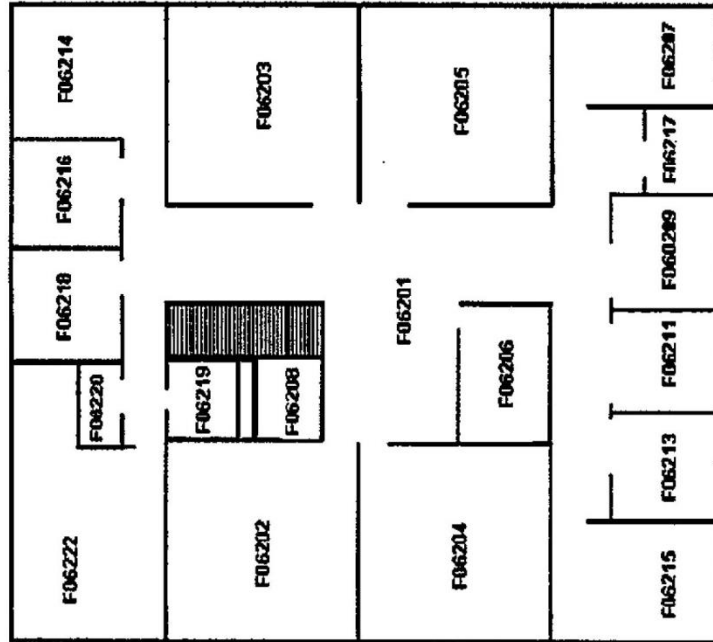
- Pipettes numéro:
 P1000: n°22009/00/008
 P1000: n°22009/00/025
 P20: n°22009/15/009
 P100: n°22009/00/054
 P10: n°22009/96/060
 P200: n°22009/00/055
 P10: n°22009/00/056
 P300 (multi 8c): n°22009/10/023
 P10: n°22009/00/105
 P3: n°22009/03/010
 P300 (multi 12c): n°22009/00/037

F06205: Laboratoire circo

- Pipettes numéro:
 P200: n°22009/00/014
 P1000: n°22009/00/071
 P1000: n°22009/00/031
 P40: n°22009/96/061
 P300 (multi 8c): n°22009/00/505
 P100 (multi 8c): n°22009/03/012
 P2: n°22009/00/053
 P300 (multi 12c): n°22009/10/021
 P20: n°22009/00/002
 P50 (multi 8c): n°22009/03/006
 P1000 (multi 8c): 22009/12/010
 P100: n°22009/15/010
 P200: n°22009/00/009
 P30: n°22009/03/009
 P10: n°22009/00/065
 P1000: n°22009/00/023
 P1000 (multi 8c): n°22009/13/016

F06214: Salle prémix

- Pipettes numéro:
 P200: n°22009/00/106
 P20: n°22009/15/001
 P1000: n°22009/10/024
 P10: n°22009/03/024



COULOIR SAS COMMUN VIRDLOGIE

Niveau 2

- F06211: Salle PCR quantitative**
Pipettes numéro:
 P200: n°22009/00/007
 P10: n°22009/00/046
 P2: n°22009/10/026
- F06215: Salle bactériologie**
Pipettes numéro:
 P1000: n°22009/00/088
 P200: n°22009/00/010
 P10: n°22009/00/021

Annexe 2 : Revue scientifique sur le PEDV



Diarrhée épidémique porcine : le retour d'une « ancienne » maladie

Sarah Gallien^{1,2,3}
 Sophie Le Poder⁴
 Nicolas Rose^{2,3}
 Béatrice Grasland^{1,3}

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané, Unité de génétique virale et biosécurité, 22440 Ploufragan, France

² Anses, Laboratoire de Ploufragan/Plouzané, Unité d'épidémiologie et bien-être porcin, 22440 Ploufragan, France

³ Université Bretagne Loire, Rennes, France

<sarah.gallien@anses.fr>

⁴ UMR 1161 Virologie, INRA-ENVA-Anses, Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort, Université Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort

Résumé. En 2013, 40 ans après le premier cas de diarrhée épidémique porcine (DEP) en Europe, la DEP est apparue aux États-Unis jusqu'alors indemne de cette maladie. Le coronavirus responsable de la maladie, le virus de la DEP (PEDV) s'est rapidement propagé dans tout le pays et dans plusieurs pays d'Amérique entraînant un impact significatif sur la production de porcs (perte de 10 % de la production totale aux États-Unis). Deux types de souches ont été identifiés : des souches hautement virulentes dites « non-InDel », et des souches dites « InDel » de part des insertions/délétions dans le gène *S* et associées à des cas cliniques moins sévères. L'infection par le PEDV provoque l'apparition de diarrhées aqueuses et peut entraîner 100 % de mortalité chez les porcelets nouveau-nés. Cette revue fait le bilan des connaissances actuelles sur le virus, sa transmission et l'épidémiologie moléculaire mondiale, sur la physiopathologie de la maladie et les moyens de contrôle.

Mots clés : diarrhée épidémique porcine, coronavirus, épidémiologie, pathologie

Abstract. In 2013, 40 years after the first case of porcine epidemic diarrhea (PED) in Europe, PED has emerged in USA that was free of that disease before. The coronavirus, etiological agent of the disease and called PEDV, spread quickly within all the country and in America leading to a significant impact on the pig production. Two types of viral strains have been identified: highly virulent "non-InDel" strains and "InDel" strains because of insertion/deletion in the *S* gene and associated with less severe clinical cases. PEDV infection causes watery diarrhea and a mortality of up to 100 % in piglets. This review sums up the current knowledge on the virus, its transmission and its worldwide molecular epidemiology, on the physiopathology of the disease and the control measures.

Key words: porcine epidemic diarrhea, coronavirus, epidemiology, pathology

Introduction

La diarrhée épidémique porcine (DEP) est apparue pour la première fois en Europe dans les années 1970. Elle est provoquée par un coronavirus, ne présentant pas de caractère zoonotique, appelé virus de la DEP (PEDV). Les porcs infectés par ce virus sont fortement déshydratés et présentent d'importantes diarrhées parfois accompagnées de vomissements. Lorsque des porcelets nouveau-nés sont atteints, une forte mortalité est observée. Les pertes économiques engendrées par ce virus sont donc significatives. En 2013, 40 ans après le premier cas de diarrhée épidémique porcine (DEP), la DEP est apparue aux États-Unis, dans

l'État de l'Iowa, alors que le pays avait toujours été indemne de cette maladie. Le virus s'est rapidement propagé dans l'ensemble du pays entraînant un impact important sur la production de porcs. En effet, après seulement une période épidémique d'un an, le pays avait déjà subi une perte de 10 % de sa production totale de porcs. Deux types de souches de ce virus ont été identifiés : des souches hautement virulentes et des souches dites « InDel » associées à des cas cliniques moins sévères. Actuellement, le virus de la DEP circule toujours aux États-Unis. Il s'est aussi propagé dans d'autres pays d'Amérique tels que le Canada et le Mexique [1, 2]. Le PEDV est aussi présent sur les territoires asiatique et européen. La répartition du virus sur le territoire européen pourrait refléter la distribution globale de la production de porcs en Europe. Les zones européennes les plus touchées sembleraient être les régions ayant une

doi:10.1684/vir.2016.0673

Tirés à part : S. Gallien

revue

forte production de porcs soit l'Allemagne, l'Espagne, les Pays-Bas, l'Italie et la Belgique. Bien que la France, la Pologne et le Danemark soient de plus gros producteurs de porcs que les Pays-Bas, l'Italie et la Belgique, ces pays sont peu touchés par la DEP ou en seraient indemnes. La même constatation peut être réalisée au niveau mondial dans les régions à forte densité d'élevages porcins, c'est-à-dire, les États-Unis, la Chine, le Brésil et le Vietnam [3].

Virus de la DEP : un coronavirus

Généralités sur les coronavirus

Ce pathogène entérique appartient à l'ordre des *Nidovirales* et à la famille des *Coronaviridae*. Les Coronavirus sont la cause de maladies majeures respiratoires, entériques mais aussi neurologiques et hépatiques chez de nombreux animaux et chez l'homme. Cette famille est divisée en deux sous-familles, les *Coronavirinae* et les *Torovirinae*. La sous-famille des *Coronavirinae* est elle-même constituée de quatre genres : les Alphacoronavirus, les Betacoronavirus, les Gammacoronavirus et les Deltacoronavirus, découverts plus récemment. Les Coronavirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. La principale caractéristique de cette famille est la taille de son génome. Avec une taille comprise entre 25,4 et 31,7 kb, ces génomes sont les plus grands virus à ARN. Les génomes ne sont pas segmentés et possèdent tous la même organisation. Le premier cadre de lecture ouvert (ORF) occupe les deux premiers tiers du génome et code les différentes protéines permettant la réplication et la transcription du génome. Le dernier tiers du génome comprend les gènes des protéines de structure toujours dans le même ordre : HE, quand elle est présente, puis S-E-M et N. De plus, entre ces gènes, d'autres cadres de lecture peuvent être présents ; ils codent des protéines dites accessoires. La localisation génomique et le nombre de gènes accessoires varient d'une espèce virale de Coronavirus à l'autre. L'enveloppe des Coronavirus contient trois ou quatre protéines virales : les protéines S, M, E et parfois la protéine HE (Hémagglutinine-Estérase) pour certains Betacoronavirus. La plus importante de ces protéines est la glycoprotéine S qui permet la reconnaissance entre la particule virale et la cellule hôte ainsi que la fusion du virion avec la membrane de cette dernière. La glycoprotéine M est, quant à elle, le composant le plus abondant des particules virales et donne sa forme à l'enveloppe du virion. La protéine E est un petit polypeptide de 8,4-12 kDa soit 76-109 acides aminés. Elle correspond aussi au composant minoritaire des virions. La protéine HE interagit avec différents types d'acide sialique et possède une activité acétyl-estérase qui élimine les groupes acétyle des O-acétylés de l'acide sialique. Ainsi, elle pourrait à la fois

avoir un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule hôte et favoriser la libération des virions néoformés en détruisant le récepteur viral. La protéine de nucléocapside ou protéine N se lie à l'ARN des virions et fournit une base structurale à la nucléocapside hélicoïdale [4]. Chez le porc, cinq Coronavirus ont été identifiés dont trois Alphacoronavirus : le virus de la gastroentérite transmissible (TGEV), le coronavirus respiratoire porcine (PRCV) qui est un mutant du TGEV et le virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) ; un Betacoronavirus : le virus hémagglutinant de l'encéphalomyélite porcine ou virus de la maladie du vomissement et du dépérissement (PHEV) et un Deltacoronavirus : le deltacoronavirus porcine (PDCoV). Deux de ces virus porcins, PEDV et PDCoV, ont été détectés au cours de ces deux dernières années aux États-Unis dans la population de porcs domestiques (*figure 1*) [5-9].

Structure et organisation génomique

Le PEDV est un membre du genre Alphacoronavirus. Il est enveloppé, d'un diamètre compris entre 95 à 190 nm, et son génome à ARN positif simple brin fait environ 28 kb et possède une coiffe en 5' et une queue polyadénylée en 3'. [2]. Le génome comprend une région non traduite (UTR pour *UnTranslated Region*) en 5' et en 3' et 7 ORF qui codent les quatre protéines structurales : S, E, M, et N et 16 protéines non structurales du complexe de réplication/transcription codées par l'ORF1a/b et l'ORF3 codant une unique protéine accessoire. L'organisation du génome est la suivante : 5'-ORF1a/1b-S-ORF3-E-M-N-3'. Les protéines S, E, M et N font respectivement 150 à 200 kDa, 7 kDa, 20 à 30 kDa et 58 kDa. Sa protéine S, protéine de spicule, est une glycoprotéine de type I composée de 1 383 acides aminés. Elle contient un peptide de signal pour le clivage par des protéases cellulaires (acides aminés 1 à 18), des épitopes de neutralisation en positions 499 à 638, 748 à 755, 764 à 771 et 1 368 à 1 374 ; et un court domaine cytoplasmique. Cette protéine peut être divisée en deux domaines : un premier domaine S1 allant du 1^{er} au 789^e acide aminé et un deuxième domaine S2 allant du 790^e au 1 383^e acide aminé. Cette protéine de spicule permet la régulation des interactions avec les récepteurs glycoprotéiques des cellules hôtes spécifiques, les entérocytes, permettant ainsi l'entrée du virus dans ces mêmes cellules. Elle est aussi la cible des anticorps neutralisants et est associée à une adaptation de la croissance *in vitro* du PEDV ainsi qu'à une atténuation de la virulence du virus *in vivo* [10]. La protéine M, protéine de membrane, joue un rôle important dans l'assemblage du PEDV en interagissant avec les protéines S et N. Elle induit aussi la production des anticorps qui neutralisent le virus en présence du complément et elle joue un rôle dans l'induction de l'interféron α (IFN α). La protéine de nucléocapside (N) lie l'ARN dans la nucléocapside. Les

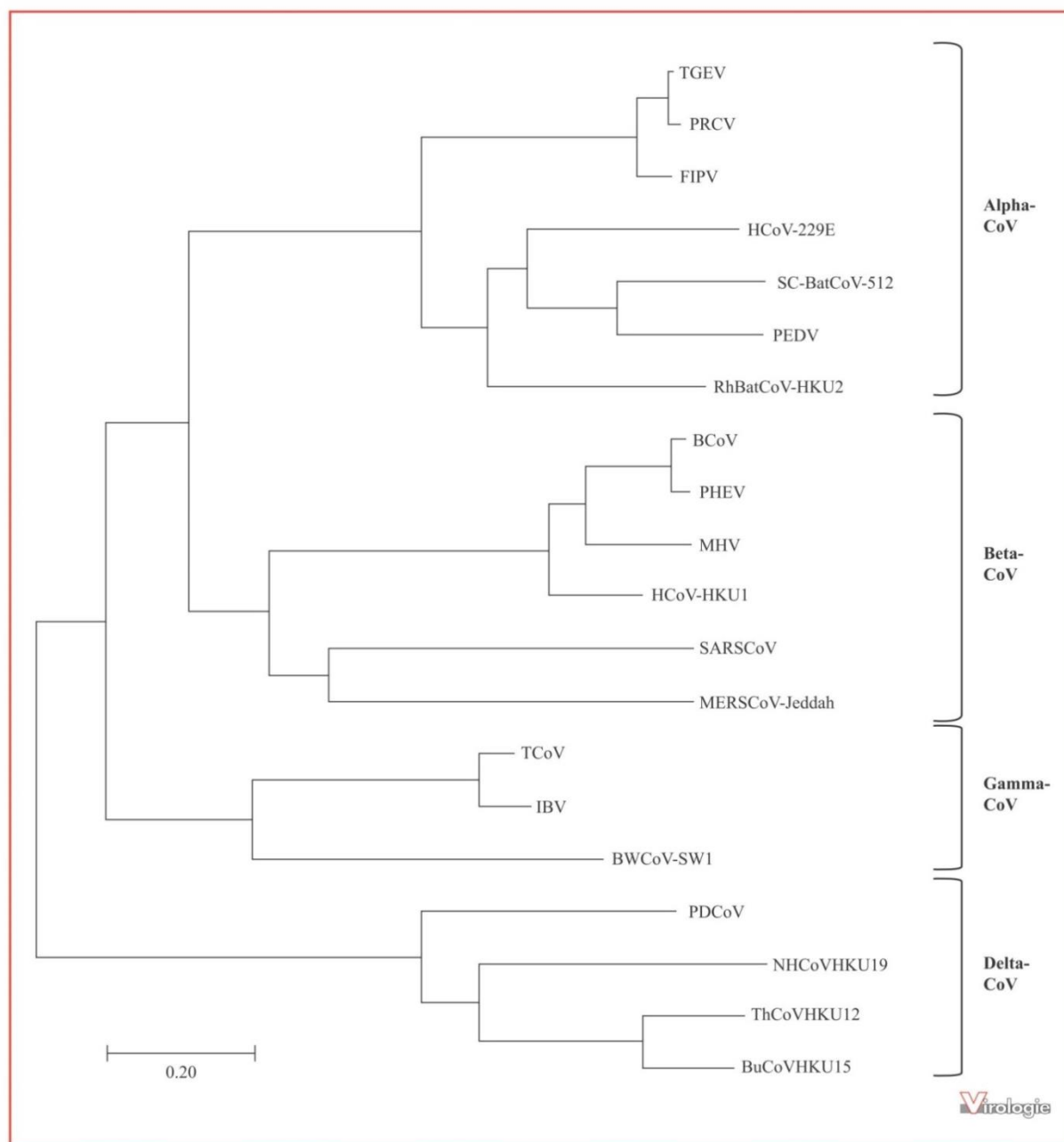


Figure 1. Analyse phylogénétique de coronavirus montrant la répartition en quatre genres : *Alpha* (Alpha-CoV), *Beta* (Beta-CoV), *Gamma* (Gamma-CoV) et *Delta* (Delta-CoV) coronavirus. Les alignements des séquences ont été réalisés par le programme Muscle et les arbres phylogénétiques en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel MEGA7. Les noms et identifiants Genbank (GB) des coronavirus utilisés pour construire l'arbre sont indiqués ci-après :

Alphacoronavirus : Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV, GB : NC_003436.1), *Feline infectious peritonitis virus* (FIPV, GB : AY994055), *Scotophilus bat coronavirus 512* (Sc-BatCoV-512, GB : NC_009657.1), *Porcine respiratory coronavirus* (PRCV, GB : DQ811787), *Rhinolophus bat coronavirus HKU2* (RhBatCoV-HKU2, GB : EF203064), *Human coronavirus-229E* (HCoV-229E, GB : NC_002645), *Porcine transmissible gastro-enteritis virus* (TGEV, GB : DQ811789)

revue

épitopes de cette protéine pourraient être importants pour stimuler l'immunité à médiation cellulaire. Les ORF1a et 1b codent l'ensemble des protéines du complexe de réplication/transcription et l'ORF3, une protéine accessoire dont la fonction pourrait être un canal ionique favorisant l'export de nouveaux virions formés (*figure 2*) [1, 11, 12].

Réplication virale

L'infection des cellules cibles par les coronavirus est initiée par l'attachement de la particule virale à la cellule cible. Cet attachement est initié par la protéine S. La liaison de cette protéine S au récepteur cellulaire cible entraîne un changement de conformation de cette dernière. Dans certains cas, l'induction de ce changement de conformation nécessite un pH acide. Une étape de fusion membranaire va suivre cette étape d'attachement spécifique. Après formation du complexe de réplication/transcription, la polymérase virale va utiliser le génome viral comme matrice pour la synthèse de nouveaux génomes et d'un ensemble d'ARN subgénomiques. Les ARN subgénomiques seront, par la suite, traduits en protéines structurales (protéines S, E, M et N) et en protéines accessoires. Les protéines S, E et M produites seront ensuite insérées dans le réticulum endoplasmique et transiteront par le compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique granulaire. Les nucléocapsides vont être formées par la protéine N afin de permettre l'encapsulation des nouveaux génomes produits. Puis, par bourgeonnement dans le compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique granulaire, les protéines S, E et M s'associent avec les nucléocapsides pour former les virions de nouvelle génération. Finalement, les virions seront exportés des cellules infectées par le transport vésiculaire d'exocytose [4].

Phylogénie

Aux États-Unis comme en Chine, deux types de souches circulent : des souches qualifiées d'hypervirulentes identifiées depuis avril 2013 dites « non-InDel » et des souches, présentes dès juin 2013 aux États-Unis, dites « InDel » (par exemple la souche OH851) et présentant une délétion puis une insertion de nucléotides dans le gène S [2].

L'analyse phylogénétique basée sur le gène S a révélé que les souches « InDel » isolées aux États-Unis partagent 99,8 à 100 % d'identité nucléotidique les unes avec les autres. Elles partagent 96,6 à 97,1 % d'identité nucléotidique avec les 67 autres souches de PEDV nord-américaines « non-InDel » analysées par Vlasova *et al.*, (2014). Cette analyse indique aussi que le gène S de la souche chinoise CH/ZMZDY/11 isolée en Chine en 2011 est proche des gènes S des souches « non-InDel » de PEDV isolées aux États-Unis (*figure 3A*). L'analyse phylogénétique basée sur la séquence du gène S révèle la présence de deux groupes. Le premier génogroupe (G1) contient les séquences de tous les PEDV dits « InDel » et se divise de nouveau en deux sous-groupes 1a et 1b englobant respectivement les anciennes souches de PEDV circulant en Europe et en Asie et les nouvelles souches « InDel » circulant depuis 2013 en Asie, en Amérique et en Europe (*figure 3A*). Le deuxième génogroupe 2 (G2) comprend les souches dites « non-InDel » comprenant des souches circulant en Asie (Corée du Sud, Thaïlande, Chine) et le sous-groupe 2b des souches circulant d'abord en Chine puis dans plusieurs pays d'Asie et en Amérique (*figure 3A*) [13]. L'arbre phylogénétique permet d'observer qu'à l'heure actuelle, en Europe, seules des souches « InDel » circulent (en vert clair sur la *figure 3A*). Depuis 2014, les souches « InDel » européennes (en italique) diffèrent des souches européennes précédentes (sous-groupe 1A) et se regroupent dans le sous-groupe 1B avec les souches « InDel » américaines (en rose et en italique). Une seule exception a été rapportée en Ukraine en 2014 avec des élevages affectés par la DEP avec une souche « non-InDel » proche (en vert foncé G2) des souches « non-InDel » américaines (en rouge G2). En Asie, les deux types de souches (en bleu) circulent mais uniquement depuis 2011 pour les souches « non-InDel » (en bleu foncé). En Amérique, les deux types de souches circulent également depuis 2013 (en rose pour les souches « InDel » et rouge pour les « non-InDel »). L'analyse phylogénétique basée sur les génomes complets de PEDV a permis d'identifier également la présence de deux groupes (*figure 3B*) séparant les anciennes souches circulant en Europe et en Asie (génogroupe 1), des nouvelles souches de PEDV circulant

Figure 1. (Continued)

Betacoronavirus : *Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strain VW572* (PHEV, GB : DQ011855.1), *Bovine coronavirus strain Mebus* (BoCoV, GB : U00735.2), *Human coronavirus HKU1* (HCoV HKU1, GB : NC_006577), SARS coronavirus (SARSCoV, GB : NC_004718), *Middle East respiratory syndrome coronavirus isolate Jeddah_1_2013* (MERSCoV Jeddah, GB : KJ556336.1), *Mouse hepatitis virus strain MHV-A59 C12 mutant* (MHV, GB : NC_001846) Gammacoronavirus : *Infectious bronchitis virus* (IBV, GB : NC_001451) *Turkey coronavirus* (TCoV, GB : NC_010800), *Beluga whale coronavirus* (BWCoV-SW1, GB : NC_010646) Deltacoronavirus : *Night heron coronavirus* (NHCoV HKU19, GB : JQ065047), *Porcine deltacoronavirus* (PorCoVHKU15, GB : JQ065048), *Bulbul coronavirus* (BuCoV HKU11, GB : FJ376619), *Thrush coronavirus* (ThCoVHKU12, GB : FJ376621)

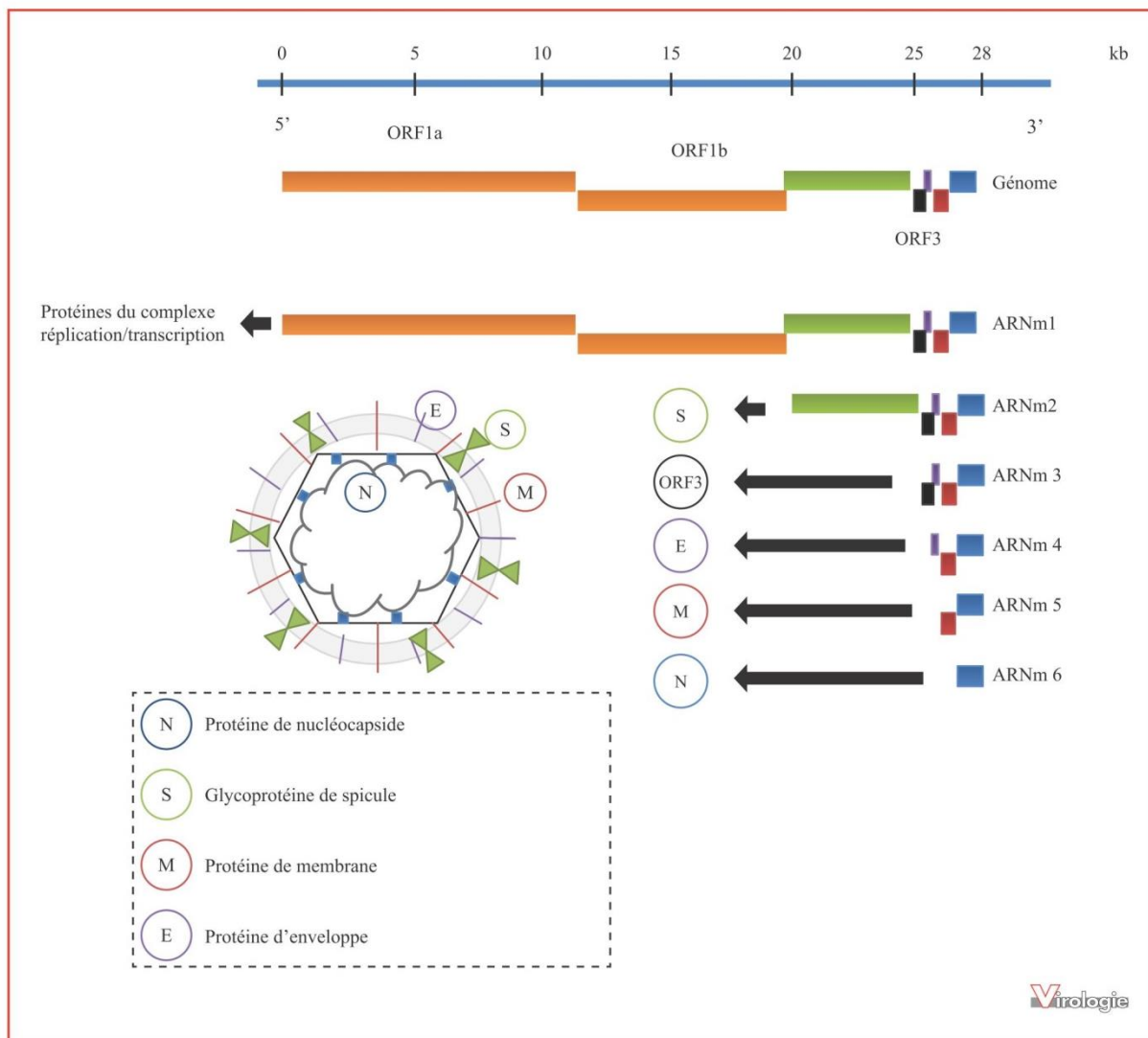


Figure 2. Représentation schématique de l'organisation génomique et structurale du PEDV.

depuis 2011 en Asie et ensuite en Amérique et en Europe (génogroupe 2). Cette analyse révèle aussi qu'il existe un ancêtre commun récent avec la souche chinoise AH2012 et les souches de PEDV américaines « non-InDel » [14].

Réaction croisée avec le TGEV

Des réactions croisées ont été observées récemment entre la souche Miller de TGEV et différentes souches de PEDV (la souche virulente originale PC22A isolée aux États-Unis, la souche « InDel » Iowa 106 isolée aux États-Unis, la souche américaine présentant une délétion de 197 acides aminés dans la protéine S, S197delIPC177, et la souche ancienne

européenne de référence CV777). Ces réactions croisées sont dues au fait que ces souches de PEDV et la souche Miller de TGEV partagent au moins un épitope conservé sur la région N-terminale de leurs protéines N [1].

Récepteur

Le virus de la DEP utilise majoritairement le récepteur pAPN (porcine aminopeptidase N) et son corécepteur, l'acide N-acétylneuraminique (Neu5Ac), pour entrer dans les cellules cibles. Le récepteur pAPN est aussi connu sous le nom de CD13. Ce récepteur est une glycoprotéine de type II de 150 kDa appartenant à la famille des métalloprotéases

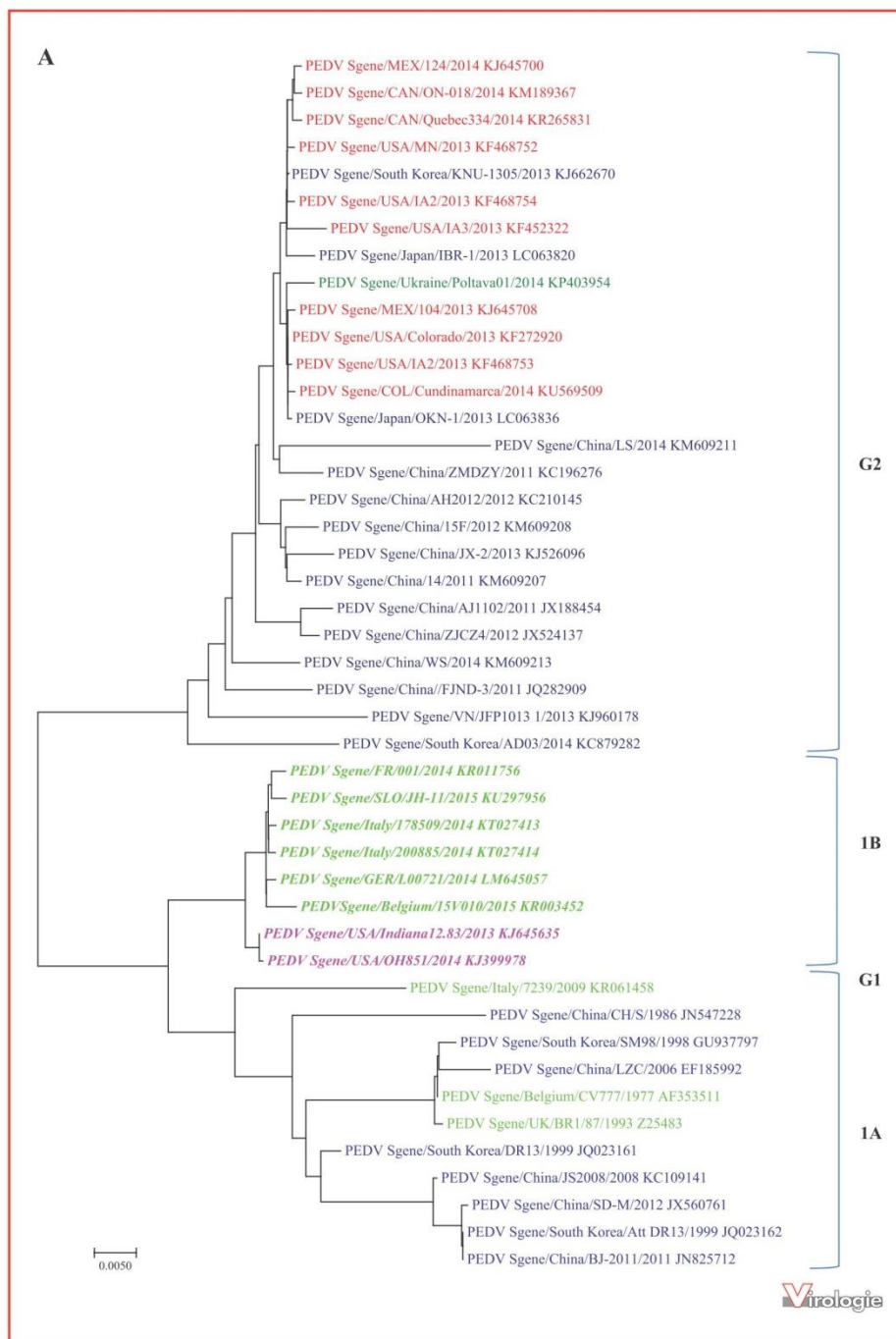


Figure 3. Analyse phylogénétique des souches de PEDV basée sur la séquence nucléotidique du gène S (A) ou sur les génomes complets (B). Les alignements des séquences ont été réalisés par le programme Muscle et les arbres phylogénétiques en utilisant la méthode *Neighbor-Joining* à l'aide du logiciel MEGA7. Le nom de la souche, le pays d'isolement et l'année, le numéro Genbank sont indiqués dans le nom de chaque souche. La localisation d'isolement par continent est indiquée par des couleurs : en bleu pour l'Asie, en vert pour l'Europe et en rouge/rose pour l'Amérique. Les souches dites « InDel » sont indiquées en couleur claire (bleu clair, vert clair et rose) et les souches « non-InDel » en couleur foncée (bleu foncé, vert foncé et rouge) [57-59].

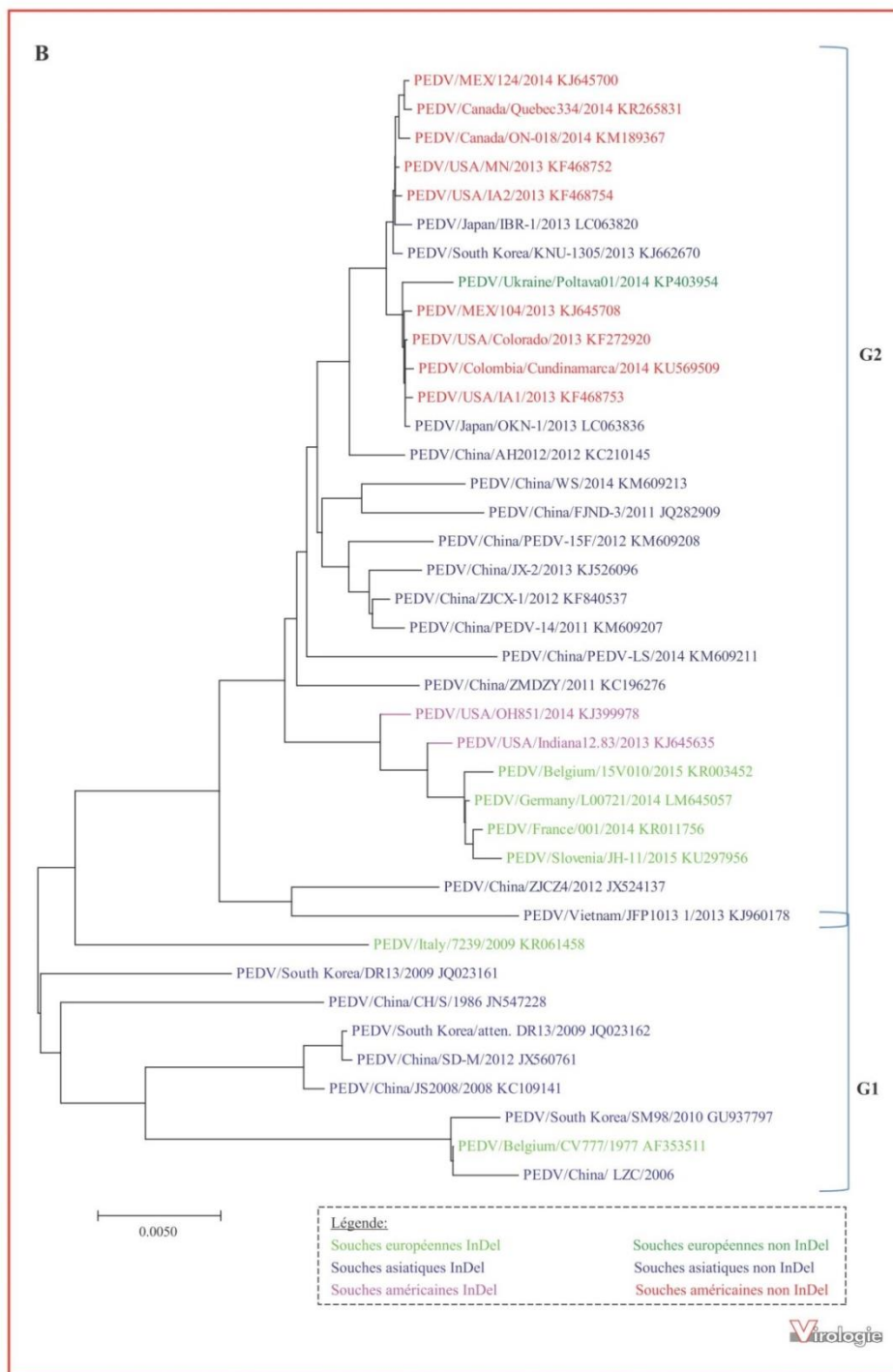


Figure 3. (Continued)

revue

membranaires. Il est exprimé majoritairement à la surface des cellules épithéliales des reins, de l'intestin (8 % des protéines totales de la membrane) et des voies respiratoires [1, 15, 16]. Ce récepteur est divisé en trois sous-domaines : SPA, SPB et SPC, ce dernier étant le domaine fonctionnel de pAPN qui permet l'entrée du virus dans la cellule. L'entrée des coronavirus se fait en plusieurs étapes, la protéine S de ces derniers, et plus particulièrement la sous-unité S1 de la protéine S, va reconnaître de façon spécifique le récepteur pAPN et une combinaison irréversible avec le domaine fonctionnel ou de liaison va être établie. Cette combinaison irréversible est suivie d'une étape de fusion membranaire permise par la sous-unité S2 de la protéine S [1, 17]. Liu *et al.* [16] ont montré que les sucres ou des analogues des sucres pourraient servir de substances antivirales pour bloquer l'infection par le PEDV en s'attachant aux corécepteurs Neu5Ac. La sous-unité S1 de la protéine S, composée de deux domaines NTD (*N-Terminal Domain*) et CTD (*C-Terminal Domain*), pourrait aussi servir à la fabrication d'un vaccin afin de neutraliser l'infection par le PEDV. En effet, les anticorps monoclonaux dirigés contre ces fragments pourraient servir d'agents immunothérapeutiques en bloquant l'attachement du PEDV au récepteur pAPN et au corécepteur Neu5Ac [16].

Propriétés biologiques et physico-chimiques

Le PEDV possède une densité de flottaison de 1,18. Il est relativement stable entre 4 et 50 °C et dans une gamme de pH allant de 6,5 à 7,5 à 37 °C et allant de 5 à 9 à 4 °C. Il est sensible à certains désinfectants comme les produits contenant du phénol, du peroxyde d'hydrogène, du chlore, de l'ammonium quaternaire ou du glutaraldéhyde [2].

Certaines combinaisons de température et de temps bien précises permettent son inactivation. Par exemple, le fait de maintenir le virus pendant 10 minutes à 71 °C ou pendant 7 jours à 20 °C entraîne son inactivation. Le virus peut survivre dans du lisier sous certaines conditions de temps et de température (28 jours à 4 °C) et dans de l'aliment sous certaines conditions de stockage (sept jours dans de l'aliment sec contaminé par des fèces à 25 °C, 14 jours dans des aliments humides à 25 °C et au moins 28 jours dans des aliments composés humides à 25 °C) [18].

Culture in vitro du virus

Le PEDV ne se réplique pas dans les cultures cellulaires à moins que de fortes concentrations de trypsine ne soient présentes [19]. Pour isoler et cultiver le PEDV, les cellules doivent donc supporter le traitement par la trypsine. Des essais ont été réalisés sur cellules de porc, mais la culture du PEDV était infructueuse [20]. La culture du PEDV a été réalisée sur des cellules Vero (cellules de rein de singe vert africain) et des cellules MARC-145 (une autre lignée de

cellules de rein de singe vert africain). Ces cellules ont bien supporté l'isolement et la propagation du PEDV en culture cellulaire avec ajout de trypsine [1], qui permet de cliver le récepteur du PEDV avant l'adsorption et la translocation dans la cellule. Il est aussi connu que la trypsine est nécessaire pour augmenter l'infectiosité dans ce sens chez les coronavirus [19]. Shibata *et al.* ont isolé avec succès le PEDV dans des cultures cellulaires dérivées de cellules de vessie et de rein de porcs avec addition de trypsine dans le milieu sur des plaques avec un revêtement de collagène [20].

Épidémiologie

En Amérique

Depuis fin avril 2013 aux États-Unis, la DEP a touché 32 états soit 8 300 élevages entraînant une mortalité de près de 7 millions de porcs (*figure 4*) [2]. Le virus s'est rapidement propagé dans tout le pays puis dans le reste de l'Amérique du Nord (Canada, Mexique) et en Amérique du Sud (Colombie) [1, 2]. Deux types majeurs de souches de PEDV circulent actuellement aux États-Unis. La première souche isolée aux États-Unis en avril 2013 est une souche « non-InDel » et présente 99,5 % d'identité nucléotidique avec la souche chinoise, China/AH2012, isolée en 2012 (*figure 3B* en rouge) [1, 6]. Ces souches « non-InDel » sont qualifiées de hautement pathogène. Les secondes souches ont été identifiées plus tard et présentent une délétion et une insertion dans la région N terminale du gène S. Elles ont été nommées souches « InDel » (*figure 3B* en rose) [1]. Bien que la première souche « InDel » américaine, nommée OH851, ait été identifiée en janvier 2014, une autre souche nommée USA/Indiana 12.83/2013 circulait dès juin 2013. Cela suggère que les deux types de souches « non-InDel » et « InDel » ont été introduites en même temps aux États-Unis [21]. Les souches « InDel » ont été identifiées dans 4 États américains : au Minnesota, dans l'Ohio, l'Iowa et l'Indiana. Le Minnesota a le plus faible niveau de détection de celles-ci (6,9 %), suivi par l'Ohio (14 %), au contraire de l'Iowa et de l'Indiana qui ont les plus forts niveaux de détection de ces dernières (respectivement 43 % et 50 %). Pour les souches « non-InDel », la comparaison de séquences du génome entier de 112 souches de PEDV a montré qu'il n'y avait aucune insertion ou délétion spécifiques aux PEDV isolées aux États-Unis : les mutations de ces souches sont uniquement représentées par des SNP (*single nucleotide polymorphism*) [14].

Au Canada, le PEDV a été identifié en janvier 2014 dans une exploitation porcine de l'Ontario, puis dans le Manitoba, sur l'île du Prince Edward et au Québec. Le bilan de l'épizootie en novembre 2015 est de 88 cas de DEP dans l'Ontario, huit

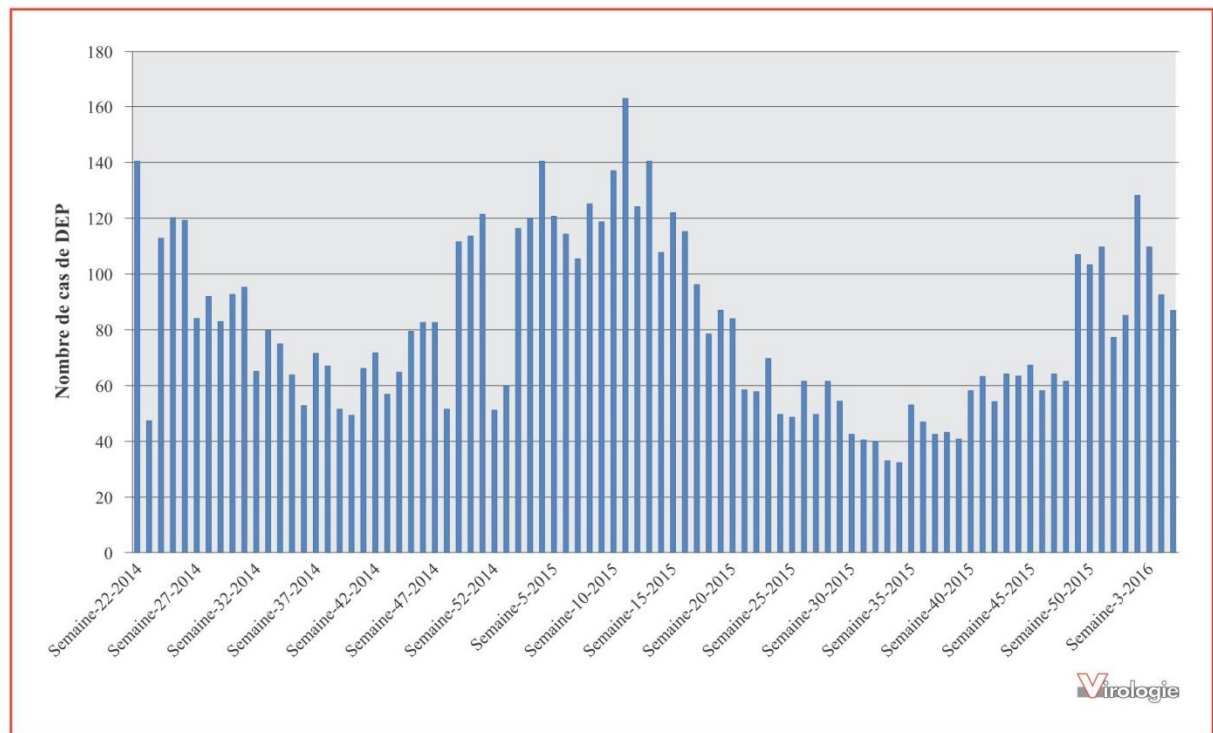


Figure 4. Évolution des cas de DEP aux États-Unis depuis leurs déclarations obligatoires (juin 2014-semaine-22-2014).

dans le Manitoba, 16 au Québec et un sur l'île du Prince Edward. Aucun nouveau cas de DEP n'a été identifié depuis le dernier cas du 14 juillet 2015 dans un élevage naisseur-engraisseur de l'Ontario [22].

Au Mexique, le premier cas de DEP a été observé le 30 juillet 2013. L'épizootie a touché par la suite 83 élevages dans 17 états. Des cas de DEP dans 45 élevages ont aussi été notés en Colombie. En Argentine, en Uruguay et au Brésil, aucun cas de DEP n'a été décrit jusqu'ici (figures 5-6) [2].

En Asie

Le PEDV a été identifié, en Asie, pour la première fois dans les années 1980-1990 selon les pays. Il est considéré comme la cause de maladies entériques dévastatrices et de pertes économiques pour l'industrie du porc dans de nombreux pays d'Asie comme la Chine, la Corée du Sud, le Japon, la Thaïlande et Taïwan [11]. En Chine, la DEP est réapparue fin 2010 et a touché plus de 10 provinces chinoises. Sa réapparition a été caractérisée par une forte morbidité (100 %) et une forte mortalité des porcelets sous la mère (80 à 100 %) malgré l'utilisation fréquente de vaccins vivants atténués basés sur la souche de référence CV777 ou sur la souche DR13 atténuée [23]. Entre 2010 et 2012, plusieurs souches

de PEDV ont été identifiées : des souches dites classiques et des nouvelles souches, « non-InDel », différant génétiquement de la souche de référence CV777. Au Japon, c'est dans les années 1980-1990 que le PEDV a été identifié comme la cause de sévères épizooties (figures 5-6) [1]. En effet, entre 1993 et 1994, une mortalité des porcelets sous la mère allant de 30 à 100 % a été observée. Une autre épizootie a eu lieu pendant l'hiver 1996 entraînant une perte de 70 % des porcs produits [24]. La DEP a été totalement éradiquée en 2007 mais est réapparue en 2013 où la présence du PEDV a été démontrée dans les préfectures d'Okinawa en octobre, puis d'Ibaraki en novembre et de Kagoshima et Miyazaki en décembre. Au total, 817 élevages porcins ont été touchés entraînant la mort de 371 000 porcs (figure 5). Les virus responsables de cette épizootie étaient proches génétiquement des souches hautement virulentes identifiées aux États-Unis en 2013. L'origine de la réapparition du PEDV au Japon n'a jusqu'alors pas été identifiée [2, 41]. En Corée du Sud, le PEDV a été identifié pour la première fois en 1992 [1]. Au cours des mois de juillet et d'août 1999, 50,4 % des 1 258 cas de maladies entériques ont été diagnostiqués comme étant de la DEP. Un abattoir coréen a trouvé une séroprévalence pour cette dernière de 45 % en moyenne via l'analyse d'échantillons de 469 porcs provenant de 7 provinces coréennes différentes. Ces résultats suggèrent que

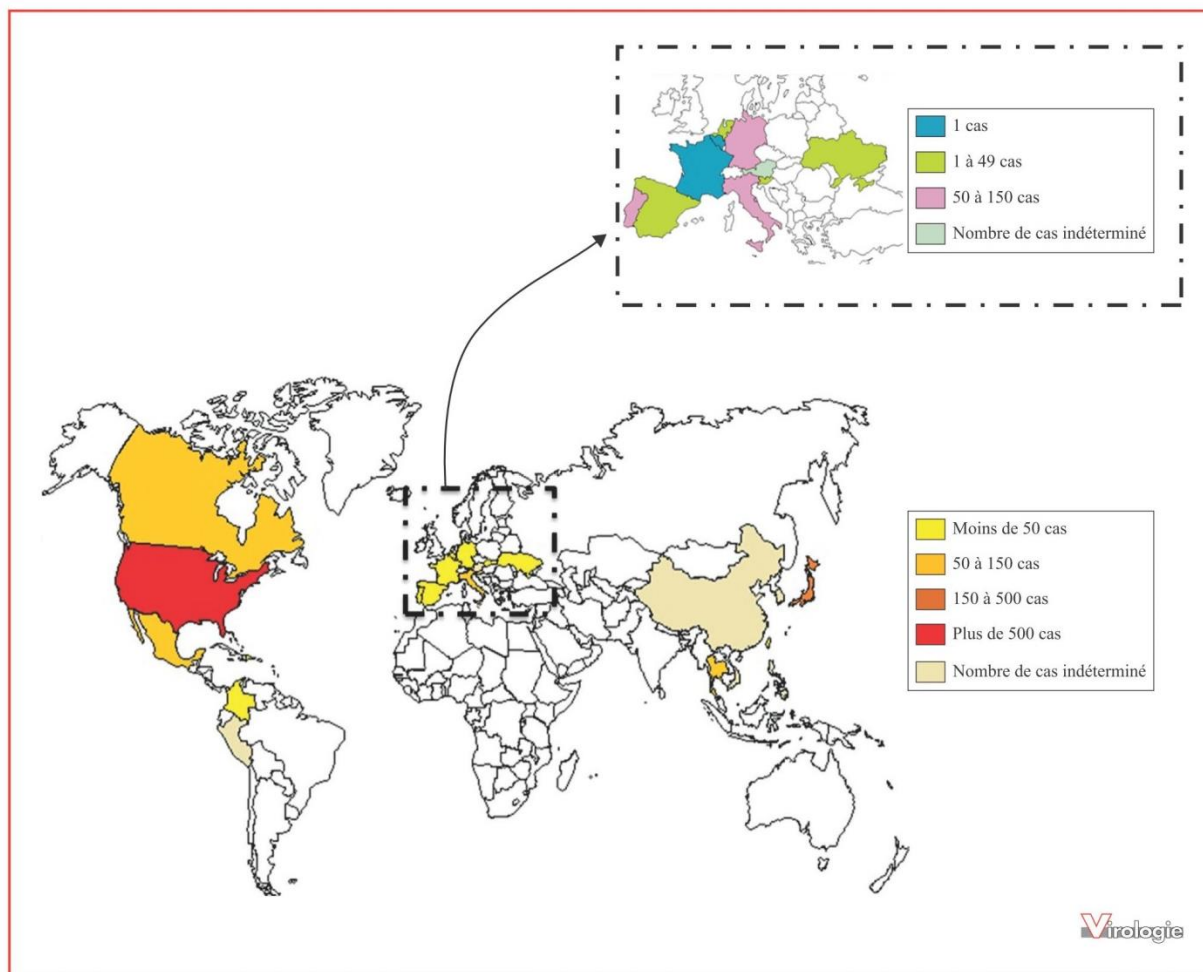


Figure 5. Pays dans lesquels des cas de DEP ont été décrits depuis 2013 avec, par pays, l'ordre de grandeur du nombre d'élevages affectés par la DEP, toutes souches de PEDV incluses.

la DEP est devenue endémique dans certaines régions de Corée du Sud [24]. En 2013, les cas de DEP ont augmenté remarquablement et la maladie s'est répandue à travers le pays : 19 % des élevages coréens ont connu un épisode de DEP et la production de porcelets a été réduite de 25 % [2]. En Corée du Sud, les souches de PEDV isolées en 2013 se sont révélées être différentes des souches de PEDV isolées dans les années 1990. Une identité nucléotidique allant de 99,2 à 99,9 % a été démontrée entre ces nouvelles souches coréennes et les souches « non-InDel » américaines [26]. De même, à Taïwan, une épizootie de DEP s'est déclarée en 2014 et les souches de PEDV étaient phylogénétiquement proches des souches « non-InDel » américaines [1]. Des foyers émergents de DEP ont été confirmés au Vietnam dès début 2009 et en Thaïlande, entre 2007 et 2008, de nombreux cas de DEP ont été rapportés (figures 5-6) [1, 2].

La maladie est d'abord apparue dans les élevages engraisseurs puis dans les élevages naisseurs avec une mortalité des porcelets nouveau-nés atteignant les 100 % [24] (figure 6).

En Europe

En Europe, dans les années 1980 et 1990, la DEP était une maladie largement répandue. Elle a été décrite pour la première fois en Angleterre en 1971. Des cas de DEP ont, par la suite, été identifiés en Angleterre, en Allemagne, en France, en Hollande, en Suisse et en Belgique où la souche de référence CV777 a été isolée en 1977 [1, 2, 24]. Actuellement, la DEP n'est pas une maladie à déclaration obligatoire dans tous les pays européens. Elle l'est, cependant, en Finlande, en France, en Irlande, en Suède et au Royaume-Uni. Depuis 2014, des cas de DEP ont été déclarés et confirmés

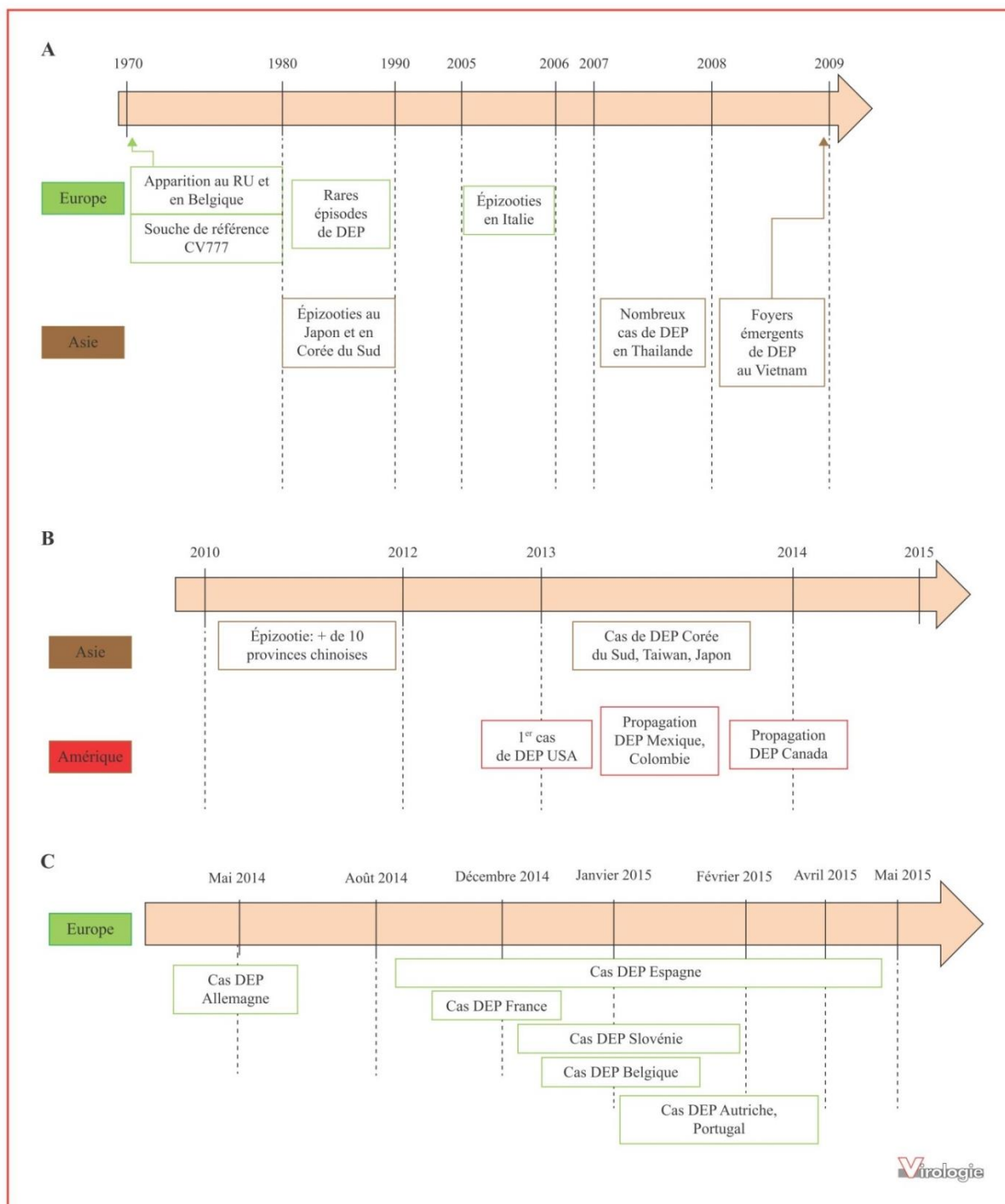


Figure 6. Récapitulatif des épisodes épidémiques dans le monde avant 2009 (A), durant la période 2010-2015 en Asie et en Amérique (B) et récemment en Europe (C).

revue

en Autriche, en Belgique, en Espagne, en France, en Italie, en Hollande, au Royaume-Uni et en Allemagne (*figures 5-6*) [3].

Une épizootie de DEP a été décrite sur la période 2005-2006 en Italie. Celle-ci est apparue principalement dans les environs de la vallée de Pô riche en exploitations porcines. Les élevages affectés étaient des naisseurs-engraisseurs mais également des engraisseurs avec un taux de mortalité maximum de 34 % pour les porcelets sous la mère [27]. De nouveaux cas de DEP ont été rapportés entre 2008 et 2016 en Italie. Au total, 73 cas de DEP ont été identifiés dans 60 élevages sur la période 2008-2014 [2]. En 2009, deux souches virales ont été séquencées : PEDV/Italy/7239/2009 et SeCoV/Italy/213306/2009. La souche SeCoV/Italy/213306/2009 est issue d'un événement de recombinaison entre le PEDV et un ancêtre de TGEV. Ces deux souches se classent dans le sous-génogroupe 1A d'après la séquence des gènes *S* (*figure 3A*) [28]. Par contre, depuis 2014, les autres souches isolées ont révélé une identité de séquence de 99,0-99,5 % avec la souche « InDel » USA/OH851/2014 et appartiennent au sous-groupe 1bB. Ces souches présentent une grande variabilité génétique avec les souches circulant avant 2012.

En mai 2014, des cas de DEP chez des porcs de tous âges ont été rapportés dans un élevage engraisseur du sud de l'Allemagne. Les premiers cas ont été observés après l'introduction de porcs charcutiers provenant d'un gros élevage naisseur. Un coronavirus a été détecté dans les fèces lors de l'analyse par microscopie électronique et l'analyse par RT-qPCR a démontré que ce coronavirus était le PEDV [29]. La souche allemande de PEDV isolée, GER/L00719/2014, est une souche de type « InDel ». Elle présente 98,7 % d'identité nucléotidique avec les souches « non-InDel » américaines et chinoises, 99,4 % avec les souches « InDel » décrites aux États-Unis [30] et 97,1 % avec la souche de référence CV777 [29]. Des cas de DEP ont aussi été rapportés aux Pays-Bas. Les souches qui y ont été isolées présentent 99,5 % d'identité avec la souche allemande isolée en 2014 et avec la souche « InDel » OH851 américaine [3].

En août 2014, des cas de DEP ont aussi été décrits en Espagne. Dix exploitations ont été touchées par la maladie entre août 2014 et mai 2015. Tous les signes cliniques ont disparu au bout de cinq jours maximum. La maladie a aussi entraîné une diminution du nombre de porcelets par portée chez les truies affectées [3].

En France, un cas de DEP a été signalé dans un élevage naisseur-engraisseur en décembre 2014 alors qu'aucun cas de DEP n'avait été décrit depuis les années 1990. Dans cet élevage, la maladie a provoqué une mortalité allant de 3,3 % à 5,5 % chez les porcs en engraissement et de 12 % chez les porcelets sous la mère. La souche de PEDV isolée corres-

pond à la souche FR/001/2014 [31] génétiquement proche des récentes souches « InDel » américaines et européennes [14]. En Slovénie, parmi 63 échantillons suspects, prélevés entre décembre 2014 et février 2015, 6 échantillons se sont révélés positifs pour le PEDV et présentaient 99,7 % d'identité nucléotidique avec la souche « InDel » allemande GER/L00719/2014 sur 390 nucléotides de la polymérase [32]. Fin janvier 2015, un cas de DEP est survenu en Belgique dans un élevage engraisseur. La souche identifiée BEL/15V010/2015 est une souche de type « InDel », proche de la souche allemande, GER/L00721/2014, avec laquelle elle partage 99 % d'identité nucléotidique [33].

Des épisodes de DEP ont aussi été rapportés en Autriche et au Portugal où 44 élevages ont été touchés dans le centre et le sud du pays entre janvier et avril 2015. Les souches autrichiennes présentent une identité supérieure à 99,5 % avec les souches isolées en Europe centrale et en Europe de l'Ouest. De même, les souches portugaises possèdent de fortes identités de séquence avec ces souches (99 % avec la souche OH851 et 100 % avec la souche allemande) [3].

En Europe, seules des souches « InDel » ont donc été caractérisées, mis à part en Ukraine où des cas de DEP sont apparus au cours de l'été et de l'automne 2014. La mortalité était de 100 % chez les porcelets de moins de 10 jours d'âge. Il a fallu 20 semaines pour stopper l'avancée de la maladie qui a provoqué au total une perte 30 000 porcelets. Le virus identifié était phylogénétiquement proche de souches « non-InDel » américaines (*figure 6*) [34].

Transmission du virus

Le PEDV peut se transmettre entre congénères de plusieurs façons. Sa voie de transmission principale est la voie oro-fécale, c'est-à-dire, une transmission par contacts directs ou indirects entre congénères ou avec des fèces de congénères contaminés [1, 2]. Le PEDV peut aussi être transmis par contact avec des équipements contaminés, par le personnel ou par les véhicules de transport d'animaux contaminés (*figure 7*) [1]. Aux États-Unis, la propagation rapide du virus à travers le pays a pu être associée notamment à des véhicules de transport contaminés. En effet, l'analyse d'échantillons provenant de véhicules de transport non contaminé à leur départ a montré la présence du PEDV dans 5,2 % des véhicules à leur retour. Le processus de transport est donc source de transmission du virus si certaines mesures d'hygiène ne sont pas mises en pratique [35]. Des études ont aussi été réalisées afin de voir si le PEDV pouvait se transmettre par voie aérienne. Expérimentalement, le PEDV est détectable et infectieux dans des échantillons d'air. Des porcs inoculés avec des échantillons d'air contaminés par le PEDV développent des signes cliniques de la DEP et le virus est détecté dans leurs intestins et leurs fèces. En condition d'élevage, l'infection par le PEDV n'a pas été

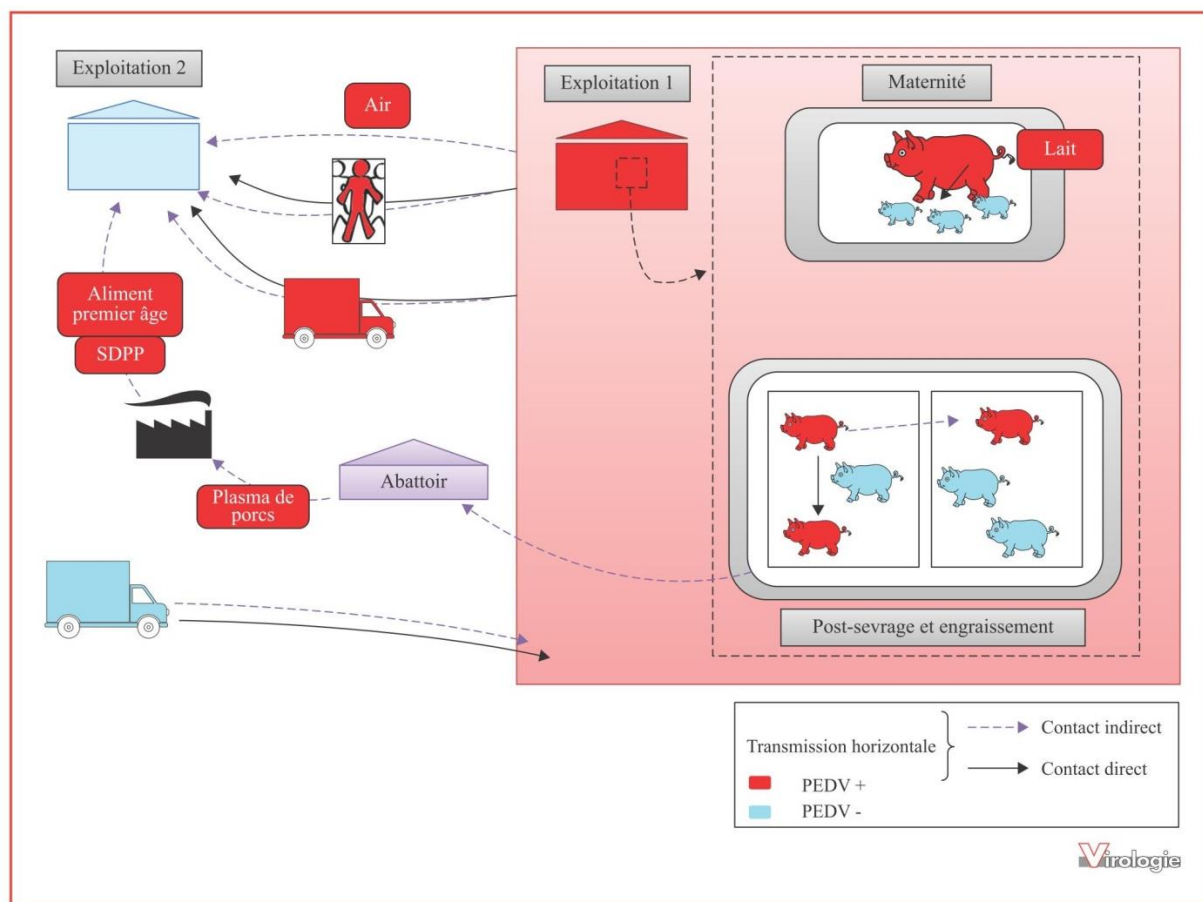


Figure 7. Représentation schématique de la transmission horizontale du PEDV par contacts direct et indirect (homme, matériel. . .).

reproduite lorsque les porcs ont été mis en contact avec des échantillons d'air infectés [36]. Cette transmission via la voie aérienne dépend des propriétés des particules volatiles avec lesquelles les virus sont associés (matière fécale, poussière. . .). La taille des particules détermine la distance sur laquelle le pathogène peut être transporté, le site sur lequel il est déposé ainsi que sa survie. Le PEDV se disperse en utilisant un vaste éventail de tailles de particule et peut donc se disséminer sur des distances plus ou moins longues. Lors de ces études, le matériel génétique du PEDV a pu être détecté à 10 miles de la zone d'infection [36, 37]. La diffusion rapide du PEDV en Amérique du Nord a aussi soulevé des préoccupations quant au rôle de l'aliment et plus particulièrement quant au rôle des sous-produits de porcs comme le plasma séché de porc (SDPP), utilisé dans les aliments premiers âges pour porcelets, dans la transmission de la DEP [38]. Le SDPP est souvent utilisé dans l'aliment pour porcelets sevrés pour améliorer leur crois-

sance, la prise alimentaire et pour réduire les diarrhées post-sevrage [39]. En janvier 2014, un cas de DEP a été relevé dans l'Ohio et une investigation épidémiologique a confirmé que la source de l'introduction du PEDV était l'aliment [40]. Un rapport canadien montre aussi que le SDPP contaminé par le PEDV est infectieux pour les porcs. Cependant, l'aliment complet contenant 5 à 10 % de ce plasma contaminé n'a pas permis l'infection de porcs en condition expérimentale [2]. Une autre équipe de recherche a mis en évidence le contraire : les porcs n'ont pas été infectés avec l'utilisation de SDPP contaminé par le PEDV. Les données indiquent que le PEDV a été inactivé pendant le processus de production du SDPP [38].

De l'ARN de PEDV a aussi été détecté dans des échantillons de lait [1]. Le lait des truies infectées par le PEDV peut donc représenter une voie de transmission verticale du PEDV de la truie vers ses porcelets (figure 7) [23]. La transmission par voie vénérienne ne peut pas non plus être écartée car

revue

le virus entraîne une virémie et par conséquent se retrouve dans le sang et dans les organes sexuels. La contamination des semences lors de leur préparation ne peut pas non plus être exclue [25].

Physiopathologie

Signes cliniques

Les premiers signes cliniques de la DEP sont une forte diarrhée aqueuse accompagnée parfois de vomissements [2]. Des différences cliniques en réponse au PEDV apparaissent en fonction de l'âge de l'animal, de la pathogénicité de la souche de PEDV et de la génétique des animaux [41]. Chez les populations naïves, les porcs sont atteints de fortes diarrhées aqueuses et de vomissements. Une perte d'appétit va apparaître quel que soit l'âge de l'animal et la morbidité atteint les 100 % [42]. Les porcelets sous la mère présentent les signes cliniques de la DEP 24 à 48 h après l'infection. Ces signes cliniques seront présents jusqu'à la mort de l'animal, 3 à 4 jours après l'infection [2]. Chez ces catégories d'animaux, une tuméfaction de l'intestin et une forte déshydratation du fait de la diarrhée sont observés [43]. La mortalité chez ces porcelets peut atteindre les 100 % [41]. Les porcs en atelier post-sevrage et en atelier d'engraissement présentent généralement des diarrhées modérées avec ou sans vomissement [41]. Ils peuvent aussi présenter des signes d'anorexie. Une forte morbidité est observée chez ces animaux mais la mortalité reste faible (1 à 3 %) [42]. Ils guérissent une semaine après l'apparition des symptômes [2]. Chez les truies, l'infection par le PEDV va influencer leurs performances de reproduction [44].

Lésions

Les lésions macroscopiques et microscopiques associées à l'infection par le PEDV sont similaires à celles entraînées lors de l'infection par le TGEV. De sévères atrophies des muqueuses concentrées au niveau de l'intestin grêle sont observées. La paroi intestinale devient fine et transparente laissant apparaître un contenu jaunâtre et aqueux [6]. Les cellules infectées par le PEDV vont présenter des changements morphologiques. Après l'apparition des premiers symptômes chez de jeunes porcelets infectés par la souche CV777, soit 6 h après l'infection, les entérocytes du jéjunum présentent un faible nombre de ribosomes libres dans le cytoplasme et peu de réticulum endoplasmique. Les citernes de réticulum sont souvent dilatées et les mitochondries présentent une forme arrondie et des crêtes mitochondriales déformées. Lorsque les cellules sont plus sévèrement affectées, le cytoplasme est très peu chargé et possède de larges vacuoles distendues de réticulum endoplasmique lisse, un appareil de Golgi multistratifié, un noyau pâle, rond et central ainsi que des mitochondries gonflées. Les membranes cellulaires sont parfois dissociées. La cellule perd sa forme

et, parfois, les jonctions tripartites perdent contact et la cellule est libérée de l'épithélium dans la lumière intestinale. Ces cellules vont aussi présenter des microvillosités courtes et irrégulières avec des plateaux terminaux fragmentés. Différents types de cellules anormales couvrant les villosités apparaissent 12 h et 24 h après l'apparition des premiers symptômes. Le premier type cellulaire à apparaître contient des particules virales et est morphologiquement identiques aux cellules infectées dégénérantes. Le deuxième type cellulaire possède quant à lui une forme de colonne et des microvillosités irrégulières avec un plateau terminal incomplet. Ces cellules sont riches en gouttelettes lipidiques et ne présentent pas de particules virales [45].

Les pertes de microvillosités décrites précédemment réduisent la surface d'absorption intestinale. Ces pertes de microvillosités associées à un fonctionnement déficient des entérocytes ainsi qu'à l'exfoliation d'une partie de ce type cellulaire provoquent une diminution de l'absorption et donc la diarrhée [45]. L'infection par le PEDV affecte les jonctions tripartites et aboutit à une altération structurale des jonctions serrées et des jonctions d'ancrage au niveau de l'épithélium des sites de l'infection primaire, le jéjunum et l'iléon. Le PEDV entraîne donc une détérioration de l'intégrité intestinale pouvant conduire notamment à l'assimilation de bactéries lumineuses. L'altération des jonctions serrées et d'ancrage pourrait aussi entraîner la formation d'une brèche dans la barrière épithéliale et permettre au PEDV d'atteindre la matrice extracellulaire et finalement la circulation systémique [1].

Tropisme cellulaire

Les villosités des entérocytes expriment en grande quantité le récepteur pAPN, récepteur majoritairement utilisé par le PEDV. L'accès à ces cellules pour le PEDV est favorisé par l'importante densité de ce récepteur sur les entérocytes. Il va pouvoir s'y répliquer et provoquer une atrophie marquée des villosités dans l'intestin grêle. Le PEDV peut aussi se répliquer dans les voies respiratoires et plus spécifiquement dans les macrophages alvéolaires des poumons [1].

Réponse immunitaire

Les infections virales induisent l'immunité innée et adaptative chez l'hôte. L'immunité innée implique la production de cytokines et d'interférons ainsi que le recrutement de certaines cellules telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules NK (*natural killer*) [46]. Chez les porcs infectés par le PEDV, un pic d'IFN α (augmentation du niveau basal d'environ de 150 à 1250 pg/mL) ainsi que des niveaux d'IL-12 (augmentation du niveau basal d'environ de 300 à 600 pg/mL) et de TNF α (augmentation du niveau basal d'environ de 40 à 50 pg/mL) sont observés au moment de l'apparition de la diarrhée, du début de

l'excrétion virale de PEDV dans les fèces et de la séroconversion. Ces pics sont observés un jour post-infection chez les porcelets sous la mère et trois jours post-infection chez les porcelets sevrés. Cependant, la production d'IFN α et de cytokines pro-inflammatoires est différente en fonction de l'âge des porcs. Par exemple, d'après les travaux de Annamalai *et al.*, la production d'IFN γ est moins importante chez les porcelets sous la mère que chez les porcelets sevrés du fait d'un nombre moins élevé de cellules NK actives [47].

Le PEDV influence l'activité du facteur de transcription NF- κ B. La région centrale de la protéine N du PEDV active NF- κ B en impliquant la voie de signalisation TRL2 (*Toll-like receptor 2*). NF- κ B p65, une forme homodimérique de NF- κ B, va migrer du cytoplasme vers le noyau dans les cellules infectées. Les récepteurs TRL3 et TRL9 participent aussi à l'activation de NF- κ B. Cette activation de NF- κ B est dépendante de la dose et de la réplication virale du PEDV [48]. L'expression stable des protéines N et E du PEDV dans les cellules épithéliales de l'intestin peut aussi activer NF- κ B et entraîner une augmentation de l'expression d'IL-8 [49, 50].

Le PEDV n'induit pas la production d'IFN de type I et l'activité des IFN peut être contrariée par la protéine non-structurale PLP2 (Papain-Like Protéase 2) codée par l'ORF1a/b du PEDV [51]. L'infection par le PEDV entraîne aussi une inhibition de la production d'IFN- β , élément essentiel de la réponse immunitaire de l'hôte contre l'infection virale [52]. La production d'IFN- β est permise par la voie de signalisation RIG-1. En effet, RIG-1 détecte l'ARN bicaténaire produit lors du cycle de multiplication virale et s'y lie. RIG-1 recrute alors ISP-1 qui va activer TBK1 (TANK-binding kinase 1) et un inhibiteur de la transcription IKK ϵ (κ B kinase- ϵ) entraînant ainsi l'activation du facteur de transcription IRF-3 et de NF- κ B. IRF-3 et NF- κ B se lient ensuite à l'activateur d'IFN- β et initient la transcription d'IFN- β . L'infection par le PEDV provoque une inhibition de cette voie de signalisation RIG-1, de l'activité de la protéine ISP-1 et de l'activation d'IRF-3 entraînant ainsi cette inhibition de la production d'IFN- β [52].

Le PEDV va aussi influencer le fonctionnement des cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigène aux cellules T. Les cellules dendritiques immatures sont plus sensibles à l'infection par la souche CV777 que les cellules matures. CV777 stimule la maturation des cellules dendritiques et améliore leur capacité à présenter, à migrer et à induire l'activation des lymphocytes T *in vivo* et *in vitro*. En effet, 48 h après l'infection par CV777, une augmentation de la capacité des cellules dendritiques intestinales à échantillonner l'antigène et à activer la prolifération des cellules T *in vivo* est notée. Une augmentation du nombre de cellules T CD3+ et CD4+ est aussi observée dès le début de l'infection entraînant une forte réponse immunitaire toujours présente

48 h post-infection. L'expression des marqueurs de surface des cellules dendritiques tels que SWC3a+CD1a+, SWC3a+CD80/86+ et SWC3a+SLA-II-DR+ va augmenter suite à l'infection par CV777. De même une modulation de la production de cytokines par les cellules dendritiques est entraînée par cette infection. Les taux d'IL-12 et d'IFN γ produits seront plus importants chez les cellules dendritiques infectés par CV777. Par contre, CV777 n'interfère pas avec la capacité de production d'IL-10 de ce type cellulaire [53].

Lors de l'infection par le PEDV, la production des immunoglobulines va être modifiée. La présence d'IgA et d'IgG est notée dans le tissu lymphoïde intestinal 21 jours post-infection et dans les sérums. Les IgG et IgA sont détectées par test Elisa à partir du 12^e et 15^e jour post-infection respectivement. Les valeurs maximales dans les sérums pour ces anticorps sont atteintes à 32 jours post-infection pour les IgG et 21 jours post-infection pour les IgA. Le nombre de cellules sécrétrices d'IgG et d'IgA a aussi été quantifié lors de l'infection par PEDV dans différents tissus : ces cellules sont plus nombreuses dans les tissus muqueux que dans les tissus lymphoïdes systémiques. Dans le sang, la présence de cellules sécrétrices d'IgA a été détectée de façon constante du 14^e jour post-infection jusqu'à la fin de l'essai, 32 jours post-infection [54].

Prophylaxie

Différents protocoles existent pour prévenir l'infection par le PEDV dans les élevages porcins même si la gestion du sanitaire et de la biosécurité au sein de l'élevage reste le meilleur moyen de prévention PEDV [42]. Lorsque le PEDV arrive dans un élevage séronégatif, il est important de vacciner les truies gestantes, si un vaccin est disponible, afin de réduire le nombre de morts chez les porcelets sous la mère. La Chine et la Corée du Sud disposent actuellement de vaccins et vaccinent presque tous les élevages. La Chine utilise un vaccin basé sur la souche CV777 mais aussi un vaccin basé sur la souche DR13 atténuée, souche présentant une délétion au niveau du gène codant l'ORF3. Ce vaccin est aussi utilisé en Corée du Sud. Des vaccins basés sur les souches KPED-9 et P-5 V atténuées sont aussi utilisés dans ce pays [1, 11, 55]. L'immunisation peut aussi être entreprise par l'exposition au virus virulent (fèces infectées ou intestins hachés de porcelets nouveau-nés infectés) avec cependant, le risque de répandre d'autres infections avec d'autres virus contenus dans les fèces ou les intestins des porcelets infectés par le PEDV [1].

Une certaine immunité transitoire face au PEDV peut aussi être fournie au porcelet par le colostrum maternel. En effet, le transfert d'IgA de la mère immunisée contre le PEDV

revue

induit chez ce dernier une immunité passive. La durée de cette immunité va dépendre du titre de la mère. Cependant, les anticorps maternels ne protègent pas le porcelet de l'infection intestinale par le PEDV [24].

Conclusion

La réapparition et la propagation rapide de la DEP démontrent que le PEDV est capable d'échapper aux systèmes de biosécurité et de contrôle mis en place actuellement dans les élevages porcins et que ces systèmes d'élevage sont vulnérables. Les nouvelles souches « non-InDel » dites hautement virulentes sont fortement entéropathogènes et provoquent des dommages cellulaires importants. Les dysfonctionnements cellulaires qui en dérivent engendrent l'apparition de signes cliniques sévères pouvant se traduire par la mort de l'animal et donc par des pertes économiques significatives pour le pays. De nouvelles connaissances sur les propriétés de ce virus et l'étude de son impact sur l'organisme du porc pourraient permettre un meilleur contrôle et une meilleure prévention de la DEP.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

- Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 2015; 204: 134-43.
- Grasland B, Bigault L, Bernard C, Andraud M, Blanchard Y, Rose N. La diarrhée épidémique porcine: quel risque en France ? Comment s'y préparer ? *Journées Recherche Porcine* 2015; 47: 259-64.
- EFSA. Collection and review of updated scientific epidemiological data on porcine epidemic diarrhoea. *EFSA J* 2016; 14: 4375.
- Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 2006; 66: 193-292.
- Li G, Chen Q, Harmon KM, et al. Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734. *Genome Announc* 2014; 2: 2.
- Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest* 2013; 25: 649-54.
- Marthaler D, Jiang Y, Collins J, Rossow K. Complete genome sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/2014, a porcine deltacoronavirus from the United States. *Genome Announc* 2014; 2: 2.
- Marthaler D, Jiang Y, Otterson T, et al. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain USA/Colorado/2013 from the United States. *Genome Announc* 2013; 1: 4.
- Laude H, Rasschaert D, Delmas B, Eleouët JF. Le coronavirus respiratoire porcine PRCV: un virus émergent pas comme les autres. *Virologie* 1998; 2: 305-16.
- Lawrence PK, Bumgardner E, Bey RF, Stine D, Bumgarner RE. Genome sequences of porcine epidemic diarrhea virus: *in vivo* and *in vitro* phenotypes. *Genome Announc* 2014; 2: 3.
- Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin Exp Vaccine Res* 2015; 4: 166-76.
- Wang K, Lu W, Chen J, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett* 2012; 586: 384-91.
- Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: an emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology* 2015; 12: 193.
- Vlasova AN, Marthaler D, Wang Q, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1620-8.
- Nam E, Lee C. Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Vet Microbiol* 2010; 144: 41-50.
- Liu C, Tang J, Ma Y, et al. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J Virol* 2015; 89: 6121-5.
- Shan Z, Yin J, Wang Z, Chen P, Li Y, Tang L. Identification of the functional domain of the porcine epidemic diarrhoea virus receptor. *J Gen Virol* 2015; 96: 2656-60.
- OIE. Fiche technique de l'OIE: infection par le virus de la diarrhée épidémique porcine, 2014, 1-4. www.oie.int/fileadmin/Home/ffr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/F_factsheet_PEDV.pdf
- Utiger A, Frei A, Carvajal A, Ackermann M. Studies on the *in vitro* and *in vivo* host range of porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv Exp Med Biol* 1995; 380: 131-3.
- Shibata I, Tsuda T, Mori M, Ono M, Sueyoshi M, Uruno K. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet Microbiol* 2000; 72: 173-82.
- Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 917-9.
- Les éleveurs de porcs du Québec, Chronique DEP, 2015, 1-11. www.lesleveursdeporcsduquebec.com/upa_porcs_files/chronique_dep_2016_02_05.pdf.
- Sun RQ, Cai RJ, Chen YQ, Liang PS, Chen DK, Song CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 161-3.
- Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 2012; 44: 167-75.
- Anses. Avis de l'Anses Saisine 2014-SA-0087. 2014 ; 1-19. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2014sa0194.pdf>.
- Lee S, Lee C. Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1223-6.
- Martelli P, Lavazza A, Nigrelli A, Meriardi G, Alborali L, Pensaert M. Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy. *Vet Rec* 2008; 162: 307-10.
- Papetti A, Lavazza A, Alborali G, et al. Highly genetically distant and recombinant Swine Enteric Coronaviruses from Italy, 2015.
- Hanke D, Jenckel M, Petrov A, et al. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 493-6.
- Stadler J, Zoels S, Fux R, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet Res* 2015; 11: 142.
- Grasland B, Bigault L, Bernard C, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea S gene indel strain isolated in France in December 2014. *Genome Announc* 2015; 3: 3.
- Toplak I, Zlabravec Z, Lainscek P, Rihtaric D. First detection of porcine epidemic diarrhea virus in Slovenia, 2015.
- Christiaens I, Conceição-Neto N, Theuns S, et al. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus strains isolated from novel outbreaks in the European Union Belgium, 2015.

34. Carr J, Zakharchenko Y, Chipenko I, Besarab J, Konovlov I, Bekh O. *Clinical signs of Porcine Epidemic Diarrhoea in the Ukraine in 2014 associated with a Chinese/USA PED Virus*, 2015, 1-8. www.thepigsite.com/articles/4950/clinical-signs-of-porcine-epidemic-diarrhoea-in-ukraine-in-2014/.
35. Lowe J, Gauger P, Harmon K, *et al.* Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 872-4.
36. Alonso C, Goede DP, Morrison RB, *et al.* Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet Res* 2014; 45: 73.
37. Alonso C, Raynor PC, Davies PR, Torremorell M. Concentration, size distribution, and infectivity of airborne particles carrying swine viruses. *PLoS One* 2015; 10: e0135675.
38. Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Zhang J, Halbur PG. Porcine epidemic diarrhea virus RNA present in commercial spray-dried porcine plasma is not infectious to naïve pigs. *PLoS One* 2014; 9: e104766.
39. Van Dijk A, Everts H, Nabuurs M, Margry R, Beynen A. Growth performance of weanling pigs fed spray-dried animal plasma: a review. *Livest Prod Sci* 2001; 68: 263-74.
40. Bowman AS, Krogwold RA, Price T, Davis M, Moeller SJ. Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation. *BMC Vet Res* 2015; 11: 38.
41. Crawford K, Lager K, Miller L, Opriessnig T, Gerber P, Hesse R. Evaluation of porcine epidemic diarrhea virus transmission and the immune response in growing pigs. *Vet Res* 2015; 46: 49.
42. Geiger J, Connor J. *Porcine epidemic diarrhea, diagnosis, and elimination*, 2013, 1-4. <https://www.aasv.org/aasv%20website/Resources/Diseases/PED/13-05-29PEDWhitePaper.pdf>.
43. Coussement W, Ducatelle R, Debouk P, Hoorens J. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. Histological and histochemical study. *Vet Pathol* 1982; 19: 46-56.
44. Olanratmanee EO, Kunavongkrit A, Tummaruk P. Impact of porcine epidemic diarrhea virus infection at different periods of pregnancy on subsequent reproductive performance in gilts and sows. *Anim Reprod Sci* 2010; 122: 42-51.
45. Ducatelle R, Coussement W, Debouk P, Hoorens J. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet Pathol* 1982; 19: 57-66.
46. Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature Rev Immunol* 2010; 10: 514-26.
47. Annamalai T, Saif LJ, Lu Z, Jung K. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 10: 193-202.
48. Cao L, Ge X, Gao Y, Ren Y, Ren X, Li G. Porcine epidemic diarrhea virus infection induces NF- κ B activation through the TLR2, TLR3 and TLR9 pathways in porcine intestinal epithelial cells. *J Gen Virol* 2015; 96: 1757-67.
49. Xu X, Zhang H, Zhang Q, *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression. *Virol J* 2013; 10: 26.
50. Xu X, Zhang H, Zhang Q, *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression. *Vet Microbiol* 2013; 164: 212-21.
51. Xing Y, Chen J, Tu J, *et al.* The papain-like protease of porcine epidemic diarrhea virus negatively regulates type I interferon pathway by acting as a viral deubiquitinase. *J Gen Virol* 2013; 94: 1554-67.
52. Cao L, Ge X, Gao Y, *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon- β production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway. *Virol J* 2015; 12: 127.
53. Gao Q, Zhao S, Qin T, Yin Y, Yang Q. Effects of porcine epidemic diarrhea virus on porcine monocyte-derived dendritic cells and intestinal dendritic cells. *Vet Microbiol* 2015; 179: 131-41.
54. de Arriba ML, Carvajal A, Pozo J, Rubio P. Isotype-specific antibody-secreting cells in systemic and mucosal associated lymphoid tissues and antibody responses in serum of conventional pigs inoculated with PEDV. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 84: 1-16.
55. Park SJ, Song DS, Park BK. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea. *Arch Virol* 2013; 158: 1533-41.
56. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33: 1870-4.
57. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11030-5.
58. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-25.

Annexe 3 : Publications, communications et formations



Publications scientifiques :

1. **Gallien S**, Le Poder S, Rose N, Grasland B. Diarrhée épidémique porcine : le retour d'une « ancienne » maladie. *Virologie* 2016; 20(6) : 335-51 doi:10.1684/vir.2016.0673.
2. **Gallien, S.**, A. Moro, G. Lediguerher, V. Catinot, F. Paboeuf, L. Bigault, M. Berri, P. C. Gauger, N. Pozzi, E. Authie, N. Rose and B. Grasland, 2018: Evidence of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars. *Veterinary Research*, 49, 7. DOI: 10.1186/s13567-018-0505-2.
3. **Gallien, S.**, Andraud, M., Moro, A., Lediguerher, G., Morin, N., Gauger, P.C. , Bigault, L., Paboeuf, F., Berri, M., Rose, N., Grasland, B., 2018: Better horizontal transmission of a US non-InDel strain compared with a French InDel strain of porcine epidemic diarrhoea virus. *Transbound Emerg Dis*. DOI: 10.1111/tbed.12945
4. **Gallien, S.**, Moro, A., Lediguerher, G., Catinot, V., Paboeuf, F., Bigault, L., Gauger, P.C., Pozzi, N., Berri, M., Authié, E., Rose, N., Grasland, B., 2018: Limited shedding of an S-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in semen and questions regarding the infectivity of the detected virus. *Veterinary Microbiology*.
5. **Gallien, S.**, Fablet, C., Bigault, L., Bernard, C., Toulouse, O., Berri, M., Blanchard, Y., Rose, N., Grasland, B., 2018: Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: Descriptive epidemiology and control measures implemented. *Veterinary Microbiology*, 226, 9-14.
6. **Gallien, S.**, Catinot, V., Pozzi, N., Berri, M., Authié, E., Rose, N., Grasland, B., No evidence of PEDV infection in French artificial insemination centers in 2015 – **Soumise à “Porcine Health Management” le 28 septembre 2018**
7. **Gallien, S.**, Rossignol, C., Fleurot, I., Chevaleyre, C., Bernard, C., Gauger P.C., Moro, A., Lediguerher, G., Paboeuf, F., Rose, N., Grasland, B., Berri, M., Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in infected pigs with a French InDel and a US non-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus – **Soumise à “Veterinary Research” le 28 septembre 2018**

Communications orales lors de congrès nationaux et internationaux :

1. Journées francophones de virologie 2018 – **S.Gallien**, M.Andraud, A.Moro, N.Morin, G.Lediguerher, F.Paboeuf, M.Berri, N.Rose, B.Grasland, Comparaison de la transmission horizontale d'une souche française INDEL et d'une souche US non INDEL de virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) – Paris – France.
2. Symposium sur l'Immunologie des animaux domestiques 2018 – **S. Gallien**, C. Rossignol, I. Fleurot, C. Chevaleyre, C. Bernard, L. Bigault, S. Melo, A. Moro, G. Lediguerher, F. Paboeuf, N. Rose, B. Grasland, M. Berri – Tours – France.

3. EPIZONE 2017 – **S. Gallien**, M. Andraud, A. Moro, N. Morin, G. Lediguerher, L. Bigault, M. Berri, F. Paboeuf, N. Rose, B. Grasland, Comparison of the horizontal transmission of a French InDel strain and a US non InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus – Paris – France.

Communications sous forme de posters lors de congrès nationaux et internationaux :

1. Journées francophones de virologie 2018 – **S. Gallien**, A. Moro, G. Lediguerher, V. Catinot, F. Paboeuf, M. Berri, P.C. Gauger, N. Pozzi, E. Authié, N. Rose, B. Grasland, Excrétion d'une souche non INDEL de virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) dans la semence de verrats infectés en conditions expérimentales – Paris – France.
2. Journées de la Recherche Porcine 2018 – **S. Gallien**, M. Andraud, A. Moro, N. Morin, G. Lediguerher, F. Paboeuf, M. Berri, N. Rose, B. Grasland, Comparaison de la transmission horizontale d'une souche française InDel et d'une souche US non InDel de virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV) – Paris – France.
3. Journée francophones de virologie 2017 – **S. Gallien**, M. Andraud, L. Bigault, N. Morin, G. Lediguerher, F. Paboeuf, N. Rose, B. Grasland, Transmission horizontale d'une souche InDel française de virus de la diarrhée épidémique porcine – Paris – France.
4. European Symposium of porcine health management 2017 – **S. Gallien**, M. Andraud, L. Bigault, N. Morin, G. Lediguerher, F. Paboeuf, N. Rose, B. Grasland, Horizontal transmission of a French InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus - Prague – République Tchèque.
5. Nidovirus 2017 – **S. Gallien**, M. Andraud, L. Bigault, M. Berri, F. Paboeuf, N. Rose, B. Grasland, Quantification of within- and between-pen transmission of a French InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus – Kansas City – USA.
6. 11. International Congress for Veterinary Virology/12. Annual Meeting of EPIZONE – **S. Gallien**, A. Moro, G. Lediguerher, V. Catinot, F. Paboeuf, M. Berri, P.C. Gauger, N. Pozzi, E. Authié, N. Rose, B. Grasland, Comparison of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) shedding in semen from infected specific pathogen-free boars (SPF) with a French S-InDel PEDV strain or a US S-non-InDel PEDV strain – Vienne – Autriche.
7. 11. International Congress for Veterinary Virology/12. Annual Meeting of EPIZONE – **S. Gallien**, C. Rossignol, I. Fleurot, C. Chevaleryre, C. Bernard, P. C. Gauger, L. Bigault, S. Melo, A. Moro, G. Lediguerher, F. Paboeuf, N. Rose, B. Grasland, M. Berri, Comparison of pathogenicity and intestinal immunity outcomes in pigs infected with French S-InDel or US S-non-InDel strains of porcine epidemic diarrhea virus – Vienne – Autriche.

Formations:

1. Formation au management de la qualité
2. Formation au logiciel R

3. Formation diplômante à l'expérimentation animale de niveau I « Conception et réalisation de procédures expérimentales »

**Annexe 4 : Publication
poster Journées de la
Recherche Porcine 2018**



Comparaison de la transmission horizontale d'une souche française InDel et d'une souche US non InDel de virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV)

Sarah GALLIEN (1,2), Mathieu ANDRAUD (1), Lionel BIGAULT (1), Angélique MORO (1), Nadège MORIN (1), Gérald LEDIGUERHER (1), Mustapha BERRI (2), Frédéric PABOEUF (1), Nicolas ROSE (1), Béatrice GRASLAND (1)

(1) ANSES, Laboratoire Ploufragan-Plouzané, Les Croix, 22440 Ploufragan, France

(2) INRA Centre Val de Loire, Site de Tours, 37380 Nouzilly, France

sarah.gallien@anses.fr

Comparison of the horizontal transmission of a French InDel strain and a US non-InDel strain of porcine epidemic diarrhea virus

Two types of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain currently exist: the InDel and the highly virulent non-InDel strains. This study aimed to compare the pathogenicity and the transmission capacity in a pig population of an InDel PEDV strain isolated in France in 2014 (FR/001/2014) to those of a non-InDel PEDV strain from the United States (USA/2014/IOWA). The study was carried out in facilities of the French Agency for Food, Environmental and Occupation Health & Safety (ANSES). Four rooms, each with 10 pigs (two contiguous pens with five pigs each, separated by 40 cm), were used. In each room, a pig from one of the two pens was inoculated orally with 5 mL of an inoculum of one of the two strains titrating 10^8 genomic copies/mL (two rooms/strain). Each inoculated pig remained in direct contact with four pigs and in indirect contact with the other five pigs. The viral genome was quantified by RT-qPCR in sera, feces and air samples. Seroconversion was assessed with an ELISA test. All pigs, both inoculated and contacts, showed clinical signs and shed virus, except for those in indirect contact for the InDel trial. All pigs seroconverted except some pigs of the non-InDel trial. The virus was detected in the air of all four rooms. Direct contact is the main transmission route for the InDel strain, while both direct contact and air are transmission routes for the non-InDel strain. Quantification of the transmission revealed a propagation rate higher for the non-InDel strain than for the InDel strain.

INTRODUCTION

La diarrhée épidémique porcine (DEP) a été décrite pour la première fois dans les années 1970 en Europe. La DEP est caractérisée par de fortes diarrhées aqueuses accompagnées de vomissements et de déshydratation. L'agent responsable de cette maladie, le PEDV, est un virus enveloppé à ARN simple brin de 28 kb appartenant à la famille des coronavirus. En 2010, des cas de DEP accompagnés d'une forte morbidité (100%) et mortalité (80 à 100%) sont apparus en Asie. Les souches virales isolées lors de ces épidémies étaient différentes des souches des années 1970-80 (insertion/délétion au niveau de la partie S1 du gène S) et entraînaient des cas cliniques plus sévères. En 2013, les Etats Unis, qui étaient indemnes de cette maladie, ont été frappés par la DEP. Au cours de cette épidémie, deux types de souches ont été identifiées (séparément ou parfois en co-circulation) dans les élevages touchés par la maladie : des souches dites non-InDel, proches des souches asiatiques isolées en 2010 et des souches dites InDel plus proches des souches européennes des années 1970-80 (Jung et Saif, 2015).

Cette étude vise à comparer les différences de pathogénicité et de transmission de ces deux types de souches. La souche InDel utilisée a été isolée en France en 2014 et la souche non-InDel a été isolée dans un élevage de l'Iowa en 2014.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux et dispositif expérimental

Les expérimentations ont été mises en place dans la station expérimentale porcine de l'ANSES en accord avec les réglementations européennes et française sur le bien-être animal en vigueur. Vingt-trois porcs EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiés) âgés de trois semaines ont été utilisés pour chaque souche. Le dispositif expérimental était le même pour les deux souches : deux salles (salles 1 et 2) composées de deux parcs de cinq porcs éloignés de 40 cm et séparés par une bâche ; une salle (salle 3) d'un parc de trois porcs témoins. Dans les salles 1 et 2, un porc d'un des deux parcs a été inoculé avec 5ml d'un inoculum d'une des deux souches titrant 10^8 copies/ml. Dans ces salles, quatre porcs étaient en contact direct (CD) et cinq porcs étaient en contact indirect (CID) avec le porc inoculé (I). Des mesures de biosécurité ont été mises en place pour prévenir le transfert mécanique du virus d'un parc à l'autre (ordre de passage, pédiluve). L'essai avec la souche InDel a duré 49 jours post-inoculation (JPI) et celle avec la souche non-InDel 72 JPI.

1.2. Evaluation clinique et prélèvements biologiques

Les poids et la température des animaux ont été relevés avant le début des expérimentations puis de façon hebdomadaire

2018. Journées Recherche Porcine, 50, 236-236.

pour les poids et journalière pour les températures au cours de l'expérimentation. Les signes cliniques ont été observés quotidiennement (diarrhées, vomissement, déshydratation, anorexie...). Des prélèvements de fèces et d'air ont été réalisés avant le début de l'essai, puis l'après-midi suivant l'inoculation, deux fois/jours de 1 à 4 JPI, une fois/jours de 5 à 6 JPI et trois fois/semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Des prélèvements de sang ont été effectués : avant le début de l'expérimentation, une fois/semaine de 1 à 4 JPI, puis deux fois/semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation.

1.3. Analyse des prélèvements biologiques et statistiques

Les ARN ont été extraits des fèces, des sérums et des échantillons d'air avec le RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne). La présence de l'ARN du PEDV a été quantifiée par RT-qPCR.

La séroconversion des animaux a été évaluée par test ELISA (kit ID Screen® PEDV Indirect, ID Vet, Grabels, France).

1.4. Statistiques et modélisation

Les comparaisons des gains moyens quotidiens (GMQ) et des charges génomiques virales excrétées selon les statuts (I, CD ou CID) et les souches ont été réalisées avec une ANOVA ou un test de Kruskal-Wallis lorsque les conditions de normalité des données et d'homogénéité des variances n'étaient pas rencontrées. Les paramètres de transmission ont été estimés par modélisation. Un modèle épidémiologique SEIR a été appliqué et les paramètres de transmission (force d'infection λ , taux de transmission direct β , taux de transmission indirect β_b , période de latence δ , durée de l'excrétion σ et le taux de clairance μ) ont été calculés en utilisant une chaîne de Monte-Carlo Markov.

Tableau 1 – Moyenne de la charge génomique virale excrétée dans les fèces (copies/ml de fèces) et nombre de porcs excréteurs

Statut	Souche	JPI	-3	1	1.5	2	3	4.5	5	6	7	14	21	28	49	56	72	
I	InDel	PE ¹	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	0/0	0/0	nd ³	nd	
		MCVE ²	0	0	0	5,6×10 ⁸	3,2×10 ⁹	8,3×10 ⁹	7,4×10 ⁹	2,6×10 ⁹	9,1×10 ⁷	8,1×10 ⁴	2,4×10 ⁵	0	0	nd	nd	
	non-InDel	PE ¹	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0
		MCVE ²	0	2,4×10 ¹⁰	7,7×10 ¹⁰	1,8×10 ¹¹	1,5×10 ¹¹	2,7×10 ¹⁰	4,5×10 ¹⁰	4,1×10 ¹⁰	1,3×10 ⁹	1,2×10 ⁸	3,9×10 ⁶	0	0	0	0	
CD	InDel	PE ¹	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	3/8	4/8	6/8	8/8	6/8	4/8	1/8	nd	nd	
		MCVE ²	0	0	0	0	0	9,2×10 ²	2,4×10 ⁷	4,0×10 ⁸	9,4×10 ⁷	8,0×10 ⁷	3,5×10 ⁷	2,0×10 ⁵	6,9×10 ⁴	nd	nd	
	non-InDel	PE ¹	0/8	1/8	3/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	6/8	4/8	2/8	1/8	0/8	0/8
		MCVE ²	0	1,5×10 ⁶	2,0×10 ⁶	9,0×10 ¹⁰	1,0×10 ¹¹	9,4×10 ¹⁰	7,8×10 ¹⁰	3,2×10 ¹⁰	5,0×10 ⁹	1,2×10 ⁸	2,5×10 ⁷	6,6×10 ⁵	3,5×10 ⁴	0	0	
CID	InDel	PE ¹	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
		MCVE ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	non-InDel	PE ¹	0/10	0/10	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	5/10	4/10	1/10	0/10	0/10
		MCVE ²	0	0	0	3,2×10 ¹⁰	1,8×10 ¹¹	3,4×10 ¹⁰	5,0×10 ¹⁰	2,6×10 ¹⁰	6,5×10 ⁹	1,2×10 ⁸	3,5×10 ⁷	1,0×10 ⁷	1,7×10 ⁶	0	0	

¹PE : porcs excréteurs, ²MCVE : Moyenne Charge génomique Virale Excrétée, ³nd : non déterminé

2. RESULTATS

Tous les porcs ont présenté des signes cliniques à l'exception des CID InDel. L'infection par le PEDV a affecté significativement les GMQ des I, des CD InDel et de tous les porcs non-InDel. Un impact sur le GMQ significativement plus important de la souche non-InDel a été observé après inoculation. Une excrétion de PEDV dans les fèces a été notée pour tous les porcs sauf pour les CID InDel qui n'ont pas été infectés tout au long de l'essai. Cette excrétion a débuté plus tôt pour les I et CD non-InDel. Les quantités de virus excrété ont été plus élevées pour les porcs non-InDel que pour les porcs InDel. Une différence statistiquement significative est observée entre les CD InDel et non-InDel entre 1 et 7 JPI. La durée d'excrétion moyenne du PEDV pour les porcs était d'environ 26 jours pour les deux souches (Tableau 1, 2). Le taux de transmission (nombre de porcs nouvellement infectés par porc excréteur et par jour) était significativement plus élevé pour la souche non-InDel que pour la souche InDel (Tableau 2). Le virus a été détecté dans l'air des salles 1 et 2 pour les deux souches. Le nombre de copies génomiques détectée était compris entre 2,08×10¹ et 1,78×10⁴ copies/L d'air pour la souche InDel et entre 1,55×10¹ et 2,11×10⁵ copies/L d'air pour la souche non-InDel. La présence du virus dans l'air a été détectée plus tôt et plus longtemps avec la

souche non-InDel (entre 1 et 35 JPI avec une nouvelle détection à 65 JPI vs entre 2 et 35 JPI pour la souche InDel). La quantité de PEDV retrouvée dans l'air était plus importante avec la souche non-InDel jusqu'à 5 JPI. La présence du PEDV dans les sérums est transitoire et difficilement détectable. Tous les porcs ont présenté une séroconversion pour le PEDV sauf certains CD souche non-InDel.

Tableau 2 – Paramètres de transmission pour les deux souches

Paramètres	Souche InDel	Souche non-InDel
β	1,36(0,6; 5,6)	2,95(1,33; 5,23)
β_b	4E-4 (8E-7; 7E-3)	0,48 (0,11; 1,35)
1/ δ (jours)	2,0 (1,2; 3,6)	0,003 (0,001; 0,15)
σ (jours)	26 (21;32)	26 (21;32)

CONCLUSION

Les résultats montrent que la voie principale de transmission est le contact direct pour la souche InDel alors que la voie aérienne s'ajoute au contact direct pour la transmission du PEDV en cas de souche non-InDel. La quantification de la transmission souligne un taux de propagation plus élevé pour les souches non-InDel que pour les souches InDel. Ces paramètres de transmission permettront de modéliser la transmission des souches InDel et non-InDel à plus grande échelle.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

- Jung, K., Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. Vet. J., 204, 134-143.

Annexe 5 : Attestation de management qualité de la thèse





Laboratoire de Ploufragan-Plouzané

Service Management Qualité

Thèse préparée par Sarah GALLIEN

« Etude comparative de la transmission de virus de la diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection ».

**Attestation de management qualité de la thèse
Par Eric CHORIN, chef du Service de Management Qualité**

Les travaux de thèse conduits par Sarah GALLIEN se sont déroulés sous management de la qualité, dans l'unité « Génétique Virale et Biosécurité » (U GVB) à compter du 01 septembre 2015. Cela s'est concrétisé par la rédaction, par la doctorante, d'un Plan de Management Qualité (PMQ) signé par elle-même, la Directrice de thèse et le Responsable qualité du Laboratoire.

Véritable engagement pour le management de la thèse, ce PMQ a deux normes pour référence :

- la norme NF EN ISO/CEI 17025 (Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) appliquée dans ce projet, pour la gestion des ressources au sein de l'unité GVB ;
- la norme ISO 10006 (Systèmes de management de la qualité – lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets) mise en œuvre pour la conduite du projet de thèse.

La préparation du PMQ

Avant la rédaction du PMQ, une réunion de travail a été organisée entre la doctorante, la directrice de thèse, la cheffe de projet selon la norme ISO 10006, et le Responsable qualité, chef du Service Management Qualité du Laboratoire. Cette réunion a d'abord permis à la doctorante de connaître et comprendre les exigences et recommandations de la norme ISO 10006, celles relatives à la norme NF EN ISO/CEI 17025 faisant l'objet d'une information systématique de tout nouvel arrivant au Laboratoire, par la Correspondante qualité de l'unité.

La deuxième partie de la réunion a surtout permis d'aborder le contenu attendu pour le PMQ en faisant systématiquement un lien entre le sujet de la thèse, sa mise en œuvre et la formalisation de son déroulement.

Ainsi a été abordée la nécessité d'un organigramme de thèse incluant les acteurs extérieurs à l'unité GVB et en les distinguant de ceux extérieurs à l'ANSES. De même, les notions de « point critique » dans le projet de thèse, ou de « revue de projet » conformément à la norme ISO 10006, ont fait l'objet d'échanges avec l'équipe de thèse.

Cette réunion a donné lieu à une prise de notes par chacun des participants.

Sarah GALLIEN a ensuite rédigé le PMQ de sa thèse en lien avec sa directrice de thèse, la cheffe de projet et le Responsable qualité. Avec ce document, ce sont des éléments d'organisation et de gestion des travaux de thèse qui ont été réfléchis, décidés et formalisés.

La mise en œuvre du PMQ

Comme pour toute démarche de management qualité, la conduite de la thèse s'est traduite par un suivi régulier de la cheffe de projet et de la Directrice de thèse avec validation des travaux de la doctorante. De nombreuses données ont été enregistrées conformément aux engagements en termes de traçabilité.

Le management de projet a donné lieu à des vérifications de l'application des dispositions d'organisation formalisées dans le PMQ. Cela s'est notamment traduit par un audit interne de management de projet conduit par le Chef du Service Management Qualité le 28 août 2018. Au terme de cet audit qui s'est déroulé selon la procédure en vigueur au Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, un rapport d'audit a été rédigé et diffusé. Aucune fiche de constat d'écart n'a été ouverte.

Les exercices de traçabilité faits par l'auditeur, se sont révélés conformes aux engagements de l'équipe de thèse. Plusieurs cahiers de laboratoires normalisés ont été utilisés, y compris pour les réunions de l'équipe de thèse. La doctorante a aussi stocké ses nombreuses données dans un fichier électronique qui lui permet de rassembler pour chaque prélèvement étudié, l'ensemble de ses caractéristiques.

Les réunions d'avancement du projet et de suivi de la doctorante, sont effectivement tracées.

Dans ses conclusions générales, l'auditeur, a notamment souligné :

- le gros travail réalisé par l'équipe et en particulier par la doctorante ;
- la qualité de la traçabilité des travaux conduits.

Bilan du management qualité de la thèse

Le déroulement de la thèse sous management qualité, a d'abord permis à Sarah GALLIEN de découvrir deux référentiels qualité qui, dans l'esprit au moins, lui seront nécessaires pour sa carrière professionnelle et directement bénéfiques pour des fonctions éventuelles au sein d'un laboratoire ou dans le management d'un projet.

En second lieu, ce management qualité a dû lui être utile sur plusieurs points :

- la formalisation la plus complète possible du projet scientifique, en particulier au démarrage ;
- l'importance de clarifier les rôles respectifs des différents acteurs du projet mais aussi de s'intégrer dans leur agenda respectif ;
- l'intérêt de réfléchir, au moins au début du projet, aux éventuels points critiques et les actions préventives nécessaires pour les maîtriser. Dans le cas présent, cet aspect « point critique » a été parfaitement géré ;
- la nécessité de mettre en œuvre la traçabilité des ressources (personnels compétents et formés, équipements principaux suivis et vérifiés, consommables critiques, locaux attribués à certains usages,...) afin de pouvoir analyser dans les meilleures conditions tout résultat inattendu ;
- l'importance de formaliser tous les résultats et les cheminements intellectuels.

Au final, je suis convaincu que Sarah GALLIEN, a pu acquérir une méthode rigoureuse de conduite de projet en ayant partagé dès le début de sa thèse avec sa directrice de thèse et cheffe de projet, la démarche de management qualité.

Fait à Ploufragan le 17 Septembre 2018



Eric CHORIN
Chef du Service Management Qualité

Titre : Etude comparative de la transmission de virus de diarrhée épidémique porcine et de l'immunité induite lors de l'infection

Mots clés : PEDV, transmission, virologie, épidémiologie, immunologie

Résumé :

La diarrhée épidémique porcine (DEP) est apparue en Europe à la fin des années 1970 et est causée par un alpha-coronavirus appelé virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV). Des épizooties sévères ont été rapportées en Asie à partir de 2010 et en Amérique à partir de 2013. Deux génotypes de souches de PEDV, se différenciant par des insertions/délétions dans le gène S, ont été isolés et circulent toujours actuellement dans ces régions. Ils regroupent d'une part les souches « S-InDel » présentes sur tous les continents, notamment en Europe y compris la France, et d'autre part les souches « S-non-InDel » hautement virulentes qui circulent en Asie et sur le continent américain uniquement. Les porcs infectés par le PEDV sont sujets à d'importantes diarrhées aqueuses ainsi qu'à des vomissements parfois accompagnés de signes de déshydratation. Les conséquences de la maladie sont d'autant plus importantes en cas d'infection par une souche « S-non-InDel » avec une mortalité pouvant atteindre les 100% chez les porcelets sous la mère. Des incertitudes subsistent cependant sur les différences de pathogénicité selon les souches de PEDV et quant à l'impact de l'introduction potentielle des souches « S-non-InDel » en France.

La pathogénicité comparée de deux souches de PEDV a été étudiée dans le cadre de cette thèse : une souche « S-non-InDel » isolée aux Etats-Unis en 2014 et une souche « S-InDel » isolée en France la même année. L'étude de la pathogénicité comparée a consisté à étudier les caractéristiques de transmission horizontale et les conséquences cliniques de l'infection en conditions expérimentales. En outre, l'excrétion dans la semence de ces deux souches a également été explorée. La dernière partie du projet de thèse était consacrée à l'étude des interactions du virus avec l'intestin ainsi que l'immunité induite, in vivo, en infection expérimentale en comparant ces deux souches de PEDV. Cette thèse a permis de mieux comprendre les différences de pathogénicité entre ces deux souches en apportant des éléments objectifs sur le plan clinique et épidémiologique via la caractérisation de la capacité de ces souches à se propager au sein des populations porcines ; mais aussi en apportant des éléments objectifs sur leur possible dissémination dans le sperme et en étudiant de manière détaillée la mise en place de la réponse immunitaire digestive lors de l'infection.

Title : Comparative study of the transmission of porcine epidemic diarrhea virus and of the immunity induced during the infection

Keywords : PEDV, transmission, virology, epidemiology, immunology

Abstract :

Porcine epidemic diarrhea (PED) appeared in Europe at the end of 1970s and is caused by an alpha-coronavirus named porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). Severe PED epizootic cases have been reported in Asia from 2010 and in America from 2013. Two genotypes of PEDV strains, differing by insertions/deletions in the S gene, have been described and circulating to date. The first genotype is represented by « S-InDel » strains group present on all continents among which Europe, including France. The second one is represented by the so-called highly virulent « S-non-InDel » strains which circulate in Asia and America only. The pigs infected by PEDV are affected by important aqueous diarrheas and sometimes vomiting accompanied by signs of dehydration. The consequences of the disease are more important in case of infection by an « S-non-InDel » strain with a mortality rate that could reach 100 % in suckling piglets. Uncertainties remained on pathogenicity differences according to the strains of PEDV and on impacts of a potential introduction of « S-non-InDel » PEDV strain in France.

This thesis aimed at studying and comparing the pathogenicity of two strains of PEDV, an « S-non-InDel » PEDV strain isolated in the United-States in 2014 and an « S-InDel » PEDV strain isolated in France the same year. To compare pathogenicity between strains, the horizontal transmission and the clinical consequences of the infection in experimental conditions have been studied. Moreover the virus shedding in semen was also explored for the two strains. The last part of the project of the thesis was dedicated to the study of the interaction of the virus with the intestine and the mediated immune response, following in vivo experimental infection using the two strains of PEDV. This thesis provided a deeper understanding of the differences in pathogenicity between these two strains by showing clinical objective differences, evaluating the differential capacity of these strains to propagate within the porcine populations through horizontal dissemination; but also providing objective data on semen shedding and on the characterization of the digestive immune response following PEDV infection.