



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/
Eprints ID : 17625](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 17625)

To cite this version :

Braud, Cindy. *Étude de la prévalence du virus de Schmallerberg chez les bovidés de parcs zoologiques dans deux contextes épidémiologiques différents*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 155 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ETUDE DE LA PREVALENCE DU VIRUS DE SCHMALLENBERG CHEZ LES BOVIDES DE PARCS ZOOLOGIQUES DANS DEUX CONTEXTES EPIDEMIOLOGIQUES DIFFERENTS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BRAUD, Cindy

Née, le 19 juillet 1988 à Saintes (17)

Directeur de thèse : M. Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :

M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Gilles MEYER

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

M. Norin CHAI

M. Guillaume LE LOC'H

Docteur Vétérinaire à Ménagerie du Jardin des Plantes, Paris

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mme Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES- MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury de thèse,

À Monsieur le Professeur Jacques IZOPET,

Professeur des Universités,

Chef de service,

Praticien hospitalier

Qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,

En témoignage de mon profond respect.

À Monsieur le Professeur Gilles MEYER,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE,

Pathologie des ruminants,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse,

Pour sa patience, sa gentillesse, sa pédagogie,

Remerciements très sincères.

À Monsieur le Professeur Stéphane BERTAGNOLI,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE,

Virologie-Infectiologie

Qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury,

Sincère reconnaissance.

À Monsieur le Docteur Norin CHAI,

Vétérinaire et Directeur adjoint de la Ménagerie du Jardin des Plantes du Muséum National
d'Histoires Naturelles à PARIS

Qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury,

Qui m'a permis de participer à ce projet, pour son soutien depuis quelques années déjà,
pour l'exemple et la motivation,

Remerciements très chaleureux.

À Madame le Docteur Eve LALOY,

Maître de conférences contractuel à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Pour son aide, ses conseils précieux, ses compétences, sa bienveillance, la qualité de son accompagnement.

Remerciements très chaleureux.

A Monsieur le Docteur Guillaume LE LOC'H

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE,

Pathologie de la faune sauvage et des nouveaux animaux de compagnie

Qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury,

pour son soutien dans la réalisation de mes projets,

Remerciements sincères

À Monsieur le Docteur Jacques KAANDORP,

Vétérinaire du parc zoologique de Beekse-Bergen (PAYS-BAS)

Pour avoir permis la réalisation de ces recherches grâce à l'envoi de ses prélèvements, pour ses conseils pertinents et le modèle qu'il est pour un bien grand nombre de vétérinaires.

Remerciements très respectueux.

A l'ensemble de l'équipe de la Ménagerie du Jardin des Plantes et de l'ANSES,

Emmanuel BREARD, Aude BOURGEOIS, Muriel KOHL, Corinne SAILLEAU, Cyril

VIAROUGE, Stephan ZIENTARA,

Pour avoir apporté leurs contributions dans la réalisation de ce projet,

Remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Docteur Dylan DUBY,

Vétérinaire de la Ménagerie du Jardin des Plantes,

Pour avoir permis le transport des prélèvements du parc zoologique de Beekse-Bergen jusqu'à l'ANSES.

Remerciements chaleureux.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.	L'AGENT PATHOGENE : LE VIRUS DE SCHMALLEMBERG.....	15
A.	Taxonomie et phylogénie.....	15
1.	Les arboviroses.....	17
2.	La famille des Bunyaviridae.....	19
3.	Le genre Orthobunyavirus et le séro groupe Simbu.....	20
B.	Caractéristiques structurales et moléculaires.....	21
1.	Caractéristiques structurales.....	21
2.	Propriétés antigéniques et contournement de la réponse immunitaire.....	23
3.	Capacités de survie dans l'environnement.....	26
C.	Epidémiologie.....	26
1.	Espèces sensibles.....	26
a)	Les ruminants domestiques.....	26
b)	Les non-ruminants.....	27
(1)	Les hommes.....	27
(2)	Autres ongulés.....	27
(3)	Carnivores et autres.....	28
2.	Transmission.....	28
a)	Transmission horizontale.....	28
(1)	Transmission vectorielle : un moucheron du genre <i>Culicoides</i>	28
(a)	Identification.....	29
(b)	Biologie.....	30
(c)	Epidémiologie du moucheron.....	30
(d)	Météorologie et activité vectorielle.....	31
(2)	Transmission vénérienne.....	32
(3)	Autres.....	32
b)	Transmission verticale.....	33
c)	« Overwintering ».....	34
II.	LE VIRUS DE SCHMALLEMBERG CHEZ LES RUMINANTS DOMESTIQUES.....	35
A.	Historique et épidémiologie descriptive de la maladie.....	35
B.	Diagnostic de la maladie de Schmallenberg.....	38
1.	Diagnostic clinique.....	38
a)	Les signes cliniques non spécifiques.....	38
b)	Les malformations congénitales.....	39
c)	Les troubles de la reproduction.....	41
2.	Diagnostic post-mortem.....	41
a)	Macroscopique.....	41
b)	Histologique.....	44
(1)	Lésions inflammatoires.....	45
(2)	Lésions dégénératives.....	46
(a)	Lésions vasculaires et pertes tissulaires.....	46
(b)	Lésions de la moelle épinière.....	46
3.	Diagnostic différentiel.....	48
4.	Diagnostic biologique.....	51

a)	Les prélèvements : Isolement et identification.	51
(1)	Tests indirects.	51
(a)	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).	52
(b)	Immunofluorescence indirecte.	53
(c)	Séroneutralisation virale (VNT).	53
(2)	Tests directs.	54
(a)	RT-qPCR.	54
(b)	Isolement du virus sur culture cellulaire.	55
(c)	Isolement du virus par hybridation in-situ.	56
C.	Prévention et mesure de lutte.	56
1.	Hygiène et prophylaxie sanitaire : la lutte contre le vecteur.	56
a)	La lutte mécanique.	57
b)	La lutte écologique.	57
c)	La lutte chimique.	58
d)	Vaccination.	59
e)	Gestion de la reproduction.	61
III.	IMPORTANCE DU VIRUS DE SCHMALLEMBERG CHEZ LES RUMINANTS SAUVAGES ET DE PARCS ZOOLOGIQUES.	61
A.	Quelques aspects généraux sur la conservation des espèces.	61
1.	Union Internationale pour la Conservation de la Nature.	61
2.	CITES.	65
3.	Le système TRACES.	66
4.	Plans d'élevage européens.	66
B.	Taxonomie et classification des ruminants domestiques et sauvages.	67
1.	Caractéristiques anatomiques.	67
2.	Caractéristiques phylogéniques.	69
3.	Quelques aspects de conservation.	75
C.	Etude de l'infection du SBV chez quelques espèces sauvages.	75
IV.	CONCLUSION.	80

DEUXIEME PARTIE: PARTIE EXPERIMENTALE

I.	OBJECTIFS.	83
II.	MATERIELS ET METHODES.	83
A.	Réalisation des prélèvements.	83
B.	Acheminement des prélèvements pour analyses.	84
C.	Informations sur les individus.	84
D.	Les analyses.	85
1.	Protocole : ELISA ID Screen® SBV Competition, ID Vet, France.	85
2.	Protocole de séroneutralisation virale.	87
3.	Protocole de RT-qPCR.	88
a)	Extraction.	88
b)	Amplification.	89
c)	Analyse selon le logiciel BLAST.	90
4.	Protocole souris IFNAR-/-	91
III.	RESULTATS.	93
A.	Séropositivité entre les deux parcs.	93
B.	Résultats sérologiques par individu.	95
C.	Suivi de séropositivité sur plusieurs années.	97
D.	Suivi de la séropositivité en fonction de l'âge.	100
E.	Suivi de la séropositivité en fonction du titre en anticorps.	100

F.	Suivi cinétique des anticorps.....	101
1.	Bharal MA6125 (MJP).....	101
2.	Hippotrague noir (Beekse-Bergen).....	102
G.	RT-qPCR en temps réel et analyses BLAST.....	103
H.	Examen des dossiers cliniques des animaux étudiés.....	104
I.	Analyses sur souris IFNAR-/-.....	105
IV.	DISCUSSION.....	106
A.	Les biais de l'étude.....	106
B.	Les risques d'introduction du SBV en parcs zoologiques.....	107
1.	Une grande diversité d'espèces infectées.....	107
2.	La persistance d'une immunité au fil des années.....	108
3.	Une rapide dissémination du virus au sein des populations de ruminants en captivité.....	109
4.	Réflexion sur l'activité des Culicoïdes en Europe et leurs rôles potentiels de transmission de la maladie en zones urbaines.....	110
C.	La faune sauvage : un rôle de réservoir ?.....	112
1.	Définition du rôle de réservoir.....	112
2.	Les conséquences envisageables pour les espèces menacées : le spillover est-il à l'origine d'un danger pour les espèces en voie de disparition ?.....	113
D.	Réflexion sur la gestion du SBV dans les parcs zoologiques.....	115
V.	CONCLUSION.....	121
	BIBLIOGRAPHIE.....	143

Liste des sigles et des abréviations utilisées

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AINOV : Aino Virus

AKAV: Akabane Virus

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

BDV : Border Disease Virus

BHK : Baby Hamster Kidney

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BTV : Bluetongue Virus

BVD : Bovine Virus Diarrhea

CDC : Center for Disease Prevention and Control

CP : Cytopathogène

Cq : Cycle quantitative

Ct : Cycle threshold = cycle seuil

DEFRA : Département pour l'environnement, l'alimentation et les affaires rurales

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

EAZWV : European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians

ECDC : European Center for Disease Prevention and Control

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid

EFSA : European Food Safety Authority

EHD : Epizootic Hemorrhagic Disease

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESA : Epidémiosurveillance en Santé Animale

FCO : Fièvre Catarrhale Ovine

FLI : Friedrich Loeffler Institut

GDS : Groupement de Défense Sanitaire

IBR : Rhinotrachéite Infectieuse Bovine
IL : Interleukines
INF : Interféron
INRA: Institut Nationale de la Recherche Agronomique
IZW : Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research
KC: Kidneys cells
KO : Knock-Out
L : Large
LACV : La Crosse Virus
LBE : Leucose Bovine Enzootique
LT : Lymphocyte T
M : Medium
NAMP : National Arbovirus Monitoring Program
NCP : Non Cytopathogène
ND : Non déterminé
NK : Natural Killer
OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale
OROV : Oropouche virus
OVI : Onderpoort Veterinary Insitute
pb : paires de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PPR : Peste des Petits Ruminants
qRT-PCR : Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit
RdRp :RNA-dependent RNA polymerase
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
S : Small
SATV : Sathuperi Virus
SBV : virus de Schmollenberg
SHAV : Shamonda Virus
SNC : Système Nerveux Central
UE : Union Européenne
UFP : Unités Formant Plaques

Liste des illustrations

Figure 1: Répartition des virus du séro groupe Simbu dans le monde (d'après Zientara, 2015)	15
Figure 2 : Arbres phylogéniques reproduisant les relations phylogénétiques entre les différents virus du séro groupe Simbu pour les régions codantes M (A), L (B), et S (C) (Goller et al.,2012).....	16
Figure 3: Représentation schématique du virus de Schmallerberg (Friedrich Loffer Institute).	21
Figure 4: Représentation schématique du génome tri-segmenté du virus de Schmallerberg (Source:ViralZone).....	22
Figure 5: Organisation structurale d'un Bunyaviridae (d'après Elliot et al., 2014)	24
Figure 6: Mode de répllication des orthobunyavirus (d'après Elliot et al., 2014)	25
Figure 7: Observation d'un <i>Culicoides</i> au microscope optique (d'après CIRAD)	29
Figure 8: Distribution de la maladie par pays et par date de détection par sérologie et/ou PCR quantitative en temps réel (K. Lievaart-Peterson et al., 2015).....	37
Figure 9 : Graphique représentant la fréquence d'observation des signes cliniques lors de SBV aigu chez les bovins (d'après Collin et al., 2012)	38
Figure 10 : Arthrogrypose et léger torticolis chez un agneau atteint de SBV congénital (Deffontaines, octobre 2013, Côte d'Or).....	39
Figure 11: Fréquence d'observations des différentes malformations dans les élevages bovins (d'après Gache et al., 2014; Desmarais, 2015)	40
Figure 12: Histopathologie de la moelle épinière d'un mouton infecté par le virus de Schmallerberg. Infiltrats multifocaux lymphohistocytaires des méninges, des espaces périvasculaires et de la matière grise et blanche (Herder et al., 2013).....	47
Figure 13: Infiltrats périvasculaires modérés caractérisés par la présence de lymphocytes et de macrophages dans le cerveau d'un mouton infecté (échelle : barre=20 pm)(Herder et al., 2013)	47
Figure 14: Piège lumineux de type OVI permettant la capture de <i>Culicoides</i> (d'après CIRAD).	58
Figure 15 : Cladogramme représentant les familles du sous-ordre des ruminants et les sous-familles de la famille des bovidés basés sur un consensus regroupant 17 arbres phylogénétiques (d'après Dekel et al., 2009).....	74
Figure 16 : Principe d'extraction d'ARN par l'utilisation de billes magnétiques (d'après	

Albertoni et al., 2011).....	89
Figure 17: Aperçu général du protocole AgPath-OneStep RT-PCR.	89
Figure 18: Comparaison du nombre de prélèvements (exprimé en pourcentage du nombre total de prélèvements) entre le parc de BB et le MNHN entre 2011 et 2015.	93
Figure 19: Comparaison de séropositivité entre les bovidés des parcs zoologiques de BB et MNHN entre 2011 et 2015.	94
Figure 20: Comparaison du nombre de prélèvements réalisés entre le MNHN et le parc de BB entre 2011 et 2015.	97
Figure 21: Evolution de la séropositivité chez les bovidés du MNHN entre 2011 et 2015.	98
Figure 22: Evolution de la séropositivité chez les bovidés du parc zoologique de BB entre 2011 et 2014.	99
Figure 23: Représentation de la séropositivité en fonction de l'âge au moment des prélèvements (A: Dans les 2 parcs; B:Beekse-Bergen; C:MNHN; D: Comparaison entre les deux parcs).	100
Figure 24: Histogramme représentant la séropositivité en fonction du titre en anticorps. Comparaison entre les deux parcs.	101
Figure 25: Evolution de la séropositivité d'Octobre 2013 à Septembre 2014 chez un Grand Bharal du MNHN.	102
Figure 26: Evolution de la séropositivité d'Octobre 2011 à Mars 2013 chez un Hippotrague noir du Parc de BB.	103
Figure 27: Représentation schématique des différentes hypothèses concernant la circulation du SBV entre les populations domestiques et sauvages.	114

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux arbovirus tropicaux.....	19
Tableau 2: Présentation des principales anomalies congénitales causées par le SBV chez les ruminants domestiques.	44
Tableau 3 : Diagnostic différentiel du virus de Schmallenberg chez les bovidés (d'après (FCO-Info, 2009 ; Ganter et al., 2014 ; Desfontaines, 2013.).....	48
Tableau 4: Définition des différentes catégories de la Liste Rouge de l'UICN.....	64
Tableau 5: Représentation des différentes sous-familles au sein de la famille des Bovidae....	71
Tableau 6: Exemple de résultats de séroneutralisation en fonction des facteurs de dilutions.	87
Tableau 7: Amorces et sondes fournies par le FLI	90
Tableau 8 : Comparaison de la séropositivité entre les bovidés des parcs zoologiques de Beekse-Bergen (BB) et de la Ménagerie du Jardin des Plantes (MNHN).	93
Tableau 9: Liste des bovidés séropositifs au SBV déterminée par ELISA et test de séroneutralisation virale dans les parcs zoologiques de BB et MNHN entre 2011 et 2015.	96
Tableau 10 : Evolution de la séropositivité d'Octobre 2013 à Septembre 2014 chez un Grand Bharal de la Ménagerie du Jardin des Plantes.	101
Tableau 11: Evolution de la séropositivité d'Octobre 2011 à Mars 2013 chez un Hippotrague noir du Parc de Beekse-Bergen.	102
Tableau 12 : Résultats des analyses sur souris IFNAR-/- (4 jours post-infection en RT-qPCR et 21 jours post-infection en ELISA et SN).....	105
Tableau 13 : Perspectives quant à l'application des mesures préventives établies chez les bovidés domestiques aux bovidés de parcs zoologiques en captivité.	117
Tableau 14: Représentation des espèces d'intérêts étudiées en fonction de leur statut UICN et de leur période de reproduction. (A : Espèce menacée/ B : Superposition période de reproduction/ activités des Culicoides).	119

Liste des annexes

<u>Annexe 1</u> : Résultats BLASTN Segment S Gnou 44 (Beekse-Bergen).....	126
<u>Annexe 2</u> : Poster scientifique « Schmallerberg virus in zoo ruminants » présenté lors de : « International Conference on Animal Diseases » organisé par l'IZW et l'EAZWV au parc zoologique de Barcelone du 13 au 16 Mai 2015.....	132
<u>Annexe 3</u> : Publication scientifique : Laloy E, Braud C, Bréard E, Kaandorp J, Bourgeois A, Kohl M, et al. Schmallerberg virus in zoo ruminants, France and the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2016 Dec. http://dx.doi.org/10.3201/eid2212.150983	134
<u>Annexe 4</u> : Protocole d'extraction d'ARN Kit MagVet.....	138
<u>Annexe 5</u> : Protocole de surveillance (ANSES).....	140

INTRODUCTION

(Martinelle et al., 2012)

Le virus de Schmallenberg (SBV) est la plus récente des maladies vectorielles constituant une menace pour l'industrie de l'élevage en Europe. Cette maladie a été mise en évidence en novembre 2011 par le Friedrich Loeffler Institute (FLI, Ile de Riems, Allemagne) suite à la détection du SBV par analyse métagénomique d'un pool d'échantillons sanguins en provenance d'une ferme de la ville de Schmallenberg (Rhénanie du Nord-Westphalie, Allemagne). Les pourcentages d'homologies nucléotidiques présentés par les séquences génétiques identifiées ont permis de classer ce nouveau virus dans la famille des Bunyaviridae, du genre Orthobunyavirus, et plus précisément du séro groupe Simbu.

La maladie chez les bovins adultes se manifeste essentiellement par des signes cliniques tels que de la fièvre, une perte d'appétit, une dégradation de l'état général ainsi qu'une chute de la production laitière, voire parfois même des diarrhées pouvant être très sévères. Les signes cliniques disparaissent généralement en quelques jours. Dans le cas d'une infection pendant la gestation de la vache, des avortements, de la mortalité ainsi que des atteintes congénitales de type arthrogrypose et hydranencéphalie sont rapportées.

Depuis sa découverte aux Pays-Bas et en Allemagne, la dispersion du virus a continué de s'accroître tout d'abord en Belgique, puis au Royaume-Uni et en France et, plus récemment, en Italie ou encore en Espagne contaminant ainsi des milliers de ruminants domestiques dans de nombreux pays européens (Tarlinton et al., 2012)

Cette infection virale est considérée comme la première circulation autochtone d'un Orthobunyavirus du séro groupe Simbu en Europe occidentale. Bien que le risque zoonotique soit considéré comme très faible, l'émergence du SBV a constitué dès sa découverte un évènement majeur en santé animale et un nouveau défi pour les vétérinaires et les chercheurs européens. Ceci a mené au développement de nombreuses enquêtes épidémiologiques, immunologiques et virologiques dans plusieurs pays européens.

Les conséquences cliniques de cette affection étaient jusqu'alors limitées aux bovins, moutons et parfois aux chèvres. Cependant, considérant que les vecteurs (*Culicoides spp.*)

ingèrent leurs repas de sang à partir d'une grande variété d'animaux hôtes, la recherche a commencé à se concentrer sur l'infection potentielle de la faune sympatrique.

La faune sauvage peut effectivement constituer une source importante de transmission de maladies infectieuses aux animaux domestiques et à l'Homme. Considérant la croissance démographique, le souhait de loisirs ainsi que les modifications de nos écosystèmes et notamment de l'habitat de la faune sauvage, l'interface entre ces différentes populations s'accroît. De plus, les connaissances concernant les maladies qui affectent la faune sauvage ne sont pas suffisantes et sont par conséquent à l'origine d'un manque de stratégies afin de prévenir et gérer l'ensemble des pathologies les affectant.

Depuis le printemps 2013, plusieurs études ont été menées afin de déterminer une éventuelle circulation du SBV parmi la faune sauvage locale. Les analyses sérologiques ont permis de montrer une circulation chez de nombreuses espèces et notamment chez les cervidés.

Compte tenu de ces informations épidémiologiques, il a été décidé au printemps 2013, de rechercher l'éventuelle présence de cet agent infectieux lors de l'autopsie d'un yack de la Ménagerie du Jardin des Plantes du Muséum Nationale d'Histoires Naturelles (MNHN, Paris, FRANCE). Considérant la positivité de la sérologie ainsi que la provenance de l'animal en question, le parc zoologique de Beekse-Bergen (BB), il a été décidé de réaliser une enquête longitudinale dans les deux parcs afin d'évaluer la prévalence du virus dans deux contextes épidémiologiques différents (ville/campagne) chez les différentes espèces de bovidés présentes.

N'ayant que très peu de renseignements concernant l'affection des espèces sauvages à ce moment-là, il a été convenu de réaliser des analyses sérologiques ainsi qu'un suivi PCR à partir des banques de sérums collectés dans les deux parcs zoologiques depuis l'été 2011 et ce jusqu'au printemps 2015. Ce sont un total de 58 échantillons qui ont été prélevés et qui, malgré le manque de représentativité lié au type d'enquête, ont permis de générer des tendances qui permettront d'étoffer les connaissances concernant le SBV chez les ruminants sauvages en captivité et d'anticiper les éventuelles mesures préventives à instaurer en cas de réémergence du virus.

PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'AGENT PATHOGENE : LE VIRUS DE SCHMALLEMBERG.

A. *Taxonomie et phylogénie.*

Le SBV est une arbovirose de la famille des *Bunyaviridae*, du genre *Orthobunyavirus*. Le SBV a été étroitement lié aux virus du séro groupe Simbu lorsqu'il a été découvert. Des séquences nucléotidiques très semblables ont effectivement été retrouvées chez les virus *Shamonda*, *Aino* et *Akabane* (AKAV), qui sont trois virus retrouvés chez les ruminants (Hoffmann et al., 2012b).

Aucun de ces virus n'avait auparavant été détecté en Europe continentale : le virus *Shamonda* a été localisé au Nigeria, au Japon et en Corée; le virus *Akabane* en Australie, au Japon, en Corée, en Israël, en Arabie Saoudite, au Kenya, au Soudan, en Chypre et en Turquie. Quant au virus *Aino*, il a été retrouvé jusqu'à maintenant au Japon, en Corée et en Australie (Lievaart-Peterson et al., 2012).

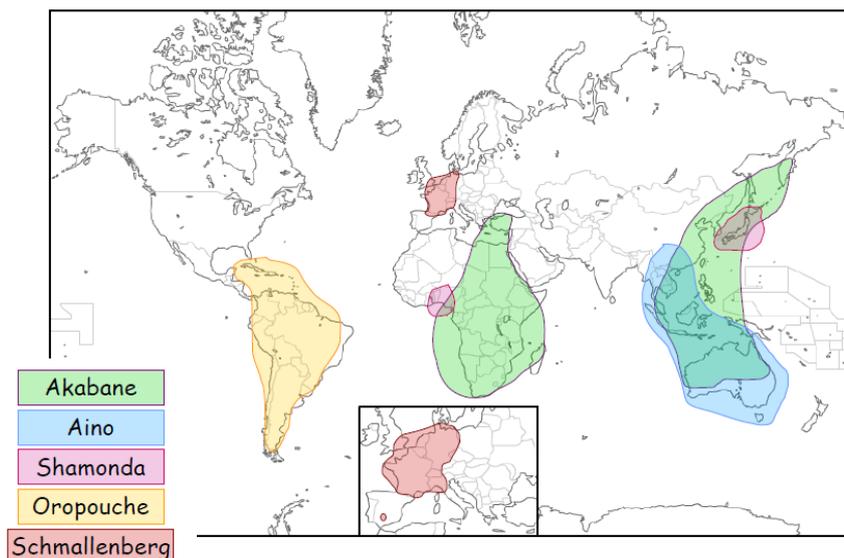


Figure 1: Répartition des virus du séro groupe Simbu dans le monde (d'après Zientara, 2015)

Des études phylogénétiques ultérieures ont montré qu'un des segments du génome du

SBV, le segment M, dériverait en réalité du virus *Shatuperi* (un autre virus du séro groupe Simbu) alors que les segments S et L dériveraient du virus *Shamonda*. Ceci suggérerait que le SBV pourrait être un réassortant entre les virus *Sathuperi* et *Shamonda* (Yanase et al., 2012).

Cependant, une autre étude basée sur des études phylogénétiques et sérologiques, a également montré que le virus *Sathuperi* pourrait en réalité être un ancêtre du virus *Shamonda* (Goller et al., 2012).

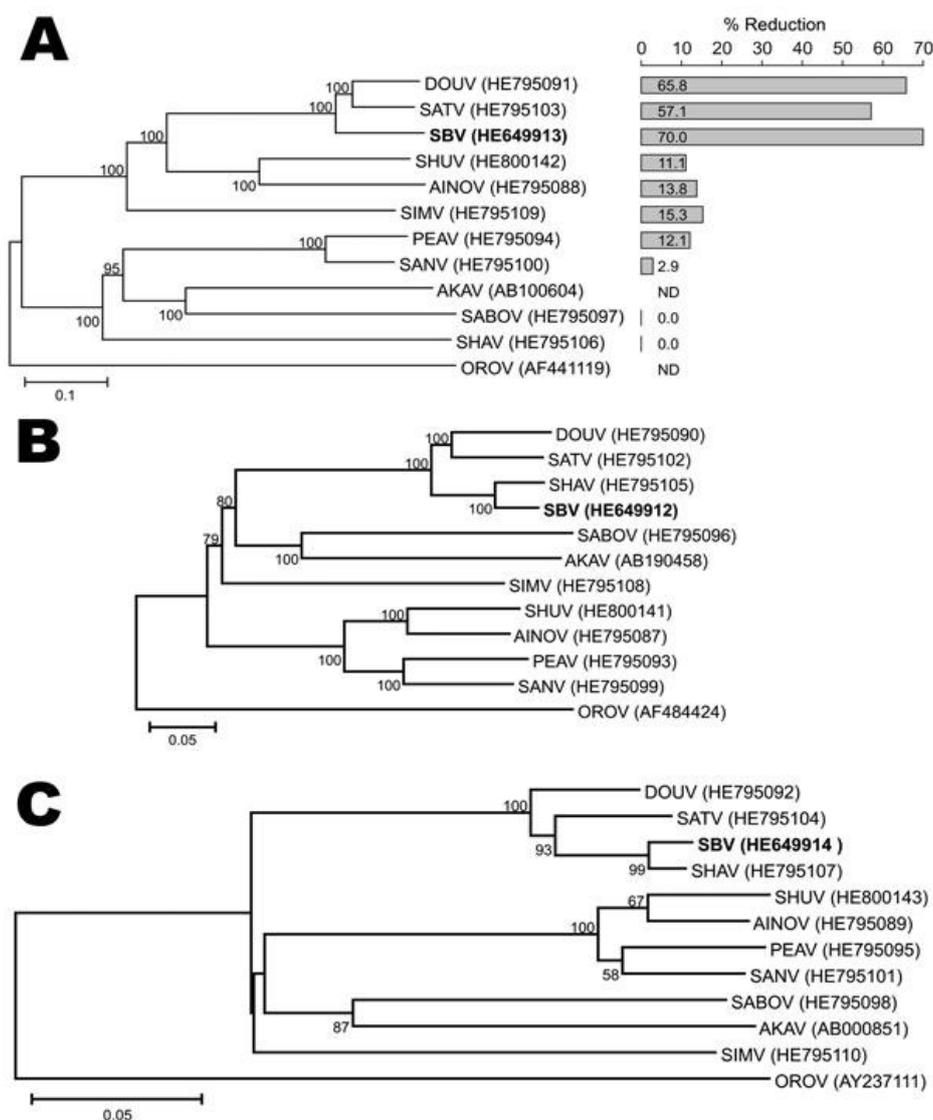


Figure 2 : Arbres phylogéniques reproduisant les relations phylogénétiques entre les différents virus du séro groupe Simbu pour les régions codantes M (A), L (B), et S (C) (Goller et al., 2012)

1. Les arboviroses.

Le terme d'arbovirose provient de l'anglais "arthropode borne virus" qui regroupe plus de 500 virus actuellement. Ils sont habituellement transmis en conditions naturelles de vertébré à vertébré par l'intermédiaire d'un arthropode hématophage qui joue le rôle de vecteur.

Hormis quelques rares exceptions, tous les arbovirus appartiennent à cinq familles de virus (Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae) mais tous les virus de ces familles ne sont pas des arbovirus. Une centaine de ces virus sont connus comme pathogènes pour l'homme et une quarantaine sont responsables de pathologies animales pouvant avoir des conséquences économiques importantes.

Il existe des arbovirus dans toutes les régions du monde, avec une répartition géographique plus ou moins étendue, dépendant de la disponibilité du vecteur et du réservoir naturel animal, sauvage ou domestique. Cette répartition géographique varie dans l'espace, en particulier en fonction des conditions climatiques et des éventuels transports possibles par les oiseaux migrateurs.

L'infection se transmet par voie sanguine alternativement de vecteur à vertébré puis de vertébré à vecteur. Les individus concernés sont les mammifères (singes, rongeurs, chauves-souris, animaux domestiques), les oiseaux, les batraciens ainsi que les reptiles. L'homme peut entrer accidentellement dans le cycle de transmission virale à la place d'un autre mammifère ou être lui-même le réservoir naturel du virus, comme c'est le cas pour les quatre virus de la dengue.

Dans certains cas, une transmission verticale d'une génération à la suivante est possible chez l'arthropode. Le cycle de base est alors modifié: le virus persiste dans les œufs du vecteur et infecte la génération suivante, permettant une persistance virale même sans infection de l'hôte vertébré habituel, surtout pendant les périodes où le vecteur est saisonnièrement absent (hiver en zones tempérées).

Différents types de vecteurs sont en cause selon les virus : moustiques, phlébotomes, culicoïdes, tiques, avec une spécificité d'espèce variable. Les vertébrés sont soit des disséminateurs et amplificateurs du virus, soit des hôtes accidentels, soit des impasses

épidémiologiques.

Trois tableaux cliniques sont communément décrits :

- les polyalgies fébriles (syndromes dengue-like).
- les fièvres hémorragiques dont l'évolution est souvent grave.
- les méningo-encéphalites dont l'évolution est souvent mortelle. En cas de guérison, des séquelles neurologiques sont très fréquemment rapportées.

Des arbovirus différents sont responsables de tableaux cliniques identiques; inversement, un même virus peut provoquer plusieurs types de syndromes. C'est pourquoi, le diagnostic de laboratoire est très important et repose sur l'isolement du virus et l'apparition d'anticorps spécifiques. Les infections asymptomatiques sont également fréquentes et possibles même dans le cas de virus dangereux comme le virus de la fièvre jaune.

L'injection de salive virulente par l'arthropode est suivie d'une répllication à proximité du point d'inoculation et dans les ganglions lymphatiques régionaux, puis d'une phase de virémie de quelques jours, jusqu'à l'apparition des premiers anticorps. Cette virémie assure la contamination de nouveaux arthropodes et une dissémination systémique du virus vers les organes cibles (système nerveux central, foie, reins, glandes endocrines et salivaires).

Dans la majorité des cas, il n'existe pas de traitement spécifique des arboviroses. Certains traitements spécifiques sont en cours de développement tels que les anticorps monoclonaux pour la dengue mais cela reste anecdotique. Le traitement est généralement symptomatique, associant repos et antipyrétique dans le cas des syndromes aigus fébriles, en évitant toujours l'aspirine en raison de la thrombopénie souvent présente et du risque hémorragique éventuel.

La prophylaxie générale des arboviroses repose sur plusieurs axes et notamment la surveillance des foyers épidémiologiques (surveillance des réservoirs naturels avec isolement de virus, la surveillance des populations de vecteurs, surveillance sérologique des populations humaines exposées), la lutte anti-vectorielle avec contrôle des populations de vecteurs domestiques responsables de la transmission à l'homme (suppression des gîtes larvaires, etc.), la protection de la population humaine réceptive (moustiquaires, répulsifs, vaccinations), la vaccination des animaux domestiques pouvant servir de relais d'infection. L'action sur les

hôtes vertébrés sauvages est illusoire.

Famille	Genre	Principaux virus africains	Principaux arbovirus Asie du Sud-Pacifique	Principaux arbovirus américains
Togaviridae	Alphavirus	Chikungunya, O' Nyong Nyong, Sindbis	Chikungunya, Sindbis, Ross River, Barmah Forest	Mayaro, Una, encéphalites équine américaines,
Flaviviridae	Flavivirus	Fièvre jaune, Dengue, West Nile, Zika,	Dengue, encéphalite japonaise, West Nile, Murray Valley, Kunjin, Zika, de la forêt de Kyasanur	Fièvre jaune, dengue, West-Nile, Rocio, Ilheus, encéphalite de Saint Louis, Zika
Bunyaviridae	Bunyavirus Phlébovirus Nairovirus	Bunyamwera, Ilesha, Bwamba, Tataguine Vallée du Rift Crimée-Congo		Oropouche
Reoviridae	Orbivirus	Orungo		

Tableau 1: Principaux arbovirus tropicaux.

2. La famille des Bunyaviridae.

La famille des *Bunyaviridae* est très importante en santé publique et vétérinaire. Avec

plus de 350 virus identifiés à ce jour, elle regroupe des virus transmis principalement par des arthropodes (arbovirus) ou des rongeurs (robavirus), responsables d'infections chez les mammifères et chez les plantes. Cette famille est divisée en 5 genres : *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* et *Tospovirus*. Les virus du dernier genre affectent les plantes alors que les virus des autres genres affectent uniquement les vertébrés (Doceul et al., 2013). L'homme peut être infecté par une soixantaine de ces Bunyaviridae, parfois avec des conséquences très graves, voire fatales.

Les exemples du SBV, du virus de la fièvre de la Vallée du Rift et du genre viral hantavirus illustrent parfaitement les nombreuses incertitudes concernant cette famille virale et leur potentiel d'émergence, leur pouvoir pathogène très varié pour des hôtes divers, et leur capacité à persister chez différents vecteurs. La longueur totale du génome est comprise entre 10,5 et 22,7 kilobases, selon les espèces. Les trois fragments codant sont dénommés L pour Large (6300-12000 nucléotides), M pour Medium (3500-6000 nucléotides) et S pour Small (1000-2200 nucléotides).

La présence d'un génome tri-segmenté rend possible l'émergence de virus réassortants, conséquence d'un échange de segments entre deux virus infectant une même cellule d'un hôte ou d'un vecteur. C'est ainsi que cette compétence a été valorisée par Yanase et al., en 2012 afin d'expliquer l'émergence du SBV.

3. Le genre *Orthobunyavirus* et le séro groupe Simbu.

Le genre *Orthobunyavirus* regroupe 170 virus répartis en 18 sérogroupes (Doceul et al., 2013) d'importance variable aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Sont ainsi inclus des virus responsables de maladies affectant les hommes tels que le virus *Oropouche* (du séro groupe Simbu) et le virus Jamestown Canyon ou encore le virus *La Crosse* (séro groupe California). Des virus responsables de maladies chez les ruminants sont également retrouvés et notamment les virus *Aino* et *Akabane* (séro groupe Simbu) ou bien encore le virus Cache Valley (séro groupe Bunyamwera) (Briese et al., 2013; Hoffmann et al., 2012a). Les 18 sérogroupes ont été déterminés à partir des résultats des tests de fixation du complément sur la protéine de la nucléocapside virale.

La répartition des *Orthobunyavirus* est très large allant de l'Asie à l'Afrique en passant

par l'Océanie (Hoffmann, 2012). Jusqu'en 2011, aucun virus du séro-groupe Simbu n'avait jusqu'alors été détecté en Europe. A ce jour, ce séro-groupe, dont fait partie le SBV, est composé de 25 virus divisés en 7 « espèces » : les virus *Akabane*, *Manzanilla*, *Oropouche*, *Sathuperi*, *Shamonda*, *Shuni* et *Simbu*. Les différences inter-espèces ont pu être déterminées par la réalisation de tests de « neutralisation » croisée et de tests « d'inhibition de l'hémagglutination » croisée (Yanase, 2012).

B. Caractéristiques structurales et moléculaires.

1. Caractéristiques structurales.

Le SBV est un virus enveloppé de petite taille, simple brin, de polarité négative, qui présente une enveloppe sphérique et hélicoïdale ainsi qu'un génome tri-segmenté comme l'ensemble des virus de la famille des Bunyaviridae. Les virions mesurent entre 100 et 120 nm et sont encapsulés sous forme de différents complexes de ribonucléoprotéines.

Les segments du génome L, M et S codent pour quatre protéines structurales (les glycoprotéines Gc et Gn, la nucléoprotéine N et la polymérase virale L) et deux protéines non structurales (Doceul et al., 2013).

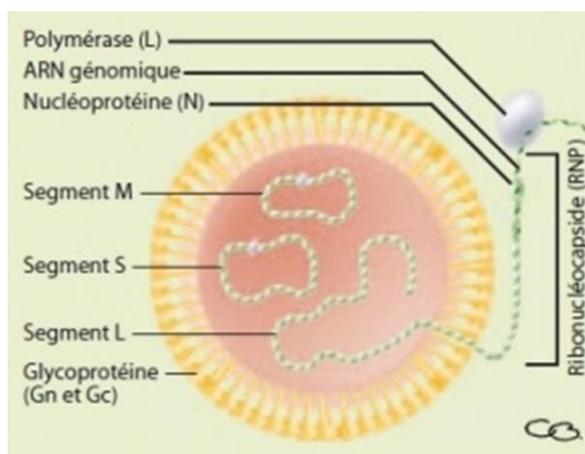


Figure 3: Représentation schématique du virus de Schmallenberg (Friedrich Löffler Institute).

- Le segment S code pour la nucléoprotéine N et la nucléoprotéine Nss. La nucléoprotéine N est la protéine la plus abondante dans le virion ainsi que dans les cellules infectées. Elle a pour rôle majeur d'encapsider le génome. Elle est également

impliquée dans la transcription et la réplication de l'ARN viral (Wernike et al., 2014a).

Bien que la protéine Nss ne soit pas essentielle pour la croissance *in vitro* du virus, elle est cependant impliquée dans la pathogénèse virale : elle joue en effet un rôle dans la modulation de la réponse antivirale des cellules infectées (Pépin, 2012).

- Le segment M code pour la protéine non structurale Nsm. Les fonctions de la protéine Nsm sont encore inconnues, bien qu'elle soit suspectée de participer à l'assemblage viral, probablement dans l'appareil de Golgi (Doceul et al., 2013).

Il code aussi pour une polyprotéine qui est ensuite clivée en deux glycoprotéines de surface (Gn et Gc). Les glycoprotéines de surface Gc et Gn sont des protéines membranaires intégrales de type I qui sont enchâssées dans l'enveloppe. Leurs extrémités C-terminales sont situées à l'intérieur du virus alors que les extrémités N-terminales sont en contact avec l'environnement extérieur. Leurs fonctions complètes n'ont pas encore entièrement été élucidées mais il semblerait qu'elles participent à l'entrée du virus dans la cellule, à la fusion entre virus et membrane plasmique et notamment au bourgeonnement lors de la sortie du virus (Strandin et al., 2013).

- Le segment L code pour la polymérase L qui est une ARN-polymérase ARN dépendante encore renommée RdRp ou protéine L. Cette protéine a quant à elle une double activité : elle agit comme ARN-polymérase mais également comme endonucléase. En tant qu'endonucléase, la protéine L clive les ARNm cellulaires après la coiffe, permettant l'utilisation de la coiffe pour l'initiation de la transcription des ARNm viraux : ce mécanisme est connu sous le nom de 'cap-snatching' (Briese et al., 2013).

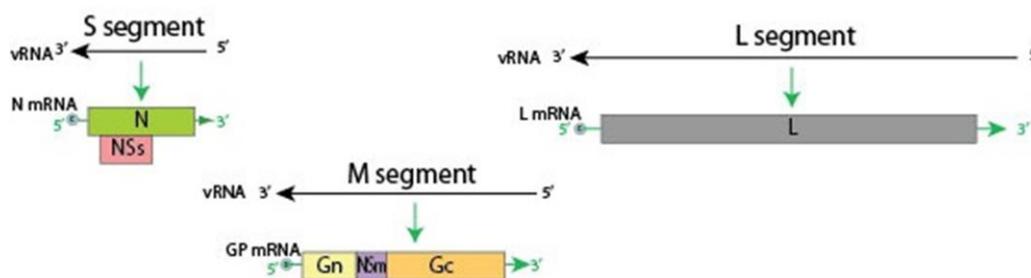


Figure 4: Représentation schématique du génome tri-segmenté du virus de Schmallenberg (Source:ViralZone).

Dans le virion, les trois segments d'ARN adoptent une configuration circulaire en association avec la protéine N de la nucléocapside. Le génome est alors associé à de nombreuses copies de la nucléoprotéine N et à quelques copies de la polymérase pour former la ribonucléoprotéine (Briese et al., 2013; Doceul et al., 2013; Wernike et al., 2014a).

2. Propriétés antigéniques et contournement de la réponse immunitaire.

Les 3 composants impliqués dans le mécanisme d'infection sont la nucléoprotéine N, ainsi que les glycoprotéines Gc et Gn.

La nucléoprotéine N représente la protéine la plus abondante dans le virion ainsi que dans les cellules infectées par le virus. D'un poids moléculaire de 25kDa, ce tétramère est actuellement largement utilisé pour la détection sérologique des infections au SBV. Son fort pouvoir immunogène permet effectivement aux anticorps N-spécifiques d'être détectés rapidement après l'infection. Cette nucléoprotéine joue un rôle crucial dans la transcription et la réplication de l'ARN viral en encapsidant les trois segments d'ARN viraux. Elle interagit avec l'ARN des espèces infectées afin de former des complexes de ribonucléoprotéines (RNP) qui vont être les modèles de réplication et de transcription de l'ARN. En raison d'une forte conservation de la séquence du gène N, une réactivité croisée de la réponse en anticorps est envisageable parmi les membres du même séro groupe Simbu.

Les glycoprotéines Gn et Gc, de masses moléculaires de 35 kDa et 110 kDa sont des protéines transmembranaires intégrales de type I. Elles forment des épines sur la particule virale qui sont essentielles pour la fixation virale et la fusion cellulaire. Ces glycoprotéines sont également les cibles des anticorps neutralisants chez l'individu hôte. Contrairement à la protéine de la nucléocapside, les séquences génétiques codant les glycoprotéines, en particulier Gc, présentent une variabilité plus importante permettant de créer une forte pression immunologique au cours du temps chez les hôtes infectés (Elliott R. B., 2011).

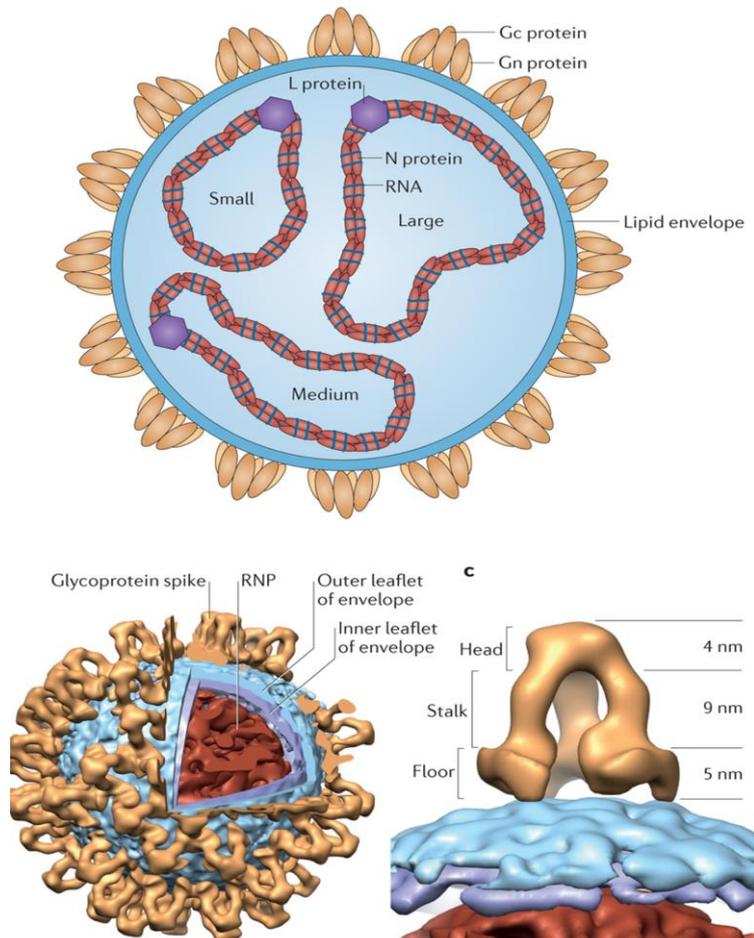


Figure 5: Organisation structurale d'un Bunyaviridae (d'après Elliot et al., 2014)

La pathogénie du SBV repose sur deux compétences principales à savoir sa capacité à échapper à la réponse immunitaire de l'individu ainsi que sa capacité à induire l'apoptose des cellules infectées.

Lors de la piqûre de l'hôte réceptif par les *Culicoides* infectés, de la salive contenant le virus est injectée à l'hôte. Une réplication du virus à proximité du site d'inoculation est observée suivie par une réplication dans les noeuds lymphatiques drainant la zone correspondante.

La phase de virémie correspondant à la dissémination du virus dans l'ensemble de l'organisme jusqu'aux organes cibles varie de 2 à 5 jours (Hoffmann, 2012). En conditions naturelles, cette phase de virémie pourrait être supérieure à 15 jours (Claine et al., 2013).

Le virus pénètre tout d'abord dans la cellule hôte par endocytose après interaction entre les glycoprotéines de surface et les récepteurs cellulaires. Après réplication et synthèse des protéines du virion, l'assemblage du nouveau virus prend place dans des tubules viraux associés étroitement à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique.

Dans le virion, chaque segment génomique est empaqueté par la nucléocapside associée à la polymérase afin de former le complexe ribonucléoprotéine ou RNP. Les virions néosynthétisés sortent de la cellule par bourgeonnement après fusion de la membrane de l'appareil de Golgi et la membrane cellulaire (Walter & Barr, 2011).

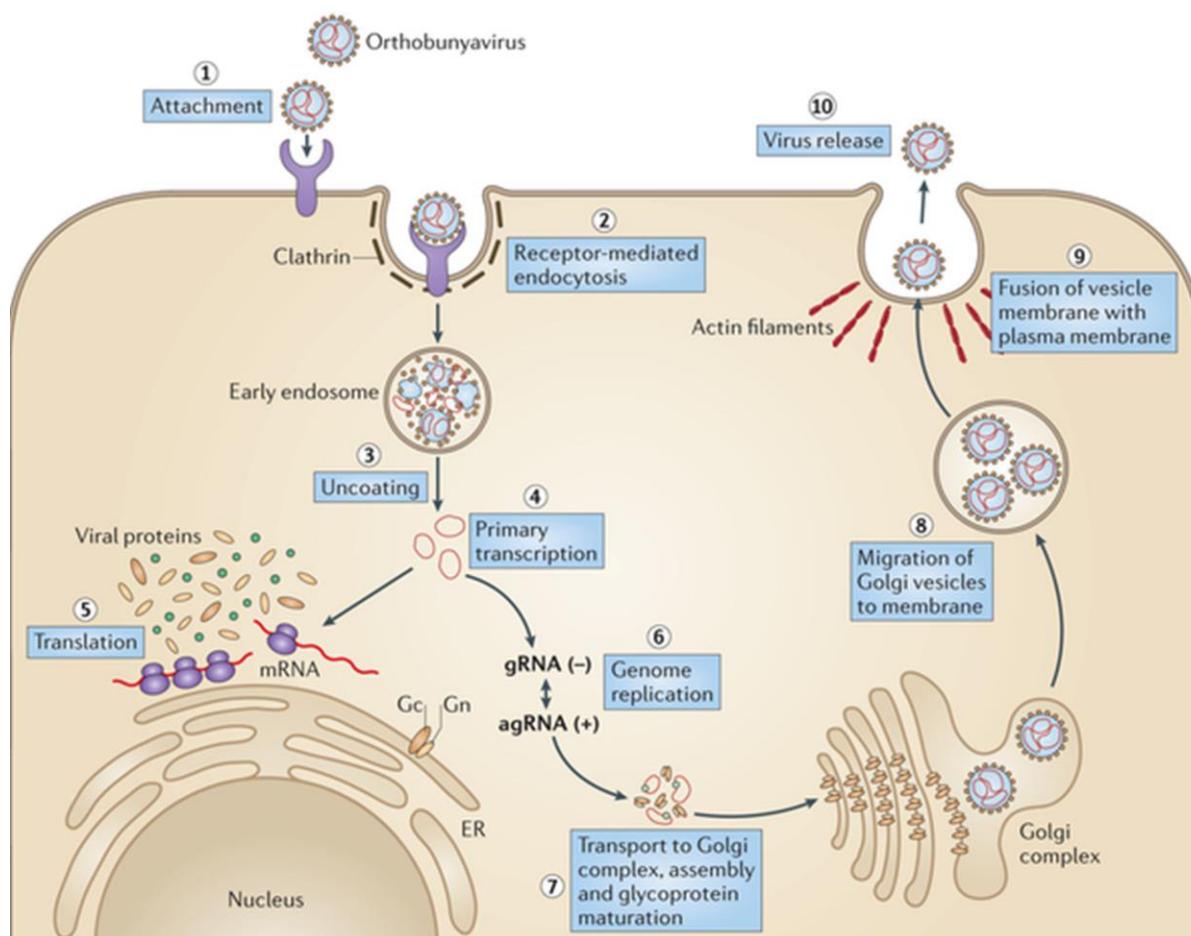


Figure 6: Mode de réplication des orthobunyavirus (d'après Elliot et al., 2014)

Les compétences d'évitement de la réponse immunitaire et en partie de la réponse immunitaire innée reposent principalement sur l'action de la protéine NSs. Cette dernière est capable d'inhiber les réponses antivirales de l'hôte infecté et notamment les réponses induites par le système interféron de type 1 (Bouloy, 2001 ; Elliott, 2009). Cette même protéine induit

également l'apoptose de la cellule hôte lorsque la formation des nouvelles particules virales est achevée (Walter, 2011).

3. Capacités de survie dans l'environnement.

En extrapolant les résultats obtenus à partir d'Orthobunyavirus du séro groupe California, il semblerait qu'un chauffage à 50-60°C pendant au moins 30 minutes ainsi que l'utilisation de désinfectants tels que le glutaraldéhyde à 2%, l'éthanol à 70%, le formaldéhyde et l'eau de javel à 1% réduiraient fortement le pouvoir infectieux du SBV.

La survie du virus dans le milieu extérieur, en dehors d'un vecteur ou de son hôte paraîtrait donc très limitée dans le temps (OIE, 2013a).

C. Epidémiologie.

1. Espèces sensibles.

L'EFSA a défini toute espèce sensible au SBV comme une espèce dans laquelle le virus peut se répliquer avec ou sans signe clinique (EFSA, 2014). L'autre terme pouvant également être utilisé est « espèce réceptive ». Selon, l'EFSA, il existe trois catégories d'espèces sensibles:

- Les espèces dans lesquelles le virus a été détecté en association avec des signes cliniques.
- Les espèces dans lesquelles le virus a directement été détecté (détection directe).
- Les espèces dans lesquelles les anticorps contre le SBV ont été détectés (détection indirecte).

a) Les ruminants domestiques.

Dans cette étude, les ruminants domestiques communément observés en Europe sont les bovins, les ovins ainsi que les caprins. Dans l'ensemble de ces espèces, la détection directe et indirecte du SBV ainsi que les signes cliniques ont été constatés aussi bien chez les adultes que chez les nouveaux-nés (Van den Brom et al., 2012; Garigliany et al., 2012; Herder et al., 2012; Wernike et al., 2014a).

b) *Les non-ruminants.*

(1) Les hommes.

Comme de nombreux virus du genre Orthobunyavirus peuvent entraîner des maladies chez les hommes, la possibilité de transmission du SBV des animaux aux hommes a été l'une des questions les plus importantes au début des épizooties.

Des tests moléculaires et sérologiques ont été réalisés sur les populations exposées en Allemagne et aux Pays-Bas mais aucune évidence de la présence d'ARN viral ni d'anticorps anti-SBV n'a pu être mise en évidence chez ces individus (Ducomble et al., 2012; Reusken et al., 2012). Le risque en terme de santé publique concernant cette maladie est donc absent ou extrêmement faible (Reusken et al., 2012).

(2) Autres ongulés.

Dans deux parcs zoologiques au Royaume-Uni, des anticorps anti-SBV ont été détectés chez des Onagres (*Equus hemionus*) et chez des zèbres de Grevy (*Equus grevyi*). Une étude chez les chevaux (*Equus caballus*) n'a cependant pas permis de détecter de séropositivité dans les échantillons étudiés chez cette espèce (EFSA, 2013).

D'autres études ont également été réalisées et notamment chez les suidés. Après infection expérimentale, il a été noté que les porcs domestiques pouvaient séroconvertir mais ne présentaient cependant pas de signe clinique ni même de virémie (Poskin et al., 2014a). Une autre étude a montré une forte séroprévalence dans les populations sangliers (*Sus scrofa*) pendant les saisons de chasse 2011/2012 et 2012/2013 en Belgique (Desmecht et al., 2013). Cette espèce est considérée comme un réservoir important pour plusieurs virus retrouvés aussi bien chez le bétail que chez les Hommes et c'est également le deuxième ongulé le plus abondant en Europe. C'est pourquoi un échantillonnage de masse (plus de 2000 animaux) a été réalisé afin de déterminer la présence d'anticorps spécifiques de la maladie. Une séroprévalence de 33% a été mise en évidence lors de la première saison de chasse, séroprévalence qui a progressivement diminué à 11% l'année suivante puis est devenue négative l'année d'après. Dans cette étude, malgré une séropositivité marquée, aucune malformation n'a été rapportée (Mouchantat et al. 2015).

(3) Carnivores et autres.

L'infection par le SBV a pu être rapportée chez les chiens (*Canis lupus familiaris*), mais seuls quelques cas ont été signalés. La présence d'anticorps anti-SBV a tout d'abord été soulignée chez un chien en France (Wensman et al., 2013).

De l'ARN viral a également été retrouvé dans le cerveau d'un chiot. Ce dernier montrait un torticolis ainsi qu'une encéphalopathie dégénérative, signes cliniques ayant mené à inclure le SBV dans le diagnostic différentiel (Sailleau et al., 2013a).

D'autres études ont cependant obtenu des résultats plutôt opposés. En Belgique notamment, une enquête sérologique réalisée sur 132 chiens n'a pu mettre en évidence aucun échantillon séropositif menant à la conclusion que l'infection au SBV serait donc probablement quelque chose d'anecdotique chez cette espèce (Garigliany et al., 2013).

Aucun anticorps anti-SBV n'a également pu être détecté chez les 195 petits mammifères (rongeurs et musaraignes) et chez les 339 carnivores (renard roux (*Vulpes vulpes*), chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*), raton laveur (*Procyon lotor*) et martre (*Martes spp*)) prélevés entre 2011 à 2013 dans une étude publiée par Mouchantat et al. en 2015.

2. Transmission.

a) *Transmission horizontale.*

(1) Transmission vectorielle : un moucheron du genre *Culicoides*.

La transmission vectorielle par le biais des moucherons du genre *Culicoides* est la principale voie de contamination des ruminants. Ce mode de transmission présente une certaine cyclicité qui varie en fonction des conditions météorologiques et qui explique en grande partie la dissémination du virus à travers l'Europe.

(a) **Identification.**

Les *Culicoides* sont des diptères hématophages qui mesurent de 1 à 3 mm de long. Le genre *Culicoides* appartient à la sous-famille des *Ceratopogoninae* et contient plus de 1400 espèces. Parmi celles-ci, 87 ont été recensées en France métropolitaine ainsi qu'en Corse (Augot, 2012). D'après Balenghien et al. (2014), plusieurs espèces seraient impliquées dans la transmission du virus : *Culicoides obsoletus*, *Culicoides scoticus*, *Culicoides dewulfi* et *Culicoides chiopterus*.

Les *Culicoides* ont la morphologie des Cératopogonidés : leur corps est élancé et présente des ailes velues qui recouvrent leur corps au repos. Leurs antennes sont longues et filiformes et sont constituées de 12 à 16 articles qui sont agencées en chapelet. L'identification des *Culicoides* se fait par l'observation de motifs noirs et blancs présents sur leur membrane alaire. Une nervure médiane pédiculée et une nervure transverse constituent également ces ailes.

Afin de différencier les mâles des femelles, il est nécessaire d'étudier attentivement les antennes ainsi que les pièces buccales des moucherons (Perie, 2005).



Figure 7: Observation d'un *Culicoides* au microscope optique (d'après CIRAD)

(b) Biologie.

La durée de vie des adultes varie de 10 à 20 jours, même si il a été constaté que certains d'entre eux pouvaient survivre entre 1,5 et 3 mois notamment lors de températures basses, leur permettant ainsi la prise de nombreux repas sanguins (Walzer, 2009).

L'alimentation des *Culicoides* est constituée de nectars. L'hématophagie est observée uniquement chez les femelles et il est important de noter que le repas sanguin précède la ponte de deux jours chez 90% des espèces.

L'éclosion des œufs se fait en milieu humide 2 à 8 jours après la ponte. Les conditions climatiques influencent le développement larvaire qui va durer entre 2 semaines et 1 mois. Les individus se transforment alors en nymphes, puis en adultes au bout de 2 à 10 jours.

L'activité des *Culicoides* est observée principalement à l'aube, au crépuscule, très rarement en pleine journée, et si c'est le cas à l'ombre. Pendant la journée, les moucheron sont observables sur les faces internes des feuilles ou sur des herbes situées dans des zones ombragées.

La dispersion active des *Culicoides* est relativement limitée. Ils sont majoritairement observables à une centaine de mètres du lieu de naissance des imagos (Mellor, 2000). Les vents chauds et humides de basse altitude (<2000 mètres) peuvent cependant les disperser à plusieurs centaines de kilomètres (Braverman, 1996). C'est ainsi que les insectes sont dispersés dans de nouvelles régions propageant ainsi les virus.

(c) Épidémiologie du moucheron.

Le genre *Culicoides* est présent des tropiques à la toundra, et du niveau de la mer à 4200 m d'altitude (au Tibet). Environ 120 espèces de *Culicoides* sont présentes en Europe, la diversité déclinant au fur et à mesure que la latitude augmente.

La densité de population de ces moucheron varie avec les saisons en fonction du type d'espèces : certaines sont présentes tout au long de l'année, notamment *Culicoides obsoletus* et *Culicoides scoticus* qui sont visibles de mi-avril à début novembre. D'autres ne sont

présentes en revanche que pendant de courtes périodes, notamment *Culicoides impunctatus*, qui n'est observable que de mai à septembre (Service, 1971) permettant ainsi d'avoir une présence continue sur l'ensemble de l'année (Rieb, 1982).

Les biotopes humides et riches en matières organiques sont les milieux dans lesquels la transmission du SBV par les moucheron est la plus favorable. Il faut par exemple noter que *Culicoides dewulfi* est une espèce exclusive des bouses de vache alors que *Culicoides obsoletus* semble en revanche être ubiquiste.

(d) **Météorologie et activité vectorielle.**

Les facteurs météorologiques tels que la température, l'humidité et le vent vont fortement influencer la survie, l'activité et la dispersion des *Culicoides*. Le facteur influençant principalement le comportement et la survie des moucheron est sans doute la température. Les *Culicoides* ont une activité significative entre 13°C et 35°C (Braverman, 1996) même si des variations sont observées en fonction des espèces: *Culicoides obsoletus* a notamment été observée pour des températures minimales situées entre 6°C et 12°C en étable au cours de l'hiver 2006-2007 (Losson, 2007) alors que de manière générale, les températures basses inhibent l'activité des adultes et le développement larvaire.

Il a été rapporté qu'une hausse des températures pouvait mener à une augmentation du nombre de repas sanguins, de la fréquence de ponte ainsi que de la taille de la population. Cependant, au-dessus d'une température seuil, un effet inverse est observé. En effet, les larves sont particulièrement sensibles à la dessiccation, menant à leur mort si le taux d'humidité est trop faible. De plus, une sécheresse trop importante est également néfaste aux adultes qui vont stopper leurs activités avant de la reprendre par temps orageux et humides.

D'autre part, il a été constaté que la pluie empêchait les moucheron de voler. L'ensemble de ces informations permettent donc de comprendre pourquoi ces vecteurs sont aussi abondants en zones tempérées avec une augmentation progressive des moucheron à partir du printemps et ceci jusqu'au début de l'automne. (septembre-octobre).

En hiver, le nombre de vecteurs est très faible. Cependant si les températures restent clémentes, les larves de nombreuses espèces survivent à cette période en se maintenant au

stade larvaire pendant 7 mois. Il a effectivement été mis en évidence qu'une moyenne mensuelle de température supérieure à 12,5 °C était favorable à la survie de *Culicoides imicola*. Cependant, un autre constat a également permis de souligner que si cette moyenne de température n'était observable que sept mois au cours de l'année, la probabilité de survie de ces moucheron était beaucoup moins importante (Perie, 2005).

(2) Transmission vénérienne.

La transmission sexuelle du virus est encore inconnue. Les taureaux peuvent excréter le virus dans leur sperme, (Hoffmann et al, 2013;. Ponsart et al, 2014;. Schulz et al, 2014). Cependant, la capacité d'une vache d'être infectée par voie vaginale ou lors d'insémination artificielle n'a pas encore été évaluée.

Ce point mériterait d'être étudié étant donné que des vaches ont pu être infectées avec succès par le virus *Akabane* lors de la réalisation d'insémination artificielle par voie utérine (Parsonson et al., 1981a).

(3) Autres.

L'ARN du SBV a pu être détecté dans des prélèvements fécaux, buccaux et nasaux chez des vaches inoculées en sous-cutanée (Wernike et al., 2013a). Cependant, la transmission horizontale, par contact direct ou indirect, semble peu probable. En effet, Wernike et al. a montré en 2013 que l'infection expérimentale entre deux bovins par voie orale n'entraînait pas de virémie transitoire détectable par PCR.

Il avait également fait le même constat en 2012 en montrant que des vaches naïves en contact avec des vaches virémiques pendant 24 jours ne développaient pas d'ARNémie et restaient séronégatives (Wernike et al., 2012b).

Par ailleurs, la survie dans le milieu extérieur du virus est très limitée dans le temps. Ces caractéristiques ne sont donc ni en faveur d'une transmission horizontale directe ni en faveur d'une transmission horizontale indirecte.

b) *Transmission verticale.*

Le SBV peut être transmis verticalement de la femelle gestante aux embryons ou aux fœtus. Des malformations congénitales associées à l'infection par le SBV ont en effet été retrouvées chez des nouveaux-nés, des morts-nés ainsi que des avortons dans les espèces ovines, bovines et caprines (Van den Brom et al., 2012; Garigliany et al., 2012; Herder et al., 2012). La transmission verticale chez les autres espèces n'a pas encore été démontrée.

Les malformations associées au SBV sont semblables à celles observées lors d'infections par le virus *Akabane* ou le virus *Aino*. Les malformations induites par les virus du séro-groupe Simbu sont regroupées dans ce qui est appelé le syndrome arthrogrypose / hydranencéphalie (Varela, 2013). Par conséquent, les données concernant la transmission verticale des virus *Akabane* et *Aino* ont été utilisées comme modèle pour le SBV.

Si l'infection a lieu avant la gestation, cette gestation se passe normalement. La période de susceptibilité se situe entre le 28^{ème} et le 50^{ème} jour de gestation pour les ovins, entre le 30^{ème} et le 50^{ème} jour de gestation chez les caprins et entre le 62^{ème} et le 173^{ème} jour de gestation chez les bovins.

Par exemple, une étude a été récemment réalisée afin de déterminer s'il existait des périodes de sensibilité plus propices chez la chèvre en gestation pouvant être à l'origine d'une transmission virale aux embryons ou aux fœtus. Des chèvres gestantes ont été inoculées aux 28^{ème} et 42^{ème} jours de gestation et ont été observées jusqu'au 55^{ème} jour de gestation. Une virémie a été constatée chez l'ensemble des chèvres sans apparition de signes cliniques. Des morts fœtales et embryonnaires, avec détection de l'ARN du SBV, ont été observées chez plusieurs chèvres infectées aussi bien pour des inoculations réalisées au 28^{ème} jour qu'au 42^{ème} jour de gestation. Parmi les fœtus vivants, deux des individus virémiques ont présenté des lésions du système nerveux central (porencéphalie). Tous les fœtus de chèvres infectées au 42^{ème} jour de gestation ainsi que la majorité des fœtus de chèvres infectées au 28^{ème} jour de gestation contenaient du génome viral, distribués dans l'ensemble des tissus des individus étudiés ainsi que dans leur placenta respectif (Laloy et al., 2016). Bien que cette étude ne montre pas la fenêtre maximale de sensibilité de cette espèce, elle permet cependant de montrer la méthode permettant de la déterminer.

c) « *Overwintering* »

Dans la mesure où les vecteurs biologiques (*Culicoides*) disparaissent en période hivernale, un hiver relativement long et froid peut théoriquement permettre l'arrêt de l'épidémie d'une année sur l'autre.

Cependant, en mai 2012 en France, huit mois après la date d'introduction probable du SBV dans le pays (Zanella et al., 2013), des signes d'infection aiguë ont été retrouvés chez des vaches, suggérant que le virus pourrait hiverner ou bien avoir été réintroduit (Sailleau et al., 2013b). Cette situation a par la suite été confirmée en Allemagne après l'apparition de nouvelles infections durant les périodes estivales et automnales de 2012 (Conraths et al., 2013). Ce phénomène s'est par la suite reproduit lors des hivers 2013 et 2014, avec l'apparition de nouveaux cas lors de la saison d'activité vectorielle (Wernike et al., 2015).

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer ce phénomène. Tout d'abord, le virus pourrait persister dans son hôte pendant plusieurs mois mais cela paraît peu probable étant donné que la virémie semblerait être de courte durée chez les ruminants domestiques adultes (Hoffmann et al., 2012b). Par ailleurs, la persistance dans le fœtus est peu probable car l'ARN viral est très rarement détecté chez les nouveaux-nés malformés (Bouwstra et al, 2013; De Regge et al, 2013). D'autre part, il faut souligner que les caractéristiques relatives à la virémie chez la plupart des ruminants sauvages ou exotiques sensibles restent encore inconnues.

Une seconde théorie serait l'existence d'une transmission transovarienne du virus dans le vecteur biologique : une étude a en effet rapporté la détection d'ARN viral dans des femelles nullipares des complexes *Culicoides obsoletus* et *Culicoides punctatus punctatus* (Larska et al., 2013b).

Troisièmement, le virus pourrait persister dans les moucheron adultes pendant l'hiver comme c'est le cas pour le virus de la peste équine (Mellor, 2000). Les moucheron adultes du complexe *Culicoides obsoletus* sont en effet capables de survivre, sans repas sanguin, pendant 10 jours à 4 ° C et jusqu'à 92 jours pour des températures comprises entre 17 ° C et 25 ° C (Goffredo et al., 2004). Considérant ceci, les moucheron infectés pourraient ainsi subsister dans les mois les plus froids de l'année dans les granges et infecter ainsi les vertébrés, une fois la remontée des températures. Cette hypothèse est supportée par l'observation d'une

transmission virale entre bovins pendant la période hivernale 2013 en Allemagne, à la suite d'une augmentation de température de 5°C pendant quelques jours (Wernike et al., 2013b).

La dernière hypothèse serait finalement que d'autres vecteurs encore non identifiés pourraient jouer un rôle dans la transmission virale lors des périodes hivernales.

II. LE VIRUS DE SCHMALLEMBERG CHEZ LES RUMINANTS DOMESTIQUES.

A. Historique et épidémiologie descriptive de la maladie.

Lors de l'été 2011, le laboratoire national de référence de la Fièvre Catharrale Ovine (FCO) (FLI ; Ile de Riems) a suspecté l'apparition de cas cliniques de FCO chez des bovins laitiers au nord de la Rhénanie-Westphalie. Cette alerte a permis la mise en place de mesures de surveillance. Dans plusieurs troupeaux étudiés, quelques animaux présentaient une hyperthermie (>40°C), de l'apathie, de l'anorexie ainsi qu'une chute de la production laitière. Ces signes cliniques pouvaient alors disparaître en quelques jours. Les analyses menées au FLI ont permis d'écarter les virus de la FCO aussi bien que d'autres agents infectieux potentiels. C'est en novembre 2011 qu'une analyse métagénomique d'un pool de trois échantillons sanguins prélevés dans une ferme de la ville de Schmallemburg a pu mettre en évidence des séquences génomiques virales présentant des homologies avec le genre Orthobunyavirus. Le virus de Schmallemburg est alors découvert.

Suite à cette mise en évidence, il apparaît que des pays voisins sont également affectés : aux Pays-Bas, une augmentation croissante du nombre d'avortons et de malformations congénitales chez les agneaux est rapportée à partir de Décembre 2011. Il en est de même pour la Belgique. En janvier 2012, ce sont le Royaume-Uni et la France qui déclarent alors plusieurs foyers d'infection. Les premiers foyers sont diagnostiqués en Meurthe-et-Moselle via la réalisation de tests à partir de cerveaux d'avortons. Les deux mois suivants, le Luxembourg, l'Italie et l'Espagne rapportent également l'apparition de cas. Lors de l'été 2012, de nouveaux foyers sont alors rapportés en Autriche, au Danemark, en Suède, en Irlande, en Finlande, en Pologne mais également en Suisse. L'ensemble de ces données indiquent que le SBV a très largement circulé sur toute la partie nord-ouest de l'Europe. Au

1er août 2012, 5701 foyers de SBV sont alors recensés en Europe, toutes espèces confondues (3124 élevages bovins, 2498 élevages ovins et 79 élevages caprins) et au 1er octobre 2012, ce sont 15 pays d'Europe qui sont alors concernés (Calavas et al., 2011 ; Martinelle et al., 2012 ; Van Den Brom et al., 2012 ; Chaintoutis et al., 2013 ; Conraths et al., 2013).

En 2013, des anticorps sont également retrouvés chez quelques vaches en Lituanie (Lazutka et al., 2014) et chez des vaches et des moutons en Grèce (Chaintoutis et al., 2014), démontrant la présence de l'infection dans ces pays. La mise en évidence d'ARN viral chez des avortons bovins et des fœtus de moutons en Juin 2012 a permis de montrer que l'infection au SBV était également observable au-delà des frontières de l'Union Européenne, en Turquie (Yilmaz et al., 2014).

Enfin, le SBV pourrait également circuler en Afrique. Des anticorps dirigés contre le virus ont été détectés par méthode ELISA chez des bovins, des moutons et des chèvres au Mozambique en 2013. Dans ce contexte, la possibilité d'une réactivité croisée avec d'autres virus du séro groupe Simbu, au vue du manque de spécificité du test ELISA, empêcherait donc de tirer une conclusion définitive (Blomström et al., 2014) quant à la présence du virus dans cette zone là. Par ailleurs, des lésions compatibles avec une infection par le SBV ont été retrouvées chez des agneaux en Afrique du Sud en 2006 et 2008, mais des tests spécifiques pour la détection du virus n'étaient pas disponible à cette période (Leask et al., 2013).

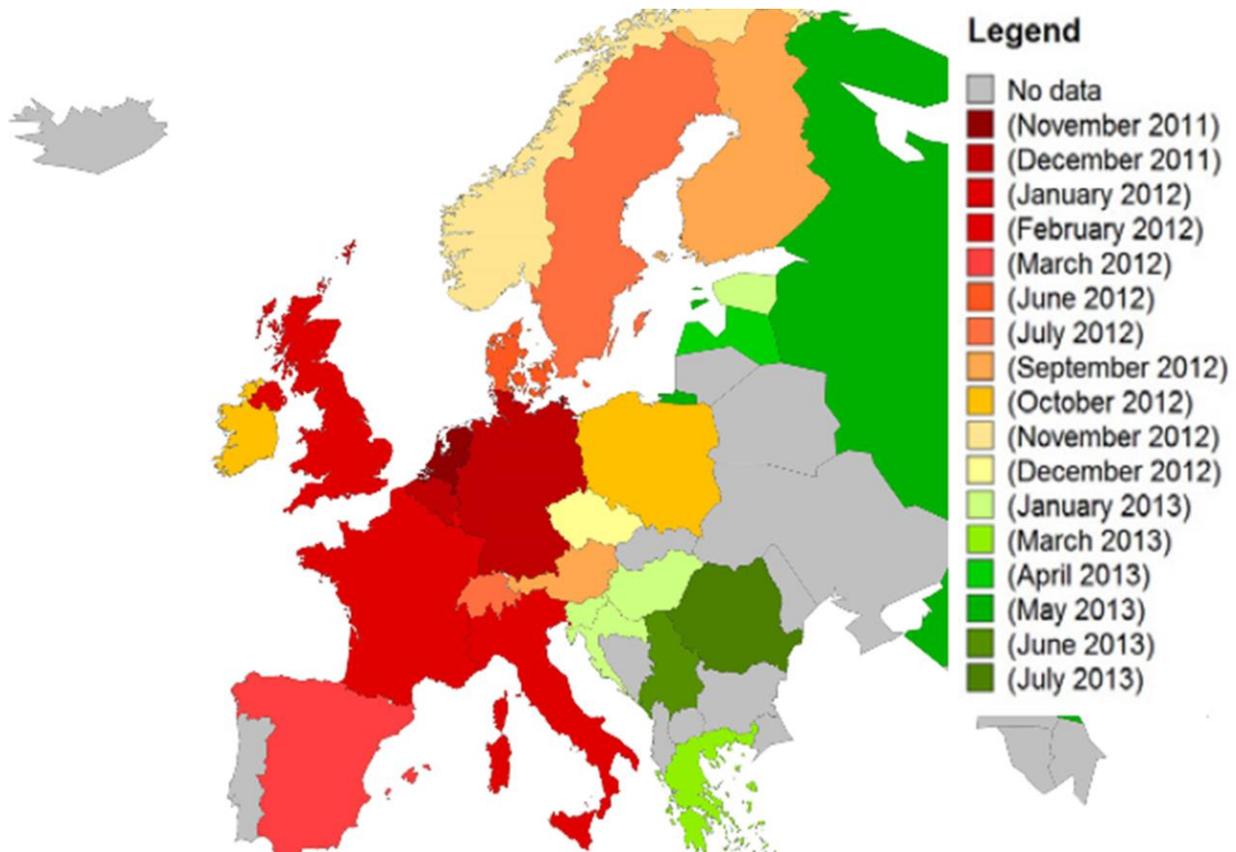


Figure 8: Distribution de la maladie par pays et par date de détection par sérologie et/ou PCR quantitative en temps réel (K. Lievaart-Peterson et al., 2015)

L'introduction du SBV en France serait en réalité antérieure à octobre 2011 car une analyse sérologique rétrospective a montré que les premières séroconversions bovines avaient été observées à partir d'octobre 2011. En janvier 2012, la séroprévalence rapportée est alors de 80%. Suite à son introduction dans le nord de la France, une rapide propagation du virus à l'ouest de la France est alors observée (Zanella et al., 2013).

En 2012, la France est divisée en deux : les départements où plus de 20 foyers de SBV congénital ont été identifiés au 15 juin 2012 et ceux où moins de 20 foyers de SBV congénital ont été répertoriés (Gache, 2013).

Au cours de la deuxième vague de surveillance (2012-2013), une extension géographique du SBV à la quasi-totalité de la France est alors observée. Suspectant une reprise de la circulation virale au printemps 2013, le groupe de suivi de la plateforme ESA a proposé la poursuite de la surveillance des formes congénitales en coordination avec les GDS de France à partir du 1er septembre 2013 selon des modalités allégées. En effet, le virus ayant

très largement circulé au cours des deux précédentes vagues, les analyses sérologiques sur femelles qui ont mis bas des produits malformés étaient désormais ininterprétables.

A l'heure actuelle, quelques cas sont encore signalés dans le cheptel bovin européen. Cependant, d'après les observations, les troupeaux déjà exposés au virus auraient déjà développé un fort degré d'immunité.

B. Diagnostic de la maladie de Schmollenberg.

1. Diagnostic clinique.

a) Les signes cliniques non spécifiques.

Dans un premier temps, l'infection a été découverte chez des vaches non gestantes en Allemagne. Les premiers signes observés étaient non spécifiques à savoir de la fièvre, une baisse de production laitière ainsi que de la diarrhée (Hoffmann et al., 2012b).

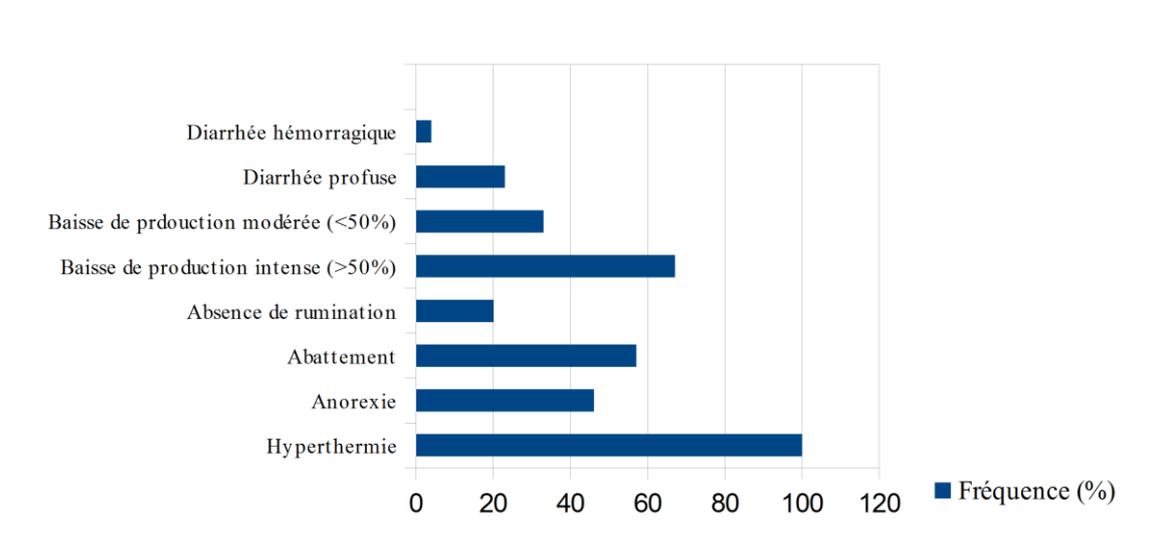


Figure 9 : Graphique représentant la fréquence d'observation des signes cliniques lors de SBV aigu chez les bovins (d'après Collin et al., 2012)

Une chute de production laitière ainsi que de la diarrhée ont également été rapportées chez les chèvres (Helmer et al., 2013) et les brebis, sans pour autant établir de lien strict avec l'infection par le SBV dans cette dernière espèce (Lievaart-Peterson et al., 2012; Luttkiholt et al., 2014).

b) Les malformations congénitales.

La manifestation de l'infection foetale par le SBV conduit généralement à la naissance de produits le plus souvent non viables chez les bovins, ovins et caprins se traduisant par des avortements, de la prématurité et de la mortinatalité.

Des malformations congénitales diverses regroupées sous le nom de syndrome arthrogrypose-hydranencéphalie (arthrogrypose, hydranencéphalie, raccourcissement des tendons du jarret, torticolis, torsion du sternum et du rachis, déformations de la mâchoire et de la tête) sont la plupart du temps observées.



Figure 10 : Arthrogrypose et léger torticolis chez un agneau atteint de SBV congénital (Deffontaines, octobre 2013, Côte d'Or)

Des signes neurologiques, suggérant des lésions induites par le SBV au niveau du système nerveux central (SNC) ont également été rapportés. Garigliany et al. a notamment décrit en 2012 l'apparition de troubles neurologiques chez un veau nouveau-né infecté in utero par le SBV et caractérisé par de l'hypertonie, une hyperréflexie, un état apathique, une cécité, un strabisme ventrolatéral, ainsi qu'une incapacité à se tenir debout.

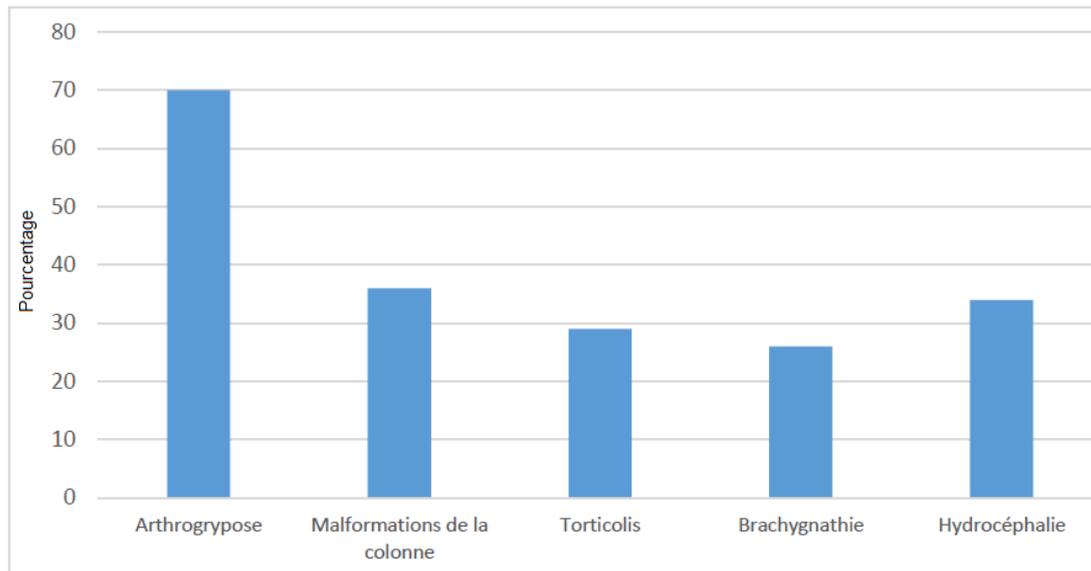


Figure 11: Fréquence d'observations des différentes malformations dans les élevages bovins (d'après Gache et al., 2014; Desmarais, 2015)

Outre les malformations les plus fréquemment constatées jusqu'à présent, les veaux atteints peuvent également paraître « normaux » ou présenter simplement une malformation du crâne, des troubles du comportement comme une absence de réflexe de succion, des problèmes de coordination (paralysie flasque, mouvements exagérés, ataxie), des troubles d'ordre sensoriel comme une cécité ainsi que des troubles d'ordre neurovégétatif comme une production anormalement élevée de larmes (Garigliany, 2012b). En revanche, ces veaux peuvent la plupart du temps se tenir debout et marcher.

Expérimentalement, l'infection de brebis gestantes par le virus *Akabane* a entraîné la naissance d'agneaux avec le même type de déformations (Parsonson, 1977). Les malformations macroscopiques observées sur le terrain pour les virus *Akabane* et *Schmallenberg* semblent donc être similaires.

Il faut également souligner que les anomalies de développement ne sont pas systématiques en cas de gestation multiple. En effet, il a été mis en évidence, lors de gestation gémellaire, qu'un seul des nouveaux-nés pouvait souffrir de malformations congénitales, tandis que l'autre pouvait rester sain ou présenter un simple retard de croissance (Doceul *et al.*, 2013). Ces observations ont à la fois été observées dans quelques élevages de vaches (Wernike et al., 2014c) et de brebis (van den Brom et al., 2012).

c) Les troubles de la reproduction.

Selon le stade de gestation des mères, l'infection par le SBV peut également être responsable de troubles de la reproduction et notamment de dystocies dues aux malformations (van den Brom et al., 2012), d'avortements et de mortinatalité.

Des études rétrospectives ont effectivement montré que dans les troupeaux infectés par le SBV, un nombre croissant de retours en chaleurs associés à une augmentation du taux d'avortements, de mortalités embryonnaires ou fœtales était observé aussi bien chez les brebis (Dominguez et al., 2014; Peterson et al., 2012; Lutikholt et al., 2014; Saegerman et al., 2014) que chez les chèvres (Dominguez et al., 2014; Helmer et al., 2013).

Chez les vaches affectées par le SBV, une augmentation du nombre de « repeat breeders » et de mortalités embryonnaires précoces a également été reportée (Dominguez et al., 2014). Une étude a notamment décrit l'association entre des mortalités fœtales précoces (approximativement à 60 jours de gestation) et la présence du génome viral dans le liquide allantoïdien prélevé chez deux vaches (Steinrigl et al., 2014).

Concernant les mortinatalités, il a été montré que certains veaux apparemment normaux à la naissance pouvaient mourir dans la semaine qui suivait sans raison apparente. La plupart du temps, des troubles d'ordre neurologique tels que de l'opisthotonos étaient observés. Dans l'ensemble des études, seul un veau présentant ce syndrome a fait l'objet d'une RTq-PCR sur prélèvement sanguin et a révélé la présence du SBV. Il serait important de clarifier si ce type de cas est attribuable à une infection néonatale ou à une infection congénitale (Garigliany, 2012a ; Plateforme ESA, 2012a).

2. Diagnostic post-mortem.

a) Macroscopique.

Un large éventail de lésions a été décrit chez les fœtus et les nouveaux-nés. Les lésions les plus fréquentes affectent les muscles squelettiques, le système nerveux central et le squelette axial et peuvent être observées de façon simultanée (Herder et al, 2012; Peperkamp et al, 2014; Seehusen et al, 2014).

L'arthrogrypose est très souvent associée à des signes d'hypoplasie musculaire caractérisée par une réduction du nombre et du diamètre des myofibrilles (Herder et al 2012. Seehusen et al., 2014).

Dans le système nerveux central, l'hydranencéphalie, la porencéphalie, l'hydrocéphalie, l'hypoplasie cérébelleuse ainsi que la micromyélie sont les lésions les plus couramment observées et sont parfois associées à une inflammation non suppurative ainsi qu'à une dégénérescence neuronale et de la nécrose.

L'examen post-mortem met souvent en évidence des malformations vertébrales, incluant de la lordose, de la cyphose, de la scoliose ou encore des torticolis, ainsi qu'un brachygnathisme mandibulaire (Herder et al., 2012)

Organes atteints	Malformation	Illustrations
Colonne vertébrale	<p>TORTICOLIS (<i>Raideur du cou. La tête est souvent basculée sur le dos de l'animal</i>)</p>	 <p><i>Crédits : GDSB2B Haute Corse</i></p>
	<p>SCOLIOSE (<i>Déviations de la colonne vertébrale</i>) LORDOSE (<i>Courbure convexe de la colonne vertébrale</i>) CYPHOSE (<i>Concavité de la colonne vertébrale</i>)</p>	 <p><i>Crédits : Avenir Agricole</i></p>
Membre	<p>ARTHROGRYPOSE (<i>Raideur des membres associée à des atteintes neurologiques</i>)</p>	 <p><i>Crédits : GDSB2B Haute Corse</i></p>
	<p>RACCOURCISSEMENT DES TENDONS DU JARRET</p>	 <p><i>Crédits : GDSB2B Haute Corse</i></p>

Muscle	HYPOPLASIE MUSCULAIRE (Sous développement musculaire)	 <p>Crédits : Perperkamp et al., 2014</p>
Crâne	HYDRANENCEPHALIE (absence partielle ou totale de cortex cérébral, remplacé par des poches contenant du liquide céphalorachidien). H: hydrocéphalie C: hypoplasie du cervelet M: hypoplasie de la moelle épinière	 <p>Crédits : Ulg</p>
Mâchoire	BRACHYGNATISME (Différence de longueur entre la mâchoire inférieure et la mâchoire supérieure. La mâchoire inférieure est généralement plus courte.)	 <p>Crédits : Deffontaines, octobre 2013, Côte d'Or</p>

Tableau 2: Présentation des principales anomalies congénitales causées par le SBV chez les ruminants domestiques.

b) Histologique.

D'après ce qui a été dit précédemment, le SBV se réplique dans les cellules nerveuses. Ceci entraîne la formation de lésions histologiques dans ces tissus. Ces lésions peuvent être de deux types : inflammatoires et dégénératives.

Les lésions macroscopiques de type hydranencéphalie et porencéphalie présentent des lésions histologiques qui peuvent être aussi bien inflammatoires que dégénératives.

(1) Lésions inflammatoires.

L'inflammation est plus fréquente chez les petits ruminants que chez les bovins (Herder,2013). Or, il faut garder à l'esprit que le délai entre l'infection et la mise bas est d'environ 3 mois chez les ovins et d'environ 5 mois chez les bovins. Par conséquent, au moment de la naissance ou de l'avortement d'un veau, il serait possible que, contrairement aux agneaux, les signes d'inflammation ne soient déjà plus visibles.

Histologiquement, une infiltration lymphohistiocytaire périvasculaire de la matière blanche et grise du cerveau ainsi que de la moelle épinière est observée. Ceci caractérise l'encéphalite qui peut dans certains cas être relativement diffuse. Les cellules infiltrantes sont des lymphocytes T (type CD3 positif) et dans une moindre mesure des lymphocytes B (type CD 79 alpha positif) mais également des macrophages (Herder, 2013).

Ces lésions ont également pu être observées lors de l'infection de chèvres gestantes par le virus *Akabane* à l'origine d'une forte proportion d'encéphalites chez les nouveaux-nés (Konno, 1982).

Les organes du système lymphoïde peuvent être atteints. C'est ainsi qu'une diminution de la quantité de cellules hématopoïétiques peut être observée dans la moelle osseuse. Une atteinte du système lymphoïde peut être visible sur la rate, les nodules lymphatiques ou le thymus (Herder, 2012).

Certains organes et tissus ne montrent cependant pas de lésions histologiques significatives, notamment la vessie, la thyroïde, le foie, le cœur, les vaisseaux cardiaques, l'utérus, les ovaires, les testicules, les nerfs périphériques, le placenta, l'oesophage, la caillette, le petit et le gros intestin, les glandes surrénales, la trachée, la peau et le tissu adipeux (Herder, 2012).

Il semblerait que les tissus musculo-squelettiques présentent quant à eux des modifications histologiques qui sont probablement secondaires aux lésions nerveuses.

L'inflammation du système nerveux n'est pas systématique chez les foetus ou les nouveaux-nés infectés par le SBV. En effet, Herder et al. a mis en évidence en 2013 dans une

étude portant sur 82 foetus et nouveaux-nés malformés, infectés naturellement par le SBV (confirmation par PCR), que la présence de cellules inflammatoires n'était constatée que chez 15 d'entre eux, aussi bien dans le cerveau que la moelle épinière (Herder, 2013).

(2) Lésions dégénératives.

La nécrose du parenchyme neuronal, la présence d'œdème et de pores multiples dans l'encéphale sont les lésions dégénératives les plus régulièrement rencontrées. Des hémorragies peuvent être également présentes. Par ailleurs, une minéralisation et des dépôts d'hémosidérine ont été mis en évidence par des colorations spéciales telles que les colorations de Von-Kossa et de Perls.

(a) Lésions vasculaires et pertes tissulaires.

La minéralisation mise en évidence par la coloration de Von Kossa est un signe de destruction tissulaire et de nécrose causée par le SBV, comme cela a été démontré pour le virus *Akabane*. La présence d'hémosidérine serait quant à elle à relier à des hémorragies anciennes.

Ces lésions, représentatives de troubles vasculaires, sont principalement retrouvées dans les zones du système nerveux central présentant des pertes tissulaires.

A l'échelle neuronale, une démyélinisation ainsi qu'une perte de densité axonale sont rapportées simultanément à l'apparition d'amas de macrophages à l'intérieur du cytoplasme cellulaire. Certaines parties du cerveau sont uniquement le siège d'inflammation, notamment le mésencéphale et l'hippocampe. Dans ces régions, la démyélinisation et la perte de densité axonale ne sont pas observées.

En revanche, dans les zones adjacentes aux zones de destruction tissulaire, la densité axonale est modérément à très fortement réduite et la démyélinisation est importante. Cela suggère que l'axonopathie n'est pas directement reliée à l'inflammation mais qu'elle est seulement secondaire à la destruction des tissus (Varela, 2013).

(b) Lésions de la moelle épinière.

Dans la moelle épinière, la micromyélie est associée aussi bien à une réduction

bilatérale sévère de la substance grise qu'à une réduction de la circonférence de la substance blanche. Elle est concomittante à une importante diminution du diamètre de la moelle épinière. Le sillon ventral est élargi par un tissu fibreux riche en collagène (Herder, 2012).

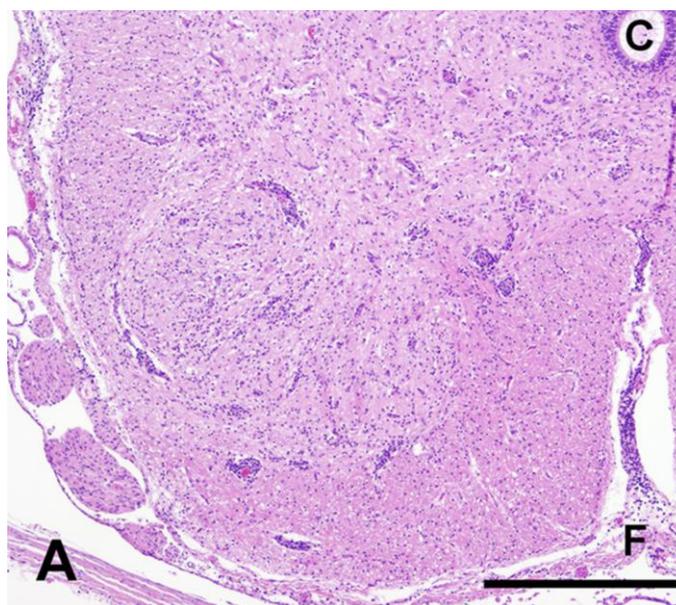


Figure 12: Histopathologie de la moelle épinière d'un mouton infecté par le virus de Schmallerberg. Infiltrats multifocaux lymphohistiocytaires des méninges, des espaces périvasculaires et de la matière grise et blanche (Herder et al., 2013)

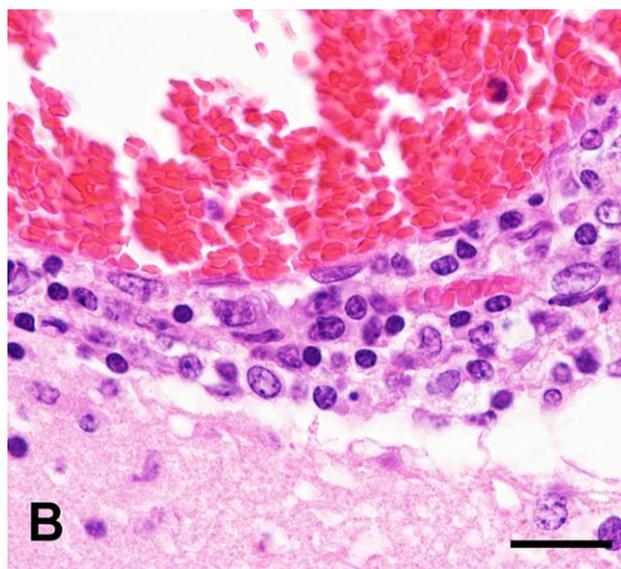


Figure 13: Infiltrats périvasculaires modérés caractérisés par la présence de lymphocytes et de macrophages dans le cerveau d'un mouton infecté (échelle : barre=20 pm)(Herder et al., 2013)

3. Diagnostic différentiel.

Considérant le grand polymorphisme de la maladie, les hypothèses diagnostiques sont nombreuses quant à la détermination de l'agent étiologique. Il sera par conséquent nécessaire dans la démarche diagnostique de relever très précisément l'anamnèse et les commémoratifs et de considérer l'épidémiologie de chacun des agents listés afin d'étayer au mieux la liste des agents pathogènes responsables.

Tableau 3 : Diagnostic différentiel du virus de Schmallenberg chez les bovidés (d'après (FCO-Info, 2009 ; Ganter et al., 2014 ; Desfontaines, 2013.)

Symptômes	Etiologie	Maladie
Syndrome fébrile associé à des troubles digestifs	Parasites	-Strongylose -Coccidiose -Babésiose
	Virus	-Orbivirus (BTV-8/FCO) -BVD - Virus du séro groupe Simbu -Herpesvirus (IBR) -Dysenterie hivernale -Maladie hémorragique épizootique
	Bactéries	-Fièvre Charbonneuse -Salmonellose -Anaplasmosse
	Maladies métaboliques	-Acidose ruminale
	Intoxication	-Fougère aigle -Glands -Mercuriale
	Avortements	Parasites
Virus		- Orbivirus (BTV-8/FCO) - IBR et autres herpesvirus - BVD - Fièvre de la vallée du Rift
Bactéries		-Brucellose -Chlamydie -Listériose -Fièvre Q
Champignons		-Aspergillose
Alimentation		- Carence en vitamine A

		- Phytoestrogènes - Mycotoxines
	Iatrogène	-Prostaglandines -Corticoïdes
	Autres	Traumatisme
Syndrome arthrogrypose-hydranencéphalie à la naissance	Parasites	-Toxoplasmose -Néosporose
	Carence	-Carence en cuivre ou en manganèse pendant la gestation
	Virus	- Orbivirus (BTV-8) -Pestivirus (BVD) -Virus du séro groupe Simbu (Akabane, Aino, Shamonda, Cache Valley, Main Drain, San Angelo, La Crosse, fièvre de la Vallée du Rift) Virus de Wesselbron (flavivirus)
	Intoxication	-Grande ciguë (<i>Conium maculatum</i>) -Nicotiana spp. -Lupin
	Génétique	-Race Suffolk : syndrome « Spider lamb » -Race Charolaise : syndrome arthrogrypose-fente palatine -Race Corriedale (anomalie autosomale récessive)
	Iatrogène	-Vaccin vivant atténué BTV Benzimidazoles (parbendazole, cambendazole, oxfendazole, nétobimine)

4. Diagnostic biologique.

a) Les prélèvements : Isolement et identification.

(1) Tests indirects.

Plusieurs techniques sont disponibles afin de rechercher des anticorps contre le SBV à partir d'un échantillon de sérum. Afin de comprendre comment fonctionnent les différents tests sérologiques, il est tout d'abord indispensable de comprendre la réponse immunologique des individus sensibles au virus.

La réponse immunitaire à l'infection par le SBV a principalement été décrite chez les bovins. Après l'inoculation de vaches naïves, les anticorps contre le virus ont été détectés entre 14 et 21 jours post-inoculation (Wernike et al., 2013a). Cette réponse en anticorps semble protéger contre les infections ultérieures mais la durée de cette protection reste encore inconnue. Elle préviendrait la multiplication du virus pendant au moins huit semaines (Wernike *et al.*, 2013a). D'autres études plus récentes rapportent cependant que les anticorps développés chez les bovins infectés en conditions naturelles pourraient persister au minimum pendant 2 ans (Elbers et al., 2014).

Les anticorps neutralisants du SBV ont pour principale cible la glycoprotéine Gc qui est exposée à la surface du virion.

Chez le fœtus, une réponse est également détectable. Les ruminants ont un placenta synépithéliochorial qui bloque toute transmission d'anticorps de la mère gestante au fœtus. L'apparition d'une immunité foetale varie donc en fonction du stade de développement et de maturation du système immunitaire du fœtus. Le système immunitaire foetal (thymus et noeuds lymphatiques) se développe à partir du 41^{ème} jusqu'au 175^{ème} jour de gestation chez le veau, et à partir du 20^{ème} jusqu'au 55^{ème} jour de gestation chez les petits ruminants. Durant cette période, la réponse en anticorps contre une infection virale est possible et il peut en résulter une inflammation de type encéphalite.

Van Maanen et al. a effectivement détecté en 2012 la présence d'anticorps anti-SBV dans 90% des 348 agneaux et dans 58% des 111 veaux montrant des malformations

congénitales de type arthrogrypose. La fenêtre dans laquelle l'infection déclencherait la production d'anticorps reste encore à déterminer de façon plus précise chez le fœtus.

Dans le cas où l'infection conduit à une tolérance par le système immunitaire, bien décrite pour la maladie du BVD (Herder *et al.*, 2013), les nouveaux-nés peuvent acquérir une immunité passive par l'ingestion et l'absorption d'immunoglobulines colostrales. Cette immunité passive peut cependant bloquer la production d'anticorps sériques en cas de vaccination précoce. L'étude de la décroissance des anticorps maternels chez les jeunes bovins montre une perte complète vers l'âge de six mois, âge à partir duquel une vaccination serait alors effective (Elbers *et al.*, 2014).

(a) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Le test ELISA est une méthode plus rapide que la séroneutralisation virale, ce qui permet de tester un plus grand nombre d'échantillons dans le même laps de temps.

Tout d'abord, les tests disponibles étaient des tests indirects: l'un basé sur un antigène recombinant de la nucléoprotéine N du SBV (Bréard *et al.*, 2013) et l'autre basé sur l'ensemble du virus (van der Heijden *et al.*, 2013). Un ELISA de compétition a été commercialisé par la suite (ID Screen® Schmallenberg virus Competition Multi-species, IDvet Laboratories, Montpellier, France).

Bien que plus pratique, les tests ELISA sont considérés comme légèrement moins sensible que la séroneutralisation virale pour détecter les anticorps du SBV, en particulier le test ELISA indirect (Van der Poel *et al.*, 2014; Poskin *et al.*, 2014b).

Plusieurs kits, élaborés par le Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maison-Alfort sont donc maintenant disponibles. Ce sont :

- ID Screen® Schmallenberg virus Indirect (sensibilité 98.8 %, spécificité 98,8 %) (Bréard *et al.*, 2013 ; Van Der Heijden *et al.*, 2013),
- ID Screen® Schmallenberg virus Competition Multi-species.

Ils peuvent être utilisés chez les bovins, les ovins et les caprins. En plus des échantillons de sérums, des échantillons de lait peuvent également être soumis à ces tests ELISA contrairement au test de neutralisation virale. Les échantillons de lait sont collectés soit au

niveau du tank afin d'évaluer l'exposition des bovins laitiers au niveau de la ferme (Balmer et al, 2014;. Humphries et Burr, 2012;. Johnson et al, 2014; Tarlinton et Daly, 2013), soit à l'échelle des individus afin d'identifier les vaches qui ont été exposées au SBV (Daly et al., 2015). Le test est commercialisé sous le nom :

- ID Screen® Schmallenberg virus Milk Indirect.

(b) Immunofluorescence indirecte.

Les tests d'immunofluorescence indirecte peuvent être effectués sur des plaques contenant des cellules BHK-21 infectées par le SBV (clone BRS5) en tant que matrice d'antigène (Bréard et al., 2013). Cependant, cette technique serait la moins sensible pour la détection d'anticorps à SBV (Bréard et al., 2013).

(c) Séroneutralisation virale (VNT).

Afin de déterminer la séroprévalence, un test de détection semi-quantitative des anticorps dirigés contre le SBV a été développé pour des échantillons bovins et ovins.

Les tests de neutralisation reposent sur des méthodes de quantification. Trois procédures sont disponibles. Dans les méthodes de plages et de microtitrages traditionnelles, le titre est calculé respectivement par la technique des unités formant plages (UFP) et par la dose infectieuse capable de causer un effet cytopathique (ECP) dans 50 % des puits inoculés (DICT50). Dans une procédure alternative, les virus sont titrés sur des monocouches de cellules Vero dans des plaques de 96 puits. Après 18 à 24 heures, les foyers d'infection sont détectés immunologiquement sur les cellules fixées à l'acétone en utilisant un sérum anti-viral. Le titre viral est exprimé comme une unité formant un foyer (UFF)/mL.

Plusieurs protocoles de neutralisation virale ont été décrits pour le SBV (Bréard et al, 2013;. Loeffen et al., 2012. Mansfield et al., 2013). Ils sont basés sur la capacité des anticorps à neutraliser le virus et ainsi empêcher l'apparition d'un effet cytopathique que le SBV peut provoquer dans les cellules Vero ou BHK. Par exemple, Loeffen et al. (2012) ont établi leur test de neutralisation à partir d'un isolat de SBV prélevé sur tissu cérébral puis cultivé cinq jours sur des cellules VERO (Figure 28).

La neutralisation virale est souvent considérée comme la méthode de référence (le gold-standard) pour la détection d'anticorps anti-SBV (Bréard et al, 2013; vander Heijden et al., 2013).

Cette méthode combine deux avantages en tant qu'outil sérologique. En premier lieu, elle peut être réalisée sur des échantillons provenant de tous types d'espèces d'animaux, parce qu'elle n'est pas spécifique d'une espèce donnée. De plus, elle fournit un résultat quantitatif, ce qui permet de suivre l'évolution des titres en anticorps en temps réel pour un individu donné (Mansfield et al., 2013).

La séroneutralisation virale présente en revanche quelques inconvénients. La réalisation de chaque test est relativement chronophage (environ 6 jours) et ne peut pas être automatisée (Bréard et al., 2013).

(2) Tests directs.

(a) RT-qPCR.

Des protocoles pour la RTq-PCR ont été mis au point en même temps que le virus a été découvert (Hoffmann et al., 2012b). Le protocole le plus utilisé est le test SBV-S3 ciblant le segment S (Bilk et al., 2012).

Une comparaison entre plusieurs dosages par RT-qPCR a montré que le test SBV-S3 était le plus sensible, tandis qu'un autre test ciblant le segment M (SBV-M1) était le plus spécifique pour la détection de l'ARN viral (Fischer et al., 2013b).

De nouvelles méthodes sont en cours de développement pour permettre l'établissement d'un test PCR de terrain réalisable au moyen d'appareils transportables (Aebischer et al., 2014).

Le génome viral peut être détecté dans des échantillons de sang ou de sérum, mais l'ARNémie chez les bovins semble être de courte durée (jusqu'à 7 jours environ) (Hoffmann

et al, 2012b; Wernike et al, 2013a..). Néanmoins, l'ARN a été retrouvé à des intervalles de deux semaines dans des échantillons sanguins d'agneaux en 2012, suggérant une virémie plus longue chez les ovins que chez les bovins (Claine et al., 2013).

Chez les fœtus ou les nouveaux-nés malformés, l'ARN se trouve principalement dans les fluides placentaires, le cordon ombilical et le système nerveux central (Bilk et al., 2012). Selon une étude chez les ovins et les bovins, dans le système nerveux central, le tronc cérébral est l'échantillon dans lequel l'ARN viral est le plus susceptible d'être détecté (De Regge et al., 2013).

Il faut cependant noter que l'ARN de SBV n'est pas si souvent retrouvé dans les individus malformés. Après avoir testé 348 agneaux montrant de l'arthrogrypose et de l'hydranencéphalie en 2011-2012 aux Pays-Bas, l'ARN n'a été mis en évidence que chez 40% des agneaux, tandis que leurs anticorps anti-SBV ont été détectés dans 90% des cas (van Maanen et al., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus en Belgique; l'absence d'ARN de SBV associée à la présence d'anticorps anti-SBV a été interprétée par les auteurs comme une clairance virale, peut-être via l'intermédiaire de la réponse humorale (De Regge et al., 2013).

Par conséquent, chez les fœtus ou les nouveaux-nés malformés, le diagnostic de l'infection serait probablement plus fiable par la réalisation de tests sérologiques que par la détection du génome.

(b) Isolement du virus sur culture cellulaire.

L'isolement viral est une technique qui permet la détection du virus infectieux. L'isolement viral de SBV peut être réalisé sur plusieurs types de cellules: les cellules KC (les cellules larvaires de *Culicoides variipennis*), les cellules BHK-21 (cellules de reins de bébé hamster) et les cellules Vero (Hoffmann et al, 2012b;.. Van Der Poel et al, 2013).

En outre, le SBV se réplique efficacement dans d'autres lignées cellulaires, en particulier dans les cellules CPT-tertio. Ce sont des cellules du plexus choroïde de moutons qui sont immortalisées par l'antigène T du virus simien 40 (SV40) et la télomérase transcriptase inverse humaine (hTERT) (Arnaud et al, 2010; Elliott et al, 2013; Varela et al., 2013).

Un modèle d'infection murin a également été développé en utilisant des souris dépourvues de récepteur interféron de type I (souris knock-out IFNAR - / -) afin de détecter le virus. Suite à l'inoculation expérimentale sous-cutanée du virus, la détection d'ARN dans le sang et les organes des animaux testés, la perte de poids et/ou la mort des individus permet de conclure au pouvoir infectieux du virus (Wernike et al., 2012a, Sailleau et al., 2013b; Ponsart et al., 2014).

(c) **Isolement du virus par hybridation in-situ.**

L'hybridation in situ (ISH) permet de visualiser le génome SBV dans des coupes tissulaires. Un protocole a été développé sur des échantillons de tissus fixés au formol et enrobés dans de la paraffine à l'aide d'une sonde détectant une partie du segment S (Hahn et al., 2013). Les cellules positives dans le système nerveux des jeunes ruminants infectés apparaissent comme des regroupements de neurones répartis au hasard dans le cerebrum, le cervelet, le tronc cérébral, le bulbe rachidien et la moelle épinière (Hahn et al., 2013). Cette technique a cependant une sensibilité faible : seulement 10 des 82 animaux positifs pour la RT-qPCR étaient ISH-positifs (Hahn et al., 2013).

C. Prévention et mesure de lutte.

Contrairement à ce qui est arrivé avec le BTV-8, les mouvements d'animaux n'ont pas été limités en Europe lors de l'épidémie de SBV. Rétrospectivement, la modélisation de la propagation du virus SBV au Royaume-Uni a permis de montrer qu'une interdiction de mouvement aurait eu une influence très limitée sur la propagation du virus (Gubbins et al., 2014A). Les principales mesures de lutte contre le SBV comprennent la protection contre les moucheron ainsi que l'acquisition d'une immunité précoce contre le virus.

1. Hygiène et prophylaxie sanitaire : la lutte contre le vecteur.

La lutte contre les *Culicoides* peut être réalisée de différentes façons : la lutte écologique, la lutte mécanique et la lutte chimique. Ces mesures sont à associer afin d'assurer

une efficacité maximale.

a) *La lutte mécanique.*

La lutte mécanique consiste à établir des mesures visant à diminuer le nombre d'interactions entre l'hôte et le vecteur. Pour cela, il est important de comprendre la biologie du moucheron. Une des principales mesures consiste à isoler physiquement les animaux des mouchérons lors de leurs périodes d'activités maximales en les enfermant dans les bâtiments. Les *Culicoides*, principalement actifs au crépuscule et à l'aube sont très peu rencontrés dans les bâtiments. L'intérêt de mettre les animaux dans les bâtiments pendant ces périodes-là, bien que difficilement réalisable en pratique serait la solution de choix afin prévenir des piqûres de mouchérons.

b) *La lutte écologique.*

La lutte écologique consiste à limiter la prolifération des vecteurs en agissant sur leur environnement. Par la réduction des sources d'humidité (drainage et assèchement des points d'eau notamment), ce sont les gîtes larvaires qui vont être éliminés. De plus, dans cette démarche-là, il est également nécessaire d'avoir une gestion raisonnée de la fumière qui contribue de façon importante à l'entretien des habitats larvaires.

L'utilisation de pièges à insectes est une autre innovation en cours d'études pouvant permettre de réduire la population de *Culicoides* autour des bâtiments (Helmer et al., 2013).



Figure 14: Piège lumineux de type OVI permettant la capture de *Culicoides* (d'après CIRAD).

c) *La lutte chimique.*

La lutte chimique consiste en l'emploi de répulsifs naturels, à la pulvérisation de traitements insecticides dans l'environnement et à l'application d'insecticides sur les animaux.

Les pyréthriinoïdes et les organophosphorés sont les deux familles d'insecticides principalement employées, bien que leur efficacité sur la diminution du risque de transmission d'un arbovirus n'ait pas été démontrée (Carpenter, 2008).

Le traitement des animaux de production avec des pyréthriinoïdes de synthèse est un moyen de lutte fréquemment utilisé, et probablement le seul utilisé sur le terrain, dans la lutte contre les arboviroses (Eisler, 2003). Ce sont des insecticides de contact qui pénètrent à travers la cuticule des insectes et agissent sur leur système nerveux. Ils diffusent très peu à travers la peau des ruminants et ne s'accumulent pas dans les tissus. De plus, ils sont faiblement toxiques pour les animaux à sang chaud.

Weihner et al. a notamment mis en évidence en 2014 que la deltaméthrine, un pyréthriinoïde, avait la capacité de diminuer le taux de nutrition des *Culicoides* pendant 35 jours chez les ovins réduisant ainsi la pression d'infection. Les pyréthriinoïdes sont disponibles sous formes de plaquettes auriculaires, de pour-on ou encore par pulvérisation ainsi qu'en spray aérosol. Carpenter et al. a montré en 2008 l'efficacité insecticide des pyréthriinoïdes (deltaméthrine, cyperméthrine) sur les *Culicoides* adultes. Il a comparé l'efficacité de quatre présentations différentes : la boucle auriculaire (Diazinon®), la deltaméthrine en pour-on (25

g/L à 4 mL/100 kg), la fluméthrine en pour-on (75 g/L à 10 mL/100 kg) et une application de fenvalérate (200 g/L) et a montré que la deltaméthrine apparaissait comme le plus efficace des traitements.

L'application de ces topiques seraient à privilégier en priorité lors des périodes d'activités maximales des *Culicoides* c'est-à-dire pendant la période estivale (Helmer et al., 2013) et plus précisément lors de la fenêtre de sensibilité maximale des femelles gestantes susceptibles d'être piquées.

Concernant l'utilisation des avermectines chez les bovins, seule la forme pour-on existe avec une AMM pour la lutte et la prévention contre les mouches (*Haematobia irritans*). L'efficacité systématique contre les *Culicoides* n'a pas pu être démontrée. Une efficacité de 99% a été observée après un traitement d'ivermectine sous-cutané à la dose de 200 µg/kg chez des *Culicoides brevitarsis* pendant 10 jours mais c'est la seule efficacité relative rapportée jusqu'à maintenant. Un des intérêts de cette molécule serait d'avoir une activité larvicide. Cependant le coût ainsi que les impacts écologiques en découlant et notamment la destruction des coléoptères coprophages en fait donc un produit peu utilisé.

Pour conclure, la lutte chimique est donc une mesure à prendre avec précautions en raison de son efficacité plutôt relative quant à la prévention de l'apparition du virus dans un élevage. L'utilisation des insecticides sur les animaux doit donc être réalisée intelligemment en veillant bien à une répartition homogène et en considérant ce moyen uniquement comme mesure complémentaire à d'autres méthodes de lutte.

d) Vaccination.

Considérant l'impact de la maladie, l'objectif prioritaire de la vaccination est la protection des femelles contre le passage transplacentaire et l'infection fœtale. Une vaccination trois semaines à un mois avant la reproduction est donc recommandée afin de permettre la production d'anticorps neutralisants à des valeurs optimales lors de la parturition. La transmission vénérienne n'a pas été entièrement démontrée, cependant considérant la présence de génome viral dans la semence de taureau, la vaccination des mâles reproducteurs est donc également envisageable (ProMed-mail, 2012b ; ProMedmail, 2012c ; ProMed-mail, 2013).

Chez les ovins, l'immunité naturelle semble protéger les brebis gestantes contre une réinfection (Rodríguez-Prieto et al., 2014). Si les vaccins ne sont pas disponibles, il est nécessaire de déplacer les femelles naïves vers une région où le virus est connu pour circuler avant la période de reproduction comme c'est indiqué pour le virus *Akabane* (Anonyme, 2013). La vaccination est cependant plus pratique et plus fiable.

En France, l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV-Anses) a accordé deux AMM circonstances exceptionnelles (AMM du 29 juillet 2013 pour bovins et ovins), pour les vaccins Bovilis® SBV (MSD Santé Animale) et SBVVAX® (Merial). La France est le deuxième pays dans lequel un vaccin a été disponible, après le Royaume-Uni (AMM du 21 mai 2013). Pour le moment, aucun vaccin n'est encore disponible avec une AMM chèvres.

Selon les deux fabricants, un protocole en une seule injection permettrait la réduction de la virémie chez les ovins. Une primovaccination en deux injections espacées de quatre semaines chez les ovins et les bovins permettrait quant à elle de prévenir l'apparition d'une virémie. L'immunité serait acquise 3 semaines après la primo-vaccination. La durée de l'immunité n'a en revanche pas encore été établie.

Ces vaccins inactivés ont été produits à partir de lignées cellulaires provenant de reins de bébés hamsters (BHK-21) et de reins de singe (MA-104). Les adjuvants principaux sont l'aluminium et l'hydroxyde de saponine.

Des études pilotes concernant des mutations de délétion chez un SBV recombinant sont très prometteuses quant à la production de vaccins vivants atténués à l'avenir : une double mutation à l'origine de la suppression des protéines NSs et NSm a été capable d'induire une séroconversion chez les bovins et de les protéger après inoculation d'épreuve.

Les vaccins vivants atténués sont intéressants car ils sont plus souvent plus efficaces que les vaccins inactivés (Kraatz et al., 2015). Cette vaccination combinerait deux avantages: elle protégerait les individus et pourrait également être utilisée pour briser la chaîne de transmission du virus. La modélisation des études a révélé que cette approche tactique pourrait être bénéfique pour réduire la propagation du virus même si seuls les bovins sont vaccinés (Bessell et al., 2014).

e) Gestion de la reproduction.

En considérant les risques de transmission foetale, une stratégie de prévention serait de décaler dans le temps les périodes de reproduction par rapport au pic d'activité des vecteurs (printemps à automne). Deux options ont été envisagées, à savoir décaler la mise à la reproduction des femelles ou bien répartir la mise à la reproduction dans le temps afin qu'un minimum de femelles ne soit affecté lors du pic d'activité vectorielle.

III. IMPORTANCE DU VIRUS DE SCHMALLEMBERG CHEZ LES RUMINANTS SAUVAGES ET DE PARCS ZOOLOGIQUES.

Le SBV, à l'origine de troubles de la reproduction et de malformations congénitales chez les ruminants, peut être d'importance majeure chez les bovidés sauvages et de parcs zoologiques. Il peut en effet influencer le nombre de naissance et donc les effectifs des différentes populations susceptibles.

Comprendre l'épidémiologie du SBV dans les populations sauvages et captives va donc permettre de déterminer les meilleures mesures à adopter pour prévenir ces espèces de l'infection. Il est également nécessaire de connaître le fonctionnement et l'articulation de l'ensemble des institutions contribuant à la conservation des espèces les plus menacées afin de développer une gestion intégrée de cette maladie en prenant en compte l'ensemble des facteurs institutionnels.

Les parcs zoologiques ont notamment au-delà, de leurs objectifs d'éducation et de récréation un rôle de conservation. Ce sont en effet dans ces structures que sont préservées certaines populations menacées d'extinction, par la réalisation de plan d'élevages. Ces structures sont régies par un ensemble de règles à respecter afin d'assurer la pérennité des espèces animales présentes. Si le SBV menace la reproduction de ces individus en danger, ce sont donc l'ensemble de ces programmes de préservation qui devront être reconsidérés.

A. *Quelques aspects généraux sur la conservation des espèces.*

1. Union Internationale pour la Conservation de la Nature.

L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) est une Union

d'adhésion composée d'organisations gouvernementales et de sociétés civiles. Elle fournit aux organisations publiques, privées et non gouvernementales les connaissances et les outils contribuant au progrès humain, au développement économique et à la conservation de la nature. Ses focus sont en priorité ceux liés aux espèces, aux écosystèmes et à la diversité biologique.

Créé en 1948, l'UICN a évolué pour devenir le réseau environnemental le plus grand et le plus diversifié du monde. Il utilise l'expertise et les ressources de ses 1.300 organisations membres et de ses quelques 16.000 experts afin de travailler pour la préservation de l'environnement et le développement durable. Elle conduit des projets sur le terrain pour mieux gérer les environnements naturels.

Les experts sont organisés en six commissions dédiées à la survie des espèces, le droit de l'environnement, les zones protégées, la politique sociale et économique, la gestion des écosystèmes, l'éducation et la communication.

L'IUCN est un lieu d'échanges neutres où les gouvernements, les ONG, les scientifiques, les entreprises, les collectivités locales, les groupes de peuples autochtones, les organisations confessionnelles et autres peuvent travailler ensemble pour forger et mettre en œuvre des solutions face aux défis environnementaux.

Le programme de l'UICN sur les espèces évalue le statut de conservation des espèces, des sous-espèces et des sous-populations à l'échelle planétaire sur les cinquante dernières années afin de mettre en évidence certains taxons menacés d'extinction.

La Liste rouge des espèces menacées TM de l'UICN a été créée afin de catégoriser les menaces et de recenser les taxons inhérents au règne animal mais également aux plantes et aux champignons. Ce programme utilise un ensemble de critères pour évaluer le risque d'extinction de milliers d'espèces et de sous-espèces. Ces critères correspondent à toutes les espèces et toutes les régions du monde. Avec sa solide base scientifique, la Liste rouge de l'UICN est reconnue comme le guide d'état le plus complet sur la diversité biologique.

C'est un indicateur critique de la santé de la biodiversité mondiale. Bien plus qu'une liste des espèces et de leur statut, c'est un puissant outil pour informer et entraîner de nouvelles actions pour la conservation de la biodiversité et instaurer des changements de

politique nécessaires pour protéger les ressources naturelles dont nous avons besoin pour survivre. Il fournit des informations sur la taille, l'étendue, l'habitat et l'écologie d'une population, l'utilisation et /ou le commerce, les menaces et les mesures de conservation qui aideront à éclairer les décisions de conservation nécessaires.

La Liste rouge de l'UICN est utilisée par les organismes gouvernementaux, les ministères de l'environnement, les organisations non gouvernementales liées à la conservation (ONG), les planificateurs de ressources naturelles, les organisations éducatives, les étudiants et le monde des affaires. Actuellement, il y a plus de 79 800 espèces sur la liste rouge de l'UICN, dont plus de 23 000 sont menacées d'extinction (41% des amphibiens, 25% des mammifères et 13% des oiseaux).

CATEGORIES	Définitions
ETEINT (EX)	Un taxon est dit Éteint lorsqu'il ne fait aucun doute que le dernier individu est mort. Un taxon est présumé Éteint lorsque des études exhaustives menées dans son habitat connu et/ou présumé, à des périodes appropriées (rythme diurne, saisonnier, annuel), et dans l'ensemble de son aire de répartition historique n'ont pas permis de noter la présence d'un seul individu. Les études doivent être faites sur une durée adaptée au cycle et aux formes biologiques du taxon.
ÉTEINT À L'ÉTAT SAUVAGE (EW)	<p>-Un taxon est dit Éteint à l'état sauvage lorsqu'il ne survit qu'en culture, en captivité ou dans le cadre d'une population (ou de populations) naturalisée(s), nettement en dehors de son ancienne aire de répartition.</p> <p>-Un taxon est présumé Éteint à l'état sauvage lorsque des études détaillées menées dans ses habitats connus et/ou probables, à des périodes appropriées (rythme diurne, saisonnier, annuel), et dans l'ensemble de son aire de répartition historique n'ont pas permis de noter la présence d'un seul individu. Les études doivent être faites sur une durée adaptée au cycle et aux formes biologiques du taxon.</p>
EN DANGER CRITIQUE (CR)	-Un taxon est dit En danger critique lorsque les meilleures données disponibles indiquent qu'il remplit l'un des critères A à E correspondant à la catégorie En danger critique et, en conséquence, qu'il est confronté à un risque extrêmement élevé d'extinction à l'état sauvage.

EN DANGER (EN)	-Un taxon est dit En danger lorsque les meilleures données disponibles indiquent qu'il remplit l'un des critères A à E correspondant à la catégorie En danger et, en conséquence, qu'il est confronté à un risque très élevé d'extinction à l'état sauvage.
VULNÉRABLE (VU)	Un taxon est dit Vulnérable lorsque les meilleures données disponibles indiquent qu'il remplit l'un des critères A à E correspondant à la catégorie Vulnérable et, en conséquence, qu'il est confronté à un risque élevé d'extinction à l'état sauvage.
QUASI MENACÉ (NT)	Un taxon est dit Quasi menacé lorsqu'il a été évalué d'après les critères et ne remplit pas, pour l'instant, les critères des catégories En danger critique, En danger ou Vulnérable mais qu'il est près de remplir les critères correspondant aux catégories du groupe Menacé ou qu'il les remplira probablement dans un proche avenir.
PRÉOCCUPATION MINEURE (LC)	Un taxon est dit de Préoccupation mineure lorsqu'il a été évalué d'après les critères et ne remplit pas les critères des catégories En danger critique, En danger, Vulnérable ou Quasi menacé. Dans cette catégorie sont inclus les taxons largement répandus et abondants.
DONNÉES INSUFFISANTES (DD)	Un taxon entre dans la catégorie Données insuffisantes lorsqu'on ne dispose pas d'assez de données pour évaluer directement ou indirectement le risque d'extinction en fonction de sa distribution et/ou de l'état de sa population. Un taxon inscrit dans cette catégorie peut avoir fait l'objet d'études approfondies et sa biologie peut être bien connue, sans que l'on dispose pour autant de données pertinentes sur l'abondance et/ ou la distribution. Il ne s'agit donc pas d'une catégorie Menacé. L'inscription d'un taxon dans cette catégorie indique qu'il est nécessaire de rassembler davantage de données et n'exclut pas la possibilité de démontrer, grâce à de futures recherches, que le taxon aurait pu être classé dans une catégorie Menacé. Il est impératif d'utiliser pleinement toutes les données disponibles.
NON ÉVALUÉ (NE)	Un taxon est dit Non évalué lorsqu'il n'a pas encore été confronté aux critères.

Tableau 4: Définition des différentes catégories de la Liste Rouge de l'UICN.

2. CITES.

« La Convention sur le Commerce International des Espèces de faune et de flore Sauvages menacées d'extinction (CITES) ou Convention de Washington, est un accord international entre états. Elle a pour but de veiller à ce que le commerce international des spécimens d'animaux et de plantes sauvages ne menace pas la survie des espèces auxquelles ils appartiennent. » On estime que le commerce international des espèces sauvages représente des milliards de dollars par an et qu'il porte sur des centaines de millions de spécimens de plantes et d'animaux.

"L'exploitation et le commerce intensifs de certaines espèces, auxquels s'ajoutent d'autres facteurs tels que la disparition des habitats, peuvent épuiser les populations et même conduire certaines espèces au bord de l'extinction. De nombreuses espèces sauvages faisant l'objet d'un commerce ne sont pas en danger d'extinction mais l'existence d'un accord garantissant un commerce durable est importante pour préserver ces ressources pour l'avenir."

La CITES contrôle et réglemente le commerce international des spécimens des espèces inscrites à ses annexes. Toute importation, exportation, réexportation (exportation d'un spécimen importé) ou introduction en provenance de la mer de spécimens des espèces couvertes par la Convention doit être autorisée dans le cadre d'un système de permis. Chaque Partie à la Convention doit désigner au moins un organe de gestion chargé d'administrer le système de permis et au moins une autorité scientifique qui lui donne son avis sur les effets du commerce sur les espèces.

Considérant que le commerce des plantes et des animaux sauvages dépasse le cadre national, sa réglementation nécessite la coopération internationale pour préserver certaines espèces de la surexploitation. La CITES a été conçue dans cet esprit de coopération. Aujourd'hui, elle confère une protection (à des degrés divers) à plus de 35 000 espèces sauvages.

Les espèces couvertes par la CITES sont inscrites à l'une des trois annexes de la Convention selon le degré de protection dont elles ont besoin.

"L'Annexe I comprend toutes les espèces menacées d'extinction. Le commerce de leurs spécimens n'est autorisé que dans des conditions exceptionnelles.

"L'Annexe II comprend toutes les espèces qui ne sont pas nécessairement menacées d'extinction mais dont le commerce des spécimens doit être réglementé pour éviter une exploitation incompatible avec leur survie."

"L'Annexe III comprend toutes les espèces protégées dans un pays qui a demandé aux autres Parties à la CITES leur assistance pour en contrôler le commerce. La procédure à suivre pour procéder à des changements dans l'Annexe III est distincte de celle pour les Annexes I et II car chaque Partie est habilitée à y apporter unilatéralement des amendements."

3. Le système TRACES.

Le TRACES ou TRAdE Control and Expert System est un système qui va permettre le suivi des mouvements d'animaux et de produits d'origine animale. Ce suivi est réalisé à l'intérieur des frontières européennes mais également pour tous les échanges effectués avec le reste du monde. Ces informations sont collectées dans une base de données. Chaque animal qu'il soit domestique ou sauvage est suivi électroniquement afin de tracer à partir de son point de départ, les différentes étapes ainsi que sa destination finale. Sont également enregistrés dans le même temps un panel d'informations concernant les individus en question. Il est nécessaire de remplir une demande électronique et d'en attendre une acceptation avant tout mouvement d'animaux. C'est aujourd'hui la Commission européenne qui est en charge de ce système, ce qui lui permet de surveiller et contrôler les échanges d'animaux pouvant potentiellement être à l'origine d'introduction de nouvelles maladies infectieuses à l'intérieur de ses frontières.

4. Plans d'élevage européens.

L'EAZA ou European Association of Zoos and Aquaria est un organisme ayant pour objectif de faciliter la coopération entre les parcs zoologiques et les aquariums européens. Ce sont près de 350 institutions et d'une quarantaine de pays qui collaborent sur autant de sujets divers et variés liés à l'éducation, la recherche et la conservation. C'est par cet organisme que les programmes d'élevage d'espèces en danger vont pouvoir être créés (European Endangered species Programme).

Ces programmes vont permettre la gestion d'élevage d'espèces menacées par les

contrôles de tous les paramètres inhérents à leur survie, leur maintien et éventuellement leur réintroduction. Un coordinateur d'espèces est désigné et va être responsable du recensement de l'ensemble des individus dans les différents parcs zoologiques européens, de la création d'arbre généalogique afin de gérer de façon optimale le pool génétique et d'éviter les problèmes de consanguinité et du transfert d'individus d'un parc à un autre afin de contrôler au mieux tous les paramètres précédemment cités.

B. Taxonomie et classification des ruminants domestiques et sauvages.

1. Caractéristiques anatomiques.

Les bovidés sont caractérisés par de longs membres onguligrades, caractéristiques des artiodactyles. Ils sont paraxoniques puisque la ligne de symétrie du pied passe entre les troisièmes et quatrièmes doigts. Chez la plupart des bovidés, les doigts latéraux sont diminués voir absents et le poids de l'animal est par conséquent reporté sur les doigts centraux restants. Les troisièmes et quatrièmes métapodes sont complètement fusionnés à l'origine de l'os du canon. L'ulna et la fibula sont réduits et fusionnés avec le radius et le tibia, respectivement. Cette disposition prévoit un grand angle de flexion et d'extension, mais limite le mouvement latéral. (Alder, et al., 1995, Danell, et al., 2006; Feldhamer, et al, 2007; Fowler et Miller, 2003; Kingdon, 1982a; Kingdon, 1982b; Vaughn, et al., 2000; Walther 1990)

En tant que membres du sous-ordre des Ruminants, les bovidés présentent un estomac à 4 chambres, adapté à la fermentation et à la digestion cellulolytique. Ainsi, ce sont des herbivores stricts, ce qui se reflète également par leur hypsodontie et leur sélénodontie : les incisives supérieures sont absentes et les canines supérieures sont soit diminuées soit absentes. A la place des incisives supérieures, les bovidés présentent un tissu épaissi dur connu sous le nom de pad dentaire, qui fournit une surface de préhension des matières végétales. Les incisives inférieures se projettent vers l'avant et sont rejoints par les canines modifiées qui simulent la fonction des incisives. Les incisives modifiées sont suivies par un espace édenté longtemps connu sous le nom de diastème. Leur formule dentaire est : I 0/3, 0/1 C, P 2-3 / 3, M 3/3. (Alder, et al., 1995, Danell, et al., 2006; Feldhamer, et al, 2007;. Fowler et Miller, 2003; Kingdon, 1982a; Kingdon, 1982b; Vaughn, et al., 2000; Walther 1990).

Une des caractéristiques distinctives de cette famille est la présence de cornes sans ramification. Les cornes proviennent d'un noyau osseux connu sous le nom du processus cornual de l'os frontal et sont recouverts d'une gaine kératinisée épaisse. Les cornes ne tombent pas comme les bois des cervidés et la plupart poussent continuellement. Sauf pour les antilopes indiennes à quatre cornes, les cornes sont observées par paires. (Alder, et al., 1995, Danell, et al., 2006; Feldhamer, et al, 2007; Fowler et Miller, 2003; Kingdon, 1982a; Kingdon, 1982b; Vaughn, et al., 2000; Walther 1990).

Les bovidés présentent un large éventail de tailles, de robes et de motifs. Par exemple, les gaur (*Bos gaurus*) ont une hauteur maximale au garrot de 3,3 mètres avec un poids maximal de plus de 1000 kg tandis que l'antilope pygmée (*Neotragus batesi*) a une hauteur de 300 millimètres avec un poids maximal de 3 kilogrammes. Les individus retrouvés dans les forêts ont tendance à avoir des membres plus courts avec des arrière-trains plus développés contrairement aux espèces d'habitats ouverts présentant de longs membres. Ces adaptations permettent aux bovidés d'échapper aux prédateurs potentiels en complément de divers mécanismes de dissimulation et notamment l'adaptation de robes et de motifs (Alder, et al., 1995, Danell, et al., 2006; Feldhamer, et al, 2007;. Fowler et Miller, 2003; Kingdon, 1982a; Kingdon, 1982b; Vaughn, et al., 2000; Walther, 1990).

La plupart des bovidés présentent un dimorphisme sexuel. Les mâles possèdent des cornes, qui sont utilisées dans les combats ritualisés au cours de la saison des amours. Les cornes des mâles ont tendance à être plus complexes et plus robustes que celles des femelles, qui ont tendance à être plus droites, plus fines et plus simples dans leur conception. Les cornes sont présentes chez les femelles dans environ 75% des espèces de plus de 40 kg et sont généralement absentes chez les espèces de moins de 25 kg. De plus, les mâles présentent également des glandes odorantes plus développées que chez les femelles, chez lesquelles elles sont réduites ou absentes notamment chez les espèces de la sous-famille des Bovinae.

L'espérance de vie des bovidés est très variable. La plupart des bovidés sauvages vivent entre 10 et 15 ans, les plus grandes espèces ayant tendance à vivre plus longtemps. Par exemple, le bison d'Amérique du Nord (*Bison bison*) peut vivre jusqu'à 25 ans et le gaur (*Bos gaurus*) jusqu'à 30 ans. Chez les espèces polygames, les mâles ont souvent une durée de vie plus courte que les femelles. Cela est probablement dû à la concurrence mâle-mâle et la nature solitaire des mâles sexuellement dimorphes entraînant une vulnérabilité accrue à la prédation.

2. Caractéristiques phylogéniques.

Les bovidés sont la plus grande des 10 familles existantes au sein des artiodactyles. Elle est composée de plus de 140 espèces existantes et 300 espèces éteintes. Bien que la classification des bovidés en sous-familles (Gray, 1821), basée sur des études moléculaires, morphologiques et fossiles, soit encore controversée à l'heure actuelle, 8 sous-familles ont jusqu'alors été suggérées: les Aepycerotinae (impalas), les Alcelaphinae (bonteboks, bubales, gnous, et parents), les Antilopinae (antilopes, dik-diks, gazelles, et les parents), les Bovinae (bisons, buffles, bovins, et apparentés), les Caprinae (chamois, chèvres, moutons et assimilés), les Cephalophinae (céphalophes), les Hippotraginae (addax, oryx, antilopes rouannes, antilopes zibeline), et les Reduncinae (genre Redunca(kobs), waterbuck et apparentés).

Sous-familles	Exemple	
Aepycerotinae	Impala (<i>Aepyceros melampus</i>)	 <p>(Crédits : Ikiwaner)</p>
Alcelaphinae	Gnou bleu (<i>Connochaetes taurinus</i>)	 <p>(Crédits : Steve Evans)</p>
	Dik-dik (Genre Madoqua)	 <p>(Crédits : Pedro Gonnet)</p>
	Bovinae	Bison d'Europe (<i>Bison bonasus</i>)

<p>Caprinae</p>	<p>Chamois (<i>Rupicapra rupicapra</i>)</p>	 <p>(Crédits : Manfred Werner)</p>
<p>Cephalophinae</p>	<p>Céphalophe noir (<i>Cephalopus niger</i>)</p>	 <p>(Crédits : Ucumari)</p>
<p>Hippotraginae</p>	<p>Addax (<i>Addax nasomaculatus</i>)</p>	 <p>(Crédits : Rogers&Leazer)</p>
<p>Reduncinae</p>	<p>Cobe des roseaux (<i>Redunca redunca</i>)</p>	 <p>(Crédits : D. Gordon)</p>

Tableau 5: Représentation des différentes sous-familles au sein de la famille des Bovidae.

Les bovidés sauvages peuvent être retrouvés dans toute l'Afrique, dans une grande partie de l'Europe, de l'Asie et de l'Amérique du Nord et sont principalement retrouvés dans les grandes prairies.

Certaines caractéristiques ont évolué en fonction de leur mode de vie en pâturage et notamment leur dentition, l'onguligradie, la spécialisation gastro-intestinale et la présence de cornes (Alder, et al., 1995, Feldhamer, et al, 2007;. Gentry, 2011; Kingdon, 1982a; Kingdon, 1982b;. Vaughn, et al, 2000; Walther, 1990).

La **sous-famille des Bovinae** rassemble des individus originaires d'Afrique, d'Amérique du Nord, d'Eurasie, d'Inde et d'Asie du Sud. Les Bovinae incluent 24 espèces de 8 genres différents, y compris l'antilope Nilgaut (*Boselaphus tragocamelus*), l'antilope tétracère (*Tetracerus quadricornis*), le bison, le buffle d'Asie, le buffle d'Afrique, et le grand koudou. Le dimorphisme sexuel est très répandu dans cette sous-famille, les mâles de certaines espèces pesant presque deux fois plus que leurs homologues féminins. Les Bovinae ont joué un rôle important dans l'évolution culturelle de l'homme : de nombreuses espèces au sein de cette sous-famille ont en effet été domestiquées à des fins de subsistance. (Estes, 1991; Gentry, 2011; Shackleton et Harested, 2010a; Shackleton et Harested, 2010b)

La **sous-famille des Antilopinae** comprend les antilopes, les dik-diks, les gazelles, et apparentés. Les petites antilopes et antilopes de taille moyenne se retrouvent dans la majorité de l'Afrique, mais particulièrement dans les zones élevées à forte densité d'Afrique orientale. Les antilopes naines, les raphicères et les dik-diks sont retrouvés dans une variété d'habitats différents, mais sont également limitées au continent africain. Enfin, les vraies gazelles comprennent entre autres les genres Eudorcas, Gazella, Nanger et Procapra. En général, les bovidés au sein de la sous-famille Antilopinae se retrouvent dans une grande partie de l'Asie et de l'Afrique. (Estes, 1991; Gentry, 2011; Shackleton et Harested, 2010a; Shackleton et Harested, 2010b).

La **sous-famille Reduncinae** est principalement distribuée dans toutes les parties de l'Eurasie et de l'Afrique. Cette sous-famille est composée de seulement trois genres : Redunca (kobs), Pelea (Péléa), et Kobus (Cobe à croissant). Ces espèces sont de taille moyenne à grande. Ce sont des brouteurs qui présentent souvent un lien étroit avec l'eau. (Estes, 1991; Gentry, 2011; Shackleton et Harested, 2010a; Shackleton et Harested, 2010b).

La **sous-famille Hippotraginae** se compose principalement de grandes antilopes de pâturage présentant de grandes cornes. Les Hippotraginae sont limités à l'Afrique et au Moyen-Orient asiatique et sont principalement des brouteurs. La plupart des espèces de cette sous-famille vivent dans des habitats arides et présentent une crinière hérissée le long de la nuque. Des recensements récents ont totalisé 8 espèces regroupées en 3 genres différents. (Estes, 1991; Gentry, 2011; Huffman, 2011; Shackleton et Harested, 2010a; Shackleton et Harested, 2010b).

La **sous-famille des Ancephalinae**, est composée de 10 espèces regroupées en 4 genres comprenant les Damalisques à front blanc, les bubales, les gnous et apparentés. Toutes les espèces de cette sous-famille sont des brouteurs nomades originaires d'Afrique. La plupart des espèces montrent un dimorphisme, les mâles étant de 10 à 20% plus grand que les femelles. Les mâles aussi bien que les femelles possèdent des cornes à double courbure, également connu sous le nom de lyrate. (Estes, 1991; Gentry, 2011; Huffman, 2011; Shackleton et Harested, 2010a; Shackleton et Harested, 2010b).

La **sous-famille Caprinae** se compose des chèvres, des moutons, des bœufs musqués, et assimilés. Cette sous-famille est divisée en 12 genres. Cette classification est cependant remise en cause. L'organisation de la sous famille Caprinae est complexe et plusieurs sous-classifications ont été proposées. Un groupe de travail de l'UICN travaille actuellement sur la taxonomie au sein des Caprinae. Ces animaux sont particulièrement adaptés aux environnements montagnards, ce qui explique sa diversification en Eurasie qu'en Afrique. De façon générale, les deux sexes présentent des cornes et un dimorphisme sexuel peut également être rapporté. (Estes, 1991; Gentry, 2011; Huffman, 2011; Mallon, 2010)

La **sous-famille Aepycerotinae** se compose d'une seule espèce, les Impalas. Les Aepycerotinae sont endémiques d'Afrique et ont probablement divergé d'autres lignées au début du Miocène, il y a environ 20 millions d'années. Les Impalas montrent un dimorphisme sexuel et seuls les mâles possèdent des cornes (Estes, 1991; Huffman, 2011; Kingdon, 1982a; Kingdon, 1982b).

La **sous famille des Cephalophinae** se compose de 18 espèces de céphalophes regroupés en 3 genres. Les céphalophes sont hautement spécialisés et vivent dans les forêts tropicales d'Afrique. Toutes les espèces sont facilement reconnaissables en raison de leur

structure corporelle, mais différent de façon significative dans leur taille d'une espèce à l'autre. Aussi, contrairement à la plupart des autres bovidés, les céphalophes sont principalement frugivores. (Estes, 1991; Huffman, 2011; Nowak, 1999).

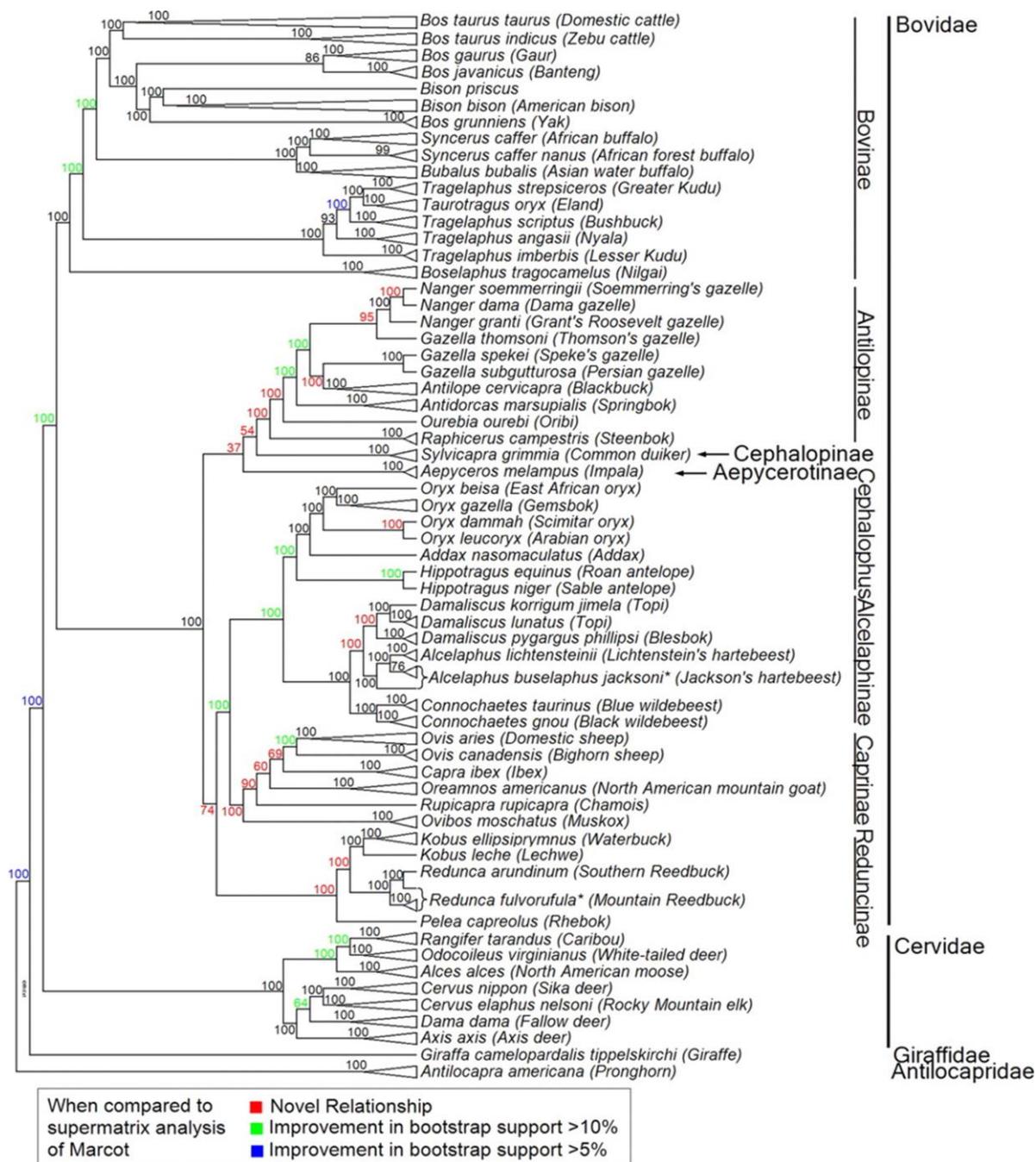


Figure 15 : Cladogramme représentant les familles du sous-ordre des ruminants et les sous-familles de la famille des bovidés basés sur un consensus regroupant 17 arbres phylogénétiques (d'après Dekel et al., 2009)

3. Quelques aspects de conservation.

Actuellement, de nombreuses espèces de bovidés jouissent d'un nombre suffisant d'animaux afin d'assurer leur survie pour les années à venir. La Liste Rouge des espèces menacées de l'UICN considère que 67 des 143 espèces répertoriées sont listées comme "Préoccupations mineures." Ceci est en partie dû à la protection de grandes étendues de terres qui aident à compenser les effets néfastes de la perte d'habitat. Par exemple, les populations de gnous et de gazelles étaient d'environ 500 000 au cours des années 1960, mais ont augmenté à plus d'un million dans les années 1990.

Dans certaines contrées toutefois, les bovidés sont surexploités pour leur viande. De plus, la perte d'habitat due au surpâturage, à l'agriculture et à l'exploitation forestière constitue une menace importante pour la persistance de nombreuses espèces. En 2009, quatre espèces de bovidés ont disparu à l'état sauvage: les aurochs, les gazelles bilkis, les gazelles d'Arabie, et l'hippotrague. L'oryx algazelle est éteint à l'état sauvage et est uniquement retrouvé dans les parcs zoologiques. Huit autres espèces sont "en danger critique". Les saolas et les mouflons sont répertoriés comme « en danger». Vingt et une autres espèces sont considérées comme vulnérables et 16 espèces sont considérées comme "quasi menacées". La CITES a listé 71 espèces en vertu de l'annexe 1 et 1 espèce dans l'annexe 2. (Alder, et al., 1995, la CITES, 2010; Danell, et al., 2006; Feldhamer, et al, 2007;. Fowler et Miller, 2003; Kingdon, 1982a; Kingdon, 1982b; Vaughn, et al., 2000; Walther, 1990).

C. Etude de l'infection du SBV chez quelques espèces sauvages.

De nombreuses études ont mis en évidence une infection par le SBV chez plusieurs espèces de ruminants sauvages, bovidés et cervidés.

C'est tout d'abord en 2012 que Lindel et al. a pu mettre en évidence la présence du virus en réalisant des dépistages sérologiques (kit ELISA ID Screen Schmallerberg Virus Antibody Indirect ELISA; ID-Vet) à partir de prélèvements de sang recueillis lors d'examen post-mortem sur des cerfs élaphe (*Cervus elaphus*) et des chevreuils (*Capreolus capreolus*), abattus dans le sud de la Belgique lors des saisons de chasse en 2010 et 2011. Sur les 313 cerfs élaphe et les 211 chevreuils, les prélèvements collectés en 2010 se sont montrés négatifs. En revanche, en 2011, une séroprévalence de 43,1% (40,5% chez les cerfs élaphe

et 45,9% chez les chevreuils) a été observée à partir des 225 prélèvements collectés. Aucun signe clinique évocateur n'a pu être rapporté lors de cette étude.

L'année suivante, Larska et al. a également souligné la susceptibilité de ces deux espèces sauvages à partir de prélèvements de sang réalisés dans huit lieux différents de Pologne entre 2011 et 2013. Dans cette étude, aucun anticorps anti-SBV n'a pu être mis en évidence jusqu'en juillet 2012. Ce n'est seulement à partir de novembre 2012 et ce jusqu'à janvier 2013 qu'une augmentation globale de la proportion de ruminants sauvages affectés, de 50% pour les cerfs élaphe et de 43% pour les daims (*Dama dama*) a pu être constatée. L'augmentation soudaine de la séroprévalence serait à relier au pic d'activité du moucheron pendant les mois d'automne (Sanders et al., 2011).

Dans la même étude, il a également été rapporté la détection d'ARN viral dans le sérum d'un wapiti polonais de 6 mois (*Alces Alces*) mort d'une bronchopneumonie. Aucune relation entre la virémie et les signes cliniques observés n'avait cependant pu être mise en évidence à l'époque.

Cette même étude a également souligné la détection d'anticorps anti-SBV dans le seul troupeau sauvage libre de bisons (*Bison bonasus*) en Europe entre juillet et novembre 2012. Cette découverte a permis de soulever la menace que le SBV que pourrait constituer pour les espèces de ruminants en voie de disparition. Une séropositivité allant jusqu'à 80% a été relevée chez cette espèce. De telles valeurs pourraient refléter une sensibilité d'espèces, une relation génétique plus étroite avec les ruminants domestiques (Buczyn' ska et al., 1999) ou bien une densité de population et une localisation propice à un contact plus fréquent avec les *Culicoides*.

Schiefer et al. a également confirmé la même année une forte diversité d'espèces infectées puisque une séroprévalence de 49,2% pour le SBV a été mise en évidence à partir d'échantillons provenant de ruminants sauvages abattus de fin Septembre 2012 à fin Novembre 2012 en Autriche. Les anticorps anti-SBV (kit ELISA ID-Vet) ont encore une fois été détectés chez le cerf élaphe (*Cervus elaphus*), le chevreuil (*Capreolus capreolus*) et le daim (*Dama dama*) mais ont également été mis en évidence pour la première fois chez le cerf sika (*Cervus nippon*), le renne (*Rangifer tarandus*) et le chamois (*Rupicapra rupicapra*).

D'autres enquêtes ont également été réalisées dans des pays plus au Sud. En effet, considérant que le SBV avait pu être mis en évidence pour la première fois en Italie du

Nord en Février 2012, une enquête sérologique a été réalisée afin évaluer la présence d'anticorps anti-SBV chez les ruminants alpins sauvages italiens tels que les chamois (*Rupicapra rupicapra*) (23) et les cerfs élaphe (*Cervus elaphus*) (352) lors des saisons de chasse 2007-2013. Tous les échantillons de sérum prélevés jusqu'à Septembre 2012 n'ont présenté aucune séropositivité. Après cette date, 1 chamois et 21 cerfs élaphe ont été diagnostiqués positifs, soulignant ainsi une circulation active du virus dans ces populations (ProMED-MAil, 2013).

En 2014, et considérant les résultats de sa précédente étude, Larska et al. a de nouveau étudié la séroprévalence chez différentes espèces de ruminants sauvages (cerfs élaphe (*Cervus elaphus*), chevreuils (*Capreolus capreolus*), bisons européens (*Bison bonasus*), daims (*Dama dama*), mouflons (*Ovis orientalis musimon*)) chassés ou immobilisés à 34 endroits différents de la Pologne lors de la période de chasse automne / hiver 2013. Sur les 580 sérums prélevés, une séroprévalence de 25% a pu être rapportée pour l'ensemble des individus étudiés avec des variations intra-district allant de 0 à 80,0%. Une séroprévalence significativement plus élevée a été observée chez les animaux des provinces de l'Est (36,6%). Dans les provinces de l'Ouest (22,8%), l'incidence de l'infection au SBV variait significativement entre les différentes espèces (une séroprévalence plus importante a été notée chez les plus grandes espèces comme le bison d'Europe) mais également selon le type de population (en liberté, captif), l'âge, le poids corporel, le pourcentage de couverture forestière, la situation géographique en Pologne ainsi que les densités de ruminants domestiques et sauvages dans chaque province. L'utilisation d'un modèle statistique multivariable a permis de montrer que le type et l'âge des populations, et la situation géographique en Pologne étaient considérés comme les principaux facteurs de risque d'infection par le SBV des ruminants sauvages. De même, la densité de ruminants domestiques à proximité serait également un facteur prépondérant à l'infection des populations sauvages, suggérant ainsi que le cycle selvatique de la transmission du SBV serait un effet spillover du pathogène à partir des populations de ruminants domestiques.

La séroprévalence plus élevée chez les animaux des provinces de l'Est (36,6%) par rapport aux provinces de l'Ouest (22,8%) suggère que le SBV pourrait circuler en « direction opposée » à la direction de l'épizootie décrite dans l'Ouest de l'Europe. Ceci souligne l'éventuel rôle que le mouvement et le commerce des animaux domestiques pourrait avoir dans la dissémination de la maladie.

La même année, Laloy et al. a également décrit la séroprévalence du SBV chez 502 cerfs élaphe (*Cervus elaphus*), obtenue à partir de prélèvements réalisés lors des saisons de chasse de Septembre 2010 à Janvier 2011 et de Septembre 2011 à Mars 2012 dans 9 départements français. Les échantillons testés par ELISA indirect, ont montré que la séroprévalence était plus élevée de Décembre 2011 à Janvier 2012 (31%; IC 95% 25% -37%) que de Septembre à Novembre 2011 (7%; IC à 95% 3% -12%) ou que de Février à Mars 2011 (14%; IC à 95% 7% -22%). Ces données montrent également une corrélation de séroprévalence entre les animaux domestiques et sauvages soulignant ainsi l'hypothèse du rôle de sentinelle des cerfs élaphe dans la propagation du virus.

Toujours en 2014, Barlow et al. a pour la première fois montré l'infection de ruminants sauvages en Angleterre en étudiant séropositivité pour le SBV de cerfs sauvages de l'Est Anglie, une région située à l'est du pays. 66 prélèvements sanguins ont été réalisés lors d'examen post-mortem chez des cerfs élaphe (7), des daims(16), des chevreuils (8) et des muntjacs (*Muntiacus reevesi*) (35) au cours de la saison de Février à Mars 2012. Cette étude a suggéré que les individus en troupeaux de grande taille (cerfs élaphe et daims) étaient plus attractifs pour les *Culicoides* que les petites espèces plus solitaires. Là encore, cette étude n'a pu souligner aucune malformation sur l'ensemble des animaux étudiés.

En 2015, plusieurs études ont continué à mettre en évidence une séropositivité pour le SBV chez différentes espèces de cervidés et de bovidés. En Allemagne, Mouchantat et al. a notamment mis en évidence une séroprévalence de 84% chez les mouflons européens (*Ovis orientalis musimon*) et 37% chez les cerfs élaphe (*Cervus elaphus*) et les cerfs sikas (*Cervus nippon*) lors de la saison de chasse 2012/2013. Cette prévalence a diminué respectivement de 51% et 17% la saison suivante.

Diaz et al. a également mis en évidence la même année que les ruminants sauvages des pays de l'Europe du Sud pouvaient être infectés. Les chercheurs ont notamment rapporté une forte séroprévalence (53,3%, IC95%42,16 à 64,18) à partir d'un échantillon de 75 chevreuils prélevés dans différents lieux d'Espagne entre 2013 et 2014.

Des preuves sérologiques ont par ailleurs montré que les camélidés étaient également sensibles au SBV. Une étude de séroprévalence menée entre septembre 2012 et décembre 2013 chez des alpagas et des lamas a montré que 62,35% de l'échantillon étudié était séropositif bien qu'aucune virémie n'ait pu être détectée. Chez ces animaux, les individus

d'âge supérieur à un an seraient significativement plus infectés. Une infection expérimentale chez ces camélidés (non gestants) a permis de mettre en évidence l'apparition d'une virémie entre 3 et 7 jours post-inoculation et l'apparition d'une séroconversion entre 9 et 21 jours post-inoculation. Malgré des résultats virologiques et sérologiques similaires à ceux observés chez les ruminants domestiques, l'absence de signe clinique suggère que l'affection est subclinique chez ces animaux. Leur rôle en tant que réservoir dans la dissémination du virus reste encore à investiguer (Schulz et al., 2015)

Enfin, l'étude la plus récemment publiée rapporte également une séroprévalence non négligeable chez six espèces sauvages (le cerf élaphe (*Cervus elaphus*), le cerf élaphe de Corse (*Cervus elaphus corsicanus*), le chevreuil (*Capreolus capreolus*), le bouquetin des Alpes (*Capra ibex*), le mouflon (*Ovis aries musimon*), le chamois (*Rupicapra rupicapra*) et l'isard (*Rupicapra pyrenaica*) soit un total de 2050 animaux) échantillonnées lors des saisons de chasse 2011/2012 et 2013/2014 dans 21 départements français. Une séroprévalence jusqu'à 30% a été observée chez l'ensemble des espèces étudiées. La séroprévalence moyenne ne semblait pas différer entre les espèces, mais des variations allant de 0 à 90% ont pu être constatées selon les zones et les périodes de prélèvement. Il a d'autre part été constaté que cette séroprévalence était observée chez des animaux retrouvés jusqu'à 1500 mètres d'altitude. Il semblerait que la propagation spatiale du SBV dans la faune sauvage ne corresponde donc pas pleinement avec les foyers positifs recensés dans le bétail. Cette différence est notamment plus évidente dans les régions montagneuses où les foyers positifs chez la faune sauvage ont été recensés en moyenne un an après l'apparition du pic de signes cliniques observés chez le bétail. Par exemple, dans les Alpes Maritimes, aucune malformation n'a pu être recensée chez les ruminants domestiques alors qu'une séroprévalence de 50% était mise en évidence la même année chez les cerfs élaphe. Au contraire, le bouquetin des Alpes n'a montré aucun cas séropositif en Isère, où des cas de SBV congénitaux étaient cependant rapportés dans les élevages domestiques. Ces résultats au-delà de confirmer une possible corrélation entre infection domestique et sauvage pose donc la question de la fiabilité des études réalisées (type d'enquête, type d'échantillonnage). (Rossi et al., 2016).

L'ensemble de ces données a permis de montrer que de nombreuses espèces de ruminants sauvages (bovidés et cervidés) sont réceptives au SBV. Dans la plupart de ces études, seuls des tests ELISA ont été réalisés. Il aurait été intéressant et plus utile de détecter le virus par PCR ou par isolement viral afin de déterminer la capacité du virus à se répliquer

chez ces individus, suggérant ainsi leur potentiel rôle de réservoirs (Tarlinton et al., 2013).

Ces résultats ont également permis de souligner l'absence de signe clinique chez l'ensemble des espèces étudiées, aussi bien sur le terrain que lors d'infections expérimentales. Ces informations doivent être analysées avec précautions. En effet, l'absence d'observations de signe clinique peut être la cause de plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'ensemble de ces études ne rapportent les résultats que de surveillances programmées réalisées lors de périodes bien déterminées (saison de chasse), créant ainsi un biais dans les résultats. En effet, aucun résultat de surveillance événementielle ne semble être rapporté dans l'ensemble de ces études. Par conséquent, il aurait pu être intéressant de rechercher d'éventuelles malformations lors des saisons de mises bas. Chez les chevreuils, la saison de reproduction est observée en juillet et en août. Elle est suivie d'une diapause embryonnaire quelques jours après l'accouplement. La gestation reprend en décembre avec une mise bas située entre mai et juin (Aitken, 1974 ; Laloy, 2015). Dans cette espèce, la période à risque est la période embryonnaire avant le début de la diapause, c'est-à-dire la période pendant laquelle les *Culicoides* sont les plus actifs. La recherche d'avortons et de malformations en mai et juin aurait donc été d'une grande utilité. Chez les cerfs élaphe en revanche, la période de reproduction varie d'octobre à décembre et les naissances sont observées de mai à juillet (Guinness et al., 1971, Laloy, 2015). Par conséquent, la probabilité que cette espèce soit exposée aux moucheron lors de la gestation est plus faible. La probabilité d'observer des anomalies spécifiques du SBV lors des saisons de mise bas au début de l'été est donc fortement diminuée. Ces deux cas sont des bons exemples de nos méconnaissances concernant le réel pouvoir pathogène du SBV sur les espèces de ruminants sauvages. A l'avenir, il serait donc intéressant d'exposer expérimentalement des individus gestants à des *Culicoides* porteurs de SBV et d'observer si des signes cliniques spécifiques pourraient être observés chez ces animaux lors des saisons de mises bas.

IV. CONCLUSION.

Le SBV est une arbovirose dont l'expression clinique chez les ruminants domestiques entraîne des conséquences modérées en termes d'impact économique à l'échelle d'une exploitation et d'un territoire par comparaison à d'autres agents pathogènes tels que le BVD notamment.

Malgré la mise en place de mesures de surveillance notables au sein de l'Europe ainsi

que le développement de mesures actives de prévention afin de limiter la dissémination de la maladie, la propagation du virus dans une majorité des pays européens a été inévitable depuis 2011.

Le cycle selvatique de la maladie a également été étudié dans une moindre mesure mais a cependant permis de s'interroger sur l'éventuel rôle des populations sauvages en tant qu'hôtes réservoirs. Les interactions entre espèces domestiques et sauvages ne sont plus à démontrer : les individus dans certaines régions partagent les mêmes zones de pâturage. De ce fait, la transmission du SBV inter-espèces est donc fortement envisageable. Bien que certaines études soulignent une corrélation de séroprévalence entre espèces domestiques et sauvages (Mouchantat et al., 2015), il reste encore très difficile de comprendre si le cycle infectieux des populations sauvages par le SBV est indépendant ou non de celui observé chez les ruminants domestiques ou bien si les deux sont liés et que l'apparition de réémergences résulterait d'un phénomène de spillover. Enfin, aucune expression clinique de la maladie n'a pu être mise en évidence dans l'ensemble des enquêtes entreprises jusqu'à maintenant. Comme nous l'avons vu, ce risque ne peut pas complètement être écarté et de nouvelles investigations sont donc nécessaires afin de pouvoir tirer des conclusions définitives sur ces observations.

Juqu'alors, l'étude de l'impact de la maladie sur les populations captives de parcs zoologiques est restée très limitée. Jusqu'à maintenant, seuls deux parcs zoologiques au Royaume-Uni ont rapporté la présence d'anticorps-antiSBV, parfois même de virémie sans signe clinique associé chez de nombreuses espèces (le Bongo (*Tragelaphus eurycerus*), le Banteng (*Bos javanicus*), le Buffle d'Afrique (*Syncerus caffer*), le Bison d'Europe (*Bison bonasus*), le Gaur (*Bos gaurus*), l'Oryx gazelle (*Oryx gazella*), le Grand koudou (*Tragelaphus strepsiceros*), l'Elan (*Alces americanus*), le Cobe de Mrs Gray (*Kobus megaceros*), le Cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*), le Renne (*Rangifer tarandus*), l'Antilope rouanne (*Hippotragus equinus*), l'Oryx algazelle (*Oryx dammah*), le Sitatunga (*Tragelaphus spekii*), et le Yak (*Bos mutus*)) (EFSA, 2014). La nécessité de connaître la pathogénie et les périodes de susceptibilité de chacune de ces espèces est pourtant indispensable. Déterminer quelles sont les espèces sensibles, la présence éventuelle de signes cliniques et corrélérer les périodes de susceptibilité avec la période d'activité des *Culicoides* pourrait être d'une grande utilité. Ces institutions, qui regroupent un nombre important d'espèces menacées, pourraient ainsi déterminer ou non la nécessité de mise en œuvre de mesures préventives nécessaires au maintien et à la survie de certaines populations où chaque naissance est indispensable.

DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE

I. OBJECTIFS.

Jusqu'alors, le SBV avait été peu étudié chez les bovidés de parcs zoologiques. En avril 2013, des tests sérologiques réalisés sur une femelle yack de la Ménagerie du Jardin des Plantes du Muséum National d'Histoires Nationales de Paris (MNHN) ont montré la présence d'anticorps anti-SBV chez cet individu. Cet animal, originaire du parc de BB ne présentait aucun antécédent pathologique jusqu'à ce jour.

Au vue de la situation épidémiologique de l'époque concernant le SBV, de la séropositivité de l'animal, et de son lieu d'origine, géographiquement très proche de l'épicentre de la maladie, il a été décidé d'établir une recherche chez les bovidés de ces deux parcs afin de déterminer la sensibilité de l'ensemble de cette population au SBV.

Notre objectif a été de déterminer et de comparer la séropositivité des individus au SBV dans deux contextes épidémiologiques différents (ville/campagne) et de comparer les résultats obtenus avec les antécédents médicaux des animaux. Nous avons également déterminé si ces individus pouvaient présenter une virémie. Enfin, nous avons cherché à comprendre le rôle des populations sauvages dans la transmission du SBV et les mesures préventives à instaurer pour ces espèces en captivité.

II. MATERIELS ET METHODES.

A. *Réalisation des prélèvements.*

Les analyses ont été effectuées à partir de 42 sérums recueillis à partir de 40 animaux différents entre 2011 et 2014 dans le parc zoologique de BB et de 16 sérums recueillis à partir de 14 animaux du MNHN entre 2013 et 2015. Un Grand Bharal (*Pseudois nayaur*) au MNHN et un Hippotrague Noir (*Hippotragus niger*) ont en effet été prélevés respectivement à trois reprises entre 2011 et 2015.

Les prélèvements sanguins ont été collectés dans des tubes secs par les vétérinaires des deux parcs. Ces échantillons n'ont pas été réalisés spécifiquement dans le but de recueillir des

informations pour cette étude : c'est la nécessité d'une capture ou d'une anesthésie à des fins médicales ou prophylactiques qui dans la plupart des cas permet de recueillir des données hématologiques, sérologiques et biochimiques. La plupart du temps, les vétérinaires profitent de ces examens afin de rassembler un maximum de matériel biologique qui pourra par la suite être utilisé à d'autres fins. C'est par conséquent la raison pour laquelle nous ne disposons pas des prélèvements exhaustifs de tous les bovidés présents sur les deux parcs.

Respectivement 16 prélèvements sur 124 bovidés (9/12 espèces) et 42 prélèvements sur 238 bovidés (16/23 espèces) ont été obtenus du MNHN et du parc de BB.

Afin de recueillir le sérum, le sang a par la suite été centrifugé pendant 10 minutes à 2000 G. L'ensemble des sérums a été stocké dans des cryotubes et congelés rapidement à -20°C dans les deux sérothèques respectives de chaque parc jusqu'à la réalisation des analyses.

Dans les parcs zoologiques, les sérothèques sont très souvent utilisées car elles sont très utiles afin de conserver des données biologiques des animaux étudiés pendant plusieurs années. Ces informations peuvent alors être réutilisées par la suite lorsqu'une étude rétrospective est développée par exemple.

B. Acheminement des prélèvements pour analyses.

Les prélèvements ont été acheminés des deux parcs zoologiques respectifs jusqu'au laboratoire de Santé Animale de Maison-Alfort (ANSES) le plus rapidement possible en utilisant des glacières permettant de maintenir les échantillons le plus longtemps possible à -20°C.

C. Informations sur les individus.

L'ensemble des données concernant les individus étudiés a été collecté grâce à l'application en ligne ZIMS (Zoological Information Management System) pour le MNHN et grâce à un document Excel pour le BB. L'espèce, l'identifiant, le sexe, l'âge, l'origine, les liens de parenté ainsi que les antécédents pathologiques ont été enregistrés pour chaque

individu.

L'application ZIMS représente une base de données fondée sur un système unifié qui référence mondialement les connaissances sur la santé et le bien-être des animaux. ZIMS fournit une ressource uniforme d'informations cohérentes et complètes à plus de 20.000 professionnels de parcs zoologiques chaque jour.

Ces professionnels utilisent cette application afin d'enregistrer les données concernant l'ensemble des animaux du parc (état de santé, anamnèse et commémoratifs). Ces informations comprennent également des données sur la gestion de la collection. Une fois les informations saisies, tous les membres utilisateurs ont la possibilité de les rechercher sur la base de données et de récupérer des informations dont ils ont besoin.

Ce logiciel est payant et n'est donc pas utilisé par l'ensemble des institutions.

D. Les analyses.

Tout d'abord, les recherches d'anticorps sériques spécifiques du SBV ont été réalisées grâce au kit ELISA ID Screen® SBV Competition, ID Vet, France et au test de séroneutralisation virale.

Par la suite, nous avons effectué une RT-qPCR sur l'ensemble des échantillons en ciblant spécifiquement le segment S du virus. Pour les éventuels échantillons positifs avec ce test, une RT-PCR a été réalisée ciblant les segments S, L et M.

Des analyses génétiques à partir de BLAST ont également été conduites afin d'étudier la phylogénie des séquences identifiées de SBV (KM047418 et KP731872, respectivement).

Enfin, l'inoculation sous-cutanée de sérum positif au SBV à des souris IFNAR - / - matures, connues pour être sensibles à l'infection par SBV, a été réalisée afin d'isoler le virus.

L'ensemble des manipulations a eu lieu au sein du Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maison-Alfort.

1. Protocole: ELISA ID Screen® SBV Competition, ID Vet, France.

L'ensemble des réactifs a été ramené à température ambiante ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) avant emploi et homogénéisé par retournement ou à l'aide d'un vortex.

Le protocole suivant a ensuite été appliqué sur l'ensemble des échantillons :

1. Distribuer :50 µl de Contrôle Positif (fourni dans le kit) dans les cupules A1 et B1.
 - 50 µl de Contrôle Négatif (fourni dans le kit) dans les cupules C1 et D1.
 - 50 µl de chaque échantillon dans les cupules restantes.
2. Incuber 45 min ± 4 min à 37°C (± 2°C).
3. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec 300 µl de solution de lavage.
Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
4. Distribuer 100 µl de conjugué prêt à l'emploi (fourni dans le kit) dans chaque cupule.
5. Incuber 30 min ± 3 min à 21°C (± 5°C).
6. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec 300 µl de solution de lavage.
7. Distribuer 100 µl de solution de révélation (fournie dans le kit) dans chaque cupule.
8. Incuber 15 min ± 2 min à 21°C (± 5°C) à l'obscurité.
9. Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
10. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Il faut garder à l'esprit que la qualité du lavage peut influencer les résultats. C'est pourquoi afin d'améliorer les résultats, il a été réalisé 5 lavages au lieu de 3 après incubation des échantillons et du conjugué.

Le test est validé si la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Négatifs (DOCN) est supérieure à 0.7 ($DOCN > 0.7$) et si le rapport entre la moyenne des Contrôles Positifs (DOCP) et la moyenne des Contrôles Négatifs (DOCN) est inférieur à 30% ($DOCP / DOCN < 0.3$)

Afin d'interpréter chaque échantillon, il faut calculer le pourcentage de compétition :

$$S/N \% = (DO \text{ échantillon} / DOCN) * 100$$

Les échantillons présentant un S/N%:

- inférieur ou égal à 40% sont considérés comme positifs.
- supérieur à 40% et inférieur ou égal à 50% sont considérés comme douteux.
- supérieur à 50% sont considérés comme négatifs.

2. Protocole de séroneutralisation virale.

1. La détermination du titre en anticorps neutralisants spécifiques du SBV a été réalisée en diluant les sérums de 2 en 2 (pur, au $\frac{1}{2}$, puis au $\frac{1}{4}$, jusqu'au $\frac{1}{256}$...) dans un Milieu Essentiel Minimum dans un volume final de 50 μ L. Ces dilutions ont été réalisées dans des plaques de microtitrage de 96 puits.
2. 50 μ l de MEM contenant 100 DICT50 de SBV (adapté aux cellules Vero) ont été incubés avec 50 μ l de chaque dilution de sérum pendant 1 heure.
3. 20 000 cellules Vero (en milieu ME% + 10% sérum de veau fœtal + 2% de sodium pyruvate) ont ensuite été ajoutées dans chaque par puits et les plaques de microtitrage ont été incubées pendant 5-6 jours à 37°C, 5% de CO₂ .
4. Les surnageants ont été éliminés et 100 μ l d'éthanol absolu ont été ajoutés par puit pour la fixation des cellules pendant 30 minutes.
5. L'éthanol a été éliminé et 100 μ l de bleu de méthylène (0,1% dans l'eau) ont été rajoutés pendant 30 minutes. Le bleu de méthylène colore les cellules qui ont été fixées.

Le titre en anticorps neutralisant de chaque sérum a été défini comme la dilution maximale permettant la neutralisation de 50% des puits infectés à 100 DITC50/puits, c'est-à-dire permettant une inhibition de 50% des effets cytopathiques liés au virus.

Le titre de la suspension fille de virus a été réévalué à chaque expérimentation selon la méthode de Reed and Muench.

Dilution	Nombre de puits positifs	Nombre de puits inoculés	% infectés
Non dilué	6	6	100%
10 ⁻¹	6	6	100%
10 ⁻²	2	6	33%
10 ⁻³	0	6	0%
10 ⁻⁴	0	6	0%

Tableau 6: Exemple de résultats de séroneutralisation en fonction des facteurs de dilutions.

La méthode de Reed-Muench est une méthode qui permet de déterminer statistiquement le titre en anticorps neutralisant pour lesquels on peut observer 50% de neutralisation de l'effet cytopathique, appelé plus communément le "endpoint50". Pour cela,

il est nécessaire de déterminer la distance proportionnée entre 2 dilutions:

$$I = \frac{[(\text{Pourcentage de puits infectés à la dilution correspondant au pourcentage au-dessus de 50\%}) - 50\%]}{[(\text{Pourcentage de puits infectés à la dilution correspondant au pourcentage au-dessus de 50\%}) - \text{Pourcentage de puits infectés à la dilution correspondant au pourcentage inférieur}]}$$

Endpoint 50 = $10^{(\log(\text{dilution correspondant au \% au-dessus de 50\%}) - (I \times \log h))}$ avec h = facteur de dilution sérié

Application:

$$I = (100-50)/(100-33)$$

$$I = 50/67 = 0,75$$

$$h=10$$

$$\text{Endpoint 50} = 10^{(-1 - (0,75 \times 1))}$$

$$\text{Endpoint 50} = 10^{(-1,75)}$$

Pour la lecture, il a été convenu qu'un titre inférieur ou égal à 2 était considéré négatif.

3. Protocole de RT-qPCR.

Deux RT-qPCR ont été développées pour la détection de l'ARN du virus. L'une est fondée sur la détection du fragment L du génome alors que l'autre permet la détection du fragment S (Bilk et al., 2012 ; Hoffmann et al., 2012). Cette dernière a fait preuve d'une meilleure sensibilité que la première (Van der Poel, 2012).

a) Extraction.

L'extraction des ARN totaux des échantillons a été réalisée au moyen de réactifs commercialisés par la société Lifetechnologie (kit MagVet™ Universal Isolation) et de l'automate Kingfisher™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis d'Amérique). Le protocole est expliqué dans l'annexe 4. Cet automate permet l'automatisation de l'extraction des acides nucléiques par la technologie des billes magnétiques. Après lyse de la matrice, les acides nucléiques totaux (cellulaires et viraux) se fixent aux billes puis des barreaux magnétiques captent celles-ci et les transfèrent dans les différentes plaques (Deepwell) contenant les divers réactifs (tampons de lavage, d'élution, etc.). Les acides nucléiques élués constituent la matrice pour la RT-PCR.

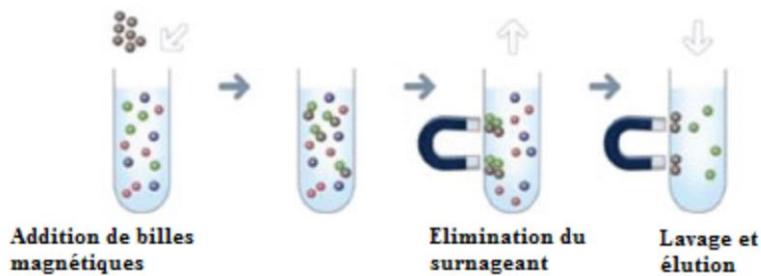


Figure 16 : Principe d'extraction d'ARN par l'utilisation de billes magnétiques (d'après Albertoni et al., 2011)

b) Amplification.

Le diagnostic virologique repose sur la détection du génome du SBV par RT-PCR en temps réel. Pour l'amplification, la méthode employée est de type duplex (co-amplification d'un gène du SBV et d'un gène endogène (β -actine) qui est utilisé comme contrôle positif interne hétérologue universel (Hoffmann et al., 2006)). Le kit « AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents » (Ambion-Applied Biosystems, CA, USA) a été utilisé en utilisant un volume total de 25 μ l.

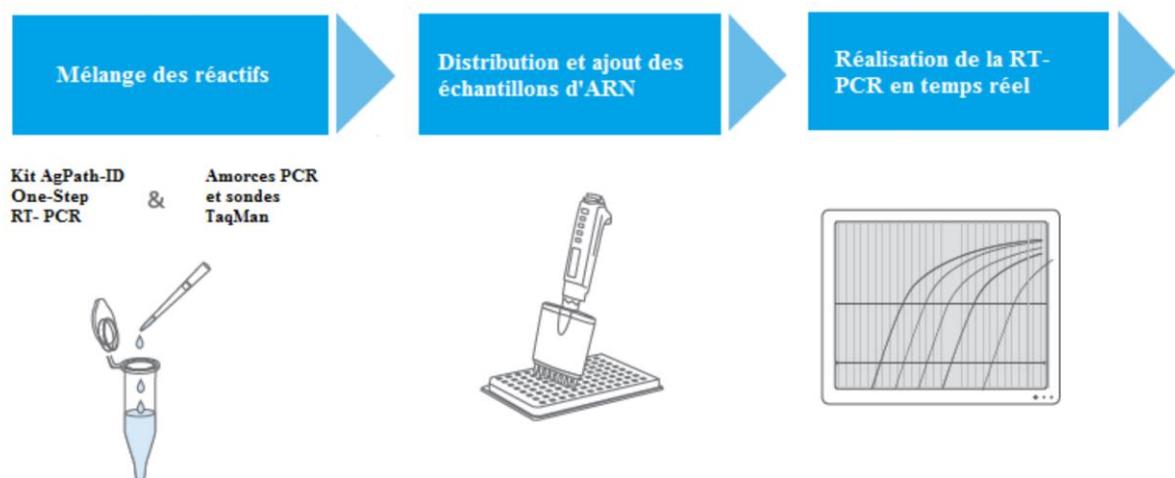


Figure 17: Aperçu général du protocole AgPath-OneStep RT-PCR.

Les amorces et sondes utilisées sont listées dans le tableau ci-après.

Nom	Séquence 5' – 3'	Position du gène
SBV-S-382F	TCA GAT TGT CAT GCC CCT TGC	382-402
SBV-S-469R	TTC GGC CCC AGG TGC AAA TC	450-469
SBV-S-408FAM	FAM-TTA AGG GAT GCA CCT GGG CCG ATG GT-BHQ1	408-433
EGFP1-F	GAC CAC TAC CAG CAG AAC AC	637-656
EGFP2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G	768-750
EGFP1-HEX	HEX-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ1	703-724

Tableau 7: Amorces et sondes fournies par le FLI

Le mélange d'amorces et de sondes a consisté à additionner 2,5 µl d'ARNase, 12,5 µl de tampons de RT-PCR, 1,0 µl d'enzyme pour RT-PCR, 2 µl d'un mélange d'amorces et de sondes (10 mM d'amorces spécifiques de SBV + 1,875 mM de sondes spécifiques de SBV) et 2 µl d'un mélange d'amorce-sonde spécifique du Contrôle Interne (2,5 mM d'amorce spécifique EGFP + 1,875 mM de sondes EGFP1-HEX). 5 µl de matrice d'ARN ont ensuite été ajoutés au mélange du kit.

Pour l'amplification, le profil de température suivant a été utilisé: 10 min à 45°C (transcription inverse), 10 min à 95°C (inactivation de la transcriptase inverse /activation de la Taq polymerase), suivi par 42 cycles de 15 s à 95°C (dénaturation), 20 s à 55°C et 30 s à 72°C (élongation).

Afin de vérifier le bon fonctionnement de la RT-qPCR, un contrôle négatif d'extraction et des contrôles à la fois négatifs et positifs de transcription inverse et d'amplification ont été inclus.

La lecture de la fluorescence s'effectue à chaque cycle, à la fin de l'étape d'élongation. Le cycle seuil « CT » (Cycle Threshold) est défini comme le numéro du cycle pour lequel l'intensité de fluorescence coupe la ligne de base ou « threshold ». Cette ligne de base est fixée manuellement ou automatiquement (par le logiciel de l'appareil).

Les valeurs de Cq égales ou supérieures à 40 correspondent à un résultat négatif.

c) Analyse selon le logiciel BLAST.

BLAST est l'acronyme de "basic local alignment search tool". C'est une méthode de recherche heuristique utilisée en bio-informatique qui permet de déterminer des régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Ce programme permet donc de retrouver rapidement dans les bases de données (GenBank) des séquences ayant des similitudes avec la séquence introduite par l'utilisateur.

BLAST effectue une recherche dans une base de données de séquence des segments qui sont localement homologues à la séquence-test introduite (query sequence) en utilisant une matrice de similarité. Des scores d'alignements entre la séquence fournie et les séquences de la base de données permettent d'évaluer statistiquement la pertinence de leur alignement et par conséquent leurs similitudes.

L'utilisateur rentre dans le site internet les séquences d'études. Ces séquences sont décomposées en segments de longueur k (k -uplets) chevauchants. Pour chacun d'entre eux, sont recherchés tous les k -uplets possibles ayant un score d'homologie supérieur à un seuil donné. BLAST constitue ainsi un dictionnaire de tous les k -uplets donnant une homologie locale minimum. Chaque fois que BLAST identifie une coïncidence dans la banque, il tente d'étendre l'homologie en amont et en aval du k -uplet initialement trouvé. Une fois l'extension de l'homologie réalisé, il évalue à partir du score obtenu la probabilité que celle-ci soit due au hasard (ou plus exactement, son espérance mathématique). Typiquement, BLAST va indiquer pour chaque alignement, la valeur de cette espérance appelée E-value. Pour des alignements biologiquement pertinents, la E-value prend des valeurs infinitésimales (de 10^{-10} à 10^{-200}), ce qui signifie qu'il est hautement improbable que le score d'alignement obtenu soit le fait du hasard (Altschul et al., 1990).

4. Protocole souris IFNAR^{-/-}.

Chez la souris, la transgénèse est un des outils permettant par manipulation génétique et grâce à la connaissance du génome murin, d'inhiber l'expression de certains gènes. On parle alors de gène KO (Knock-Out). Ainsi, selon le gène touché, il est possible de créer des lignées de souris dont certaines fonctions métaboliques ou immunitaires sont modifiées.

C'est le cas de la lignée IFNAR KO. Dans cette lignée murine, de lignée génétique C57BL/6, l'expression du récepteur à l'interféron de type I (IFNAR) est annihilée (van der Broek et al., 1995). Ce récepteur, lorsqu'il est activé par de l'interféron de type I, permet l'activation des gènes ISG (Interferon Stimulated Genes) à l'origine de l'expression de protéines cellulaires antivirales.

Ces protéines vont préparer la cellule et l'aider à lutter contre l'infection, déjà présente dans la cellule ou imminente. Le récepteur IFNAR joue donc un rôle prépondérant dans

l'immunité antivirale innée et son absence diminue très fortement le pouvoir de cette réponse. Ce type de modèle a déjà largement été utilisé pour étudier le rôle de la réponse interféron dans les maladies d'origine virale (van der Broek et al., 1995).

Dans le cadre de cette étude, grâce à l'utilisation de ces souris dont l'immunité innée est déficiente, nous nous sommes attachés à étudier le pouvoir pathogène du virus, en recherchant la présence et la viabilité du virus dans ces souris.

Trois de ces souris (N°855, 857, 859) ont été inoculées par injection sous-cutanée en région nucale avec de l'isolat viral provenant du sérum 44 du gnou bleu ayant montré une virémie par RT-qPCR.

Chacune des souris a été examinée quotidiennement pendant la durée de l'expérience. Après inoculation, un échantillon de sang sur tube EDTA a été réalisé et testé pour le SBV quatre jours post-inoculation par qRT-PCR, puis une séroconversion a été recherchée deux à trois semaines après par la réalisation du test ELISA. L'état clinique et le poids des souris ont également été surveillés quotidiennement (Wernike et al., 2012 ; Ponsart et al., 2014).

L'ensemble des animaux utilisés au cours de cette expérience a été manipulé dans le parfait respect des règles de bonne pratique de laboratoire telles que définies par la charte nationale d'éthique animale. Toutes les expériences de ce projet ont été soumises à l'accord du comité régional d'éthique.

III. RESULTATS.

A. *Séropositivité entre les deux parcs.*

Les données globales de séroprévalence sont indiquées au Tableau 8 et Figures 18 et 19.

	Nombre d'échantillons séropositifs	Nombre total d'échantillons
Beekse-Bergen	22	42
MNHN	13	16
TOTAL	35	59

Tableau 8 : Comparaison de la séropositivité entre les bovidés des parcs zoologiques de Beekse-Bergen (BB) et de la Ménagerie du Jardin des Plantes (MNHN).

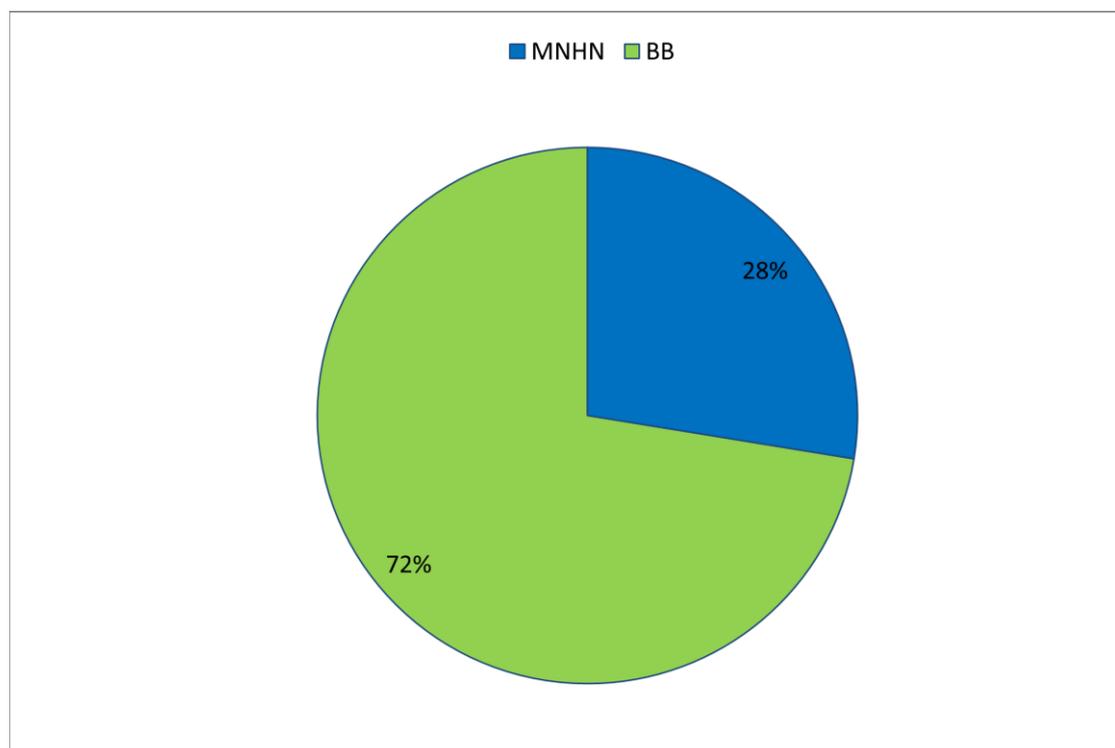


Figure 18: Comparaison du nombre de prélèvements (exprimé en pourcentage du nombre total de prélèvements) entre le parc de BB et le MNHN entre 2011 et 2015.

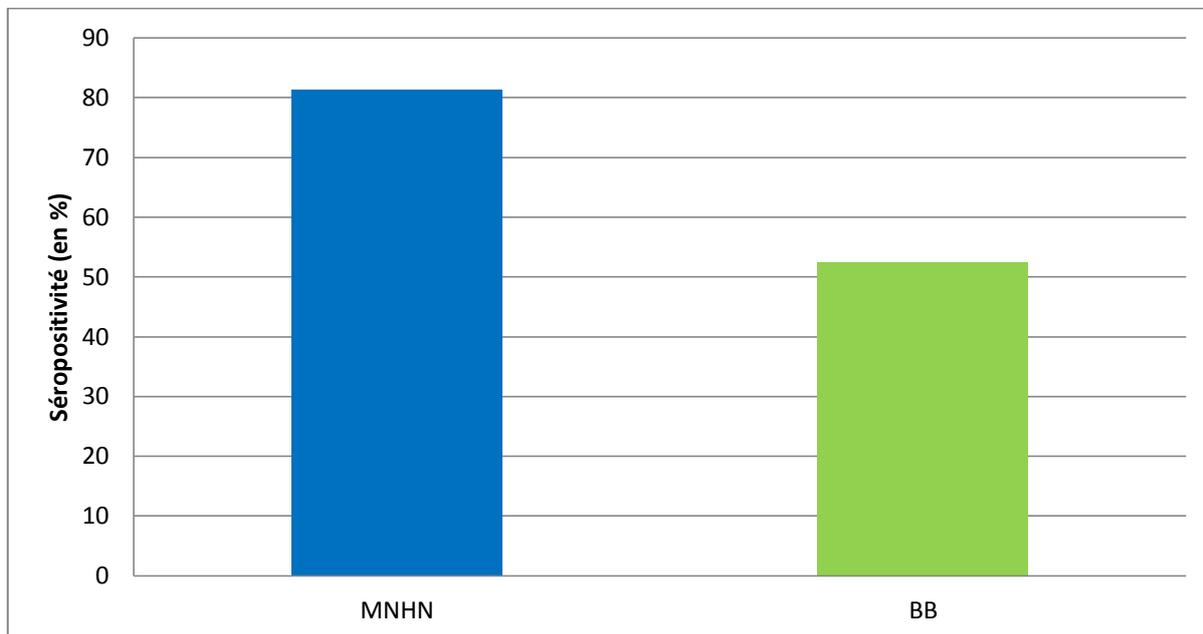


Figure 19: Comparaison de séropositivité entre les bovidés des parcs zoologiques de BB et MNHN entre 2011 et 2015.

Ces diagrammes permettent de montrer une séropositivité de 52,4 % pour le parc de BB et de 81,3% pour le parc de la MJP. Cependant, il est important de souligner que ces résultats sont à analyser avec précaution étant donné qu'il y a eu seulement 42 prélèvements pour le parc de BB et 16 prélèvements pour la MJP.

Afin de déterminer si les deux séroprévalences sont statistiquement différentes, nous avons donc réalisé un test de Fischer. La p-value (= 0.3629), largement supérieure à 0,05 a permis de montrer que les deux séropositivités observées n'étaient pas statistiquement différentes entre les deux parcs.

B. Résultats sérologiques par individu

MNHN							
Espèces	Nom scientifique	Date prélèvement	Ct RT_qPCR	%_ELISA	Resultat_ELISA	SN_titre	SN_resultat
Urial	<i>Ovis aries arkal</i>	23/07/2014	40	11	+	64	POS
Grand Bharal	<i>Pseudois nayaur</i>	10/10/2013	40	17	+	16	POS
Grand Bharal	<i>Pseudois nayaur</i>	04/09/2014	40	20	+	16	POS
Grand Bharal	<i>Pseudois nayaur</i>	08/02/2014	40	22	+	32	POS
Grand Bharal	<i>Pseudois nayaur</i>	11/10/2013	40	54	-	0	NEG
Grand Bharal	<i>Pseudois nayaur</i>	24/07/2014	40	9	+	256	POS
Chèvre naine	<i>Capra aegagrus hircus</i>	04/09/2014	40	52	-	0	NEG
Gaur	<i>Bos gaurus</i>	13/01/2015	40	4	+	128	POS
Markhor	<i>Capra falconeri</i>	18/12/2014	40	85	-	16	POS
Markhor	<i>Capra falconeri</i>	18/12/2014	40	83	-	2	NEG
Markhor	<i>Capra falconeri</i>	18/12/2014	40	8	+	128	POS
Chèvre des Montagnes Rocheuses	<i>Oreamnus americanus</i>	27/08/2014	40	8	+	64	POS
Chèvre du Caucase	<i>Capra caucasica caucasica</i>	28/07/2014	40	8	+	32	POS
Chèvre du Caucase	<i>Capra caucasica caucasica</i>	06/02/2014	40	12	+	16	POS
Vigogne	<i>Vicugna vicugna</i>	30/09/2013	ND	15	+	64	POS
Yack	<i>Bos grunniens grunniens</i>	11/09/2013	ND	7	+	256	POS
BB							
Cerf axis	<i>Cervus axis</i>	ND	40	75	-	2	NEG
Cerf axis	<i>Cervus axis</i>	10/11/2014	ND	11	+	32	POS
Eland du Cap	<i>Taurotragus oryx</i>	16/04/2014	40	88	-	0	NEG
Oryx gazelle	<i>Oryx gazella gazella</i>	19/10/2011	40	15	+	256	POS
Gnou bleu	<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>	05/09/2011	ND	28	+	256	POS
Gnou bleu	<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>	05/09/2011	40	39	+	64	POS
Gnou bleu	<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>	05/09/2011	40	96	-	2	NEG
Gnou bleu	<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>	05/09/2011	30	93	-	2	NEG
Gnou bleu	<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>	05/09/2011	ND	83	-	64	POS
Antilope cervicapre	<i>Antilope cervicapra</i>	13/11/2014	40	59	-	0	NEG
Antilope cervicapre	<i>Antilope cervicapra</i>	13/11/2014	40	80	-	0	NEG
Antilope cervicapre	<i>Antilope cervicapra</i>	26/11/2014	ND	80	-	0	NEG
Antilope cervicapre	<i>Antilope cervicapra</i>	26/11/2014	ND	61	-	0	NEG
Antilope cervicapre	<i>Antilope cervicapra</i>	26/11/2014	40	76	-	0	NEG
Antilope cervicapre	<i>Antilope cervicapra</i>	13/11/2014	40	73	-	0	NEG
Antilope cervicapre	<i>Antilope cervicapra</i>	27/03/2013	40	14	+	128	POS
Daim de Perse	<i>Dama mesopotamica</i>	20/10/2013	40	6	+	128	POS
Nyala	<i>Tragelaphus angasii</i>	29/10/2012	40	32	+	64	POS
Nyala	<i>Tragelaphus angasii</i>	10/04/2012	40	91	-	0	NEG
Cerf du Père David	<i>Elaphurus davidianus</i>	14/10/2011	40	13	+	256	POS
Céphalopoppe du Natal	<i>Cephalophus natalensis</i>	03/09/2012	ND	93	-	0	NEG
Céphalopoppe du Natal	<i>Cephalophus natalensis</i>	14/11/2011	40	101	-	2	NEG
Hippotrague noir	<i>Hippotragus niger niger</i>	26/07/2013	40	12	+	128	POS
Hippotrague noir	<i>Hippotragus niger niger</i>	19/10/2011	40	16	+	128	POS

Hippotrague noir	<i>Hippotragus niger niger</i>	19/10/2011	40	13	+	256	POS
Hippotrague noir	<i>Hippotragus niger niger</i>	01/03/2013	40	9	+	128	POS
Hippotrague noir	<i>Hippotragus niger niger</i>	03/09/2012	40	6	+	128	POS
Springbock	<i>Antidorcas Marsupialis</i>	03/04/2014	40	15	+	32	POS
Springbock	<i>Antidorcas Marsupialis</i>	28/02/2014	40	86	-	4	NEG
Springbock	<i>Antidorcas Marsupialis</i>	18/02/2014	40	32	+	64	POS
Springbock	<i>Antidorcas Marsupialis</i>	24/03/2011	ND	96	-	0	NEG
Springbock	<i>Antidorcas Marsupialis</i>	27/03/2014	40	7	+	128	POS
Cerf sika	<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	03/10/2014	40	31	+	128	POS
Cobe à croissant	<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>	18/11/2011	40	55	-	128	POS
Cobe à croissant	<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>	27/03/2014	40	86	-	0	NEG
Cobe à croissant	<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>	27/03/2014	40	95	-	0	NEG
Cobe à croissant	<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>	27/03/2014	40	59	-	0	NEG
Watussi	<i>Bos taurus taurus watussi</i>	05/09/2011	40	88	-	0	NEG
Yack	<i>Bos grunniens grunniens</i>	03/08/2012	40	5	+	256	POS
Yack	<i>Bos grunniens grunniens</i>	06/03/2014	40	69	-	8	POS
Yack	<i>Bos grunniens grunniens</i>	06/03/2014	40	83	-	0	NEG
Yack	<i>Bos grunniens grunniens</i>	06/03/2014	40	88	-	8	POS

Tableau 9: Liste des bovidés séropositifs et viropositifs (Ct <40) au SBV déterminée par ELISA et test de séroneutralisation virale dans les parcs zoologiques de BB et MNHN entre 2011 et 2015.

D'après ces résultats, nous pouvons constater qu'un grand nombre d'espèces a été infecté par le SBV à savoir 9 au MNHN et 16 dans le parc de BB. D'autres espèces de bovidés sont également présentes dans les deux parcs mais nous ne pouvons tirer aucune conclusion concernant ces individus car aucune analyse sérologique n'a été effectuée sur ces animaux pendant la période d'étude.

Nous pouvons également souligner que sur l'ensemble des résultats, 5 échantillons ont été retrouvés positifs par séroneutralisation alors que les tests ELISA avaient montré des résultats négatifs. Ces différences peuvent être expliquées par une meilleure sensibilité de la séroneutralisation. C'est donc pourquoi il est indispensable dans notre cas de se baser sur les résultats obtenus par séroneutralisation (méthode de choix pour le diagnostic du SBV).

C. *Suivi de séropositivité sur plusieurs années*

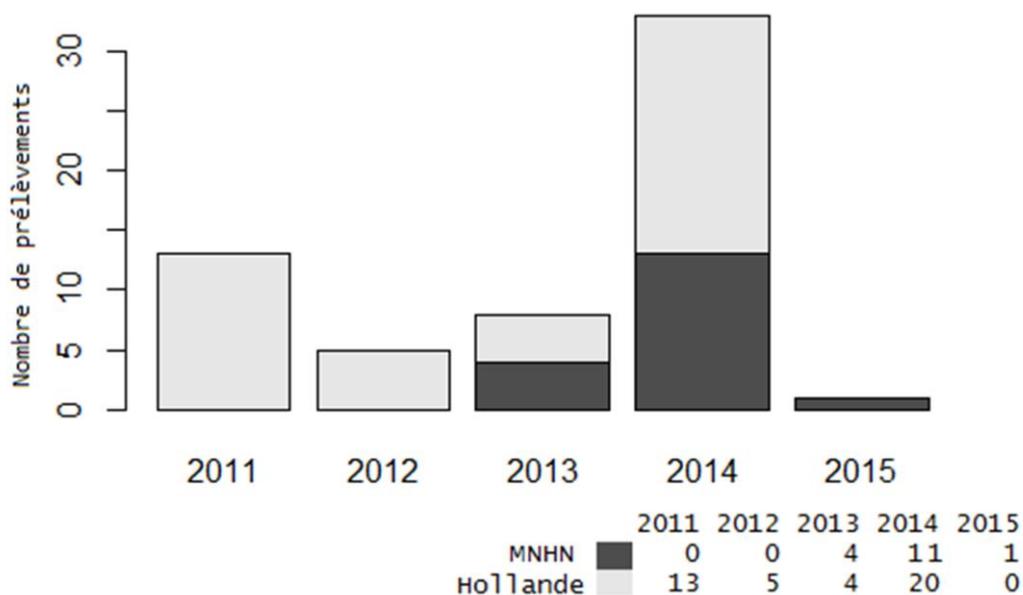


Figure 20: Comparaison du nombre de prélèvements réalisés entre le MNHN et le parc de BB entre 2011 et 2015.

Cet histogramme représente les différences d'échantillonnage entre le parc de BB et le MNHN. Il permet de souligner une hétérogénéité dans les dates et nombre de prélèvements entre les deux parcs. En effet, comme nous pouvons le constater, les prélèvements étudiés datent de 2011 à 2014 pour le parc de BB et de 2013 à 2015 pour le MNHN et rassemblent 16 échantillons pour le MNHN et 42 pour le parc de BB.

Cette différence d'échantillonnage peut être expliquée par plusieurs facteurs. Tout d'abord, les prélèvements provenant de la sérothèque du parc de BB ont été transférés fin 2014 et aucun transfert supplémentaire n'a pu être réalisé par la suite. D'autre part, le MNHN ne présente aucun prélèvement avant 2013 car ces prélèvements ont été utilisés pour la réalisation d'autres études.

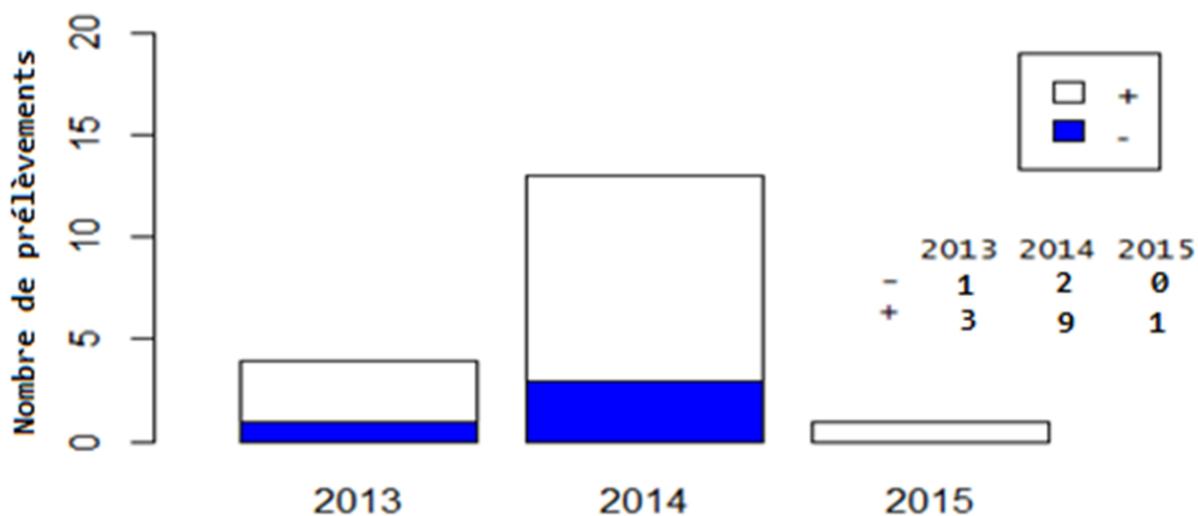


Figure 21: Evolution de la séropositivité chez les bovidés du MNHN entre 2011 et 2015.

En raison du faible nombre d'échantillons prélevés par année, nous avons choisi d'exprimer les résultats sous forme de proportion et non de pourcentage.

Au MNHN, sur un total de 16 prélèvements, $\frac{3}{4}$ sont revenus positifs par séroneutralisation en 2013, 9/11 en 2014 et 1/1 en 2015. Ces résultats montrent donc qu'une forte proportion des individus ont été infectés par le virus et ceci sur les trois années étudiées.

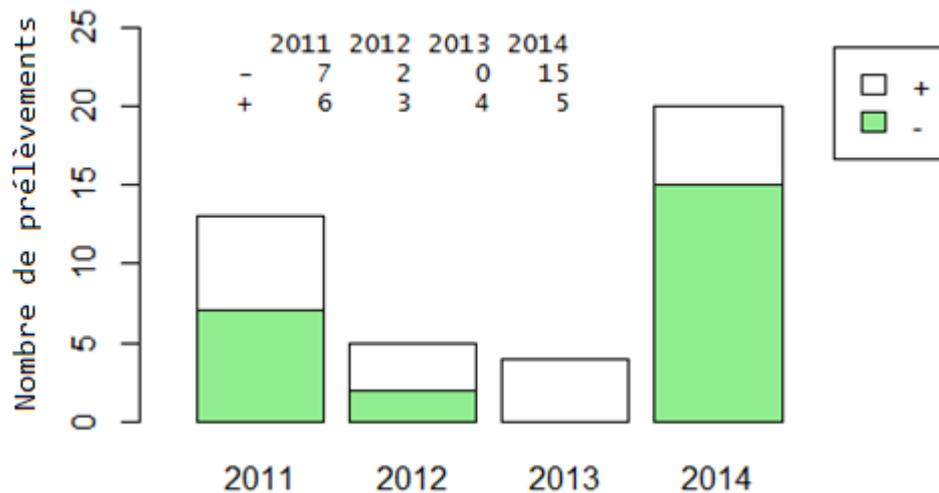


Figure 22: Evolution de la séropositivité chez les bovidés du parc zoologique de BB entre 2011 et 2014.

Dans le parc de BB, la proportion d'individus ayant montré des résultats positifs par séroneutralisation est également non négligeable de 2011 à 2014 avec 6/13 individus positifs en 2011, 3/5 en 2012, 4/4 en 2013 et 5/15 en 2014.

En comparant la séropositivité des individus par année, nous aurions pu notamment être interpellés par une diminution en 2014 dans le parc de BB (5 individus positifs sur 15 soit environ 33%). Cette diminution aurait notamment pu être corrélée à une diminution de l'infection du SBV en Europe. Cependant, en comparant ce résultat avec ceux du MNHN, nous pouvons constater une séropositivité beaucoup plus élevée la même année au MNHN (10/13 soit 77%). Cette hypothèse ne peut donc pas être confirmée. Il serait également envisageable de penser que l'infection au SBV aurait pu diminuer aux Pays-Bas tout en restant stable en France. Mais, le faible nombre d'individus prélevés ne permet pas de valider statistiquement ces hypothèses. Il reste donc très difficile pour l'ensemble des années étudiées de conclure et de comparer les séroprévalences entre les deux parcs, d'une part car les périodes étudiées ne sont pas similaires et d'autre part car le faible nombre de prélèvements ne permet pas, comme il l'a été montré précédemment, de tirer des conclusions statistiquement viables.

D. *Suivi de la séropositivité en fonction de l'âge.*

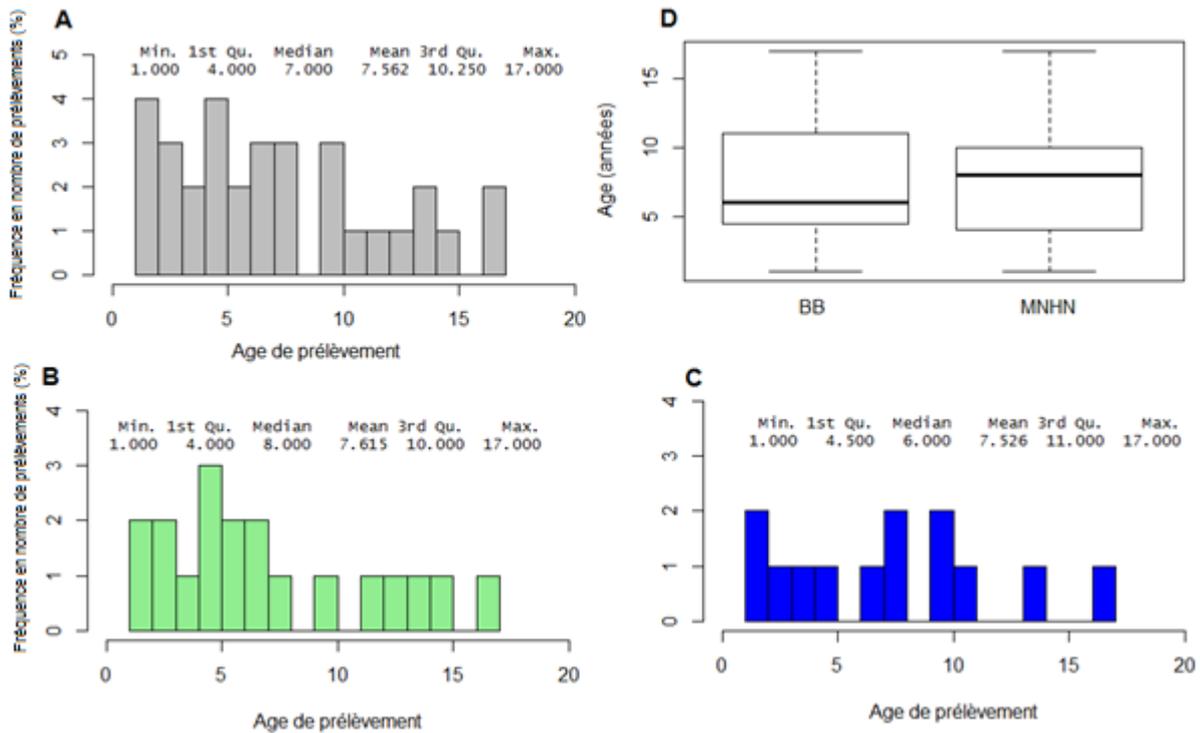


Figure 23: Représentation de la séropositivité en fonction de l'âge au moment des prélèvements (A: Dans les 2 parcs; B:Beekse-Bergen; C:MNHN; D: Comparaison entre les deux parcs).

Le suivi de la séropositivité en fonction des âges permet de montrer que les juvéniles aussi bien que les individus âgés présentaient une réponse en anticorps neutralisants. La comparaison entre les deux parcs permet de souligner un âge médian de 6 ans pour le MNHN et de 8 ans pour BB. Par ailleurs, en considérant les boîtes à moustache et les écarts-types, on peut dire qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux parcs dans la répartition de l'âge des individus affectés. Ceci peut être dû au faible nombre d'individus prélevés ou bien tout simplement au fait qu'il n'y ait pas de réelle différence d'âge.

E. *Suivi de la séropositivité en fonction du titre en anticorps*

Les titres en anticorps neutralisants varient selon les individus entre 16 et 256 EID50/mL de sérum. Les titres des animaux prélevés au MNHN semblent globalement légèrement inférieurs à ceux observés à BB, mais les différences ne sont pas significatives (comparaison des moyennes).

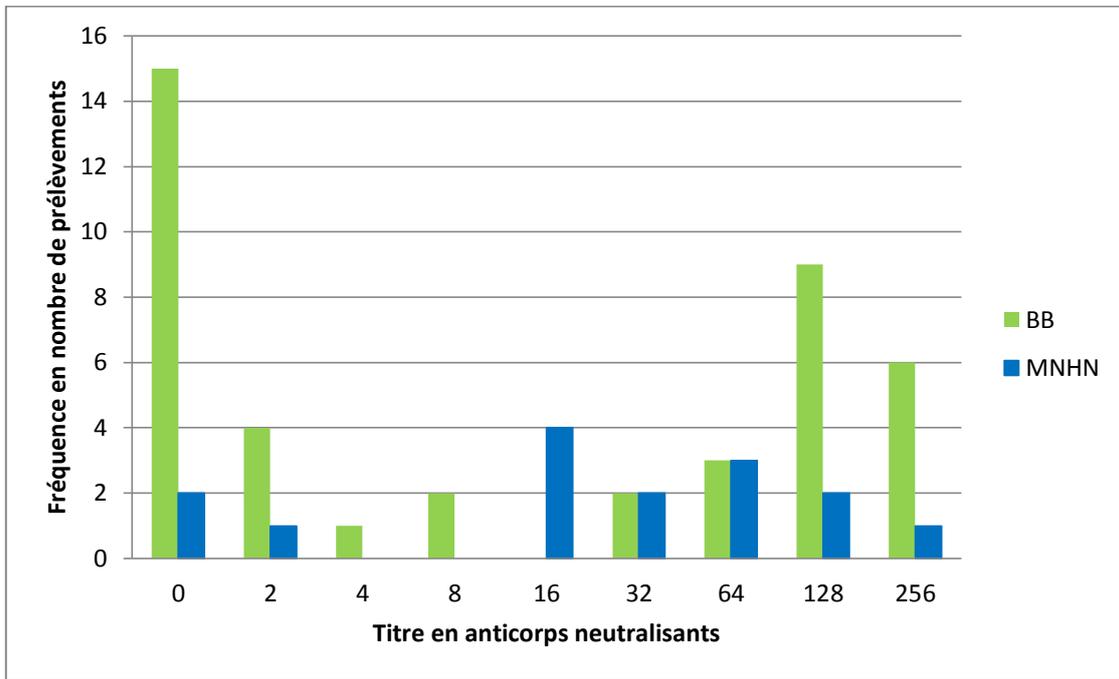


Figure 24: Histogramme représentant la séropositivité en fonction du titre en anticorps. Comparaison entre les deux parcs.

F. *Suivi cinétique des anticorps.*

Cette étude nous a également permis de réaliser un suivi cinétique des anticorps anti-SBV chez deux individus. En effet, un Grand Bharal du MNHN ainsi qu'un Hippotrague noir du parc de BB ont été prélevés trois fois respectivement en octobre 2013, en février 2014 et en septembre 2014 pour le Grand Bharal et en octobre 2011, septembre 2012 et mars 2013 pour l'Hippotrague noir.

1. Bharal MA6125 (MJP)

	Oct 2013	Févr 2014	Sept 2014
ELISA (S/N %)	17	22	20
SN	16	32	16

Tableau 10 : Evolution de la séropositivité d'octobre 2013 à septembre 2014 chez un Grand Bharal de la Ménagerie du Jardin des Plantes.

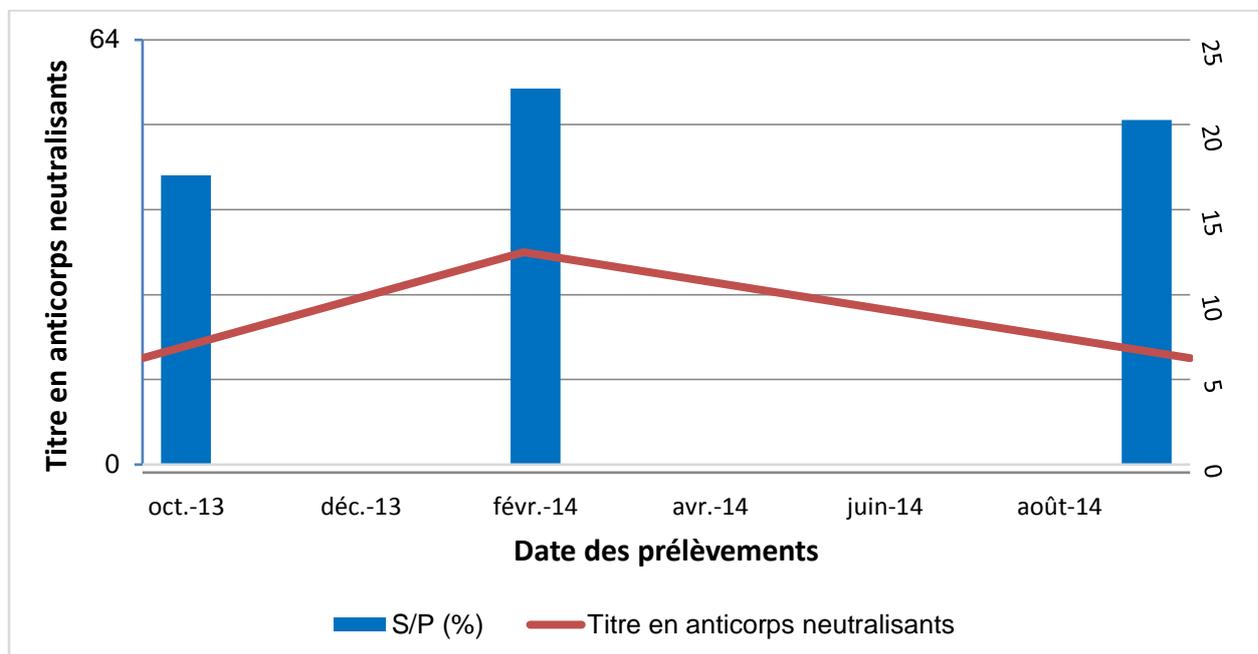


Figure 25: Evolution de la séropositivité d'Octobre 2013 à Septembre 2014 chez un Grand Bharal du MNHN.

2. Hippotrague noir (Beekse-Bergen)

	Oct 2011	Sept 2012	Mars 2013
ELISA (S/N %)	13	6	9
SN	256	128	128

Tableau 11: Evolution de la séropositivité d'Octobre 2011 à Mars 2013 chez un Hippotrague noir du Parc de Beekse-Bergen.

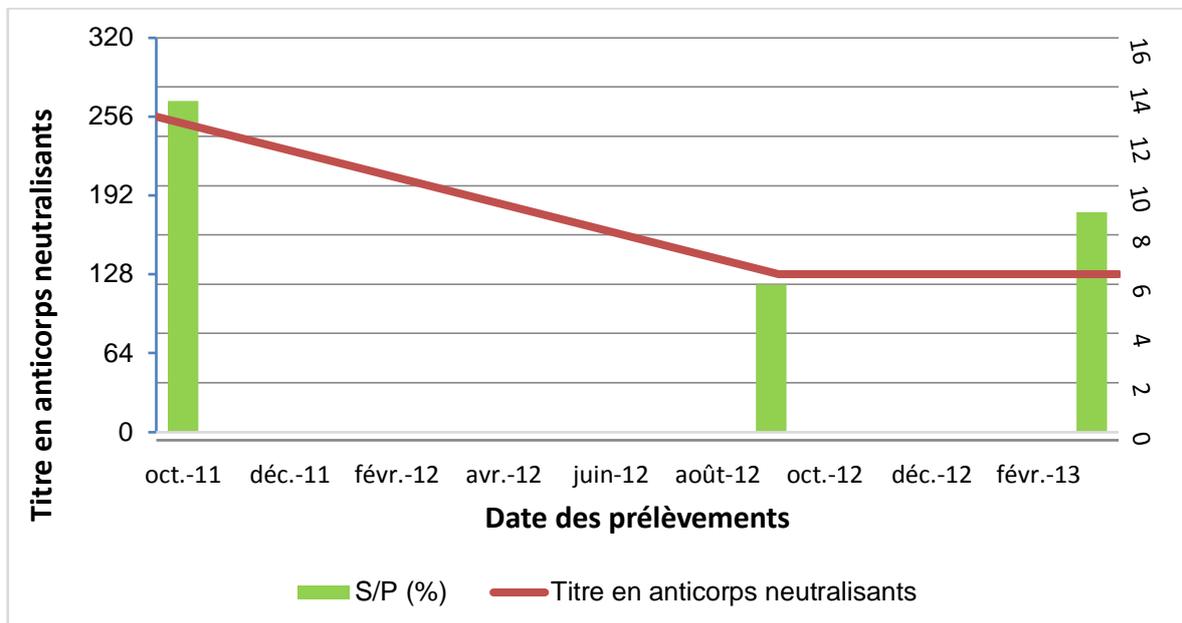


Figure 26: Evolution de la séropositivité d'Octobre 2011 à Mars 2013 chez un Hippotrague noir du Parc de BB.

Les deux suivis cinétiques ont permis de constater le maintien des anticorps anti-SBV chez les deux individus et pour les deux périodes étudiées. Dans les deux cas, les résultats sont similaires aussi bien en ELISA qu'en séroneutralisation. Ces résultats suggèrent que les anticorps peuvent persister sur plusieurs années chez ces individus ou bien que ces derniers ont été réinfectés entre les différents prélèvements.

G. RT-qPCR en temps réel et analyses BLAST.

Sur l'ensemble des RT-qPCR réalisées, seul un gnou séronégatif (*Connochaetes taurinus taurinus*) du parc de BB prélevé en Septembre 2011 a été retrouvé positif avec un Cq égal à 30.

Par conséquent, une PCR en temps réel a été réalisé sur cet échantillon ciblant cette fois-ci les segments S, L et M afin de séquencer le génome viral et de le comparer avec les autres génomes viraux déjà séquencés. Cette analyse a permis d'isoler une séquence partielle de 2866 pb du segment M (déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion KR828816) et une séquence partielle du segment L de 1374 pb (déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion KR828815).

Grâce au logiciel BLAST, les analyses génétiques ont révélé que les séquences partielles L et M avaient respectivement 100% d'identité nucléotidique et 99,79% de

similarité, avec deux séquences de SBV isolés chez des vaches (KM047418 et KP731872 respectivement).

H. Examen des dossiers cliniques des animaux étudiés.

Afin de déterminer si une corrélation pouvait être réalisée entre les individus présentant une sérologie ou virémie positive pour le SBV et l'apparition de signes cliniques, les dossiers cliniques des animaux étudiés ont été examinés pour l'ensemble des bovidés des deux parcs.

L'analyse des dossiers médicaux des animaux du parc de BB n'a pu souligner aucun signe clinique de type arthrogrypose/hydranencéphalie ni même d'avortement pendant la période étudiée.

Au MNHN, des avortements ont été signalés chez deux grands bharals (*Pseudois nayaur*) en 2011 et 2012 et chez une Chèvre du Caucase (*Capra caucasica caucasica*) en 2013, mais aucune corrélation n'a pu être faite entre ces avortements et les résultats sérologiques du SBV. En effet, concernant la Chèvre du Caucase, la sérologie datait du 28 juillet 2014. Or, l'avortement observé chez cet individu datait du 01 avril 2013. Une association entre les deux évènements bien que possible n'est donc pas scientifiquement prouvée .

Concernant les grands bharals, un avortement a pu être observé chez une femelle en juin 2011. A l'époque, la sérologie était revenue positive pour *Salmonella abortus* mais aucune sérologie n'avait été réalisée pour le SBV. En revanche, 3 sérologies successives positives en octobre 2013, février et septembre 2014 ont montré le passage du SBV chez cet individu, sans pour autant ne pouvoir associer à l'avortement de 2011. En effet, les analyses ont été réalisées de manière beaucoup trop tardive pour pouvoir associer les deux évènements. De plus, l'introduction du SBV France n'a pu être objectivée qu'à partir de septembre 2011.

Un deuxième avortement a pu être observé chez une femelle en 2012. Mais l'avorton ne présentait aucune malformation évocatrice et aucune sérologie n'avait été effectuée sur la mère. Aucune cause spécifique n'avait pu être mise en évidence à ce moment-là. L'hypothèse d'une infection par le SBV bien que non confirmée cliniquement et biologiquement ne peut donc pas être écarté dans ce cas précis.

Grâce à l'analyse des dates de transferts des animaux séropositifs, il a également pu être montré que l'infection de nouveaux individus avait pu se dérouler au MNHN, malgré un contexte épidémiologique moins favorable (ville, peu de bétails et de vecteurs à proximité).

En effet, une Chèvre du Caucase prélevée en février 2014 a montré une sérologie positive pour le SBV alors qu'elle avait été transférée du parc d'Olomouc (République Tchèque) en février 2011 c'est-à-dire avant le début de l'épizootie et de l'arrivée du virus sur le territoire tchèque (en 2012). C'est également le cas pour une Vigogne et pour un Mouflon dont la sérologie positive a été mise en évidence respectivement en septembre 2013 et juillet 2014 alors que les individus avaient été transférés des parcs zoologiques Twycross et Tierpark en novembre et octobre 2010.

Enfin, l'analyse des dossiers a également montré la présence d'anticorps anti-SBV chez deux grands bharals dont la mort à 11 et 12 jours après la naissance n'a pu être expliquée. Si les deux individus avaient été infectés à la naissance, les anticorps n'auraient pas eu le temps de se développer. Ces animaux étant séropositifs, cela confirme la transmission des anticorps maternels via le colostrum. Il aurait été intéressant dans ces deux cas de déterminer le statut sérologique et virémique des deux mères pour le SBV.

I. Analyses sur souris IFNAR-/-.

N° souris	RT-qPCR SBV	DO net ELISA	% ELISA	Résultats ELISA	Titre SN	Résultats SN
855	40	1,458	63	NEGATIF	<2	NEGATIF
857	40	1,773	76	NEGATIF	<2	NEGATIF
859	40	1,913	82	NEGATIF	<2	NEGATIF

Tableau 12 : Résultats des analyses sur souris IFNAR-/- (4 jours post-infection en RT-qPCR et 21 jours post-infection en ELISA et SN).

Notes : Rt-qPCR : Ct>40 = négatif

Quatre jours après l'inoculation sous-cutanée du sérum du gnou virémique aux trois souris adultes IFNAR - / -, les analyses par RT-qPCR n'ont pas pu mettre en évidence de virémie. Par ailleurs, après trois semaines, une prise de sang sur tube EDTA a été réalisée chez les trois individus afin de rechercher une éventuelle séroconversion par la réalisation des tests ELISA et SN. Pour les trois individus testés, aucune séroconversion aussi bien par ELISA que par SN n'a pu être mise en évidence. De plus, sur l'ensemble de l'étude, le suivi clinique des trois souris n'a souligné aucun abattement ni aucune hyperthermie. Le résultat de ces analyses nous a donc permis de supposer que la charge virale ou le pouvoir pathogène du SBV retrouvé chez le gnou ne permettait pas d'entraîner une nouvelle infection.

IV. DISCUSSION.

A. *Les biais de l'étude*

Cette enquête a eu pour objectif d'obtenir une idée générale de la séropositivité du SBV chez les espèces de parcs zoologiques dans deux contextes épidémiologiques très différents : le MNHN, situé au centre d'une grande métropole et le parc de BB, situé dans un environnement rural. Bien que certaines informations aient pu être obtenues à partir de ces recherches, il est néanmoins nécessaire de souligner les différents biais d'interprétation liés à cette enquête.

Dans un premier temps, il est important de noter que l'interprétation de la vraisemblance d'une étude est normalement réalisable par l'établissement d'un protocole épidémiologique prédéterminé suivant des règles bien précises, établies avant le début de l'enquête. L'échantillonnage est notamment un des facteurs qui va avoir une influence majeure sur la puissance des résultats. Dans notre enquête, nous avons disposé de 42 prélèvements provenant du parc de BB et de 15 prélèvements provenant du MNHN. Comme il l'a été souligné par la réalisation d'un test de Fischer, l'échantillon dont nous avons disposé ne nous a donc pas permis d'être exhaustif : la différence de séropositivité observée dans les deux parcs (52,4% pour BB et 81,3% pour le MNHN) n'est pas considérée comme statistiquement différente et ne permet donc pas de tirer de conclusions poussées sur ces résultats.

La problématique d'échantillonnage en parc zoologique est un des freins majeurs à la réalisation d'enquêtes épidémiologiques. En effet, afin de réaliser des prélèvements, il est dans la majorité des cas nécessaires de réaliser une anesthésie. Ces anesthésies, comme nous l'avons mentionné précédemment doivent être réfléchies et nécessaires en raison de l'importance biologiques des espèces captives. Ce risque anesthésique à des fins de recherche est très controversé étant donné la valeur des animaux qui sont pour la plupart du temps menacés d'extinction. L'évaluation du rapport bénéfice-risque quant à ce genre d'approche est donc la plupart du temps le plus souvent en faveur de la non-prise de risque. C'est ainsi que pour l'ensemble des prélèvements obtenus, une indication médicale était le plus souvent nécessaire (parage, prophylaxie, soin divers,...).

L'extrapolation de nos données à l'ensemble de la population de bovidés détenue en captivité en France et aux Pays-Bas n'est donc pas réalisable dans notre cas. Ces premières données permettent simplement de dégager des tendances mais en aucun cas de tirer des

conclusions qui pourraient être interprétables à plus grande échelle. Malgré cela, il est important de souligner que sur l'ensemble de l'échantillon, une séropositivité de 59,3% a été constatée. Ces résultats paraissent donc tout de même semblables aux résultats divulgués sur la plateforme ESA concernant l'incidence de la maladie chez les bovins, ovins et caprins domestiques.

Un autre biais dans cette étude provient de l'absence de prélèvements histologiques et sérologiques chez les avortons observés au MNHN avant le début de l'enquête, à savoir 2013. En effet, en 2011 et 2012, considérant le peu de connaissances sur la maladie, l'association entre avortements, malformations congénitales et le SBV était peu réalisée. L'analyse rétrospective des antécédents médicaux des bovidés étudiés souligne l'absence de certaines informations nécessaires afin d'attribuer les signes cliniques observés à la maladie.

Deux grands bharals (*Pseudois nayaur*) et une Chèvre du Caucase (*Capra caucasica caucasica*) ont par exemple avorté respectivement en 2011, 2012 et 2013. Cependant, aucune analyse n'avait été faite sur ces avortons à ce moment-là. Par conséquent, il a été impossible de déterminer si ces avortements étaient la conséquence d'une infection par le SBV ou bien étaient dus à un autre agent pathogène. Idéalement, il aurait été nécessaire de prélever chaque avorton et chaque mère afin de détecter ou non la présence du virus.

D'autre part, une analyse comparant les résultats entre les deux parcs est difficilement réalisable. En effet, au MNHN, aucune analyse n'a pu être réalisée en 2011 et 2012 alors qu'au parc de BB, aucun prélèvement n'a pu être analysé en 2015. Cette hétérogénéité dans les périodes de prélèvement, associée au faible nombre d'échantillons, rend une fois de plus difficile la comparaison. En 2015, nous avons par exemple pu montrer une séropositivité moyenne de 50% à partir d'un seul échantillon séropositif (MNHN) et d'aucun échantillon analysé pour BB. Au vu du nombre de prélèvements, cette valeur est donc fortement discutable et ne mériterait pas d'être exposée de la sorte. Ceci justifie notre choix d'avoir présenté nos résultats en nombre d'individus séropositifs et non en pourcentage.

B. Les risques d'introduction du SBV en parcs zoologiques.

1. Une grande diversité d'espèces infectées.

D'après la littérature, on note une grande diversité d'espèces de bovidés et de cervidés

sauvages infectés en Europe. Notre étude a également permis de confirmer cela puisque ce ne sont pas moins de 25 espèces de bovidés différentes qui ont présenté des anticorps pour le SBV. Puisque le nombre d'individus prélevé pour chaque espèce étudiée est très faible, il n'est cependant pas possible de déterminer si une espèce est plus réceptive qu'une autre ou bien manifeste une réponse immunitaire de façon plus importante que les autres.

Il est important de garder à l'esprit que plus le nombre d'espèces susceptibles est important, plus la persistance du virus dans l'environnement et les effets de spillover de la faune sauvage aux animaux domestiques sont envisageables en supposant que ces populations soient des hôtes compétents.

2. La persistance d'une immunité au fil des années.

Nous avons pu constater en réalisant une cinétique sérologique chez un grand bharal du MNHN d'Octobre 2013 à Septembre 2014 et chez un hippotrague noir du parc de BB d'Octobre 2011 à Mars 2013 que les anticorps anti-SBV ont persisté chez ces deux espèces pendant la durée de l'étude (sans virémie associée). Deux hypothèses sont donc concevables afin d'expliquer ce phénomène : soit l'immunité de ces individus a persisté au fil des années, soit les individus ont été réinfectés d'une année sur l'autre.

Ces informations doivent être comparées aux études menées chez les bovidés domestiques. En 2014, une étude a mis en évidence que les anticorps pouvaient être maintenus pendant au moins 2 ans chez les vaches. Pour affirmer cela, 5 prélèvements sérologiques avaient été effectués sur un troupeau entier constitué de 60 vaches, de 50 génisses et de veaux. Au premier prélèvement, en avril 2012, l'ensemble des 60 vaches adultes âgées de plus d'un an étaient séropositives. Dix-sept mois plus tard, lors du 5ème échantillonnage en septembre 2013, 80% des vaches adultes et seulement 9% des vaches âgées de moins d'un an étaient encore séropositives avec un titre en anticorps diminuant progressivement sur l'ensemble de la période étudiée (chez les vaches adultes) suggérant donc que les individus avaient été protégés tout au long de l'étude (Elbers et al., 2014).

Il semblerait donc que la réponse en anticorps contre le SBV soit similaire entre bovidés sauvages et domestiques.

3. Une rapide dissémination du virus au sein des populations de ruminants en captivité.

Comme il a été constaté aussi bien dans la littérature que dans notre étude, il semblerait que la dissémination du SBV au sein des populations de bovidés sauvages se soit déroulée beaucoup plus rapidement que ce qui avait été estimé. En effet, parmi nos échantillons, un gnou séronégatif a présenté une virémie en Septembre 2011 c'est-à-dire approximativement à la même période que la découverte du virus chez les bovidés domestiques. A ce moment-là, l'ensemble des publications scientifiques évoquait tout juste l'apparition de ce virus en Allemagne.

Par ailleurs, 85,7% des individus du parc de BB étudiés en 2011 montraient une sérologie positive pour le SBV. Ceci est non négligeable et suggère donc que le virus était présent dans la faune sauvage en captivité, dans des pays autres que l'Allemagne. La durée de l'immunité vis-à-vis de cette infection virale n'ayant pas encore été établie avec certitude, il reste cependant difficile de déterminer précisément si les individus concernés auraient pu être affectés avant la mise en évidence de la maladie chez les bovins dans la ville de Schmalleberg.

Dans cette étude, la réflexion de départ a été de s'interroger sur la provenance du yack séropositif. Considérant l'absence de sérologie précédente concernant cet individu, deux interrogations principales ont été soulevées à savoir « Depuis quand cet animal était-il séropositif ? » et donc de manière sous-jacente « Est-ce que ce yack transféré au MNHN était déjà séropositif dans son parc d'origine ? Aurait-il pu être à l'origine d'une dissémination à l'intérieur de la population de bovidés captifs du parc ou bien a-t'il été infecté à son arrivée au MNHN ? »

Afin de répondre à ces interrogations, il est nécessaire de prendre en considération un certain nombre d'éléments. Cela doit tout d'abord passer par une analyse de risque qualitative de l'introduction du virus par le transfert des bovidés sauvages de parcs en parcs en le comparant au risque d'introduction via les transferts d'animaux domestiques à proximité des zoos ainsi qu'au risque d'introduction lié à la capacité de dissémination du virus par les vecteurs, les *Culicoides*.

Concernant la probabilité d'introduction du virus par le transfert d'animaux entre parcs zoologiques, Species 360, une organisation non gouvernementale internationale gérant une base de données sur les animaux sauvages en captivité a permis de relever quelques centaines de transferts de bovidés sauvages en captivité entre les différents zoos européens. En considérant ces données et en les comparant aux données concernant les transferts de bovins en Europe qui étaient de l'ordre de 971 600 animaux exportés et 29100 animaux importés pour l'année 2015 (FranceAgriMer, 2016), nous avons donc considéré que le risque de dissémination de la maladie par le transfert d'individus entre parcs zoologiques était très faible.

La transmission entre les deux parcs a-t-elle donc réellement eu lieu ? Ceci est difficile à confirmer. Cependant, plusieurs animaux nés au MNHN ont été infectés dans les infrastructures même du parc confirmant qu'une transmission dans un environnement urbain était donc possible. Considérant ceci mais également le fait que les *Culicoides* soient les principales sources de contamination entre les bovidés domestiques, il est donc nécessaire de comprendre quelles sont les différentes transmissions virales envisageables dans un contexte épidémiologique non favorable, à savoir une grande métropole.

4. Réflexion sur l'activité des Culicoïdes en Europe et leurs rôles potentiels de transmission de la maladie en zones urbaines.

Très rapidement après la mise en évidence du SBV, plusieurs espèces de *Culicoides* ont rapidement été incriminées dans la transmission du SBV à travers une série d'études aux Pays-Bas (Elbers et al., 2013) et en Belgique (De Regge et al., 2012).

Des études détaillées de la répllication et de la diffusion du SBV dans le modèle d'étude *Culicoides sonorensis* ont permis de confirmer que le niveau d'ARN viral (Elbers et al., 2013b) était susceptible d'être à l'origine d'infections transmissibles (Veronesi et al., 2013). En effet, la rapidité avec laquelle les ruminants domestiques ont séroconverti suite à la découverte du SBV ne peut être expliquée que par la capacité des *Culicoides* à être transportés par le vent, les transports de bovins étant beaucoup moins importants. Par ailleurs, le taux de séroconversion semblerait également varier avec la fréquence de moucheron présents à proximité des exploitations (Elbers et al., 2014) suggérant de nouveau le rôle important que

joueraient ces moucheron dans la transmission du virus (Elbers et al, 2012; Meroc et al, 2013).

Par ailleurs, Balenghien et al. a également montré en 2014 le rôle de *Culicoides obsoletus* et du complexe *Culicoides C.obsoletus* et *C.scoticus* dans la transmission du virus en France en mettant en évidence l'ARN du SBV dans ces moucheron. *C. nubeculosus* a également été impliqué pour la première fois dans cette transmission. Il faut souligner qu'une très faible quantité d'ARN viral a pu être mis en évidence chez ces moucheron et que les infections expérimentales des *Culicoides nubeculosus* et *scoticus* ont entraîné une virémie très faible. Ces observations posent donc la question de la charge virale nécessaire à l'infection d'un nouvel individu. En se basant sur des études réalisées chez les *Culicoides* transmettant d'autres virus, une hypothèse serait donc de dire qu'une très faible charge virale serait nécessaire à la transmission de l'infection comme c'est le cas pour le BTV-8. Cette faible charge virale serait compensée par la capacité des *Culicoides* à sécréter des molécules vasodilatatrices, à recruter des cellules inflammatoires et à inhiber la réponse immunitaire des individus infectés (Pages et al, 2014). Par ailleurs la compétence vectorielle des *Culicoides* pour le SBV pourrait dépasser celle enregistrée pour le BTV, soit dans le nombre d'espèces capables de transmettre le virus ou dans la proportion d'individus au sein d'une espèce capable d'agir en tant que vecteurs. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le virus apparenté *Akabane* est isolé à une fréquence beaucoup plus élevée que le BTV dans les *Culicoides* en Australie (St George et al., 1978).

L'ensemble de ces informations suggèrent que l'introduction des *Culicoides*, transportés par les vents (Burgin et al, 2013), semblerait donc être un des facteurs contribuant le plus à la transmission du SBV dans de nouveaux écosystèmes comme cela a été mis en évidence pour le BTV-8 en Europe du Nord (Carpenter et al, 2009). Dans notre cas, il est cependant indispensable de garder à l'esprit qu'une transmission d'un individu infecté à un autre par proximité est également envisageable.

Dans le cas du MNHN, deux hypothèses sont donc envisageables : soit la transmission de la maladie a été réalisée via le transport par les vents des *Culicoides* des fermes situées à la périphérie de la métropole; soit la transmission entre deux espèces du parc a été réalisée par l'introduction d'un nouvel individu infecté dans le zoo, via des populations de *Culicoides* locales, adaptées aux environnements urbains. Purse et al. a en effet pu mettre en évidence en

2012, l'existence de populations de *Culicoides* (*Culicoides paraensis*, responsable de la transmission du virus de OROV) exploitant les habitats semi-urbains et par conséquent susceptibles de transmettre l'infection d'un individu infecté à un autre.

Afin de déterminer cela, il pourrait être intéressant de poser des pièges à *Culicoides* à différents endroits du MNHN afin de capturer ces insectes. La détermination des espèces de moucheron mais également la mise en évidence et le séquençage d'un éventuel virus dans ces derniers pourrait permettre ainsi de déterminer quelles hypothèses seraient les plus probables.

C. La faune sauvage : un rôle de réservoir ?

Nos résultats ont pu confirmer le développement d'une réponse immunitaire chez de nombreuses espèces sauvages maintenues en captivité. Au vue de ces informations et des données de la littérature, une question se pose quant au rôle de cette population dans le maintien du virus dans l'environnement. Ces individus pourraient-ils avoir un rôle réservoir ?

1. Définition du rôle de réservoir.

Un point clé dans la conception de mesures de contrôle des agents pathogènes multihôtes consiste donc à définir ce que l'on entend par « des populations réservoirs» et élaborer des lignes directrices pour leur identification. Bien que de nombreuses maladies humaines et animales émergentes soient supposées être maintenues dans ces populations réservoirs, ces dernières sont rarement identifiées (Daszak et al, 2000).

De nombreuses définitions différentes et souvent contradictoires des populations réservoirs existent. Certaines associent certaines caractéristiques à la définition de cette population par exemple "les infections chez les hôtes réservoirs sont toujours asymptomatiques" ou encore "tout hôte naturel est un hôte réservoir", " le réservoir doit être une espèce différente", "les réservoirs sont des hôtes sans importance économique" (Dorland et al., 1994; Henderson et al., 1989; Swinton et al., 2001). Certaines définitions impliquent qu'un réservoir ne comprenne qu'une seule espèce; d'autres définitions suggèrent qu'un système écologique puisse agir comme réservoir (Swinton et al., 2001). Ces définitions parfois déroutantes, contradictoires, et souvent incomplètes constituent le concept de ce que

l'on appelle population réservoir. Haydon et al. (2002) a donc proposé une définition plus précise des agents réservoirs : « les réservoirs sont une ou plusieurs populations ou environnements épidémiologiquement connectés dans lequel l'agent pathogène peut être maintenu de façon permanente et à partir desquelles l'infection est transmise à la population définie. »

L'existence d'une population réservoir est donc confirmée lorsque la persistance de l'infection à l'intérieur de la population cible ne peut être maintenue une fois que l'ensemble des transmissions entre la population cible et les populations non cibles ont été éliminées (Haydon et al., 2002). Les populations réservoirs peuvent être identiques ou différentes de l'espèce cible et peuvent inclure les espèces vectrices. Cependant, l'identification exhaustive de toutes les populations réservoirs peut être difficile. Cette identification ne doit pas être une priorité de gestion si le contrôle de la maladie est dirigée contre la population cible ou dirigée à l'échelle de la transmission entre la population réservoir et la population cible.

Dans le cas où l'on souhaite déterminer la persistance de l'infection dans une éventuelle population réservoir, la réalisation d'enquêtes longitudinales est indispensable. Dans notre cas cependant, cela reste très compliqué en raison des contraintes d'échantillonnage évoquées précédemment. L'accumulation de données épidémiologiques peut donc fortement contribuer à l'identification d'un réservoir. Les données quantitatives sur les facteurs de risque d'infection peuvent notamment être obtenues par des recherches épidémiologiques avancées, comme la réalisation d'études cas-témoins ou d'enquête de cohorte (Berg et al., 1998). Dans l'ensemble des cas, la caractérisation des agents viraux par PCR et séquençage reste le meilleur moyen de déterminer si un même virus peut affecter deux populations différentes.

2. Les conséquences envisageables pour les espèces menacées : le spillover est-il à l'origine d'un danger pour les espèces en voie de disparition ?

Le spillover est la capacité d'un pathogène à atteindre une forte prévalence à l'intérieur d'une population réservoir permettant ainsi sa transmission à une autre population hôte indépendamment de son mode de transmission (Daszak et al., 2000). Dans le cas du SBV et considérant les séroprévalences relativement élevées aussi bien chez les populations de

bovidés domestiques que sauvages (cf Partie1.III.C), il serait intéressant de déterminer si le spillover du SBV pourrait être observé à partir des populations domestiques vers les populations sauvages ou inversement.

Dans notre cas, la question se pose de savoir si les bovidés maintenus en captivité pourraient entretenir leur propre cycle viral en parallèle de celui observé chez les ruminants domestiques ou bien si une interaction pourrait exister entre les deux populations, le tout formant un même cycle. Etant donné qu'il est impossible d'empêcher tout contact entre faune domestique et faune sauvage, l'utilisation d'outils virologiques (PCR, séquençage) reste donc de choix afin de déterminer les liens entre les populations.

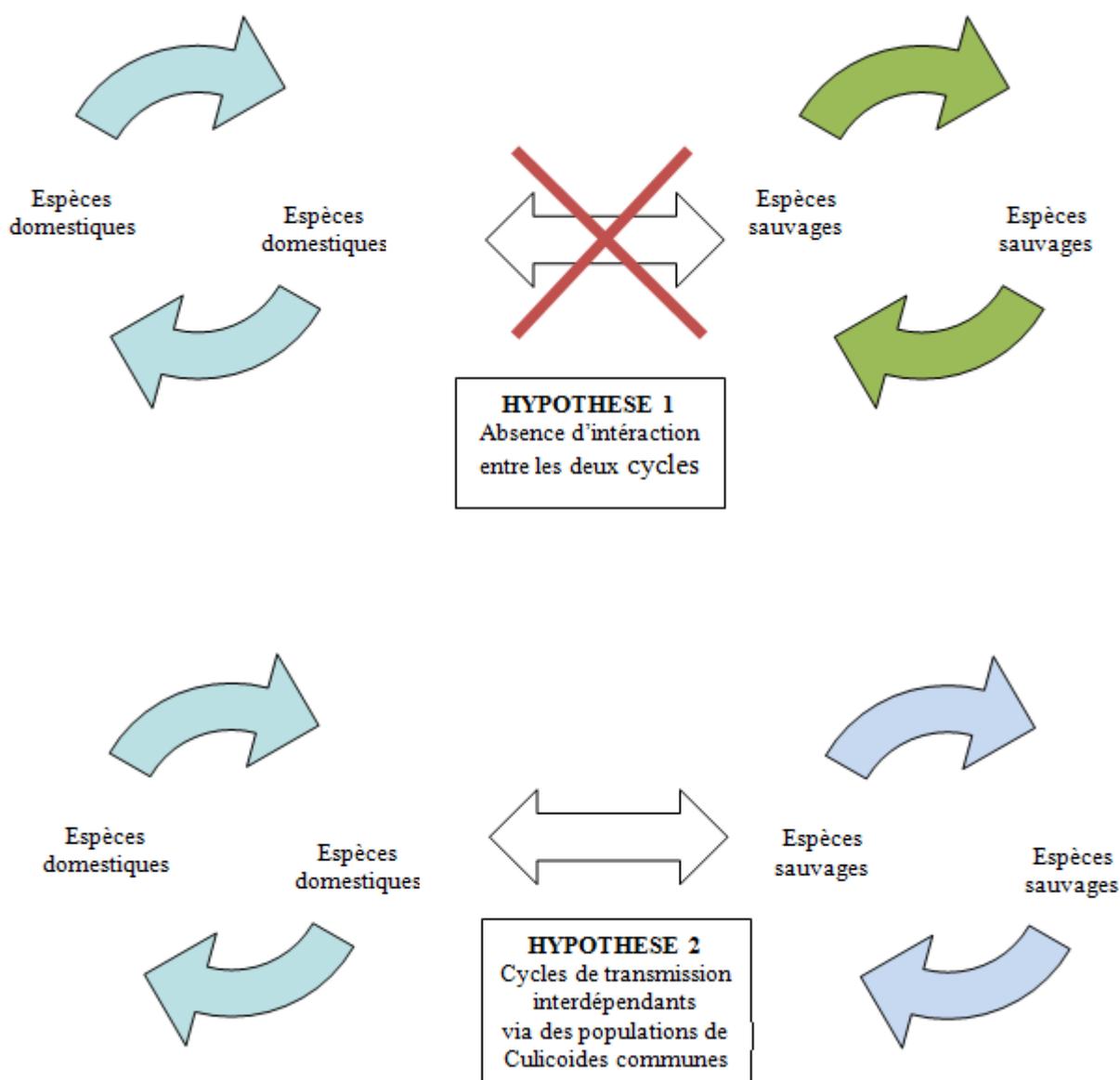


Figure 27: Représentation schématique des différentes hypothèses concernant la circulation du SBV entre les populations domestiques et sauvages.

Si l'hypothèse N°2 était confirmée, le phénomène de spillover pourrait éventuellement être considéré dans le cas où la prévalence diminuerait dans l'une ou l'autre des populations. L'absence de signe clinique rapportée jusqu'à maintenant laisserait penser qu'un spillover des populations domestiques vers les populations sauvages ne menacerait cependant pas ces individus, à conditions que l'absence de signe clinique chez ces espèces soient confirmées.

D. Réflexion sur la gestion du SBV dans les parcs zoologiques.

Le contrôle de la maladie de Schmallenberg repose sur plusieurs approches.

Dans un premier temps, il est possible d'intervenir à l'interface hôte-vecteur par l'utilisation de répulsifs ou encore par le maintien des animaux à l'intérieur des bâtiments lors des pics d'activités vectoriels comme cela est prodigué dans les élevages bovins et ovins. Ces approches sont dans la plupart des élevages compliquées à mettre en œuvre en raison du manque d'efficacité des répulsifs, du coût et des contraintes techniques liés au maintien des animaux dans les étables. Ces deux options pourraient être considérées dans les parcs zoologiques bien que le maintien des espèces dans les bâtiments semble difficilement réalisable.

Une autre option proposée et notamment appliquée chez les petits ruminants est de retarder l'accouplement des femelles jusqu'à ce que les populations de *Culicoides* soient moins abondantes (Luttikholt et al., 2014). Cette option pourrait éventuellement être envisagée chez les espèces de parcs zoologiques s'il s'avérait que des avortements étaient constatés.

Une autre alternative est la vaccination des troupeaux. Cette vaccination, réalisée avant la saison de reproduction, permet de prévenir l'apparition de signes cliniques en protégeant le fœtus contre les effets tératogènes du virus. Elle permet également d'inhiber la transmission vectorielle. Vacciner avant la saison de reproduction semble donc être la méthode la plus efficace d'intervention.

Chez les bovidés domestiques, il a été montré qu'il était possible de déterminer les

troupeaux à vacciner de ceux qui ne le nécessitaient pas. Le passage du SBV dans un troupeau entraîne la séroconversion de la plupart des animaux. En effectuant un sondage sérologique sur un échantillon de femelles reproductrices, il serait possible de déduire la séroprévalence de l'ensemble du troupeau. Dans le cas d'un troupeau où la séroprévalence est forte, l'intérêt de la vaccination n'apparaîtrait alors pas indispensable. Il a cependant été montré que le virus pouvait tout de même continuer de circuler dans un troupeau ovin où la séroprévalence était élevée (99,5 % des brebis étaient séropositives) et qu'il infectait alors les agnelles de renouvellement puisque celles-ci étaient restées naïves vis-à-vis du SBV (Claine et al., 2013). L'intérêt de vacciner le troupeau de renouvellement chez les ovins paraîtrait donc indispensable.

Dans le cas des parcs zoologiques, le calcul du taux de prévalence chez l'ensemble des bovidés sauvages n'est malheureusement pas réalisable étant donné la nécessité d'anesthésier les animaux afin de réaliser une sérologie. D'autre part, la vaccination est très peu réalisée car certains anticorps vaccinaux peuvent entraîner des biais lors des analyses sérologiques réalisées lorsque les animaux sont transférés d'un parc à un autre. Par ailleurs, des incertitudes persistent quant à la relation entre une éventuelle virémie et l'apparition de troubles de la reproduction. Considérant ces données, la vaccination n'apparaît donc pour le moment pas indispensable chez ces espèces-là d'autant plus que l'efficacité et l'inocuité des vaccins SBV commercialisés n'a jamais été évaluée chez ces individus.

Enfin, l'arrêt complet de la circulation d'animaux en Europe n'est pas du tout envisageable. Considérant la répartition ubiquiste des vecteurs biologiques et la nécessité économique de maintenir les marchés, cette alternative ne peut donc pas être considérée. Dans le cas très peu probable où une infection serait détectée en phase de virémie chez un bovidé sauvage en captivité, une interdiction ponctuelle de transfert d'un parc à l'autre avec isolement de l'individu pourrait éventuellement être considérée afin d'éviter tout risque de dissémination.

Mesures préventives	Bovidés domestiques	Bovidés sauvages maintenus en captivité
<u>LUTTE MECANIQUE :</u> Mesures de confinement des animaux lors du pic d'activités des Culicoïdes	AVANTAGES : faible coût	PERSPECTIVES : -Malgré un faible coût, difficulté de mise en place en raison de la nécessité de visibilité des animaux par le public.
	INCONVENIENTS : difficile à mettre en place dans les élevages.	
<u>LUTTE ECOLOGIQUE :</u> Limitation de la prolifération des vecteurs (drainage points d'eau, pièges à insectes)	AVANTAGES : pratique, réalisable, peu coûteux.	PERSPECTIVES : -Pratique, faible coût et par conséquent envisageable -Efficacité modérée (complémentaire à d'autres mesures)
	INCONVENIENTS : Efficacité modérée (complémentaire à d'autres mesures)	
<u>LUTTE CHIMIQUE :</u> Utilisation de pyréthrinoïdes de synthèse	AVANTAGES : praticité	PERSPECTIVES : -Faible praticité pour application individuelle -Efficacité modérée (complémentaire à d'autres mesures)
	INCONVENIENTS : Efficacité modérée (complémentaire à d'autres mesures) Coût	
<u>VACCINATIONS :</u>	AVANTAGES : Protection de l'apparition d'une éventuelle virémie.	PERSPECTIVES : -Protection de l'apparition d'une éventuelle virémie. -En réalité quasiment impossible en parcs zoologiques dû à la nécessité de dépistage sérologique lors des transferts d'animaux (interférence vaccination/immunité naturelle)
	INCONVENIENTS : Balance bénéfique/risque en termes de coût négative	
<u>GESTION DE LA REPRODUCTION :</u> Mise à la reproduction décalée	AVANTAGES : diminution du risque d'avortements, de malformations congénitales lors des mises bas	PERSPECTIVES : -diminution du risque d'avortements, de malformations congénitales lors des mises bas -maintien du nombre d'individus dans les populations
	INCONVENIENTS: Pertes économiques envisageables en fonction de la mise en vente des produits de production.	

Tableau 13 : Perspectives quant à l'application des mesures préventives établies chez les bovidés domestiques aux bovidés de parcs zoologiques en captivité.

Il semblerait donc au-delà de la lutte écologique que la gestion de la reproduction soit une des solutions majeures en parc zoologiques. Dans l'ensemble des individus étudiés, il existe des espèces dont la gestion de reproduction doit être prioritaire : ce sont les espèces classées vulnérables, en danger ou éteints à l'état sauvage (A) ou encore dont la période de reproduction chevauche la période d'activités maximales des Culicoides (juillet à octobre) (B).

Espèce	Statut UICN (nombre d'individus à l'état sauvage)	Période de reproduction	Intérêts particuliers de gestion des reproductions
Antilope cervicapre (<i>Antilope cervicapra</i>)	Quasi menacé (50000)	Toute l'année avec deux pics: Août à Octobre et Mars à Avril	A/B
Buffle du Cap (<i>Syncerus caffer caffer</i>)	LC	Toute l'année	B
Céphalophe du Natal (<i>Cephalophus natalensis</i>)	LC	Toute l'année	B
Cerf axis (<i>Cervus axis</i>)	LC	Varie en fonction de la localité En hiver en Europe	
Cerf du Père David (<i>Elaphurus davidianus</i>)	Eteint à l'état sauvage	Août-Septembre	A/B
Cerf Sika (<i>Cervus nippon pseudaxis</i>)	LC	Septembre à Novembre	B
Chèvre des Montagnes Rocheuses (<i>Oreamnos americanus</i>)	LC	Fin novembre-Début janvier	
Chèvre du Caucase (<i>Capra caucasica caucasica</i>)	En danger (5000 en 2004)	Novembre à Janvier	A
Chèvre naine (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Vulnérable (non estimée)	Toute l'année avec un pic d'août à décembre	A/B
Cobe à croissant (<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>)	LC	Toute l'année	B

Daim de Perse (<i>Dama mesopotamica</i>)	En danger (250 individus en liberté)	Octobre-Novembre	A/B
Eland du Cap (<i>Taurotragus oryx</i>)	LC	Toute l'année	B
Gaur (<i>Bos gaurus</i>)	Vulnérable (15000-35000)	Toute l'année avec un pic de décembre à juin	A
Gnou bleu (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)	LC	Février-Mars	
Grand Bharal (<i>Pseudois nayaur</i>)	LC	Novembre-Février	
Hippotrague noir (<i>Hippotragus niger niger</i>)	LC	Juin	
Markhor (<i>Capra falconeri</i>)	Quasi menacé (5000-6000)	Octobre à janvier	A
Nyala (<i>Tragelaphus angasii</i>)	LC	Toute l'année avec deux pics au printemps et à l'automne	B
Oryx gazelle (<i>Oryx gazella gazella</i>)	LC	Toute l'année	B
Springbok (<i>Antidorcas Marsupialis</i>)	LC	Avril-Mai	
Urrial (<i>Ovis aries arkal</i>)	VU	Novembre-Décembre	A
Vigogne (<i>Vicugna vicugna</i>)	LC	Mars-Avril	
Watusi (<i>Bos taurus primigenius</i>)	LC	Mai-Mai et Août à Octobre	B
Yack (<i>Bos grunniens grunniens</i>)	VU	Septembre-Novembre	A/B

Tableau 14: Représentation des espèces d'intérêts étudiées en fonction de leur statut UICN et de leur période de reproduction. (A : Espèce menacée/ B : Superposition période de reproduction/ activités des Culicoides).

Dans l'ensemble des espèces étudiées, 9 espèces sont menacées (A) d'après la Liste Rouge de l'UICN. Par conséquent des observations sur l'apparition d'avortements et/ou de malformations congénitales doivent être considérées avec un plus grand intérêt chez ces

individus-là.

D'autre part, 12 espèces montrent une période de reproduction se superposant avec la période d'activités maximales des *Culicoides* (B). Chez ces individus-là, la nécessité de décaler la période de reproduction de quelques mois afin de diminuer les éventuels contacts moucheron-animaux est donc recommandée. L'antilope cervicapre (*Antilope cervicapra*), la chèvre naine (*Capra aegagrus hircus*), le daim de Perse (*Dama mesopotamica*), le cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*) et le yack (*Bos grunniens grunniens*) sont les espèces pour lesquelles il faut redoubler d'attention étant donné d'une part leur statut de conservation et d'autre part leur période de reproduction.

Bien que la vaccination ne soit que très peu réalisée en parcs zoologiques, il pourrait être envisageable de déterminer les populations les plus sensibles pour lesquelles il est impossible de décaler les périodes de reproduction (saison de reproduction très courte) afin d'obtenir une protection des nouveaux-nés.

L'ensemble de ces indications sont donc à prendre en compte dans le cas où des observations futures confirmeraient le rôle pathogène du SBV chez ces espèces. Ces réflexions sont portées sur un nombre mineur d'espèces mais peuvent être appliquée à l'ensemble des animaux de cette famille.

V. CONCLUSION.

Cette étude a permis de confirmer de nombreuses recherches précédentes soulignant la susceptibilité des bovidés sauvages au SBV. Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence la présence du virus aux seins de populations en zones urbaines, suggérant la capacité des vecteurs à transmettre cet agent pathogène dans ce type d'environnement. Le rôle de réservoir attribué à ces populations est à envisager bien que le type de cycle (dépendant ou non des bovidés domestiques) reste encore à déterminer.

La mise en place de mesures préventives est discutable à l'échelle de ces populations étant donné qu'aucun cas clinique, ni même suspect n'a pu être mis en évidence jusqu'à maintenant. La gestion de la reproduction semble cependant être la meilleure alternative en complément de la mise en place de mesures de lutte écologique. La vaccination bien que très peu employée dans ces institutions pourraient également être considérée pour un nombre défini d'espèces pour lesquelles les solutions présentées précédemment ne seraient pas applicables.

CONCLUSION

A ce jour, le SBV continue de progresser sur l'ensemble du territoire européen. En raison de la forte séroprévalence observée jusqu'à maintenant, l'incidence de la maladie va probablement diminuer et se limiter à des zones endémiques. Toutefois, si une réduction de la séroprévalence est observée, la réémergence est alors très probable. Tant qu'il y aura des vecteurs et des populations sensibles, le SBV pourra continuer à diffuser et /ou bien à devenir endémique. La persistance du virus en zones d'endémie dépend également de la disponibilité des vecteurs, de la présence de réservoirs hôtes sauvages et/ou domestiques.

D'autre part, il faut garder à l'esprit que chaque nouvelle génération est susceptible de créer de nouveaux hôtes sensibles. Le renouvellement annuel d'un troupeau dans les exploitations ovines est par exemple est de l'ordre de 20% à 25% permettant la formation de nouvelles populations sensibles. Bien que ce renouvellement ne soit pas de cet ordre là chez les individus de parcs zoologiques, les transferts entre parcs accroissent les possibilités d'introduction d'individus naïfs au sein de collections déjà bien affectées. La pression d'infection sur ces nouveaux individus est par conséquent relativement importante permettant ainsi le maintien et la dissémination du virus.

Tant que le SBV circulera en Europe, la réémergence virale à l'origine d'épidémies majeures avec l'apparition de nouveaux cas cliniques est donc fortement envisageable. La réémergence, après une période d'absence de la maladie clinique pourrait se produire lorsque les circonstances météorologiques changent, en faveur de la survie et de la dissémination des vecteurs et des virus, et/ou lorsqu'une grande proportion des hôtes redevient sensible. Il pourrait également être possible qu'une future réémergence soit causée par une nouvelle introduction virale à partir de régions endémiques.

Jusqu'à maintenant, aucune observation de malformations évocatrices du SBV n'a pu être confirmée chez les bovidés sauvages. Seul, un cas chez un chevreuil (*Capreolus capreolus*) a été évoqué (Rossi et al., 2015) parmi l'ensemble des investigations réalisées chez les populations de chevreuils et de cerfs élaphe. Comme il l'a été évoqué, il n'est pas impossible que la maladie survienne chez ces individus, ni même chez des espèces maintenues en captivité. Les conséquences pourraient éventuellement varier en fonction des

périodes de reproduction pour chaque espèce.

Une réflexion concernant la prise en charge thérapeutique ainsi que l'établissement de mesures préventives est indispensable. Les mesures de lutte écologiques ainsi que la gestion de la reproduction apparaissent comme les mesures clés à adopter. La vaccination pourrait être suggérée pour un certain nombre d'individus dont la gestion reste difficile. Cependant, l'interférence entre immunité vaccinale et statut sérologique des animaux lors des contrôles sérologiques réalisés lors des transferts d'animaux d'un parc à un autre remet en cause cette proposition.

Jusqu'à aujourd'hui aucun cas clinique n'a pu être confirmé chez les bovidés sauvages maintenus en captivité. Les enquêtes sérologiques et virémiques en cas de malformations caractéristiques doivent cependant être maintenues. Il est pour cela recommandé de suivre les protocoles conseillés par la plateforme ESA afin de détecter toutes réémergences ou toutes évolutions virales qui pourraient avoir des conséquences plus importantes dans le futur.

Cette étude complète les rares connaissances sur la sensibilité au SBV des espèces de bovidés maintenues en captivité et permet d'établir une réflexion quant aux mesures à établir en cas de réémergence et/ou d'évolution virale : la gestion des périodes de reproduction reste à ce jour et dans notre cas une des principales alternatives envisageables. D'autres études seraient éventuellement nécessaires en cas de réémergences afin de confirmer statistiquement nos résultats et de tenter de mettre en application nos éventuelles recommandations.

ANNEXES

Annexe 1

Résultats BLASTN

Séquences GNOU 44

Séquence segment M 33-1962

Identité maxi = 99%

Avec plusieurs séquences SBV de GenBank

Entre autres :

Schmallenberg virus isolate BH652/12 segment M M polyprotein (M) gene, complete cds

Sequence ID: [gb|KP731872.1](#)|Length: 4212Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 33 to 1962[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment
statistics for
match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	3465 bits(3842)	0.0	1926/1930(99%)	0/1930(0%)	Plus/Plus
Query 1			AGCCTGTTTAGCTTTTGCACCTCCCACTTAAGGAAGGCACTAGAGGGTCTAGGTGCTTCCT		
60					
Sbjct 33			AGCCTGTTTAGCTTTTGCACCTCCCACTTAAGGAAGGCACTAGAGGGTCTAGGTGCTTCCT		
92					
Query 61			GAATGSCGAACTGGTTAAAACCTGTTAACACATCAAAGGTCGTTTCAGAATGCTGTGTGAA		
120					
Sbjct 93			GAATGGCGAACTGGTTAAAACCTGTTAACACATCAAAGGTCGTTTCAGAATGCTGTGTGAA		
152					
Query 121			AGACGACATATCTATCATTAAATCAAATGCTGAACATTATAAATCAGGAGATCGGTTGGC		
180					
Sbjct 153			AGACGACATATCTATCATTAAATCAAATGCTGAACATTATAAATCAGGAGATCGGTTGGC		
212					
Query 181			TGCTGTAATAAAATATTATCGTTTATATCAGGTGAAGGATTGGCATTCTTGCAATCCAAT		
240					
Sbjct 213			TGCTGTAATAAAATATTATCGTTTATATCAGGTGAAGGATTGGCATTCTTGCAATCCAAT		
272					
Query 241			TTATGATGACCACGGTTCCTTTATGATATTAGATATAGATAAATACTGGCACATTAATCCC		
300					
Sbjct 273			TTATGATGACCACGGTTCCTTTATGATATTAGATATAGATAAATACTGGCACATTAATCCC		
332					
Query 301			TAAAATGCATACATGCAGAGTTGAATGCGAAATAGCACTGAATAAAGATACTGGCGAAGT		


```

1560
Sbjct 1533 |||||
1592 CGAACAAGAATTAATAAAAAGCTTAAACTTGAAGTGAATGTCATAGATAGGTTTATTTTC

Query 1561 CGAATCTAGTGTTATTGAGACTCAAGTTTATTATGAGTATATAAAAATCACAGTTGTGCC
1620

Sbjct 1593 |||||
1652 CGAATCTAGTGTTATTGAGACTCAAGTTTATTATGAGTATATAAAAATCACAGTTGTGCC

Query 1621 TCTCCAAGTGCATGATATTTTCACTATCAATTCAGCAAGTAACATACAATGGAAAGCACT
1680

Sbjct 1653 |||||
1712 TCTCCAAGTGCATGATATTTTCACTATCAATTCAGCAAGTAACATACAATGGAAAGCACT

Query 1681 GGCCCGAAGTTTCACCTTAGGAGTGTGCAATACGAATCCTCATAAACATATATGTAGATG
1740

Sbjct 1713 |||||
1772 GGCCCGAAGTTTCACCTTAGGAGTGTGCAATACGAATCCTCATAAACATATATGTAGATG

Query 1741 CTTGGAGTCTATGCAAATGTGCACATCAACCAAGACAGACCACGCTAGGGAAATGTCAAT
1800

Sbjct 1773 |||||
1832 CTTGGAGTCTATGCAAATGTGCACATCAACCAAGACAGACCACGCTAGGGAAATGTCAAT

Query 1801 ATATTATGATGGTCATCCAGATCGCTTTGAGCATGACATGAAAATAATATTGAATATAAT
1860

Sbjct 1833 |||||
1892 ATATTATGATGGTCATCCAGATCGCTTTGAGCATGACATGAAAATAATATTGAATATAAT

Query 1861 GAGATATATAGTCCCTGGATTAGGTCGAGTCTTGCTTGATCAAATCAAACAAACAAAAGA
1920

Sbjct 1893 |||||
1952 GAGATATATAGTCCCTGGATTAGGTCGAGTCTTGCTTGATCAAATCAAACAAACAAAAGA

Query 1921 CTACCAAGCT 1930
|||
Sbjct 1953 CTACCAAGCT 1962

```

Séquence segment M 2016-2951

Identité maxi = 100%

Avec plusieurs séquences SBV de GenBank

Dont par exemple (1ère entrée) :

Schmallenberg virus isolate BH652/12 segment M M polyprotein (M) gene, complete cds

Sequence ID: [gb|KP731872.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gb|KP731872.1) | Length: 4212 | Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 2005 to 2940 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment

statistics for

match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1689 bits(1872)	0.0	936/936(100%)	0/936(0%)	Plus/Plus

Séquence segment L 3087-4460

Identité maxi = 100%

Avec plusieurs séquences SBV de GenBank

Dont par exemple (1ère entrée) :

Schmallenberg virus isolate 96.1 segment L, complete sequence

Sequence ID: [gb|KM047418.1](#)|Length: 6864Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 3087 to 4460[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment

statistics for

match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2479 bits(2748)	0.0	1374/1374(100%)	0/1374(0%)	Plus/Plus

Annexe 2

SCHMALLEMBERG VIRUS IN ZOO RUMINANTS

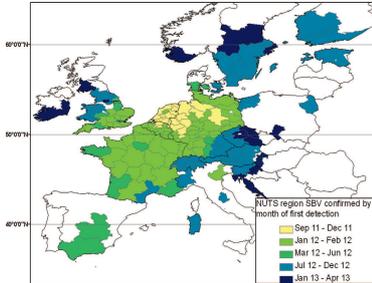
Braud C¹, Bourgeois A¹, Breard E², Kaandorp J³, Kohl M¹, Laloy E², Meyer G⁴, Rejaud C¹, Saillieu C², Viarouge C², Zientara S², Chai N¹



¹Ménagerie du Jardin des Plantes, Muséum National d'Histoire Naturelle, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, FRANCE; chai@mnhn.fr
²UMR Virologie 1161, ANSES/INRA/ENVA-UPEC, Laboratoire de Santé animale, ANSES, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort, FRANCE
³SafariPark Beekse Bergen, Beekse Bergen 1, 5081 NJ Hilvarenbeek, THE NETHERLANDS
⁴UMR 1225 IHAP Interaction Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex, FRANCE

INTRODUCTION

Schmallenberg virus (SBV) is a new Orthobunyavirus of the family Bunyviridae, transmitted by *Culicoides* spp biting midges. It emerged in 2011 in the North of Germany and since then, has spread to most parts of Europe.



Most infections are asymptomatic in adult ruminants but the virus can occasionally cause clinical signs such as milk drop, fever, anorexia and diarrhea. Infection of susceptible pregnant animals can lead to **abortion, stillbirth and congenital malformations** in newborn calves, lambs and goat kids.

The disease mainly affects livestock but antibodies against SBV have been found:

- in **free-ranging wild species**: the red deer (*Cervus elaphus*), the roe deer (*Capreolus caprolus*), the European bison (*Bison bonasus*), the elk (*Alces alces*), the chamois (*Rupicapra rupicapra*), the moufflon (*Ovis musimon*), the wild boar (*Sus scrofa*), the fallow deer (*Dama dama*), the sika deer (*Cervus nippon*).

- in **exotic species kept in captivity**: the bongo (*Tragelaphus eurycerus*), the babirusa (*Buru babirusa*), the banteng (*Bos javanicus*), the African forest buffalo (*Syncerus caffer nanus*), the gaur (*Bos gaurus*), the gemsbok (*Oryx gazella gazella*), the greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), the Grevy's zebra (*Equus grevyi*), the moose (*Alces alces*), the Nile lechwe (*Kobus megaceros*), the Nubian goat (*Capra aegagrus hircus*), the onager (*Equus hemionus*), the Pere David's deer (*Elaphurus davidianus*), the reindeer (*Rangifer tarandus*), the roan antelope (*Hippotragus equinus*), the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*), the sitatunga (*Tragelaphus spekii*) and the yak (*Bos grunniens*).

OBJECTIVE

This study was carried on to investigate the susceptibility to SBV of wild and exotic ruminants kept in two zoological parks in France and in the Netherlands.

MATERIALS AND METHODS

Sera were collected from wild and exotic ruminants from two zoos:
 • 43 samples (16 species) from SafariPark Beekse Bergen (BB), Hilvarenbeek, THE NETHERLANDS
 • 16 samples (9 species) from La Ménagerie du Jardin des Plantes, Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Paris, FRANCE

PART 1: Looking for antibodies to SBV: Detection of antibodies specific to SBV by ELISA ID Screen® SBV Competition (ID Vet, France) and by serum neutralisation test (SNT): the gold standard technique.

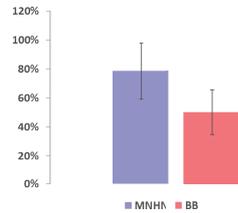
PART 2: Looking for the genome of SBV: RNA extraction and SBV-specific RT-qPCR on the S segment (FLI, Germany). Conventional RT-PCR on S, L, and M segments, sequencing and comparison to published sequences of SBV genome in GenBank.

PART 3: Looking for clinical signs that could be related to SBV infection: Retrospective analysis of medical records of all ruminants and correlation with laboratory analyses.

RESULTS

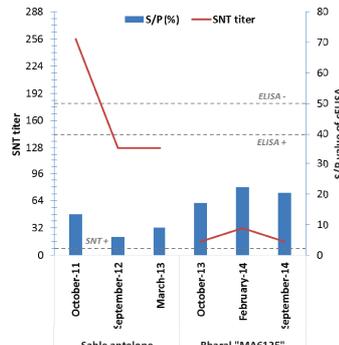
PART 1: Looking for antibodies to SBV

- Seroprevalence for SBV was high in each zoo, even in MNHN located in an urban area**



Estimated seroprevalence for SBV in each zoo between 2011 and 2015, as determined by SNT.

- Bharal and sable antelope: antibodies to SBV can persist up to 2 years in the same animal**



Monitoring of SBV antibodies evolution in 2 different species, as determined by SNT and ELISA.

1-year monitoring for the Sable antelope « Kifaranza » (BB);
 2-year monitoring for the Bharal « MA6125 » (MNHN).

- Antibodies specific to SBV were found in numerous ruminant species kept in captivity**

Number of positive results by species, as determined by SNT, in ruminants from MNHN and BB.

Species	Number of positive samples (total)
Blue wildebeest (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)	3 (5)
Springbok (<i>Antidorcas marsupialis</i>)	3 (5)
Sable antelope (<i>Hippotragus niger niger</i>)	3 (3)
Waterbuck (<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>)	1 (4)
Nyala (<i>Tragelaphus angasii</i>)	1 (2)
Père David's deer (<i>Elaphurus davidianus</i>)	1 (1)
Gemsbok (<i>Oryx gazella gazella</i>)	1 (1)
African buffalo (<i>Syncerus caffer caffer</i>)	1 (1)
Persian fallow deer (<i>Dama mesopotamica</i>)	1 (1)
Vietnamese sika deer (<i>Cervus nippon pseudaxis</i>)	1 (1)
Blackbuck (<i>Antelope cervicapra</i>)	0 (6)
Axis deer (<i>Cervus axis</i>)	0 (2)
Red forest duiker (<i>Cephalophus natalensis</i>)	0 (1)
Common eland (<i>Taurotragus oryx</i>)	0 (1)
Watussi (<i>Bos taurus watussi</i>)	0 (1)
Yak (<i>Bos grunniens grunniens</i>)	4 (5)
West caucasian tur (<i>Capra caucasica caucasica</i>)	3 (3)
Bharal (<i>Pseudois nayaur</i>)	2 (3)
Markhor (<i>Capra falconeri</i>)	2 (3)
Arkal urial sheep (<i>Ovis aries arkal</i>)	1 (1)
Rocky mountain goat (<i>Oreamnus americanus</i>)	1 (1)
Vigogna (<i>Vicugna vicugna</i>)	1 (1)
Gaur (<i>Bos gaurus</i>)	1 (1)
Pygmy goat (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	0 (1)

■ Samples from the BB
 ■ Samples from the MNHN
 ■ Samples from both zoos



PART 2: Looking for the genome of SBV

- The **genome of SBV was found in one sample collected in a blue wildebeest** (*Connochaetes taurinus taurinus*) in September 2011. Antibodies to SBV were not detected in this sample.
- We retrieved a 2871 bp sequence from the **M segment** that had **99,79% identity** with the sequence of the M segment from SBV isolate BH652/12 (GenBank: KP731872.1)
- We retrieved a 1374 bp sequence from the **L segment** that had **100% identity** with the sequence of the L segment from SBV isolate 96.1 (GenBank: KM047418.1)



PART 3: Looking for clinical signs that could be related to SBV infection

- Abortions reported in two bharals (*Pseudois nayaur*) in 2011 and 2012 (MNHN) and in one West Caucasian tur (*Capra caucasica caucasica*) in 2013 (MNHN).
- No obvious correlation** between the abortions and the serological results as sampling has not been conducted immediately afterwards. Unfortunately, no material from aborted fetuses has been tested by SBV RT-qPCR.



CONCLUSIONS

We found evidence of susceptibility to SBV in 18 wild and exotic ruminant species kept in captivity.

For the first time, we report antibodies to SBV in the following species:

the African buffalo (*Syncerus caffer caffer*), the sable antelope (*Hippotragus niger niger*), the arkal urial sheep (*Ovis aries arkal*), the bharal (*Pseudois nayaur*), the blue wildebeest (*Connochaetes taurinus taurinus*), the markhor (*Capra falconeri*), the nyala (*Tragelaphus angasii*), the Persian fallow deer (*Dama mesopotamica*), the Rocky Mountain goat (*Oreamnus americanus*), the springbok (*Antidorcas marsupialis*), the Vietnamese sika deer (*Cervus nippon pseudaxis*), the vigogna (*Vicugna vicugna*), the waterbuck (*Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus*), the West Caucasian tur (*Capra caucasica caucasica*).

For the first time, we report evidence of SBV viremia in a blue wildebeest (*Connochaetes taurinus taurinus*).

No evidence of a causal relationship between abortion and SBV but the limited set of data does not allow us to establish a definitive conclusion. We recommend testing the umbilical cord and the central nervous system of aborted fetuses by SBV-specific PCR.

Annexe 3

References

1. Regional action plan for the conservation of western lowland gorillas and central chimpanzees, 2015–2025 [cited 2016 Aug 2]. http://static1.1.sqspcdn.com/static/f/1200343/25932483/1423326166303/WEA_apes_plan_2014
2. Bermejo M, Rodríguez-Teijeiro JD, Illera G, Barroso A, Vilà C, Walsh PD. Ebola outbreak killed 5,000 gorillas. *Science*. 2006;314:1564. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1133105>
3. Nagel M, Dischinger J, Türk M, Verrier D, Oedenkoven M, Ngoubangoye B, et al. Human-associated *Staphylococcus aureus* strains within great ape populations in central Africa (Gabon). *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:1072–7. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12119>
4. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010;467:420–5. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09442>
5. Ochman H, Worobey M, Kuo C-H, Ndjango J-B, Peeters M, Hahn BH, et al. Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000546. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000546>
6. Subtil A, Collingro A, Horn M. Tracing the primordial Chlamydiae: extinct parasites of plants? *Trends Plant Sci*. 2014;19:36–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.005>
7. Ehrlich R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol Cell Probes*. 2006;20:60–3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>
8. Lienard J, Croxatto A, Aeby S, Jaton K, Posfay-Barbe K, Gervais A, et al. Development of a new Chlamydiae-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2637–42. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00114-11>
9. Baud D, Thomas V, Arafa A, Regan L, Greub G. *Waddlia chondrophila*, a potential agent of human fetal death. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1239–43. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1308.070315>
10. Baud D, Goy G, Osterheld M-C, Croxatto A, Borel N, Vial Y, et al. Role of *Waddlia chondrophila* placental infection in miscarriage. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:460–4. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2003.131019>

Address for correspondence: Beate Henrichfreise, Institute for Pharmaceutical Microbiology, University of Bonn, Meckenheimer Allee 168, Bonn 53115, Germany, email: bhenrich@uni-bonn.de

Schmallenberg Virus in Zoo Ruminants, France and the Netherlands

Eve Laloy, Cindy Braud, Emmanuel Bréard, Jacques Kaandorp, Aude Bourgeois, Muriel Kohl, Gilles Meyer, Corinne Sailleau, Cyril Viarouge, Stéphan Zientara, Norin Chai

Author affiliations: ANSES, Maisons-Alfort, France (E. Laloy, C. Braud, E. Bréard, C. Sailleau, C. Viarouge, S. Zientara); Safaripark Beekse Bergen, Hilvarenbeek, the Netherlands (J. Kaandorp); Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris,

France (A. Bourgeois, M. Kohl, N. Chai); École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France (G. Meyer)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2212.150983>

To the Editor: Schmallenberg virus (SBV), a new orthobunyavirus of the family *Bunyaviridae*, emerged in August 2011 in northwestern Europe (1) and spread to most parts of Europe by *Culicoides* vectors (2). Most infections are asymptomatic in adult ruminants, yet fever, milk drop, and diarrhea have been reported (1). SBV is responsible for congenital malformations in newborn calves, lambs, and goat kids and has also been associated with abortions and early embryonic losses (3). The virus affects domestic livestock, but antibodies to SBV have also been found in free-ranging wild ruminants in several European countries (3–6) and in wild and exotic ruminants kept in captivity in the United Kingdom and in Austria (3–5). We carried out a study to investigate the exposure to SBV of wild and exotic ruminants born in Europe and kept in 1 zoological park in France and 1 in the Netherlands.

We tested 42 serum samples (from 39 animals) collected between 2011 and 2014 in the Safaripark Beekse Bergen (SPBB, Hilvarenbeek, the Netherlands) and 18 serum samples (from 15 animals) collected between 2013 and 2015 in the Ménagerie du Jardin des Plantes, Muséum National d'Histoire Naturelle (MJP, Paris, France). First, we determined the presence of SBV-specific antibodies in the samples by ELISA (ELISA ID Screen SBV Competition; ID Vet, Grabels, France) and by virus neutralization test (VNT) according to a protocol previously described (7). The 2 methods gave identical results except for 5 samples found negative by ELISA and positive by VNT. Thirty (55.6%) of 54 animals were found to be seropositive by VNT, which is regarded as the standard for SBV detection (Table). Antibodies to SBV were found in 11 (73.3%) of 15 animals from MJP and 19 (48.7%) of 39 animals from SPBB. Positive results were found in samples collected every year during 2011–2015; the earliest positive result was found in a sample collected in September 2011 (SPBB).

Several seropositive ruminants from MJP were either born in Paris or transferred to Paris from another park in Europe before 2010, which suggests that they were exposed to SBV in Paris. SBV antibodies were found in 3 consecutive samples collected in October 2011, September 2012, and March 2013 from a sable antelope (*Hippotragus niger niger*) in SPBB but also in 3 consecutive samples collected in October 2013, February 2014, and September 2014 in a bharal (*Pseudois nayaur*) from MJP. These data suggest that SBV antibodies can persist for ≥ 1 year in these 2 species.

We then performed SBV-specific quantitative reverse transcription PCR targeting the small segment (8) of the virus on every sample. One sample from an SBV seronegative

Table. Results of virus neutralization testing for Schmallenberg virus among exotic and wild ruminants from 2 zoological parks in France and the Netherlands, 2011–2015*

Common name (species)	No. positive/no. tested	Year(s) of sampling	Animal ages at sampling		Zoological park
			Seropositive	Seronegative	
African buffalo (<i>Syncerus caffer caffer</i>)	1/1	2013	3 y		SPBB
Arkal urial sheep (<i>Ovis aries arkal</i>)	1/1	2014	5 y		MJP
Axis deer (<i>Cervus axis</i>)	0/2	2011–2014		ND, ND	SPBB
Bharal (<i>Pseudois nayaur</i>)	2/4	2013, 2014	1 d, 7 y, † 8 y†	10 d, 2 y	MJP
Blackbuck (<i>Antilope cervicapra</i>)	0/6	2014		7 mo, 7 y, 15 y, ND, ND, ND	SPBB
Blue wildebeest (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)	3/5	2011	1 y, 6 y, 13 y	1 y, 13 y	SPBB
Common eland (<i>Taurotragus oryx</i>)	0/1	2014		1 y	SPBB
Gaur (<i>Bos gaurus</i>)	1/1	2015	3 y		MJP
Gemsbok (<i>Oryx gazella gazella</i>)	1/1	2011	17 y		SPBB
Markhor (<i>Capra falconeri</i>)	2/3	2014	1 y, 10 y	1 y	MJP
Nyala (<i>Tragelaphus angasii</i>)	1/2	2012	5 y	ND	SPBB
Père David's deer (<i>Elaphurus davidianus</i>)	1/1	2011	15 y		SPBB
Persian fallow deer (<i>Dama mesopotamica</i>)	1/1	2013	8 y		SPBB
Pygmy goat (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	0/1	2014	2 y		MJP
Red forest duiker (<i>Cephalophus natalensis</i>)	0/1	2011, 2012		7 y, † 8 y†	SPBB
Rocky mountain goat (<i>Oreamnus americanus</i>)	1/1	2014	17 y		MJP
Sable antelope (<i>Hippotragus niger niger</i>)	3/3	2011, 2012, 2013	4 y, 5 y, † 6 y, † 7 y, † 10 y		SPBB
Springbok (<i>Antidorcas marsupialis</i>)	3/5	2011, 2014	5 y, 14 y, ND	4 y, 5 y	SPBB
Vietnamese sika deer (<i>Cervus nippon pseudaxis</i>)	1/1	2014	12 y		SPBB
Vigogna (<i>Vicugna vicugna</i>)	1/1	2013	4 y		MJP
Waterbuck (<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>)	1/4	2011, 2014	7 y	6 mo, 4 y, ND	SPBB
Watusi (<i>Bos taurus taurus watusi</i>)	0/1	2011		1 y	SPBB
West Caucasian tur (<i>Capra caucasica caucasica</i>)	2/2	2014	10 y, 14 y		MJP
Yak (<i>Bos grunniens grunniens</i>)	4/5	2012, 2013, 2014	2 y, 3 y, 11 y, ND	1 y	SPBB (4), MJP (1)

*MJP, Ménagerie du Jardin des Plantes (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France); ND, not determined; SPBB, Safaripark Beekse Bergen (Hilvarenbeek, the Netherlands).

† Animals sampled more than once.

blue wildebeest (*Connochaetes taurinus taurinus*) collected in September 2011 in SPBB was positive (quantitation cycle value = 30), whereas the other samples were negative. We also performed several in-house conventional reverse transcription PCR targeting the small, large, and medium segments on the positive sample, which enabled us to retrieve a 2,866-bp partial sequence from the medium segment (deposited in GenBank under accession no. KR828816) and a 1,374-bp partial sequence from the L segment (deposited in GenBank under accession no. KR828815). Genetic analyses based on BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) revealed that the large and medium partial sequences had 100% and 99.79% identity, respectively, with SBV sequences from cows (GenBank accession nos. KM047418 and KP731872, respectively).

Subcutaneous inoculation of serum to adult IFNAR^{-/-} mice, which have been reported to be susceptible to SBV infection (9,10), did not trigger any clinical sign or seroconversion. No genome could be amplified from their blood.

According to the medical records of SPBB, no clinical signs possibly related to an SBV infection were observed in the ruminants during the period studied. Abortions were

reported in MJP in 2 bharals in 2011 and 2012 and in 1 West Caucasian tur (*Capra caucasica caucasica*) in 2013, but no correlation could be drawn between these abortions and the SBV serologic results.

This study demonstrates the circulation of SBV in 18 wild and exotic ruminant species kept in captivity in the Netherlands and in France during 2011–2015. Exposure to the virus may occur even in an urban area (such as central Paris). We report evidence of SBV viremia in a blue wildebeest that was seronegative by ELISA and VNT when the serum was collected. SBV RNA has previously been found in an elk (6), but the duration of viremia was not determined. Further investigations are required to determine whether zoo ruminants may play a role in dissemination of SBV.

Acknowledgments

We are grateful to Dylan Duby and Claire Réjaud. We thank Manjula Deville and Marc Chodkiewicz for editing the manuscript.

This study was supported and financed by the Muséum National d'Histoire Naturelle (grant identification: ATM—Collections vivantes 2014 and 2015).

References

- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirmer H, et al. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:469–72. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111905>
- Wernike K, Conraths F, Zanella G, Granzow H, Gache K, Schirmer H, et al. Schmallenberg virus—two years of experiences. *Prev Vet Med*. 2014;116:423–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.021>
- Steinrigl A, Schiefer P, Schleicher C, Peinhopf W, Wodak E, Bagó Z, et al. Rapid spread and association of Schmallenberg virus with ruminant abortions and foetal death in Austria in 2012/2013. *Prev Vet Med*. 2014;116:350–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.006>
- EFSA (European Food Safety Authority). Schmallenberg virus: state of the art. *EFSA journal*. 2014;12(5):3681 [cited 2015 May 17]. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3681.htm>
- Molenaar FM, La Rocca SA, Khatri M, Lopez J, Steinbach F, Dastjerdi A. Exposure of Asian elephants and other exotic ungulates to Schmallenberg virus. *PLoS One*. 2015;10:e0135532. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0135532>
- Larska M, Krzysiak M, Smreczak M, Polak MP, Zmudziński JF. First detection of Schmallenberg virus in elk (*Alces alces*) indicating infection of wildlife in Białowieża National Park in Poland. *Vet J*. 2013;198:279–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.013>
- Bréard E, Lara E, Comtet L, Viarouge C, Doceul V, Desprat A, et al. Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapsid recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS One*. 2013;8:e53446. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053446>
- Bilk S, Schulze C, Fischer M, Beer M, Hlinak A, Hoffmann B. Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet Microbiol*. 2012;159:236–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.035>
- Wernike K, Breithaupt A, Keller M, Hoffmann B, Beer M, Eschbaumer M. Schmallenberg virus infection of adult type I interferon receptor knock-out mice. *PLoS One*. 2012;7:e40380. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040380>
- Ponsart C, Pozzi N, Bréard E, Catinot V, Viard G, Sailleau C, et al. Evidence of excretion of Schmallenberg virus in bull semen. *Vet Res*. 2014; 45:37.

Address for correspondence: Eve Laloy, UMR Virologie 1161 (ANSES/INRA/ENVA), Laboratoire de Santé animale, ANSES, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort, France; eve.laloy@vet-alfort.fr

Fatal Case of West Nile Neuroinvasive Disease in Bulgaria

Magdalena Baymakova, Iva Trifonova, Elitsa Panayotova, Severina Dakova, Monia Pacenti, Luisa Barzon, Enrico Lavezzo, Yancho Hristov, Konstantin Ramshev, Kamen Plochev, Giorgio Palu, Iva Christova

Author affiliations: Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria (M. Baymakova, S. Dakova, Y. Hristov, K. Ramshev, K. Plochev); National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Sofia (I. Trifonova, E. Panayotova, I. Christova); Padova University Hospital, Padova, Italy (M. Pacenti); University of Padova, Padova (L. Barzon, E. Lavezzo, G. Palu)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2212.151968>

To the Editor: West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne flavivirus. Approximately 80% of human infections are asymptomatic, 10%–20% are characterized by an acute febrile illness, and <1% by involvement of the central nervous system (West Nile neuroinvasive disease) (1). Sporadic human cases and small outbreaks of West Nile fever were reported in Europe until the mid-1990s (2), when the first large outbreak occurred in Romania in 1996 (3).

Since then, and especially in recent years, sporadic human cases and outbreaks have been reported in other countries in Europe and neighboring countries on the Balkan Peninsula (2). A large outbreak of WNV lineage 2 infection occurred in Greece in 2010 (4). Outbreaks have also been reported in other countries in Europe, which showed spread of WNV lineage 2 (5–8). Some probable cases of West Nile fever were reported to the Bulgarian Ministry of Health on the basis of serologic test results.

We report a case of fatal West Nile neuroinvasive disease in a man in Bulgaria. This case was confirmed by detection of specific antibodies against WNV and sequencing of the full virus genome.

A 69-year-old man was admitted to the Emergency Center, Military Medical Academy (Sofia, Bulgaria), on August 27, 2015, because of fever, headache, hand tremor, muscle weakness and disability of lower extremities, nausea, and vomiting. These signs and symptoms developed 3 days before hospitalization. The patient reported being bitten by insects through the summer. He also had concomitant cardiovascular disease. In the 24-hour period after hospitalization, a consciousness disorder and deterioration of the extremities' weakness developed, and the patient had a Glasgow come score ≤ 8 .

The patient was transferred to Department of Intensive Care. Neurologic examination showed neck stiffness, positive bilateral symptoms of Kernig and Brudzinski, right facial paralysis, and areflexia of the lower extremities. The patient underwent intubation, and despite complex medical therapy, a cardiopulmonary disorder developed, and he died 14 days after admission.

Laboratory test results at admission were within reference ranges. Lumbar puncture was performed, and cerebrospinal fluid (CSF) testing showed a clear color, leukocytes 39×10^6 cells/L (reference range $0\text{--}5 \times 10^6$ cells/L), polymorphonucleocytes 2% (0%–6%), lymphocytes 93%

Annexe 4

Le protocole d'extraction sur billes magnétiques présenté ci-après est utilisable indifféremment avec les automates KingFisher™ mL et KingFisher™ 96/Flex. En effet, seul le nombre d'échantillons traités diffère.

Avant de commencer :

- Reconstitution de la solution **NM1** : Transvaser la totalité de la **solution N1** (100 ml) dans la bouteille contenant la **solution M1** (25 ml) et bien vortexer. Le tampon de lyse NM1 (125 ml) ainsi obtenu est stable 1 an à température ambiante.
- Reconstitution de la solution **NM2+Billes** : Chaque réaction requiert 20 µL de **NM_LSI_Beads** et 600 µL de **NM2 binding buffer**. Il est conseillé de reconstituer cette solution juste avant utilisation et de ne pas la conserver ensuite. Bien homogénéiser la solution contenant les billes en la vortexant juste avant utilisation.
- Préparer et identifier le nombre de microtubes, de barrettes d'extraction et de plaques d'extraction correspondant au nombre d'échantillons à extraire (comprenant les témoins négatifs et positifs).

Protocole :

1. Préparer les consommables pour la série d'extraction :

- Pour l'automate KingFisher™ mL : sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes d'extraction dessus pour distribution des tampons sur paillasse.
- Pour l'automate KingFisher™ 96/Flex : les tampons seront distribués dans les plaques sur paillasse.

2. Réaliser la lyse et la purification des échantillons suivant le protocole fourni :

3. Après distribution de ces tampons, ajouter **620 µL** de solution **NM2+Billes (ou 600 µL de NM2 et 20 µL de billes)** pour chaque échantillon dans le puit en **position A** de la barrette ou la **plaque 1** (selon l'automate utilisé).

4. Positionner les peignes protecteurs des barreaux aimantes.

5. Placer les barrettes ou plaques dans l'automate.

6. Lancer le run d'extraction :

- Script **NM_LSI_15prep** pour l'automate KingFisher™ mL
- Script **NM_LSI_RRC96** pour l'automate KingFisher™ 96/Flex

7. A la fin du run d'extraction :

- Sur l'automate KingFisher™ mL : transférer les **éluats** en **position E de la barrette d'extraction** dans des microtubes préalablement identifiés.

- Sur l'automate KingFisher™ 96/Flex : recouvrir la plaque d'élution (**plaque 5**) avec un film adapté.

- Jeter les autres consommables plastiques utilisés pour l'extraction (plaques, barrettes, peignes).

Maintenir les éluats obtenus (plaque fermée ou microtube) entre 2 °C et 8 °C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de -16 °C.

Annexe 5

Conduite à tenir en cas de suspicion clinique d'infection par le virus Schmallerberg

Pour toute suspicion d'infection par le virus, une fiche de renseignement est complétée par un vétérinaire sanitaire.

L'animal visé par la suspicion fait l'objet d'un prélèvement (sang sur EDTA et sérum (animal vivant), cerveau ou rate (animal mort)). Si l'avorton ou la carcasse date de plus de 24 heures, alors la mère de celui-ci fait l'objet d'un prélèvement de sang. Les recommandations relatives aux prélèvements à réaliser sont présentées au tableau 1.

Tableau 1. Prélèvements à réaliser dans le cadre d'une suspicion d'infection par le virus Schmallerberg

Animal vivant	Animal mort (carcasse ou avorton < 24 heures)
Sang sur EDTA et sérum (tube sec)	Rate ou cerveau
Volume minimal à prélever : 2 mL	Poids minimal à prélever 1g, maximum 10 g
Conservation à + 4°C Ne pas congeler	Acheminement sous froid positif (+ 4°C) Si transport supérieur à 48 heures : congeler (-20°C)
	Si la carcasse ou l'avorton a plus de 24 heures, réaliser un prélèvement de sang chez la mère (sur EDTA et tube sec)

Le prélèvement et la fiche de renseignement correspondante sont transmis au LDA. Une copie de la fiche de renseignement est transmise à la DDecPP concernée qui étudie la légitimité de la suspicion (conformité avec les définitions de cas). La DDecPP informe immédiatement la DGAI de toute suspicion légitime (envoi d'une copie scannée de la fiche de suspicion à bsa.sdspa.dgal@agriculture.gouv.fr, avec pour objet du message :: « DDecPP ___ / virus Schmallerberg / suspicion clinique ». Les prélèvements relatifs à une suspicion clinique légitime et la fiche de renseignement correspondante sont immédiatement transmis par le LDA au Laboratoire de santé animale Anses de Maisons-Alfort où sont réalisées des analyses virologiques (RT-PCR « virus Schmallerberg » développée par le Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) disponible au Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort, unité de virologie).

ANSES - Laboratoire de santé animale - Maisons-Alfort
UMR 1161 Virologie
22, rue Pierre Curie
94703 MAISONS-ALFORT CEDEX
Tél. : 01.49.77.13.00 (standard)
Télécopie : 01 43 68 97 62

Annexe II : Fiche de renseignement

Suspicion clinique d'infection par le virus Schmallerberg - N°DDecPP (dpt/num.ordre) :/.....

VETERINAIRE DECLARANT
Nom _____
Prénom _____
E-mail _____
Date de la visite ____/____/____

EXPLOITATION
N°EDE Cheptel _____
Département ____ Commune _____
Espèce(s) présente(s) dans le cheptel et effectif(s) approximatif(s) d'animaux adultes :
Bovins _____ Porcins _____
Ovins _____ Equidés _____
Caprins _____

ANIMAL SUSPECT
N° identification (ou celui de sa mère) _____
Espèce _____
Age (si né à terme) _____
Stade de gestation (si avorton) _____
Description des malformations ou des troubles neurologiques observés

PRELEVEMENT
Nature du prélèvement _____
Si le prélèvement n'a pas pu être réalisé chez l'animal suspect (carcasse de plus de 24 heures), quel animal a été prélevé ? _____
Laboratoire destinataire _____

AUTRE CAS
D'autres cas de malformations ou de troubles neurologiques chez des nouveau-nés ont-ils été observés au cours des trois mois écoulés ? Si oui, préciser pour chaque cas la date et l'espèce concernée.

Des cas de diarrhée, chute de production, hyperthermie ou avortement ont-ils été observés dans l'élevage (depuis le printemps 2011, en particulier chez la mère) ? Si oui préciser, la période, les symptômes observés et le nombre et l'espèce des animaux atteints.

Prélèvement Date réception LDA/...../..... Date réception LSAN/...../..... Qualité bon mauvais
Fiche Date réception DDecPP...../...../..... Renseignement bon mauvais Suspicion validée oui non
Résultat Date résultat/...../..... Date rendu vétérinaire/...../.....

BIBLIOGRAPHIE

AEBISCHER A, WERNIKE K, HOFFMANN B, AND BEER M (2014). Rapid genome detection of Schmallenberg virus and bovine viral diarrhoea virus by use of isothermal amplification methods and high-speed real-time reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1883–1892.

AFONSO A, ABRAHANTES J.C, CONRATHS F, VELDHUIS A, ELBERS A, ROBERTS H, VAN DER STEDE Y, MÉROC E, GACHE K AND RICHARDSON J (2014). The Schmallenberg virus epidemic in Europe-2011-2013. *Prev. Vet. Med.* 116, 391–403.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW ET LIPMAN DJ (1990) « Basic local alignment search tool », *Journal of molecular biology*, vol. 215, no 3, 5 octobre, p. 403-10

ARNAUD F, BLACK S.G, MURPHY L, GRIFFITHS D.J., NEIL S.J., SPENCER T.E AND PALMARINI M. (2010). Interplay between Ovine Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2/Tetherin and Endogenous Retroviruses. *J. Virol.* 84, 4415–4425.

ANONYMOUS (2014). Technical and scientific studies on Schmallenberg virus - final report about “Commission Implementing Decision of 27 June 2012 supporting studies on Schmallenberg virus by the five-country consortium of veterinary research institutes”.

AUGOT D ET AL. (2012) Surveillance et contrôle des Culicoides vecteurs de la fièvre catarrhale du mouton en France. Centre National d'Expertise sur les Vecteurs, rapport sur l'analyse du cadre actuel de gestion et propositions d'amélioration, 4-31

AZKUR A.K, ALBAYRAK H, RISVANLI A, PESTIL Z, OZAN E, YILMAZ O, TONBAK S, CAVUNT A, KADI H, MACUN H.C, ET AL (2013). Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1825–1828.

BALENGHIEN T., DELÉCOLLE J.C, SETIER-RIO M.L, RAKOTOARIVONY I, ALLÈNE X, VENAIL R, DELÉCOLLE D, LHOIR J (2012) .Vecteurs du virus de la fièvre catarrhale ovine : suivi des populations de culicoides en 2011 en France. *Bulletin Epidémiologique, Santé Animale, Alimentation, Spécial MRE, Bilan 2011*, 54, 35-40.

BALMER S, VÖGTLIN A, THÜR B, BÜCHI M, ABRIL C, HOUMARD M, DANUSER J, et SCHWERMER H (2014). Serosurveillance of Schmallenberg virus in Switzerland using bulk tank milk samples. *Prev. Vet. Med.* 116, 370–379.

BARLOW A, GREEN P, BANHAM T, HEALY N (2013). Serological confirmation of SBV infection in wild British deer. *Vet Rec.*;172:429.

BERG AL, RAID-SMITH R, LARSON M, BONNETT B.(1998) Case control study of feline Bornavirus in Sweden. *Vet Rec.*;142:715–7.

- BESSELL P.R, AUTY H.K, SEARLE K.R, HANDEL I.G., PURSE B.V AND DE C BRONSVOORT B.M (2014). Impact of temperature, feeding preference and vaccination on Schmallenberg virus transmission in Scotland. *Sci. Rep.* 4, 5746.
- BILK S, SCHULZE C, FISCHER M, BEER M, HLINAK A AND HOFFMANN B (2012). Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet. Microbiol.* 159, 236–238.
- BLOMSTRÖM A.-L, STENBERG H, SCHARIN I, FIGUEIREDO J, NHAMBIRRE O, ABILIO A.P, FAFETINE J AND BERG M (2014). Serological screening suggests presence of Schmallenberg virus in cattle, sheep and goat in the Zambezia Province, Mozambique. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 289–292.
- BLOMSTRÖM A.-L, GU Q, BARRY G, WILKIE G, SKELTON J.K, BAIRD M, MCFARLANE M, SCHNETTLER E, ELLIOTT R.M, PALMARINI M. ET AL. (2015). Transcriptome analysis reveals the host response to Schmallenberg virus in bovine cells and antagonistic effects of the NSs protein. *BMC Genomics* 16, 324.
- BLUNDELL A. G, & MASCIA M. B (2005). Discrepancies in reported levels of international wildlife trade. *Conservation Biology*, 19(6), 2020-2025.
- BOULOY M, JANZEN, VIALAT P, KHUN H, PAVLOVIC J, HUERRE M ET HALLER O (2001). Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of Rift Valley fever virus nonstructural protein NSs. *Journal of Virology*, 75, 1371–1377
- BOUWSTRA R.J, KOOI E.A, DE KLUIJVER E.P, VERSTRATEN E.R. A. M, BONGERS J.H, VAN MAANEN C, WELLENBERG G.J, VAN DER SPEK A.N AND VAN DER POEL W.H.M. (2013). Schmallenberg virus outbreak in the Netherlands: routine diagnostics and test results. *Vet. Microbiol.* 165, 102–108.
- BRAVERMAN Y. ET CHEICHIK F (1996). Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Revue Scientifique et Technique*, 15, (3), 1037-1052
- BRÉARD E, LARA E, COMTET L, VIAROUGE C., DOCEUL V, DESPRAT A, VITOUR D, POZZI N, BRIGITTE CAY A, DE REGGE N, POURQUIER P, SCHIRRMIEIER H, HOFFMANN B, BEER M, SAILLEAU C ET ZIENTARA S (2013). Validation of a Commercially Available Indirect Elisa Using a Nucleocapside Recombinant Protein for Detection of Schmallenberg Virus Antibodies. [en ligne], <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0053446>, (page consultée le 3 juillet 2013)
- BRIESE T, CALISHER C.H AND HIGGS S (2013). Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology* 446, 207–216.
- CARPENTER S, MELLOR P.S. ET TORR S.J (2008) Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the U.K. And northwestern Palaearctic. *Medical and*

Veterinary Antomology, 22, (3), 175-187

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2010). 2009 H1N1 Flu : International Situation update. [en ligne], <http://www.cdc.gov/h1n1flu/updates/international/>, (page consultée le 10 juillet 2013)

CHAIKOUTIS S.C, KIOSSIS E, GIADINIS N.D, BROZOS C.N, SAILLEAU C, VIAROUGE C, BRÉARD E, PAPANASTASSOPOULOU M, ZIENTARA S, PAPADOPOULOS O ET AL. (2014). Evidence of Schmallenberg virus circulation in ruminants in Greece. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 251– 255.

CHENAIS E, STÅHL K, FRÖSSLING J, BLOMQVIST G, NÄSLUND K, SVENSSON L, RENSTRÖM L, MIEZIEWSKA K, ELVANDER M AND VALARCHER J.F. (2013). Schmallenberg Virus beyond Latitude 65°N. *Transbound. Emerg. Dis.*

CHIARI M, SOZZI E, ZANONI M, ALOBORALI LG, LAVAZZA A, CORDIOLI P (2014) Serosurvey for Schmallenberg virus in alpine wild ungulates. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61:1–3.

CHIPPAUX A (2003) Généralités sur arbovirus et arboviroses. *Médecine et maladies infectieuses* 377–384.

CLAINE F, COUPEAU D, WIGGERS L, MUYLKENS B et KIRSCHVINK N (2013). Schmallenberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1115– 1117

COLLIN E, DOMINGUEZ M. ET CALAVAS D (2012). Description clinique de l'infection aiguë des bovins par le virus Schmallenberg. Résultats d'une enquête en France, été 2012. [en ligne], <http://www.plateforme-esa.fr/images/documents/2012115etudesbvaigu.pdf>, (page consultée le 10 juin 2013)

CONRATHS FJ, PETERS M, BEER M. Schmallenberg virus, a novel orthobunyavirus infection in ruminants in Europe: potential global impact and preventive measures. *N Z Vet J.* 2013;61:63–67.

COUPEAU D, CLAINE F, WIGGERS L, KIRSCHVINK N, MUYLKENS B. (2013). In vivo and in vitro identification of a hypervariable region in Schmallenberg virus. *J. Gen. Virol.* 94, 1168–1174.

DALY J.M, KING B, TARLINTON R.A, GOUGH K.C, MADDISON B.C, AND BLOWEY R. (2015). Comparison of Schmallenberg virus antibody levels detected in milk and serum from individual cows. *BMC Vet. Res.* 11, 56.

DASZAK P, CUNNINGHAM AA HYATT AD. Wildlife ecology—emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science* 2000;287:443–9.

DEKEL Y MACHLUF Y, BEN-DOR S, YIFA O, STOLER A, BEN-SHLOMO I, BERCOVICH D. Dispersal of an ancient retroposon in the TP53 promoter of Bovidae: phylogeny, novel mechanisms, and potential implications for cow milk persistency. *BMC*

Genomics. 2015 Feb 5;16:53

DE REGGE N, DEBLAUWE I, DE DEKEN R, VANTIEGHEM P, MADDER M, GEYSEN D., SMEETS F, LOSSON B, VAN DEN BERG T, AND CAY A.B (2012). Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 471–475.

DE REGGE N, VAN DEN BERG T, GEORGES L, AND CAY B. (2013). Diagnosis of Schmallenberg virus infection in malformed lambs and calves and first indications for virus clearance in the fetus. *Vet. Microbiol.* 162, 595–600.

DE REGGE N, MADDER M, DEBLAUWE I, LOSSON B, FASSOTTE C, DEMEULEMEESTER J, SMEETS F, TOMME M, et CAY A.B (2014). Schmallenberg virus circulation in *Culicoides* in Belgium in 2012: field validation of a real time RT-PCR approach to assess virus replication and dissemination in midges. *PloS One* 9, e87005.

DESMECHT, D., GARIGLIANY, M.-M., BEER, M., SCHIRRMEIER, H., PATERNOSTRE, J., VOLPE, R., AND LINDEN, A. (2013). Detection of antibodies against Schmallenberg virus in wild boars, Belgium, 2010-2012. In: *Proceedings of the 31th Congress of the International Union of Game Biologists* (Brussels, Belgium).

DOMINGUEZ, M., GACHE, K., TOURATIER, A., PERRIN, J.-B., FEDIAEVSKY, A., COLLIN, E., BRÉARD, E., SAILLEAU, C., VIAROUGE, C., ZANELLA, G., ET AL. (2014). Spread and impact of the Schmallenberg virus epidemic in France in 2012-2013. *BMC Vet. Res.* 10, 248.

DORLAND WAN. *Dorland's illustrated medical dictionary*. London: W.B.Saunders; 1994.

DUCOMBLE, T., WILKING, H., STARK, K., TAKLA, A., ASKAR, M., SCHAADÉ, L., NITSCHÉ, A., AND KURTH, A. (2012). Lack of evidence for Schmallenberg virus infection in highly exposed persons, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1333–1335.

EFSA (2013) “Schmallenberg” virus: analysis of the epidemiological data (May 2013). EFSA Supporting Publications 2013. EN-3429.

EFSA (2014). Schmallenberg virus: State of the Art. *EFSA journal* 2014; 12(5):3681, 54 pp.

ELBERS AR, LOEFFEN WL, QUAK S, DE BOER-LUIJTZ E, VAN DER SPEK AN, BOUWSTRA R, MAAS R, SPIERENBURG MA, DE KLUIJVER EP, VAN SCHAIK G, VAN DER POEL WH. Seroprevalence of Schmallenberg virus antibodies among dairy cattle, the Netherlands, winter 2011–2012. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1065–1071.

ELBERS A.R.W, MEISWINKEL R, VAN WEEZEP E, SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN M.M, et KOOI E.A (2013a). Schmallenberg virus in *Culicoides* spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 106–109.

ELBERS, A.R.W., MEISWINKEL, R., VAN WEEZEP, E., KOOI, E.A., AND VAN DER POEL, W.H.M. (2013b). Schmallenberg Virus in *Culicoides* Biting Midges in the Netherlands

in 2012. *Transbound. Emerg. Dis.* DOI 10.1111/tbed.12128.

ELBERS AR, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N, VAN DER POEL WH. Schmallenberg virus antibodies in adult cows and maternal antibodies in calves. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:901–902.

ELLIOTT R.M, BLAKQORI G, VAN KNIPPENBERG I.C, KOUDRIAKOVA E, LI P, MCLEES A, SHI X et SZEMIEL, A.M. (2013). Establishment of a reverse genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe. *J. Gen. Virol.* 94, 851–859.

FISCHER M, SCHIRRMEIER H, WERNIKE K, WEGELT A, BEER M et HOFFMANN B (2013b). Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic PCR systems. *Virol. J.* 10, 327.

FISCHER M, SCHIRRMEIER H, WERNIKE K, WEGELT A, BEER M et HOFFMANN B (2013b). Development of a pan-Simbu real-time reverse transcriptase PCR for the detection of Simbu serogroup viruses and comparison with SBV diagnostic PCR systems. *Virol. J.* 10, 327.

FRANCE AGRIMER COMITE BOVIN VIANDE Données arrêtées au 21 Septembre 2016. Conjoncture Viande rouge L'analyse économique de FrancAgriMer. 21 Septembre 2016.

GARIGLIANY MM, BAYROU C, KLEIJNEN D, CASSART D, JOLLY S, LINDEN A. & DESMERCHT D (2012) Schmallenberg virus: a new Shamonda/Sathuperi-like virus on the rise in Europe. *Antiviral Research* 95, 82-87

GARIGLIANY MM, BAYROU C, KLEIJNEN D, CASSART D, DESMECHT D. Schmallenberg virus in domestic cattle, Belgium, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1512–1514. doi: 10.3201/eid1809.120716.

GARIGLIANY MM, DESMECHT D, BAYROU C et PEETERS D (2013). No serologic evidence for emerging Schmallenberg virus infection in dogs (*Canis domesticus*). *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 13, 830–833.

GOFFREDO M, ROMEO G, MONACO F, DI GENNARO A et SAVINI G (2004). Laboratory survival and blood feeding response of wild-caught *Culicoides obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. *Vet. Ital.* 40, 282–285.

GOLLER K.V, HÖPER D, SCHIRRMEIER H, METTENLEITER T.C et BEER, M (2012). Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1644–1646.

GRAY JE (1821). On the natural arrangement of Vertebrate Animals. *London Medical Repository* 15 : 296–310

GUBBINS S, TURNER J, BAYLIS M, VAN DER STEDE Y, VAN SCHAIK G, ABRAHANTES J.C et WILSON A.J (2014a). Inferences about the transmission of

Schmallenberg virus within and between farms. *Prev. Vet. Med.* 116, 380–390.

HAHN K, HABIERSKI A, HERDER V, WOHLSEIN P, PETERS M, HANSMANN F et BAUMGÄRTNER W (2013). Schmallenberg virus in central nervous system of ruminants. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 154–155.

HAYDON ET AL. Identifying Reservoirs of Infection: A Conceptual and Practical Challenge *Emerging Infectious Diseases* • Vol. 8, No. 12, December 2002

HELMER C, EIBACH R, TEGTMEYER P.C, HUMANN-ZIEHANK E, et GANTER M (2013). Survey of Schmallenberg virus (SBV) infection in German goat flocks. *Epidemiol. Infect.* 141, 2335–2345.

HELMER C, EIBACH R, TEGTMEYER P.C, HUMANN-ZIEHANK E, RUNGE M, et GANTER M (2015). Serosurvey of Schmallenberg Virus Infections in Sheep and Goat Flocks in Lower Saxony, Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 425–436.

HERDER V, WOHLSEIN P, PETERS M, HANSMANN F et BAUMGÄRTNER W (2012). Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallenberg virus in Germany. *Vet. Pathol.* 49, 588–591.

HERDER V, HANSMANN F, WOHLSEIN P, PETERS M, VARELA M, PALMARINI M et BAUMGÄRTNER W (2013). Immunophenotyping of Inflammatory Cells Associated with Schmallenberg Virus Infection of the Central Nervous System of Ruminants. *PLoS ONE* 8, e62939.

HENDERSON IF, HENDERSON WD. *Henderson's dictionary of biological terms.* London: Longman Scientific & Technical; 1989.

HOFFMANN A.R, WELSH C.J, VARNER P.W, DE LA CONCHA-BERMEJILLO A, BALL J.M, AMBRUS A et EDWARDS J.F (2012a). Identification of the target cells and sequence of infection during experimental infection of ovine fetuses with Cache Valley virus. *J. Virol.* 86, 4793–4800.

HOFFMANN B, SCHEUCH M, HOPER D, JUNGBLUT R, HOLSTEG M, SCHIRRMIEIER H, ESCHBAUMER M, GOLLER KV, WERNIKE K, FISCHER M, BREITHAUPT A, METTENLEITER TC, BEER M. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:469–472. doi: 10.3201/eid1803.111905.

Hofmann, M.A., Mader, M., Flückiger, F., and Renzullo, S. (2015). Genetic stability of Schmallenberg virus in vivo during an epidemic, and in vitro, when passaged in the highly susceptible porcine SK-6 cell line. *Vet. Microbiol.* 176, 97–108.

HORIKITA T, YOSHINAGA S, OKATANI A.T, YAMANE I, HONDA E et HAYASHIDANI H (2005). Loss of milk yield due to Akabane disease in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 67, 287–290.

HUMPHRIES D et BURR P (2012). Schmallenberg virus milk antibody ELISA. *Vet. Rec.* 171, 511–512.

JACK C, ANSTAETT O, ADAMS R, NAOD J, BROWNLIE, MERTENS P (2012): Evidence of seroconversion to SBV in camelids. *Vet. Rec.* 170, 603.

JOHNSON A, BRADSHAW B, BOLAND C et ROSS P (2014). A bulk milk tank study to detect evidence of spread of Schmallenberg virus infection in the south-west of Ireland in 2013. *Ir.Vet. J.* 67, 11.

KOENRAADT C.J, BALENGHIEN T, CARPENTER S, DUCHEYNE E, ELBERS A.R, FIFE M, GARROS C, IBÁÑEZ-JUSTICIA A, KAMPEN H, KORMELINK R.J et AL (2014). Bluetongue, Schmallenberg - what is next? *Culicoides*-borne viral diseases in the 21st Century. *BMC Vet. Res.* 10, 77.

KONNO S et NAKAGAWA M (1982). Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. *Experimental disease. Vet. Pathol.* 19, 267–279.

KONNO S, MORIWAKI M et NAKAGAWA M (1982). Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. *Spontaneous disease. Vet. Pathol.* 19, 246–266.

KRAATZ F, WERNIKE K, HECHINGER S, KÖNIG P, GRANZOW H, REIMANN I et BEER M (2015). Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge. *J. Virol.* 89, 1825–1837.

KUROGI H, INABA Y, TAKAHASHI E, SATO K, ET GOTO, Y. (1977). Experimental infection of pregnant goats with Akabane virus. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)* 17, 1–9.

LOSSON B, MIGNON B, PATERNOSTRE J, MADDER M, DE DEKEN R, DE DEKEN G, et AL. 2007. Biting midges overwintering in Belgium. *Veterinary Record*, 160, (13), 451-452

LALOY E, BREARD E, SAILLEAU C, VIAROUGE C, DESPRAT A, ZIENTARA S, KLEIN F, HARS J, ROSSI S. Schmallenberg virus infection among red deer, France, 2010–2012. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:131–134.

LARSKA M, KRZYSIAK M, SMRECZAK M, POLAK M.P ET ZMUDZIŃSKI J.F (2013a). First detection of Schmallenberg virus in elk (*Alces alces*) indicating infection of wildlife in Białowieża National Park in Poland. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 198, 279–281.

LARSKA M, LECHOWSKI L, GROCHOWSKA M ET ŻMUDZIŃSKI J.F (2013B). Detection of the Schmallenberg virus in nulliparous *Culicoides obsoletus/scoticus* complex and *C. punctatus*-- the possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet. Microbiol.* 166, 467–473.

LARSKA M, KRZYSIAK M.K, KĘSIK-MALISZEWSKA J AND ROLA J. (2014). Cross-sectional study of Schmallenberg virus seroprevalence in wild ruminants in Poland at the end of the vector season of 2013. *BMC Vet. Res.* 10, 967.

LAZUTKA J, ZVIRBLIENE A, DALGEDIENE I, PETRAITYTE-BURNEIKIENE R, SPAKOVA A, SEREIKA V, LELESIUS R, WERNIKE K, BEER M ET SASNAUSKAS, K. (2014). Generation of Recombinant Schmallenberg Virus Nucleocapsid Protein in Yeast and

Development of Virus- Specific Monoclonal Antibodies. *J. Immunol. Res.* 2014.

LEASK R, BOTHA A.M ET BATH, G.F (2013). Schmallerberg virus--is it present in South Africa? *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 84, E1–E4.

LEE J.K, PARK J.S, CHOI J.H, PARK B.K, LEE B.C, HWANG W.S, KIM J.H, JEAN Y.H, HARITANI M, YOO H.S ET AL. (2002). Encephalomyelitis associated with akabane virus infection in adult cows. *Vet. Pathol.* 39, 269–273.

LIEVAART-PETERSON K, LUTTIKHOLT S.J.M, VAN DEN BROM R, AND VELLEMA P. (2012). Schmallerberg virus infection in small ruminants – First review of the situation and prospects in Northern Europe. *Small Rumin. Res.* 106, 71–76.

LINDEN A, DESMECHT D, VOLP R, WIRTGEN M, GREGOIRE F, PIRSON J. & OTHERS (2012) Epizootic spread of Schmallerberg virus among wild cervids, Belgian, Fall 2011. *Emerging Infectious Diseases*

LOEFFEN W, QUAK S, DE BOER-LUIJTZE E, HULST M, VAN DER POEL W, BOUWSTRA R, ET MAAS R (2012). Development of a virus neutralisation test to detect antibodies against Schmallerberg virus and serological results in suspect and infected herds. *Acta Vet. Scand.* 54, 44.

LUTTIKHOLT S, VELDHUIS A, VAN DEN BROM R, MOLL L, LIEVAART-PETERSON K, PEPPERKAMP K, VAN SCHAIK G ET VELLEMA P (2014). Risk factors for malformations and impact on reproductive performance and mortality rates of Schmallerberg virus in sheep flocks in the Netherlands. *PloS One* 9, e100135.

MANSFIELD K.L, LA ROCCA S.A, KHATRI M, JOHNSON N, STEINBACH F ET FOOKS A.R (2013). Detection of Schmallerberg virus serum neutralising antibodies. *J. Virol. Methods* 188, 139–144.

MARTINELLE L, DAL POZZO F, KIRSCHVINK N, DE LA GRANDIÈRE M.A, THIRY E, SAEGERMAN C. Le virus Schmallerberg ou l'émergence du premier Orthobunyavirus du séro-groupe Simbu en Europe *Ann. Méd. Vét.*, 2012, 156, 7- 24

MELLOR P.S (2000). Replication of arboviruses in insect vectors. *J. Comp. Pathol.* 123, 231–247.

MÉROC E, POSKIN A, VAN LOO H, VAN DRIESSCHE E, CZAPLICKI G, QUINET C, RIOCREUX F, DE REGGE N, CAIJ B, VAN DEN BERG T E et AL (2013). Follow-up of the Schmallerberg Virus Seroprevalence in Belgian Cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* DOI 10.1111/tbed.12050.

MOUCHANTAT S, WERNIKE K, HOFFMANN W, ULRICH RG, BORNER K, WITTSTATT U, BEER M (2015) A broad spectrum screening of Schmallerberg virus antibodies in wildlife animals in Germany *Veterinary Research*, 2015, Volume 46, Number 1, Page 1

MURRAY DL, KAPKE CA, EVERMANN JF, FULLER TK. Infectious disease and the

- conservation of free-ranging large carnivores. *Animal Conservation* 1999;2:241–54.
- OEM J-K, YOON H-J, KIM H-R, ROH I-S, LEE K-H, LEE O-S et BAE, Y.-C (2012). Genetic and pathogenic characterization of Akabane viruses isolated from cattle with encephalomyelitis in Korea. *Vet. Microbiol.* 158, 259–266.
- OIE 2013. Fiche technique de l'OIE : le virus Schmallerberg. [en ligne], http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Our_scientific_expertise/docs/pdf/F_Schmallerberg_virus.pdf, (page consultée le 6 mars 2015)
- PARSONSON I.M, DELLA-PORTA A.J et SNOWDON, W.A (1977). Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect. Immun.* 15, 254– 262.
- PARSONSON I.M, DELLA-PORTA A.J, SNOWDON W.A et O'HALLORAN M.L (1981a). The consequences of infection of cattle with Akabane virus at the time of insemination. *J. Comp. Pathol.* 91, 611–619.
- PEPERKAMP N.H, LUTTIKHOLT S.J, DIJKMAN R, VOS J.H, JUNKER K, GREIJANUS S, ROUMEN M.P, VAN GARDEREN E, MEERTENS N, VAN MAANEN C et AL. (2014). Ovine and Bovine Congenital Abnormalities Associated With Intrauterine Infection With Schmallerberg Virus. *Vet. Pathol.* DOI 10.1177/0300985814560231.
- PEPIN M, LAABERKI MH, DUPINAY T, MARIANNEAU P, LEGRAS-LACHUER C, De l'importance croissante des Bunyaviridae en santé publique et vétérinaire, illustré avec les Hantavirus et les virus de Schmallerberg et de la fièvre de la vallée du Rift. *Bull. Acad. Vét. France — 2012 - Tome 165 - N°4* <http://www.academie-veterinaire-defrance.org/>
- PERIE P, CHERMETTE R, MILLMANN Y. ET ZIENTARA, S. 2005. Les Culicoides, Diptères hématophages vecteurs de la fièvre catarrhale du mouton. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 158, (3), 213-223
- PLATEFORME ESA 2016C. Surveillance SBV congénital [en ligne], http://www.plateformeesa.fr/images/documents/surveillance%20sbv%20congnital_document%20technique.pdf, (page consultée le 6 novembre 2016)
- PONSART C, POZZI N, BRÉARD E, CATINOT V, VIARD G, SAILLEAU C, VIAROUGE C, GOUZIL J, BEER M, ZIENTARA S ET AL. (2014). Evidence of excretion of Schmallerberg virus in bull semen. *Vet. Res.* 45, 37.
- POSKIN A, VAN CAMPE W, MOSTIN L, CAY B et DE REGGE N (2014a). Experimental Schmallerberg virus infection of pigs. *Vet. Microbiol.* 170, 398–402.
- POSKIN A, MARTINELLE L, MOSTIN L, VAN CAMPE W, DAL POZZO F, SAEGERMAN C, CAY A.B et DE REGGE, N. (2014b). Dose-dependent effect of experimental Schmallerberg virus infection in sheep. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 201, 419–422.
- PROMED-MAIL (2013). Schmallerberg virus - Europe (07). (Germany) virus RNA in bovine semen.[en ligne], <http://www.promedmail.org/direct.php?id=20130123.1511878>, (page

consultée le
15 juin 2013)

PURSE B.V, MELLOR P.S, ROGERS D.J, SAMUEL A.R, MERTENS P.P.C. ET BAYLIS, M. 2005. Climate Change and the Recent Emergence of Bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 171-181

RASMUSSEN LD, KRISTENSEN B, KIRKEBY C, RASMUSSEN TB, BELSHAM GJ, BODKER R, BØTNER A. Culicoids as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1204–1206.

REUSKEN C, VAN DEN WIJNGAARD C, VAN BEEK P, BEER M, BOUWSTRA R, GODEKE G.-J, ISKEN L, VAN DEN KERKHOF H, VAN PELT W, VAN DER POEL W et AL. (2012). Lack of evidence for zoonotic transmission of Schmallenberg virus. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1746–1754.

RIEB J.P. 1982. Contribution à la connaissance de l'écologie et de la biologie des Cératopogonidés (Diptera, Nematocera). Thèse de Doctorat en Sciences Naturelles, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 395 pages

RODHAIN F. Fièvre jaune, dengue et autres arboviroses. EMC – Maladies infectieuses 2001 ; 8-062-A-10, 19 p.

RODRÍGUEZ-PRIETO V, KUKIELKA D, MOURIÑO M, PARADELL H, PLAJA L, URNIZA A et SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. (2014). Natural Immunity of Sheep and Lambs Against the Schmallenberg Virus Infection. *Transbound. Emerg. Dis.* DOI 10.1111/tbed.12256.

ROSSI S, VIAROUGE C, FAURE E, GILOT-FROMONT E, GACHE K, GIBERT P, VERHEYDEN H, HARS J, KLEIN F, MAILLARD D, GAUTHIER D, GAMELL D, POZET F, SAILLEAU C, GARNIER A, ZIENTARA S, BREARD E. Transboundary and Emerging Diseases. Exposure of Wildlife to the Schmallenberg Virus in France (2011–2014): Higher, Faster, Stronger (than Bluetongue)!

SAEGERMAN C, MARTINELLE L, DAL POZZO F et KIRSCHVINK N (2014). Preliminary survey on the impact of Schmallenberg virus on sheep flocks in South of Belgium. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 469–472.

SAILLEAU C, BOOGAERTS C, MEYRUEIX A, LALOY E, BRÉARD E, VIAROUGE C, DESPRAT A, VITOUR D, DOCEUL V, BOUCHER C et AL. (2013a). Schmallenberg virus infection in dogs, France, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1896–1898.

SAILLEAU C, BRÉARD E, VIAROUGE C, DESPRAT A, DOCEUL V, LARA E, LANGUILLE J, VITOUR D, ATTOUI H et ZIENTARA S(2013b). Acute Schmallenberg virus infections, France, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 321–322.

SCHIEFER P, STEINRIGL A, WODAK E, DEUTZ A et SCHMOLL F (2013) Detection of SBV antibodies in wild ruminants in Austria, 2012.

- SCHULZ C, WERNIKE K, BEER M et HOFFMANN B (2014). Infectious Schmallenberg Virus from Bovine Semen, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 337–339.
- SCHULZ C, BERRE M, HOFFMAN B (2015). *Veterinary Microbiology* 180. 171–179 173
- SEDDA L et ROGERS D.J (2013). The influence of the wind in the Schmallenberg virus outbreak in Europe. *Sci. Rep.* 3, 3361.
- SEEHUSEN F, HAHN K, HERDER V, WEIGAND M, HABIERSKI A, GERHAUSER I, WOHLSEIN P, PETERS M, VARELA M, PALMARINI M et AL (2014). Skeletal Muscle Hypoplasia Represents the Only Significant Lesion in Peripheral Organs of Ruminants Infected with Schmallenberg Virus during Gestation. *J. Comp. Pathol.* 151, 148–152.
- SERVICE M.W (1971). Adult Flight Activities of some British Culicoides Species. *Journal of Medical Entomology*, 8, (5), 605-609
- SPICKLER A.R (2009). Akabane disease. In: The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University. en ligne <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/akabane.pdf> (accessed July 5, 2015).
- STEINRIGL A, SCHIEFER P, SCHLEICHER C, PEINHOPF W, WODAK E, BAGÓ Z et SCHMOLL F (2014). Rapid spread and association of Schmallenberg virus with ruminant abortions and foetal death in Austria in 2012/2013. *Prev. Vet. Med.* 116, 350–359.
- SWINTON J, WOOLHOUSE MEJ, BEGON ME, DOBSON AP, FERROGLIO E, GRENFELL BT. Microparasite transmission and persistence. In: Hudson PJ, editor. *The ecology of wildlife diseases*. Oxford: Oxford University Press; 2001. Proceedings of the International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 2013. Vienna, February 15 to 18, 2013
- TARLINTON R, DALY J, DUNHAM S et KYDD J. (2012). The challenge of Schmallenberg virus emergence in Europe. *Vet. J. Lond. Engl.* 197, 10–18.
- TARLINTON R, DALY J, DUNHAM S, KYDD J.H (2013). Schmallenberg virus: Could wildlife reservoirs threaten domestic livestock? *The Veterinary Journal*. Volume 198, Issue 2, November, Pages 309–310
- VAN BRESSEM M-F, VAN WAEREBEEK K., JEPSON PD, RAGA JA, DUIGNAN PJ, NIELSEN O. An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Vet Microbiol* 2001;81:287–304.
- VAN DEN BROM R, LUTTIKHOLT S.J.M, LIEVAART-PETERSON K, PEPERKAMP N.H.M.T, MARS M.H, VAN DER POEL W.H.M et VELLEMA P (2012). Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 137,106–111.
- VAN DER POEL WH, CAY B, ZIENTARA S, STEINBACH F, VALARCHER JF, BÖTNER A, MARS MH, HAKZE-VAN DER HONING R, SCHIRRMIEIER H, BEER M. Limited

interlaboratory comparison of Schmallenberg virus antibody detection in serum samples. *Vet Rec.* 2014;174:380.

VARELA M, SCHNETTLER E, CAPORALE M, MURGIA C, BARRY G, MCFARLANE M, MCGREGOR E, PIRAS I.M, SHAW A, LAMM C ET AL. (2013). Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog.* 9, e1003133

VERONESI E, HENSTOCK M, GUBBINS S, BATTEN C, MANLEY R, BARBER J, HOFFMANN B, BEER M, ATTOUI H, MERTENS P.P.C, ET AL. (2013). Implicating *Culicoides* biting midges as vectors of Schmallenberg virus using semi-quantitative RT-PCR. *PloS One* 8, e57747.

VILAR M.J, GUI S, KRZYWINSKI J, SANDERSON S et BAYLIS M (2011). *Culicoides* vectors of bluetongue virus in Chester Zoo. *Vet. Rec.* 168, 242.

WENSMAN JJ, BLOMQVIST G, HJORT M, HOLST BS. Presence of antibodies to Schmallenberg virus in a dog in Sweden. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2802–2803.

WERNIKE K, CONRATHS F, ZANELLA G, GRANZOW H, GACHE K, SCHIRRMIEIER H, VALAS S, STAUBACH C, MARIANNEAU P, KRAATZ F, HÖRETH-BÖNTGEN D, REIMANN I, ZIENTARA S, BEER M. Schmallenberg virus-two years of experiences. *Prev Vet Med.* 2014;116:423–434. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.03.021

WERNIKE K, SILAGHI C, NIEDER M, PFEFFER M, BEER M. Dynamics of Schmallenberg virus infection within a cattle herd in Germany, 2011. *Epidemiol Infect.* 2014;142:1501–1504.

WERNIKE K, HOFFMANN B, CONRATHS FJ, BEER M. Schmallenberg virus reoccurrence, Germany, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:1202–1204. doi: 10.3201/eid2107.150180.

WERNIKE K, BREITHAUPT A, KELLER M, HOFFMANN B, BEER M, ESCHBAUMER M. Schmallenberg virus infection of adult type I interferon receptor knock-out mice. *PLoS One.* 2012;7:e40380.

WERNIKE K, ESCHBAUMER M, SCHIRRMIEIER H, BLOHM U, BREITHAUPT A, HOFFMANN B, BEER M. Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. *Vet Microbiol.* 2013;165:155–159.

YANASE T, KATO T, AIZAWA M, SHUTO Y, SHIRAFUJI H, YAMAKAWA M, et TSUDA T (2012). Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus *Orthobunyavirus* in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch. Virol.* 157, 1611–1616.

YILMAZ H, HOFFMANN B, TURAN N, CIZMECIGIL U.Y, RICHT J.A, et VAN DER POELW.H.M (2014). Detection and partial sequencing of Schmallenberg virus in cattle and sheep in Turkey. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 14, 223–225.

ZANELLA G, RABALLAND C, DURAND B, SAILLEAU C, PELZER S, BENOIT F, DOCEUL V, ZIENTARA S, et BRÉARD E (2013). Likely Introduction Date of Schmallenberg Virus into France According to Monthly Serological Surveys in Cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 10.1111/tbed.12198.

Étude de la prévalence du virus de Schmallenberg chez les bovidés de parcs zoologiques dans deux contextes épidémiologiques différents

Le virus de Schmallenberg (SBV) est un Orthobunyavirus de la famille des Bunyaviridae. Il a été découvert en août 2011 dans le nord-ouest de l'Europe et s'est propagé à la plupart des régions du continent par transmission vectorielle via les *Culicoides*. La plupart des infections sont asymptomatiques chez les ruminants adultes, mais le virus peut occasionnellement causer des signes cliniques tels qu'une diminution de la production laitière, de l'hyperthermie, de l'anorexie et des diarrhées. L'infection de femelles gestantes sensibles peut entraîner de la mortalité ainsi que des malformations congénitales chez les veaux, les agneaux et les chevreaux. La maladie affecte principalement les ruminants domestiques mais des anticorps ont été retrouvés chez différentes espèces sauvages en liberté mais également maintenues en captivité. Notre étude a évalué la séroprévalence du SBV chez des bovidés sauvages maintenus en captivité dans deux situations épidémiologiques différentes: 42 échantillons (40 animaux) ont été prélevés au parc de Beekse Bergen (BB, Hilvarenbeek - Pays-Bas) entre 2011 et 2014 et 16 échantillons (14 animaux) ont été collectés entre 2013 et 2015 à la Ménagerie du Jardin des Plantes, Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris). Trente-cinq des cinquante prélèvements ont été confirmés positifs par séroneutralisation virale : des anticorps ont été retrouvés chez 13 des 16 prélèvements du MNHN et chez 22 des 42 prélèvements du parc de BB. Pour la première fois, du SBV a été détecté dans le sang d'un gnou bleu (*Connochaetes taurinus taurinus*). Aucune preuve de lien de causalité entre maladie et virémie n'a pu être mise en évidence jusqu'à maintenant. Les mesures thérapeutiques et préventives, le rôle hypothétique de réservoir et les possibilités de dissémination sont discutés pour l'ensemble des espèces étudiées.

Mots-clés : bovidés, Schmallenberg, séropositivité, virus, zoos.

Seroprevalence of Schmallenberg virus in zoo bovidae in two epidemiological situations

Schmallenberg virus (SBV) is an Orthobunyavirus of the Bunyaviridae family. It emerged in August 2011 in north-western Europe and spread to most parts of Europe via *Culicoides* vectors. Most infections are asymptomatic in adult ruminants but the virus can occasionally cause clinical signs such as milk drop, fever, anorexia and diarrhea. Infection of susceptible pregnant animals can lead to abortion, stillbirth and congenital malformations in newborn calves, lambs and goat kids. The disease mainly affects livestock but antibodies against SBV have been found in free-ranging wild species and in different exotic species kept in captivity. The investigation was carried out to assess the SBV seroprevalence in wild bovids kept in captivity in two different epidemiological situations : 42 samples (40 animals) were collected in the SafariPark Beekse Bergen (BB, Hilvarenbeek - the Netherlands) between 2011 and 2014 and 16 serum samples (14 animals) were collected between 2013 and 2015 in the Ménagerie du Jardin des Plantes, Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris – France). Thirty out of 50 samples were found to be seropositive by VNT. Antibodies to SBV were found in 13/16 samples from MNHN and 22/42 samples from SPBB. For the first time, we report evidence of SBV viremia in a blue wildebeest (*Connochaetes taurinus taurinus*). No evidence of causal relationships between disease and SBV viraemia was pointed out in wild bovids but the limited set of data did not allow us to establish a definitive conclusion. The therapeutic and preventive measures, the hypothetical role of reservoir and the possibilities of dissemination are discussed for those species.

Key words: bovidae, seropositivity, Schmallenberg, virus, zoos.