

Virus Schmallerberg : Pathogenèse de l'infection chez les ruminants domestiques et circulation chez les ruminants sauvages

Résumé du manuscrit de thèse

Eve LALOY

Le virus Schmallerberg (SBV) appartient au genre *Orthobunyavirus*, dans la famille des *Bunyaviridae*. C'est un arbovirus transmis par les moucheron du genre *Culicoides*. Découvert en 2011 en Europe du Nord, il affecte les ruminants domestiques.

I. Etat de l'art

1. Historique

Le virus SBV a été découvert suite à un épisode de maladie chez les vaches laitières en Allemagne et au Pays-Bas. Les signes cliniques, peu spécifiques, incluaient une fièvre, une chute de la production laitière et une diarrhée. Malgré de nombreuses analyses, aucun agent connu n'avait été identifié dans les prélèvements en provenance de ces bovins. C'est par analyse métagénomique qu'un nouveau virus a été trouvé sur ces prélèvements, un virus du genre *Orthobunyavirus*, du séro groupe Simbu. Ce virus a été nommé virus Schmallerberg en référence à la ville d'Allemagne d'où provenait l'un des échantillons.

2. Structure

Comme tous les virus de la famille des *Bunyaviridae*, SBV est un virus enveloppé à génome ARN simple brin segmenté. Il comprend 3 segments. Le segment S code la nucléoprotéine N et la protéine non-structurale NSs. Le segment M code une polyprotéine qui est clivée en deux glycoprotéines de surface (Gn et Gc) ainsi qu'une protéine non-structurale NSm. Le segment L code l'ARN-polymerase ARN-dépendante.

3. Phylogénie

Le genre Orthobunyavirus comprend plus de 170 virus répartis en 18 sérogroupes. SBV appartient au séro groupe Simbu, comme les virus Shamonda, Aino et Akabane qui sont également retrouvés chez des bovins. Excepté SBV, aucun virus du séro groupe Simbu n'a été trouvé en Europe. SBV serait un ancêtre du virus Shamonda.

4. Epidémiologie

Les espèces sensibles à SBV sont les espèces chez lesquelles le virus peut se répliquer, avec ou sans signes cliniques. Les ruminants domestiques sont des espèces sensibles pour lesquelles des signes cliniques ont été décrits. Des preuves de réplication, directes (détection du génome) ou indirectes (détection d'anticorps), ont été trouvées chez plusieurs espèces de ruminants sauvages ou de zoo, sans description de signes cliniques associés. L'homme n'est pas une espèce sensible. Le chien semble être sensible à SBV, avec de rares cas de signes cliniques associés à la présence du virus.

SBV est un arbovirus transmis par les insectes hématophages du genre *Culicoides*. En particulier, les vecteurs compétents sont les membres du groupe *Culicoides obsoletus*, ainsi que les espèces *C. dewulfi* et *C. chiopterus*.

Une transmission horizontale est possible chez les ruminants domestiques, pouvant donner lieu à des malformations congénitales. Chez ces mêmes espèces, la transmission horizontale par voie orale ou nasale ou par contact ne semble pas efficace. En revanche, la transmission horizontale par voie sexuelle est une possibilité non exclue. En effet, du virus vivant a été retrouvé dans des échantillons de semence bovine.

Le virus SBV est capable de transhivernage. Les causes de cette survie d'une saison vectorielle à une autre ne sont pas connues.

Le virus a été détecté initialement en Allemagne, aux Pays-Bas et en Belgique en 2011. Il s'est ensuite propagé dans les autres pays d'Europe, au Nord comme au Sud, à l'Est comme à l'Ouest. Le génome de SBV a par la suite été détecté en Turquie en 2012.

Différents facteurs de risque de l'infection à SBV ont été identifiés. Le risque diffère principalement selon les espèces (les moutons sont moins à risque que les bovins) et les conditions d'élevage (les animaux élevés en plein air sont plus à risque que les animaux maintenus en stabulation).

5. Signes cliniques et lésions

a) Description

Chez les ruminants domestiques femelles non-gestantes, les signes cliniques sont peu spécifiques : diarrhée, chute de production laitière et fièvre. Aucune lésion n'a été décrite dans cette catégorie de population.

En revanche, chez les ruminants domestiques femelles gestantes, des signes cliniques et des lésions ont été décrites. Chez les femelles elles-mêmes, il s'agit de dystocie (quand le nouveau-né est malformé) mais aussi d'avortements et de pertes embryonnaires. Chez les nouveau-nés qui survivent, les signes cliniques sont essentiellement nerveux : dépression, hypertonicité, strabisme, amaurose. Les lésions décrites chez les avortons et nouveau-nés sont de nombreuses malformations congénitales. Elles concernent essentiellement le système nerveux central (SNC), les muscles squelettiques et le squelette. Dans le SNC, les lésions les plus fréquentes sont : hydranencéphalie, hydrocéphalie, porencéphalie, hypoplasie cérébelleuse et micromyélie ; elles sont parfois associées histologiquement à une inflammation non-suppurée et à une nécrose neuronale. Les lésions atteignant les muscles sont une arthrogrypose (macroscopique) associée à une hypoplasie des rhabdomyocytes (microscopique). Enfin, les lésions du squelette les plus fréquentes sont : lordose, cyphose, scoliose, torticolis et brachygnathisme inférieur. L'ensemble de ces signes cliniques et des lésions associées à l'infection par SBV est tout à fait similaire à ce qui a été décrit en Asie lors d'infection par le virus Akabane, chez les ruminants domestiques.

b) Hypothèses de pathogénie des lésions

Suite à ce constat de similitude entre l'infection par SBV et par le virus Akabane chez les ruminants domestiques, il est possible de formuler des hypothèses de travail sur la pathogénèse des lésions induites par SBV.

L'âge du fœtus lors de l'infection est probablement l'un des déterminants majeurs de l'apparition de lésions et de leur type. De manière plus détaillée, voilà les probables facteurs qui déterminent la sensibilité du fœtus à l'infection :

- La maturité des placentomes : si l'infection de la femelle a lieu avant leur maturité, le fœtus est probablement protégé de l'invasion virale
- Le stade de maturité des organes-cibles : plus ces organes sont matures, moins ils seraient sensibles au virus
- Le stade de développement du système immunitaire du fœtus : plus ce système est développé, plus il serait capable d'inhiber la progression du virus et les lésions viro-induites.

Ainsi, chez les petits ruminants, le fœtus serait le plus sensible à l'infection par SBV entre 30 et 70 jours de gestation.

Un autre déterminant de l'apparition de lésions serait la nature de l'inoculum : les lésions pourraient différer selon la souche virale utilisée et sa voie d'inoculation.

Les lésions du système nerveux central pourraient être dues à une atteinte préférentielle des cellules progénitrices, possiblement par un effet direct du virus. Les lésions musculaires pourraient être soit secondaires à l'atteinte nerveuse, soit secondaires à un effet direct du virus sur les rhabdomyocytes en croissance, soit à une combinaison des deux.

6. Impact

Dans les troupeaux infectés, l'impact résulte essentiellement de la mortalité ou des malformations des nouveau-nés. Ces jeunes ne sont pas valorisables, ce qui entraîne une perte financière pour l'éleveur.

L'impact dû à l'infection des adultes est limité aux chutes de production laitière chez les vaches laitières et aux dystocies chez les brebis et vaches. L'impact négatif du virus sur la fertilité a peu été évalué mais semble réel chez les brebis et les vaches.

Au-delà de l'impact au sein des élevages, l'infection à SBV a généré des restrictions commerciales dans les échanges entre pays européens et pays extra-européens, entraînant ainsi des pertes économiques pour l'Europe.

7. Diagnostic et prévention

a) *Diagnostic*

Les signes cliniques et lésions, même s'ils peuvent être évocateurs d'une infection par SBV, ne suffisent pas à établir un diagnostic. Le diagnostic de l'infection peut être réalisé via des méthodes directes, mettant en évidence le virus ou son génome, ou via des méthodes indirectes, mettant en évidence la réaction sérologique de l'individu vis-à-vis du virus.

- **Méthodes directes**

L'une des méthodes directes est l'isolement viral. Il peut être effectué à l'aide de plusieurs lignées cellulaires : les cellules KC (de *Culicoides variipennis*), les cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney) et les cellules Vero. Une autre méthode directe est l'inoculation du virus à des cellules IFN^{-/-}, qui sont sensibles à l'infection par SBV.

La mise en évidence du génome viral, une autre méthode directe, peut s'effectuer par RT-qPCR. Le protocole le plus sensible pour la détection du génome de SBV est le protocole SBV-S3, basé sur le segment S. Les échantillons appropriés sont le sang et le sérum chez les adultes ; les liquides placentaires, le cordon ombilical et le système nerveux central chez les nouveau-nés.

Les antigènes viraux peuvent être mis en évidence sur tissu par immunohistochimie, avec un anticorps polyclonal dirigé contre la nucléoprotéine N.

Le génome viral peut également être mis en évidence sur tissu par hybridation *in situ*, mais cette méthode est peu sensible.

- Méthodes indirectes

La réponse humorale des ruminants à l'infection par SBV a surtout été décrite chez les bovins. Les anticorps persistent au moins 2 ans après exposition au virus. Chez le jeune, les anticorps colostraux anti-SBV disparaissent après 6 mois.

La détection des anticorps anti-SBV fait appel à l'immunofluorescence indirecte (peu utilisée), à la séroneutralisation virale (méthode de référence) ou à des tests ELISA. Ces tests sont applicables à des prélèvements de sérum et, dans le cas de l'ELISA, à des prélèvements de lait.

b) Prévention

Les mesures préventives sont de deux ordres : protection contre les vecteurs, et protection par acquisition d'une réponse humorale.

La protection contre *Culicoides* spp. inclut des traitements insecticides en topique, la mise en stabulation permanente, l'installation de pièges à insectes, et l'adaptation du calendrier de mise à la reproduction pour éviter d'exposer les femelles gestantes aux vecteurs. Cette protection diminue le risque d'exposition aux vecteurs infectés mais n'est pas fiable.

La vaccination, qui permet l'acquisition d'une réponse humorale, est plus fiable pour protéger les individus. Deux vaccins inactivés ont été développés et mis sur le marché pour les ovins et bovins. Actuellement, il n'existe pas de vaccin pour les chèvres.

II. Etudes expérimentales

Les études présentées dans ce manuscrit ont eu pour objectifs : (i) de décrire et comprendre les conséquences de l'infection par SBV chez les ruminants domestiques, en particulier la chèvre ; (ii) d'explorer l'exposition des ruminants sauvages et exotiques au virus.

Après infection expérimentale chez le mouton adulte, la virémie était courte et les signes cliniques étaient rares – aucune hyperthermie n'a été relevée. Des anticorps anti-SBV sont apparus entre 10 et 14 jours post-inoculation (pi). Aucune lésion significative n'a été observée lors de l'autopsie. Le génome viral a été détecté dans la rate et les nœuds lymphatiques jusqu'à 44 jours pi. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après infection expérimentale de bovins.

Après infection expérimentale chez des boucs et des chèvres adultes, de la même manière, la virémie était courte, suivie d'une séroconversion entre 7 et 14 jours pi. Aucun signe clinique n'a été relevé et aucune lésion significative n'a été observée à l'examen macroscopique et microscopique des tissus. Le génome viral était présent dans l'ovaire d'une chèvre uniquement. Le génome viral n'a pas été détecté dans la semence des boucs collectée pendant 28 jours pi. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus précédemment chez le mouton.

Ces deux études suggèrent que les organes hématolymphopoiétiques et l'appareil reproducteur pourraient être des organes-cibles pour le virus.

Deux autres études expérimentales ont porté sur l'infection par SBV chez des chèvres en reproduction, l'une autour du moment de l'insémination et l'autre pendant la gestation. La première étude a révélé que le virus pouvait infecter la chèvre par voie vaginale au moment de l'insémination artificielle. La seconde étude a montré la sensibilité de la chèvre gestante au virus SBV entre 28 et 42 jours de gestation. Toutes les chèvres gestantes inoculées (par

voie intraveineuse) ont montré une virémie sans signe clinique. Le passage transplacentaire du virus a été montré pour tous les fœtus issus de mères infectées à 42 jours de gestation, et pour la majorité des fœtus issus de mères infectées à 28 jours de gestation. Certains fœtus infectés n'ont pas montré d'anomalie ; chez les autres, les conséquences de l'infection virale sur le fœtus à cette période ont été une mortalité fœtale ou des lésions du système nerveux central (porencéphalie). Le génome et les antigènes du SBV ont été détectés en association avec les lésions. Le diamètre maximal des placentomes était significativement plus faible chez les chèvres infectées à J42 que chez les chèvres témoins, suggérant que le virus peut diminuer l'efficacité de l'échange fœto-maternel ; la mortalité fœtale pourrait éventuellement résulter d'une ischémie.

L'exposition des ruminants sauvages au virus en France entre 2010 et 2012 a été évaluée sur 9 populations de cerfs sauvages par sérologie (ELISA et séroneutralisation). Des anticorps spécifiques de SBV ont été détectés chez 7 de ces populations. D'après les résultats sérologiques, le virus a progressé rapidement depuis le Nord-Est jusqu'au Sud-Ouest de la France entre octobre et décembre 2011. Le virus a progressé en parallèle chez les ruminants domestiques et les ruminants sauvages. Le rôle des ruminants sauvages dans la dissémination du virus reste incertain.

Enfin, l'exposition des ruminants sauvages ou exotiques en captivité a été évaluée dans deux parcs zoologiques, l'un aux Pays-Bas, l'autre en France à Paris. Les analyses sérologiques (ELISA et séroneutralisation) ont permis de détecter des anticorps anti-SBV chez des animaux de 18 espèces différentes, dont des gnous (*Connochaetes taurinus taurinus*). Du génome viral a été détecté dans le sérum d'un gnou séronégatif. Après amplification des segments L et M, le séquençage et l'analyse des séquences partielles correspondantes ont montré 100 % et 99.79 % d'homologie, respectivement, avec des séquences de SBV détectées chez des bovins domestiques. Aucun signe clinique n'a pu être mis en relation avec l'infection par SBV chez les ruminants de zoo étudiés.

III. Discussion

1. Pathogénie de l'infection à SBV : hypothèses émises à partir des données d'infection expérimentale

Le passage transplacentaire de SBV peut avoir pour conséquence la mort du fœtus ou de l'embryon. Si le fœtus survit, des lésions peuvent se développer *in utero* dans le système nerveux central, dans le muscle squelettique et le squelette axial. La troisième possibilité après infection fœtale par SBV est un développement normal suivi par la naissance d'un nouveau-né cliniquement normal. Actuellement, il n'existe aucune donnée en faveur de l'existence de nouveau-nés immunotolérants infectés permanents par SBV.

Après infection expérimentale de chèvres gestantes à 42 jours de gestation, certains fœtus étaient positifs en PCR pour le virus mais vivants et dépourvus de lésions à 12 jours post-inoculation. Ces observations peuvent correspondre à un sacrifice à un temps trop précoce, avec des lésions non encore développées. Une interprétation alternative serait celle d'une élimination rapide du virus par ces fœtus, via la réponse immune innée par exemple.

2. Dissémination chez les ruminants sauvages et domestiques

Le virus SBV s'est répandu rapidement chez les ruminants domestiques à travers l'Europe, plus rapidement que le virus BTV-8 (Bluetongue virus), virus infectant des ruminants domestiques également, apparu au même endroit d'Europe quelques années auparavant et transmis par des insectes du genre *Culicoides*. Cette vitesse pourrait avoir résulté d'une forte proportion de vecteurs infectés par SBV, proportion plus élevée que pour le BTV-8.

Par ailleurs, SBV a infecté de nombreuses espèces de ruminants sauvages et exotiques. En particulier, le virus a infecté davantage d'espèces sauvages en France que ne l'avait fait le virus BTV-8. Cette différence pourrait être due à un nombre d'espèces réceptives plus grand pour SBV que pour BTV-8, mais aussi à des différences entre les espèces de *Culicoides* spp. capables de transmettre chacun de ces virus aux ruminants sauvages.

Enfin, SBV a circulé dans des écosystèmes variés. En écosystème urbain, par exemple : les ruminants du parc zoologique de la Ménagerie du Jardin des Plantes à Paris ont été exposés au virus. Le virus a également circulé en montagne, y compris à haute altitude.

3. Conséquences sur le terrain : impact et mesures de prévention

Chez les ruminants domestiques, les pertes embryonnaires ou fœtales précoces suite à l'infection à SBV ont probablement été sous-estimées. En effet, ce sont des événements difficiles à repérer par les éleveurs ; de plus, les systèmes de collection de données sur la reproduction des ruminants domestiques en Europe ne sont pas accessibles facilement. La mise en place d'une surveillance syndromique pourrait faciliter la surveillance de la reproduction.

Les études expérimentales ont montré la sensibilité de la chèvre gestante vis-à-vis de SBV entre 28 et 42 jours de gestation. Il serait judicieux de mettre en place des mesures de protection contre l'infection virale chez les chèvres naïves avant ou pendant la mise à la reproduction. L'absence de vaccin développé dans cette espèce contre SBV rend la prévention difficile.

Chez les ruminants sauvages et exotiques sensibles à SBV, les espèces pour lesquelles l'infection virale pourrait avoir le plus d'impact sont celles dont la période de reproduction coïncide avec la saison d'activité des *Culicoides* spp. Parmi elles, nous pouvons citer le cerf du Père David (*Elaphurus davidianus*) et le daim de Perse (*Dama mesopotamica*), qui sont des espèces menacées d'extinction. Cependant, l'effet de l'infection par SBV chez ces espèces n'est pas connu.

IV. Conclusions

L'émergence du virus SBV a été associée dès le départ à une intense collaboration entre les scientifiques des pays européens, avec une transparence et une réactivité remarquables.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le cadre d'une commande de la Commission Européenne à des laboratoires européens de santé animale. Ils ont permis de décrire la cinétique de la virémie et de la séroconversion chez le mouton et la chèvre ; de mettre en évidence la possibilité d'infection de la chèvre par SBV par voie vaginale ; de décrire les conséquences de l'infection de la chèvre gestante entre 28 et 42 jours de gestation ; enfin, de découvrir la sensibilité de plusieurs espèces sauvages ou exotiques captives vis-à-vis du virus.

Le scénario probable pour les années à venir, étant donné l'existence d'une population naïve au virus, est l'apparition sporadique de cas cliniques. En cas de déclin important de l'immunité à l'échelle de la population, de nouvelles épizooties pourraient survenir.