



**HAL**  
open science

# Etude de la maladie épizootique hémorragique en Tunisie

Sameh Ben Dhaou

► **To cite this version:**

Sameh Ben Dhaou. Etude de la maladie épizootique hémorragique en Tunisie. Sciences agricoles. Université Paris-Est; Faculté des sciences de Bizerte (Tunisie), 2017. Français. NNT : 2017PESC0023 . tel-01763049

**HAL Id: tel-01763049**

**<https://theses.hal.science/tel-01763049>**

Submitted on 10 Apr 2018

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

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

## THÈSE EN COTUTELLE

Préparée entre

L'Université de Carthage (Tunis) et l'Université de Paris-Est Créteil

### ECOLE DOCTORALE :

Sciences de la vie et de la santé de Créteil

Faculté des Sciences de Bizerte

### DISCIPLINE

### VIROLOGIE

ANNÉE 2016-2017

SÉRIE DOCTORAT N° : xx

### THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue publiquement le xx/xx/2017

par

**SAMEH BEN DHAOU**

# La maladie Hémorragique Epizootique en Tunisie

**Directeur de thèse :** Pr. Salah HAMMAMI,

Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire  
Sidi Thabet

Dr. Stéphan ZIENTARA,

Directeur de Recherche (ANSES Maisons-  
Alfort)

**Co-directeur de thèse :** Dr. Emmanuel BREARD,

Maître de conférences (ANSES Maisons-  
Alfort)

### Composition du jury :

**Président du jury :** Prénom NOM

Fonction (et lieu d'exercice)

**Rapporteurs :**

Dr. Sophie LE PODER, HDR, École Nationale

Vétérinaire de Maisons Alfort

Pr. Amine SLIM

Faculté de Médecine de Tunis

**Examineurs :**

Prénom NOM

Fonction (et lieu d'exercice)

Prénom NOM

Fonction (et lieu d'exercice)

**Membres invités :** Prénom NOM

Fonction (et lieu d'exercice)

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une cotutelle entre la Faculté des Sciences de Bizerte (FSB) et l'Université Paris-Est Créteil (UPEC).

Elle est financée par un projet Egide CMCU n° 11G0813 et le Ministère de l'Enseignement Supérieur de Tunis.

Les tests et autres examens ont été réalisés dans le laboratoire de virologie de l'Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie et l'unité de virologie l'UMR 1161 de l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Alimentaire, de la Santé, du travail et de l'Environnement), sous la direction :

du Professeur Salah Hammami,

du Docteur Stephan Zientara,

du Docteur Emmanuel Breard,

du Docteur Besma Babay

## Remerciements

Mes remerciements les plus distingués vont particulièrement au Professeur Salah Hammami, Directeur de Thèse pour avoir cru en mes capacités, pour le temps que vous m'avez consacré tout au long de ces années..

Je tiens à remercier le Professeur Stephan Zientara, Directeur de recherche à l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Alimentaire, de la Santé, du travail et de l'Environnement), pour son suivi et sa disponibilité pendant toute cette période, pour avoir eu la gentillesse d'assister en tant qu'invité à la présentation de mon exposé.

Je tiens à remercier tout spécialement le Docteur Emmanuel Breard, Maître assistant à l'ANSES (Maisons Alfort) pour le suivi quotidien de mon travail, sa relecture et ses encouragements pendant la rédaction.

Je tiens à remercier le Docteur Besma Babay, Maître assistante à l'Institut de recherche vétérinaire de Tunis pour son soutien, sa gentillesse et les précieux renseignements dont elle m'a fait bénéficier.

Un merci tout spécial au Docteur Corinne Sailleau, Ingénieur de recherche à l'ANSES pour sa gentillesse et sa disponibilité lorsque j'en avais tant besoin. Merci d'avoir pris de votre temps pour m'aider dans l'analyse des données.

Cyril Viarouge, Technicien à l'Unité de virologie de l'ANSES, votre dynamisme et votre aide m'ont beaucoup apporté. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Merci à Dominique Videau et Alexandra Desprat, pour votre contribution.

Je remercie aussi très chaleureusement l'équipe de virologie de Tunisie : Sofien, Abd Errazek Dkhil, Yosra, Salma Haddouchi, Khaled, Selma Mejri, Sonia Ben Hassen, Emna Fakhfakh pour l'ambiance amicale lors de mon stage. Je leur souhaite à tous un très bel avenir.

Un grand merci aux éleveurs de bovins et dromadaires des gouvernorats de Nabeul Bizerte, Beja, El kef, Monastir, Sousse, kairouan, Sidi Bouzid, Kebeli, Tozeur, Tataouine, Mednine.

Un grand merci aux vétérinaires et aux chauffeurs.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin par leur soutien moral ou scientifique à l'élaboration de cette recherche.

## **A notre président de thèse,**

A Monsieur le Professeur XX Professeur des XX, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Hommages respectueux.

## **A notre jury de thèse,**

A Madame le Dr. Sophie LE PODER, Maître de conférences, à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort, pour sa participation à mon jury de thèse en qualité de rapporteur, pour toutes les remarques intéressantes faites.

A Monsieur le Pr. Amine SLIM, Professeur à la Faculté de Médecine de Tunis et Chef de service à l'hôpital Charles Nicoles de Tunis pour avoir accepté de relire cette thèse et d'en être le rapporteur.

La version finale de ce mémoire a bénéficié de leur lecture très attentive et de leurs remarques précieuses.

Je tiens également à présenter mes remerciements à Monsieur xx, Docteur à xx, et Madame XX, Docteur à XX pour avoir accepté d'être examinateurs et membres de ce jury.

Ma gratitude, mon profond respect et mes remerciements vont à tous les membres du jury : rapporteurs, examinateurs et encadreurs, pour l'attention avec laquelle ils m'ont lu.

A vous tous, merci !

*Je dédie ce travail  
A mes parents qui ont suffisamment cru en moi pour me laisser partir,  
A tous les membres de ma famille,  
A tous mes amis.*

## Table des matières

Remerciements .....	3
Table des matières .....	6
Liste des abréviations .....	9
Liste des figures .....	11
Liste des tableaux.....	13
INTRODUCTION GENERALE.....	14

### CHAPITRE I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Etude bibliographique .....	18
1.1. Epidémiologie .....	18
1.1.1. Situation de l'EHD dans le monde avant son émergence au Maghreb et dans les pays du pourtour méditerranéen .....	18
1.1.2. Emergence de l'EHD au Maghreb et dans les pays du Bassin méditerranéen en 2006 .....	20
1.1.3. Transmission de l'EHDV .....	24
1.2. Etiologie de l'EHDV .....	27
1.2.1. Génome de l'EHDV.....	29
1.2.2. Les protéines virales structurales.....	31
1.2.3. Les protéines virales non structurales .....	32
1.2.4. Variabilité sérotypique de l'EHDV .....	34
1.2.5. Propriétés et variabilité génétique du virus.....	37
1.2.6. Le cycle viral .....	38
1.2.7. Réassortiment génétique .....	40
1.3. Interactions entre l'hôte et le pathogène .....	40
1.3.1. Pathogénie.....	40
1.3.2. Infection par le virus et effet sur l'immunité .....	41
1.3.3. Signes cliniques et lésions .....	43
1.4. DIAGNOSTIC .....	47
1.4.1. Diagnostic sérologique.....	47
1.4.2. Diagnostic virologique .....	48
1.5. PROPHYLAXIE .....	50
1.5.1. Définition.....	50

1.5.2. La prophylaxie sanitaire .....	50
1.5.3. Vaccination .....	51
2. Objectifs du travail de thèse.....	54

## CHAPITRE II - Matériels et méthodes

3. Matériels et méthodes .....	57
3.1. Echantillons .....	58
3.1.1. Echantillons prélevés en 2006 pour l'étude de la caractérisation moléculaire de l'EHDV .....	58
3.1.2. Echantillons de 2000 et 2007 : étude rétrospective .....	58
3.1.3. Echantillons de bovins prélevés en 2012 .....	58
3.1.4. Echantillons bovins collectés en 2012 pour un suivi sentinelle .....	59
3.1.5. Echantillons de bovins sentinelles prélevés en 2013 et 2014 .....	63
3.1.6. Echantillons de dromadaires prélevés entre 2001 et 2013 pour la recherche de l'EHDV .....	63
3.1.7. Echantillons de <i>Culicoïdes imicola</i> collectés en 2015.....	66
3.1.8. Autres prélèvements .....	67
3.2. Recherche de l'EHDV .....	67
3.2.1. Préparation d'aliqots de broyat de <i>Culicoïdes</i> .....	67
3.2.2. Extraction des ARN et RT-qPCR des échantillons de sang de 2006 .....	67
3.2.3. PCR EHDV conventionnelles pour l'amplification des segments 2, 3, 5, 7 et 10 ....	68
3.2.4. Séquençage et analyse des séquences .....	70
3.3. Recherche du génome du BTV dans les prélèvements de dromadaires et de bovins en 2013 .....	71
3.4. Isolement viral .....	71
3.4.1. Sur œufs embryonnés.....	71
3.4.2. Sur BHK-21.....	72
3.4.3. Sur KC cells (cellules de <i>Culicoïdes</i> ).....	73
3.5. Etude sérologique.....	73
3.5.1. Elisa de compétition EHDV .....	73
3.5.2. Elisa de compétition BTV .....	73
3.5.3. Séroneutralisation .....	73
3.6. Tri et identification des <i>Culicoïdes</i> piégés en 2015 .....	74

## CHAPITRE III - RESULTATS

4. RESULTATS .....	76
4.1. Détection et caractérisation moléculaire de l'EHDV-6 .....	76

4.1.1. Séquences des segments génomiques.....	77
4.2. Isolement du virus.....	89
4.2.1. Sur œufs embryonnés.....	89
4.2.2. Sur BHK-21.....	89
4.2.3. Sur KC cells.....	89
4.3. Recherche de la présence de l'EHDV en Tunisie hors épizootie de 2006.....	89
4.3.1. Chez les bovins.....	89
4.3.2. Présence de l'EHDV chez les dromadaires.....	92
4.3.3. Recherche de l'EHDV chez les <i>Culicoïdes</i> .....	93
4.4. Recherche de la Bluetongue.....	94
4.4.1. Chez les bovins.....	94
4.4.2. Chez les dromadaires.....	94
4.4.3. Chez les caprins.....	94

#### CHAPITRE IV - Discussion

5. Discussion.....	96
5.1. Génétique de la souche d'EHDV qui circulait en Tunisie en 2006.....	96
5.2. Recherche de la présence de l'EHDV en Tunisie avant et après l'épizootie de 2006.....	99
5.2.1. Chez les bovins.....	99
5.2.2. Chez les dromadaires.....	102
5.2.3. Les <i>Culicoïdes</i> .....	102
5.3. La recherche du BTV.....	103
Conclusion et perspectives.....	106

## Liste des abréviations

AHSV	African Horse Sickness Virus
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
BHK	Baby Hamster Kidney
BT	Bluetongue
BTV	Bluetongue virus
Ct	Cycle threshold
DCP 50%	Doses cytopathiques 50%
DMSO	DiMéthylSulfoxyde
DO	Densité Optique
ECP	Effet Cytopathique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
FCO	Fièvre Catarrhale Ovine
Ig	ImmunoGlobuline
IL	Interleukine
KC	Cellules de <i>Culicoïdes</i>
M	Molaire
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
NS1	Non Structural protein 1
NS2	Non Structural protein 2

NS3	Non Structural protein 3
NS4	Non Structural protein 4
OIE	Office International des Epizooties (Organisation Mondiale de la Santé Animale)
pb	Paire de Bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
SDS	DocécylSulfate de Sodium
TCID	Tissue Culture Infectious Dose
VERO	Cellules de reins de singe vert, Cercopithecus aethiops
VP	Viral Protein

## Liste des figures

Figure 1 : Répartition mondiale des infections par l'EHDV (EFSA, 2009).....	20
Figure 2 : Foyers de l'EHD en 2006 en Tunisie (OIE, 2012).....	21
Figure 3 : Photos des premiers symptômes cliniques de l'EHD en 2006 en Tunisie.....	22
Figure 4 : Répartition de la nouvelle incursion de l'EHD (2006-2007) dans les pays du Bassin méditerranéen (Caporale et al., 2009).....	23
Figure 5 : Foyers de l'EHD en 2015 en Tunisie (OIE, 2015).....	23
Figure 6 : Représentations d'une aile de <i>Culicoïdes obsoletus</i> , <i>Culicoïdes scoticus</i> et <i>Culicoïdes imicola</i> . (Jean-Claude Delécolle).....	24
Figure 7 : Femelles de <i>Culicoïdes</i> ( <i>C. imicola</i> ) (Balenghien et al., 2009).....	25
Figure 8. Cycle de développement des <i>Culicoïdes</i> (Delécolle, 1985).....	26
Figure 9. Représentation en 3 dimensions de la structure de l'EHDV .....	29
Figure 10 : Protéines virales codées par les différents segments d'ARN.....	33
Figure 11 : Représentation schématique du cycle de réplication des Orbivirus, adapté de (Mohl and Roy, 2014) .....	39
Figure 12 : Pathogénie de l'infection par l'EHDV (adaptée de l'infection du BTV (site du CIRAD 2009-2010) .....	41
Figure 13 : Signes cliniques détectés chez les bovins.....	45
Figure 14 : Schéma représentatif des études réalisées.....	55
Figure 15 : Carte de la Tunisie montrant les sites d'échantillonnage de 2000 à 2015 .....	57
Figure 16 : Sites visités mensuellement de bovins sentinelles (photos prises par Sofien Sghair).....	59
Figure 17 : Site d'échantillonnages des dromadaires à l'intérieur de la Tunisie et sur la frontière algéro-tunisienne et libyo-tunisienne. ....	65
Figure 18 : Isolement sur œufs embryonnés (source ANSES).....	72
Figure 19 : Isolement du virus de l'EHDV sur culture cellulaire .....	72
Figure 20: Le piégeage, tri et identification des <i>Culicoïdes</i> [Dufour (2008)].....	74
Figure 21 : Gel d'agarose après migration d'1h des produits d'amplification du segment 2. Les pistes 1, 4, 7 présentent les amplifications issues des échantillons de la Tunisie. Les pistes 3, 6, 9 celles des témoins positifs (EHDV 6 souche marocaine) et les pistes 2, 5, 8 sont issus de témoins négatifs. M désigne le marqueur de la taille moléculaire. ....	77
Figure 22. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 2 du virus tunisien .....	78
Figure 23. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 6 du virus .....	81
Figure 24. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 7 du virus tunisien et d'autres EHDV.....	83
Figure 25. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du	

segment génomique 10 du virus tunisien et d'autres EHDV.....	85
Figure 26. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 3 du virus tunisien et d'autres EHDV.....	87

## Liste des tableaux

Tableau 1: Différents sérogroupes appartenant au genre <i>Orbivirus</i> .....	28
Tableau 2 : Caractéristiques des segments génomiques du virus d'EHDV et de leurs produits d'expression (Anthony et al., 2009) .....	30
Tableau 3 : Les souches de référence constituant les 7 sérotypes de l'EHDV .....	35
Tableau 4 : Les huit souches de référence constituant les 8 sérotypes de l'EHDV connues actuellement .....	36
Tableau 5: Régions, gouvernorats, nombre des prélèvements bovins et mois d'échantillonnage 2012.....	61
Tableau 6 : Fiche de suivi clinique .....	62
Tableau 7 : Localisation et répartition des échantillons de dromadaires pour la période 2010-2011 .....	64
Tableau 8 : Localisation et répartition des échantillons de 2013.....	65
Tableau 9 : Les amorces utilisées pour l'amplification des segments 2, 3, 6, 7 et 10 du génome de l'EHDV .....	69
Tableau 10 : Comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et d'acides aminés du S2 de l'EHDV-6 tunisien avec d'autres S2.....	79
Tableau 11: comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S6 d'EHDV-6 tunisien avec d'autres.....	82
Tableau 12 : Comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S7 d'EHDV-6 tunisien.....	84
Tableau 13 : Comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S10 de l'EHDV-6 tunisien.....	86
Tableau 14 : comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S3 de l'EHDV-6 tunisien.....	88
Tableau 15 : Résultats de la recherche d'anticorps chez les bovins, en fonction de la région et de l'âge .....	91
Tableau 17: Résultats sérologiques d'Elisa BTV .....	94
Tableau 18 : Récapitulatif des échantillons de bovins de 2000 à 2014.....	101

# **INTRODUCTION GENERALE**

La maladie épizootique hémorragique (EHD) est une maladie animale, d'origine virale, vectorielle et non contagieuse. Elle atteint les ruminants sauvages essentiellement les cervidés, ou domestiques: les bovins. Cette maladie a été découverte pour la première fois en Amérique du Nord suite à une épidémie survenue chez le cerf à queue blanche (*Odocoileus virginianus*) dans l'Etat du New Jersey (Shope et al., 1960).

L'agent pathogène, responsable de cette maladie est l'EHDV, appartenant à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*, véhiculé par des insectes femelles diptères hématophages appartenant au genre *Culicoïdes* (*Diptera*, *Ceratopogonidae*). Le *C. imicola*, est considéré comme le vecteur biologique compétent de la maladie en Afrique et en Europe méditerranéenne. Il est historiquement présent dans les régions tropicales et subtropicales entre le 49° de latitude nord et le 35° de latitude sud.

Sept sérotypes viraux ont été décrits par Anthony en 2009, répartis dans le monde sur 4 continents (Amérique, Afrique, Asie, Australie) alors que l'Europe reste encore relativement indemne. Jusqu'en 2006, le Maghreb n'était pas concerné par la maladie. Seuls quelques pays de la Péninsule Arabique: Bahreïn et sultanat d'Oman et des pays d'Afrique sub-saharienne comme le Soudan, ont connu l'émergence de l'EHDV-6 (Mohamed et al., 1996). A partir de juillet 2006, le Maghreb et quelques pays du pourtour méditerranéen : la Turquie, Israël et la Jordanie ont été envahis, en quelques mois, par des épizooties d'EHDV-6 et d'EHDV-7 chez les bovins, générant des conséquences importantes sur l'économie d'élevage.

Des études se sont intéressées aux relations phylogénétiques entre les différentes souches d'EHDV en comparant les séquences nucléotidiques de certains isolats à travers le monde. Les chercheurs se sont alors rendu compte que le virus ne cessait de s'adapter rapidement à un nouvel environnement ou à un nouvel hôte. Ces études phylogénétiques sont primordiales pour déterminer le sérotype et l'origine contribuant ainsi à une meilleure connaissance du virus.

Les raisons de l'extension de la maladie ne sont pas connues avec certitude mais, est fortement suspecté, le réchauffement climatique qui participerait à l'accroissement de la population des vecteurs (Maclachlan et Guthrie, 2010). Compte tenu de la grande similitude existant entre la FCO et l'EHD, on peut craindre une apparition de l'EHD en Europe puisque la FCO y est endémique. Différents auteurs (Bréard et al. 2010a, b ; Savini et al. 2011) pensent que l'EHD peut présenter un risque sanitaire identique à celui de la Bluetongue en Europe méditerranéenne.

Le présent travail s'est attaché à démontrer que la forme tunisienne de la maladie EHD était identique à celle qui sévissait en Algérie et au Maroc. Dans ce présent travail, nous avons caractérisé moléculairement l'EHDV apparu en Tunisie en 2006. Pour cela, nous avons procédé à l'analyse phylogénétique des séquences VP2, VP3, VP5, VP7 et VP10, protéines à l'origine des sérotypes, en les comparant à celles des autres souches provenant du monde entier dans le but d'établir leur origine et leur parcours. Cette émergence et la morbidité du virus constatées dans

différents foyers de bovins en 2006 ont révélé la nécessité de développer des axes de recherche s'appuyant sur un travail de terrain qui avait pour but de rechercher la présence du virus nouvellement détecté chez les bovins, les dromadaires et les *Culicoïdes*.

Ce travail est organisé en quatre grands chapitres :

- Le premier présente une synthèse des connaissances actuelles sur l'EHDV, aux plans épidémiologique, étiologique, clinique, prophylactique ainsi que sur le système vectoriel responsable de la transmission de la maladie.
- Le deuxième chapitre est dédié à la description et à l'analyse des prélèvements réalisés sur des bovins, des dromadaires et des *Culicoïdes*.
- Le troisième chapitre décrit les résultats obtenus.
- Le dernier chapitre comportera la discussion ainsi que la conclusion et les perspectives de cette recherche.

**CHAPITRE I**  
**DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

## 1 Etude bibliographique

La maladie épizootique hémorragique des cervidés, dénommée en anglais *Epizootic hemorrhagic disease* (EHD), est une maladie animale, infectieuse, vectorielle et non contagieuse. C'est une arbovirose (*arthropode borne viruses*) c'est à dire une maladie virale transmise par morsure ou pique d'un arthropode qui, dans le cas de l'EHD, est un diptère hématophage du genre *Culicoïdes*, de la famille des *Ceratopogonidae*.

La première observation de cette maladie a été faite en 1950 chez les cervidés, chez lesquels elle peut revêtir des formes très graves (Shope et al., 1955). En 1959, une épizootie est survenue chez des bovins au Japon, puis, en 2006, au Maroc, en Algérie, en Tunisie, en Israël et en Jordanie (Savini et al., 2011; Yadin et al., 2008) avant de gagner la Turquie en 2007 (Temizel et al., 2009).

Le virus EHDV, responsable de l'EHD, appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus* (nommés ainsi à cause de leur forme annulaire). Il s'agit d'un virus nu à ARN double brin segmenté dont, à l'heure actuelle, 8 sérotypes ou variants génétiques ont été décrits (Antony et al., 2009a; Wright, 2013; Maan et al., 2016).

Depuis 2008, décidée par l'OIE, sa survenue doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire qui entraîne la mise en place de mesures sanitaires strictes.

Les pertes économiques liées à cette maladie peuvent être importantes sur l'économie d'élevage et font, de son contrôle, un enjeu majeur en médecine vétérinaire. Comme l'éradication de l'insecte vecteur paraît difficile, la vaccination pourrait se révéler un moyen de lutte possible à condition que des vaccins efficaces soient disponibles en ciblant les spécificités sérotypiques.

Dans ce chapitre, nous vous présentons une synthèse des connaissances actuelles sur cette maladie.

### 1.1 Epidémiologie

#### 1.1.1 Situation de l'EHD dans le monde avant son émergence au Maghreb et dans les pays du pourtour méditerranéen

Les premières descriptions dans la littérature datent de la fin de 20<sup>ème</sup> siècle chez les cervidés en Amérique du Nord. La maladie se répartissait dans une zone comprise entre les latitudes 49° nord et 35° sud, sur tous les continents sauf l'Europe (Figure 1). Une extension progressive de la maladie a été enregistrée sur les autres continents (Asie, Afrique, Australie), à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle et au début du 21<sup>ème</sup>. Elle a notamment été à l'origine d'épizooties au Japon, en Amérique du sud, dans les Caraïbes et à la Réunion (Sailleau et al., 2011; Viarouge et al., 2014).

En Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada), depuis leur découverte en 1955, l'EHDV-1 et 2 sont régulièrement isolés lors d'épisodes cliniques (Shope et al., 1955 ; Chalmers et al., 1964 ; Garrett et al., 2015). En 2006, l'EHDV-6 a été isolé à partir de prélèvements effectués sur des cerfs à queue blanche de Virginie morts dans l'Indiana et l'Illinois. Les études génétiques indiquent que ce virus serait le résultat d'un réassortiment entre la souche EHDV-2 Alberta et d'une souche EHDV-6 exotique (Allison et al., 2010).

En Amérique du Sud, seule une étude sérologique réalisée dans les années 80, révèle la présence d'anticorps dirigés contre l'EHDV-1 et 2 (Gumm et al., 1984). L'EHDV-6 a été identifié en Guyane française, en 2012, suggérant que ce sérotype circule en Amérique du sud (Viarouge et al., 2014).

Dans les Caraïbes, en Martinique et en Guadeloupe, l'EHDV-2 et 6 ont été identifiés en 2010 et 2011 à partir de prélèvements de bovins nouvellement introduits mais sans observation de signes cliniques (Gerbier, 2010).

En Australie, l'EHDV-1, 2, 5, 6, 7 et 8 ont été isolés lors d'une étude réalisée dans les années 80 à partir de prélèvements de bovins sentinelles (St George et al., 1983).

Au Japon, l'EHDV-2 (souche Ibaraki) a été détecté pour la première fois en 1959 puis régulièrement lors d'épisodes cliniques sévères chez les bovins dans les années 80, en 1997 (Ohashi et al., 1999) puis plus récemment, en 2013 (Hirashima et al., 2015). L'EHDV-1 et 7 semblent circuler également mais sans induire de signe clinique (Hirashima et al., 2015).

A la Réunion, plusieurs sérotypes ont été détectés suite à l'apparition de signes cliniques évocateurs de la FCO chez les bovins notamment en 2003 et 2009 avec l'EHDV-6 (Breard et al., 2004; Sailleau et al., 2012), en 2011 avec l'EHDV-1 et plus récemment en 2014 avec l'EHDV-7 (données du laboratoire).

Enfin, aux frontières de l'Europe, l'EHD a été régulièrement responsable d'épisodes cliniques sévères chez les bovins dans le bassin méditerranéen notamment en 2006, au Maroc, en Algérie, en Tunisie, en Turquie dû à l'EHDV-6 (Temizel et al., 2009; Albayrek et al., 2010) et en Israël dû à l'EHDV-7 (Yadin et al., 2008).

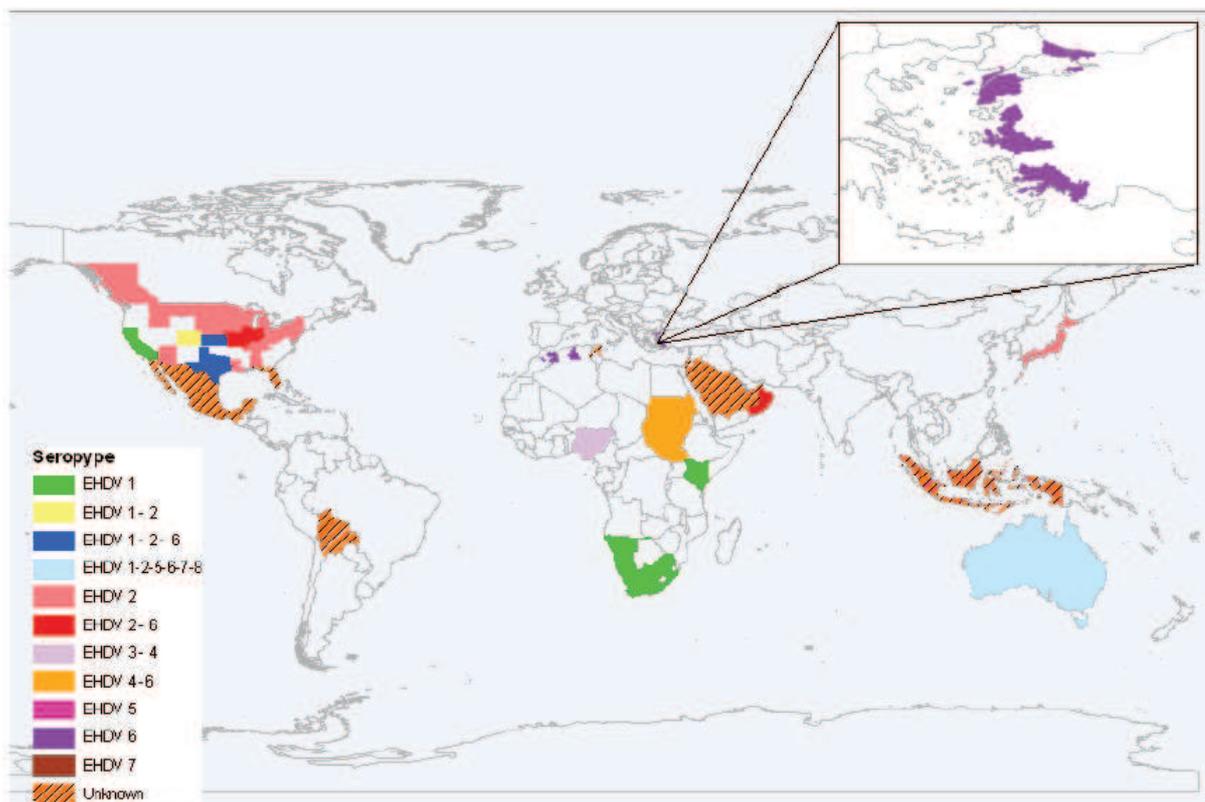


Figure 1 : Répartition mondiale des infections par l'EHDV (EFSA, 2009).

### 1.1.2 Emergence de l'EHD au Maghreb et dans les pays du Bassin méditerranéen en 2006

La situation de l'EHD dans les pays du Bassin méditerranéen n'était pas connue avant 2000. La présence du virus de l'EHD n'avait été que rarement signalée. L'histoire de son émergence passe par deux périodes : une première dans laquelle sa présence a été confondue avec le BTV, et une seconde, où la différenciation entre les deux virus était rendue possible par la découverte d'outils de diagnostic moléculaire à partir des années 2000.

En 1951, la maladie a été décrite en Israël, pour la première fois, chez des bovins et des ovins (Komarov et Goldsmith, 1951 ; Savini et al., 2011) où elle a été confondue avec la maladie de la Bluetongue. En 1991, la maladie a été aussi décrite en Turquie, suite à une détection d'anticorps à l'EHDV chez des bovins (Burgu et al., 1991 ; Savini et al., 2011).

A partir de l'année 2000, la situation de l'EHD, dans les pays méditerranéens, a totalement changé. Des cas cliniques d'EHD ont été décrits chez des bovins, en Israël, mais sans que le sérotype en soit déterminé.

L'année 2006 a été marquée par la propagation de l'EHDV, essentiellement des sérotypes 6 et 7, qui ont montré leur compétence à déclencher des épidémies chez les bovins.

La première épidémie, accompagnée de signes cliniques importants, chez les bovins, est survenue en juillet 2006 au Maroc. De sérotype 6, sa morbidité a été de 18% et son taux de mortalité apparent de 2.2% (OIE, Wahid, 2006a). Ce sérotype s'est répandu en Algérie, en juillet 2006, causant une morbidité de l'ordre de 8% et une mortalité de l'ordre de 0.5% (OIE, 2006b).

En Tunisie, en septembre 2006, une épizootie d'EHD est survenue dans 24 foyers de bovins répartis sur toute la Tunisie (OIE, 2006b.) (Figure 2). Le taux de morbidité était de l'ordre de 11% et celui de mortalité de l'ordre de 0.6%. Le tableau clinique en était : une hyperthermie (40°C), une congestion pulmonaire, des ulcères de la bouche, du ptyalisme et une augmentation des sécrétions nasales et oculaires (Figure 3) (Hammami et al., 2007).



Figure 2 : Foyers de l'EHD en 2006 en Tunisie (OIE, 2012)



Figure 3 : Photos des premiers symptômes cliniques de l'EHD en 2006 en Tunisie.

(Centre National de Veille Zoosanitaire, 2010 (photos Baccar, 2006) et (photos Hammami, 2006))

A: Oedème de l'auge, B: La conjonctive, C: Déchirure, D: Œdème de la paupière,  
 E: Erosion de la muqueuse buccale, F: Ecoulement nasal et salivation, G: Congestion et une ulcération de la tétine, H: Cyanose de la langue.

Toujours en 2006, des cas cliniques ont été décrits, chez des bovins, en Israël, incriminant le sérotype EHDV-7, causant une morbidité variable selon les cheptels (de 5 à 80%) et une létalité de 2% (OIE, 2006d ; Yadin et al., 2008). Sa caractérisation moléculaire réalisée plus tard a permis de mettre en évidence une parenté génétique avec le segment 10 des souches de l'EHDV-6 au Moyen Orient, à Bahrein et en Afrique du Sud (Wilson et al., 2015). Ce sérotype continuait au cours de la même année à se répandre en Jordanie (Figure 4).

En 2007, le sérotype 6 s'est étendu à la Turquie (OIE, 2006c ; Temizel et al., 2009).

En septembre 2015, en Tunisie, 5 vaches de 3 ans ont été découvertes séropositives en Elisa EHDV dans le gouvernorat de Mahdia (dans un foyer à Oued Beja Nord sidi Alouane Mahdia (ProMed-mail, 2015). La même année, en Israël, sur 1400 bovins, 170 ont été déclarés positifs en Elisa et en PCR mais de sérotype non identifié (Wilson et al., 2015 ; OIE, 2015) (Figure 5).

En 2016, le sérotype 6 d'EHDV a été isolé sur des bovins porteurs de signes cliniques en Israël (Bumbarov et al., 2016).

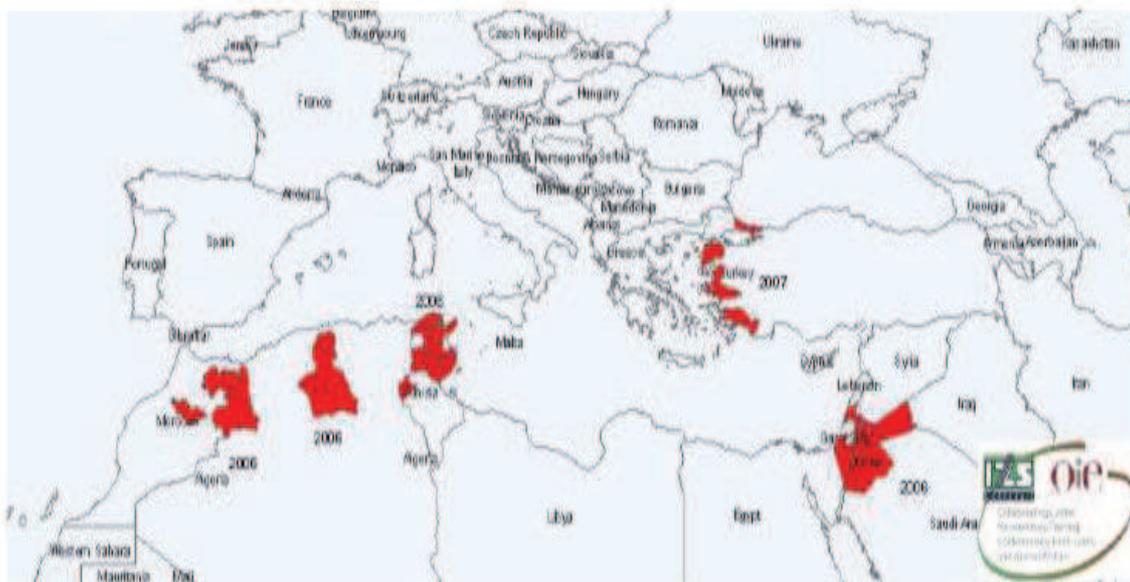


Figure 4 : Répartition de la nouvelle incursion de l'EHD (2006-2007) dans les pays du Bassin méditerranéen (Caporale et al., 2009)



Figure 5 : Foyers de l'EHD en 2015 en Tunisie (OIE, 2015)

### 1.1.3 Transmission de l'EHDV

#### 1.1.3.1 Vecteur de la maladie

La propagation de l'EHD est due, essentiellement à l'abondance de son vecteur biologique, les *Culicoïdes*, qui sont de petits moucheron piqueurs hématophages (Gard et Melville., 1991; Aradaib et Ali, 2004 ; Savini et al., 2011). Ces *Culicoïdes* ont été décrits pour la première fois au début du 18ème siècle, en Angleterre, par William Derham et ensuite au début du 19ème siècle par Latreille. Les *Culicoïdes* du genre *Schultzei* ont été décrits pour la première fois en Afrique tropicale, en Namibie, par l'entomologiste allemand Enderlein au début du 20ème siècle (Mathieu, 2011).

Le genre *Culicoïdes* appartient au règne animal, à la série des invertébrés, à l'embranchement des *Arthropodes*, à la classe des insectes, à l'ordre des *diptères*, au sous ordre des *Nématocères* et à la famille des *Cératopogonidés* (Walzer, 2009). Ce genre compte plus de 1300 espèces (Borkent, 2014), réparties en 25 sous genres dont le genre *Avartia* (*Imicola*) comprenant plusieurs espèces de femelles hématophages impliquées également dans la transmission d'autres maladies comme la Bluetongue et la Peste Equine Africaine. C'est au cours d'un repas sanguin qu'une femelle hématophage *Culicoïdes*, précédemment infectée, peut transmettre le virus à un animal réceptif (ruminant) (Botner et al., 2009 ; Cêtre-Sossah et al., 2010).

L'identification des *Culicoïdes* adultes se fait par l'observation des ailes et des caractéristiques morphologiques. L'espèce est identifiée dans un premier temps, grâce à la forme alaire parsemée de taches sombres et de taches claires (Delécolle, 1985), donnant des informations majeures sur l'identification de l'espèce (Figure 6).

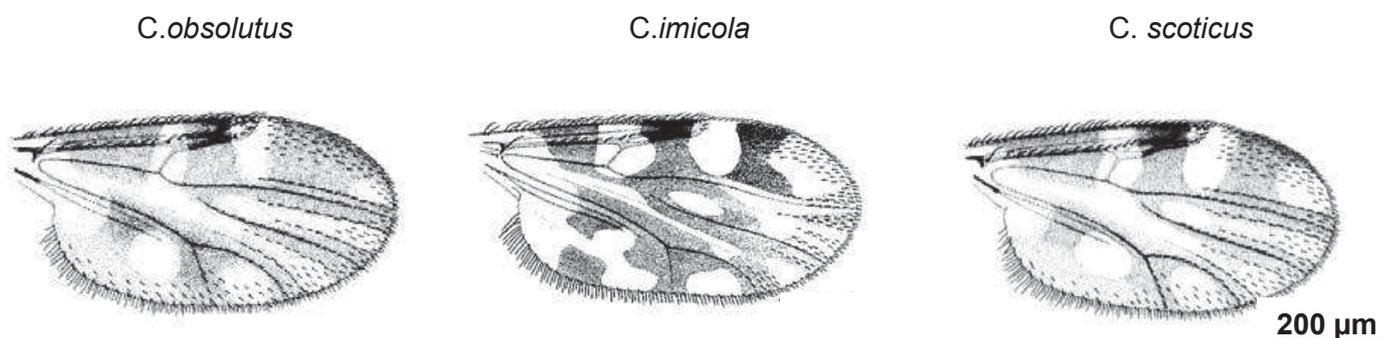


Figure 6 : Représentation d'une aile de *Culicoïdes obsoletus*, *Culicoïdes scoticus* et *Culicoïdes imicola*. (Jean-Claude Delécolle)

Lorsque cette première identification est insuffisante, des études proposent de recourir à la dissection de spécimens et au montage lame et lamelle pour une observation microscopique.

L'identification des femelles est facilitée par la forme des spermathèques, et de l'espace interoculaire (yeux soudés ou séparés, nus ou pubescents), le nombre et l'arrangement des soies présentes sur les antennes. L'indice antennaire (long ou court), les sensilles coëloconiques (nombre et disposition) et autres sensilles antennaires (forme, taille, présence ou absence). Les segments abdominaux portent les structures génitales mâles et femelles qui sont très caractéristiques d'une espèce. Pour les mâles, la forme du genitalia est généralement suffisante pour établir une identification spécifique (Meiswinkel et al., 1994). Au stade adulte, les *Culicoïdes* sont de petits insectes piqueurs mesurant entre 1 à 3 mm de long (Delécolle et Schaffner, 2003). La tête, de forme légèrement aplatie, porte des antennes assez longues pourvues, chez les mâles, de longues soies couchées (Figure 7).



Figure 7 : Femelles de *Culicoïdes* (*C. imicola*) (Balenghien et al., 2009)

#### 1.1.3.2 Biologie du vecteur

Les *Culicoïdes* sont, principalement, décrits comme des crépusculaires avec une activité nocturne. Les mâles se nourrissent de suc de végétaux tout au long de leur vie alors que les femelles *Culicoïdes* sont hématophages et leur préférence trophique varie en fonction des espèces (Delécolle et Schaffner, 2003). Ils sont maintenus dans la nature par un cycle de développement de type holométabole qui passe par 4 stades larvaires : un stade nymphal et un stade adulte (Figure 8). Leur développement et leur reproduction sont conditionnés par un certain nombre de facteurs (vent, température, humidité, pluie). L'accouplement se déroule le plus souvent dans de grands espaces, et c'est après celui-ci, que les femelles hématophages présentent des besoins accrus d'un repas sanguin, nécessaire à la maturation des œufs, au cours duquel la transmission du virus à un ruminant réceptif s'établit. Deux à 3 jours plus tard, la ponte a lieu au sol sur des matières végétales en décomposition (trous d'arbres, feuilles mortes, etc.), recyclées par les animaux (bouses, crottins). Dans les 2 à 8 jours suivant la ponte, les œufs donnent naissance à des larves (Balenghien et Délecolle, 2009). Ces larves, se nourrissent de débris organiques divers, de bactéries, de protozoaires, de nématodes (Linley, 1979) et, parfois, de leurs propres congénères. Dans les pays tropicaux, le *C.Imicola* se développe en 2 semaines. Dans les pays

tempérés où les conditions climatiques sont plus défavorables, la vie larvaire peut durer plusieurs mois et les larves peuvent entrer en hypobiose. La larve au stade IV, remonte en surface et recherche un support, où elle se transforme en une nymphe, mobile mais très peu active ne se nourrissant pas (Delécolle et Schaffner, 2003). La durée du stade nymphal est fonction de la température et de l'espèce de *Culicoïdes* mais est, en général, très courte, en moyenne de 2 à 10 jours. Par exemple elle dure deux jours en été pour *C.imicola* (Breverman., 1994) parfois jusqu'à 3 à 4 semaines (Delécolle et al., 2003). A partir de la nymphe émerge l'adulte mâle ou femelle. La durée de vie estimée de ces adultes est de 90 jours en conditions de laboratoire (Boorman, 1991). La survie est très fortement influencée par la température et est optimale entre 13°C et 35°C (Sellers, 1981), maximale à des températures avoisinant les 24°C, alors qu'ils s'arrêtent de voler en dessous de 12.5°C pour les mois les plus froids (Mellor, 1990).

Les déplacements des femelles *Culicoïdes* sont principalement effectués pour la recherche de l'hôte qui fournira un repas sanguin. Cependant, sous l'action du vent et des courants d'air chaud, les *Culicoïdes* peuvent être dispersés sur de très grandes distances. Ces déplacements passifs peuvent aller de 1 à 700 km pour des vents allant de 10 à 40 km/h et des températures situées entre 12°C et 35°C (Gibbs et Greiner, 1994). Ce transport passif sous l'effet du vent serait à l'origine des épizooties de la fièvre catarrhale ovine (FCO) au Portugal en 1956, à Chypre en 1977 et de la peste équine africaine au Portugal en 1956-1966 et au Cap-Vert en 1943. Ces épidémies se seraient produites via la diffusion de *Culicoïdes* infectés d'origine africaine (Sellers et Mellor, 1993).

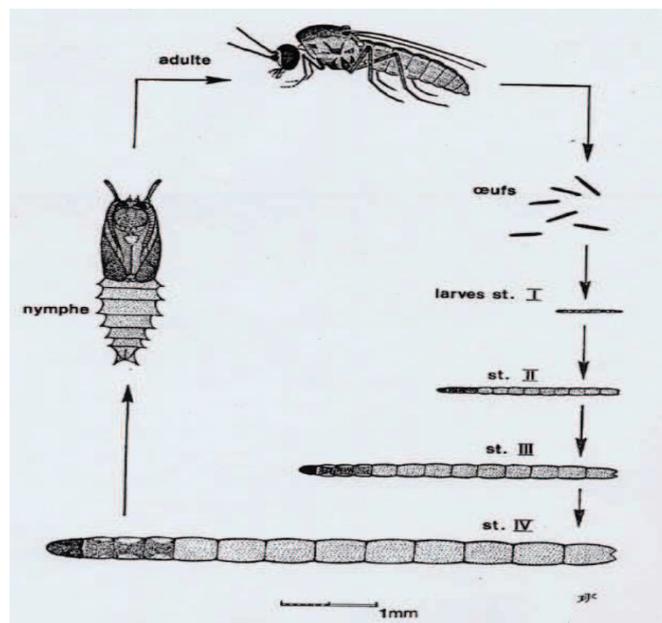


Figure 8. Cycle de développement des *Culicoïdes* (Delécolle, 1985)

### 1.1.3.3 Implication des *Culicoïdes* dans la transmission de l'EHD

Plusieurs espèces des *Culicoïdes* répertoriées dans le monde sont responsables de la transmission de l'EHDV. La maladie est présente sur tout le continent américain, en Afrique (Afrique subsaharienne, Afrique du sud), en Asie du sud Est, au Japon, en Australie et depuis 2006 au Maghreb, en Turquie et en Israël affectant des hôtes vertébrés domestiques et sauvages (Savini et al., 2011).

Le moucheron impliqué en Amérique du Nord est le *Culicoïdes sonorensis* (Foster et al., 1977). En Afrique, l'EHDV a été isolé à partir de *Culicoïdes* du groupe *Schultzei* (Mellor et al., 1984) et en Australie à partir de *Culicoïdes Brevitaris* (Mellor et al., 2000). Les vecteurs en Amérique centrale, en Amérique du Sud, au Japon et en Asie du Sud-Est sont encore inconnus (Mellor et al., 2000). Le vecteur suspecté au Maghreb et dans les pays du bassin méditerranéen est le *Culicoïdes Imicola* déjà présent en Afrique, au Moyen Orient, en Israël, en Espagne et au Portugal provoquant diverses épizooties de FCO et de peste équine. La distribution de cette espèce s'est ensuite élargie à la Grèce, à la Turquie, et à Chypre, dissémination aidée par des facteurs environnementaux favorables (Walzer, 2009).

## 1.2 Etiologie de l'EHDV

Le virus responsable de la maladie épizootique hémorragique (EHD) est un virus à ARN double brin (Maclachan, 2004) qui appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*.

La famille de *Reoviridae* regroupe 15 genres viraux pouvant infecter aussi bien les vertébrés que les invertébrés et les plantes. Parmi ces genres: les *Orbivirus*, les *Orthoreovirus*, les *Rotavirus*, les *Coltivirus*, les *Aquareovirus*, les *Cypovirus*, les *Fijivirus*, les *Phytoreovirus*, les *Oryzavirus*, les *Seadornavirus*, les *Idnoreovirus*, les *Mycoreovirus*, les *Mimireovirus*, les *Cardoreovirus* et les *Dinovernavirus* (Mertens et al., 2005).

Le genre *Orbivirus* et *Rotavirus* font partie des plus connus en médecine humaine et vétérinaire. Depuis 1959, Sabin proposa de les regrouper au sein d'un groupe spécifique des virus jusqu'alors classés dans le groupe des *Echovirus*, virus isolés du tractus gastro-intestinal et de l'arbre respiratoire, sans être liés à des entités cliniques définies (Sabin, 1959). Il proposa le nom de *Reovirus* pour les virus respiratoires, entériques et orphelins. Il s'agit de virus non enveloppées possédant une capsid de symétrie icosaédrique d'un diamètre de 60 à 80 nm. Le genre *Orbivirus* inclut 22 espèces dont le virus de l'EHD, et d'autres plus connus comme le virus de la Bluetongue (BTV) et le virus de la peste équine africaine (AHSV).

Le sérotype viral est notamment défini par la caractérisation des anticorps neutralisants induits par la protéine de capsid externe (VP2) chez l'hôte infecté. Son sérotype est l'ensemble de plusieurs sérotypes (Gould et Hyatt, 1994) possédant en commun un facteur caractéristique qui

est pour les *orbivirus* les anticorps de l'hôte induits par la protéine de la capsid interne (VP7).

Sur la base de leur profil sérologique, 14 sérogroupes différents ont été identifiés avec certitude (Tableau 1).

Tableau 1: Différents sérogroupes appartenant au genre Orbivirus

Sérogroupes	Nombre de sérotypes	Hôtes vertébrés	Invertébrés vecteurs
Virus de la maladie hémorragique épizootique EHDV	7	Cervidés, chameaux, bovins	<i>Culicoïdes</i>
Virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO)	29	Ruminants domestiques	<i>Culicoïdes</i>
Virus de la peste équine africaine (AHSV)	9	Equidés, zèbres, chiens, éléphants, chameaux, ovins, caprins	<i>Culicoïdes</i> , moustiques et tiques
Virus de l'encéphalose équine (EEV)	7	Chevaux, humains	Moustiques
Virus Warrego	2	Marsupiaux	<i>Culicoïdes</i>
Virus Wallal	2	Marsupiaux	<i>Culicoïdes</i>
Virus Palyam	11	Bovins, ovins	Culicoïdes, phlébotomes
Virus Changuinola	12	Humains, rongeurs	<i>Culicoïdes</i> , phlébotomes
Virus Corriparta	4	Humains, rongeurs	Moustiques
Virus Kemerovo	40	Humains, bovins, caprins, singes, ovins	Tiques
Virus Umatilla	3	Oiseaux	Moustiques
Virus Orungo	4	Humains, chameaux, bovins, caprins, singes, ovins	Moustiques
Virus Lebombo	1	Humains, rongeurs	Moustiques
Virus Eubenangee	4	Inconnu	Moustiques ( <i>Aedes</i> )

### 1.2.1 Génome de l'EHDV

Le génome viral est composé de 10 segments d'ARN double brin (ARN db) de tailles différentes (S1-S10) identifiés dans l'ordre décroissant du poids moléculaire (Mertens et al., 2005; Attoui et al., 2012; Stewart et al., 2015), codant chacun pour une ou deux protéines (Attoui et al., 2012 ; Roy, 2013). On dénombre ainsi sept protéines structurales (VP1 à VP7) (Van Standen et Huismans, 1991) et 4 protéines non structurales produites dans la cellule infectée (NS1, NS2, NS3 et NS3A) (Mertens et al., 2005 ; Anthony et al., 2009a,b,c; Savini et al., 2011; King et al., 2012). La taille totale du génome est d'environ 19 200 paires de bases. Le plus grand segment avoisine les 4000 pb et code VP1, tandis que le plus petit segment, codant les protéines NS3 et NS3A ne compte que 822 pb. Les extrémités 5' et 3' de l'ensemble des segments sont conservées (GUUAAA en 5', et ACUUAC en 3' des brins positifs) (Mertens et al., 1987; Mertens and Sangar, 1985). Les 10 segments d'ARN db avant d'être emballés dans une capsidie protéique icosaédrique interagissent avec chaque autre segment (ARN-ARN) pour former des complexes bien stables pour l'organisation du génome viral (Boyce et al., 2016; Fajardo et al., 2016).

Le tableau 2 présente les caractéristiques des segments génomiques de l'EHDV ainsi que leurs produits d'expression. Une présentation de la structure de l'EHDV est donnée en (Figure 9).

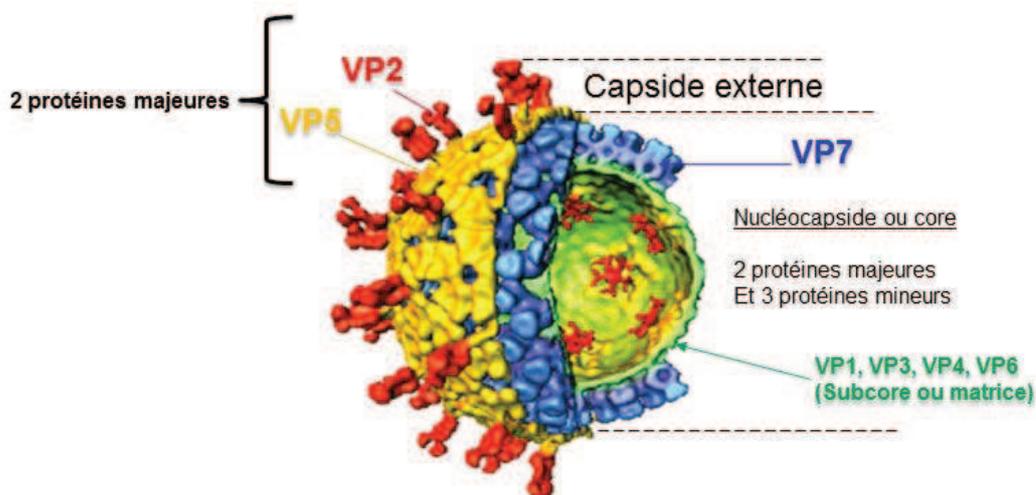


Figure 9. Représentation en 3 dimensions de la structure de l'EHDV (Mertens et al., 2010)

Tableau 2 : Caractéristiques des segments génomiques du virus d'EHDV et de leurs produits d'expression (Anthony et al., 2009)

Segments génomiques	Protéine	Protéine codée	Propriétés et fonctions
1	3954	VP1	ARN dépendant ARN polymérase.
2	2965	VP2	Trimère, constituant majeur de la capsid externe, antigène spécifique, la protéine la plus variable, détermine le sérotype viral ; induit anticorps neutralisants, protéine de l'attachement viral et de la pénétration dans la cellule.
3	2770	VP3	Constituant mineur de la capsid interne ; protéine qui est hautement conservée protection des protéines avec activités enzymatiques actives (VP1, VP4 et VP6) Organisation physique du génome.
4	1981	VP4	Dimère, enzyme de coiffage, guanylyltransférase, coiffe et polyadényle les ARNm précoces.
5	1769	NS1	Forme des tubules dans le cytoplasme de la cellule infectée ; implication dans la de la particule virale ; participe aux mécanismes de transport intracellulaire.
6	Entre 1640 - 1645	VP5	Trimère, protéine majeure de la capsid externe, glycosylé, antigène spécifique de type, protéine variable. Composant mineure de la capsid externe ; propriétés de déstabilisation de la capsid virale ce qui permet au core d'être relargué dans le cytoplasme.
7 (1162)		VP7	Trimère, surface externe du core, symétrie : T=13, impliquée dans la pénétration cellulaire, impliqué dans la très haute infectivité du core chez l'insecte vecteur et la cellule, neutralise en association avec le core les anticorps, le principal antigène spécifique du sérotype. Composante majeure de la capsid interne ; séquence très conservée entre les différents sérotypes, antigène spécifique du groupe.
8	1124	NS2	Constituant majeur des corps d'inclusion, se fixe sur l'ARN simple brin, phosphorylée, peut être associé avec la capsid externe. Constituant majeur des corps d'inclusion cytoplasmique ; favorise la traduction des ARNm au sein de ces corps d'inclusion.
9	(1140- 1149 Souche de l'ouest) 1073-1074 Souche de l'Est)	VP6	Se fixe à l'ARN simple et double brin, hélicase, NTPase ARN hélicase ; déroule les brins d'ARN en présence d'ATP ; active dans le core viral.
10	822	NS3/ NS3a	Glycoprotéine, protéine membranaire, impliquée dans la libération des particules virales par les cellules infectées, protéine variable et peut être impliquée dans la détermination de la virulence.

### 1.2.2 Les protéines virales structurales

La capside virale, d'une taille de 60 à 90 nm, présente une symétrie icosaédrique. Elle est constituée d'une capside externe et d'une capside interne (cette dernière étant également appelée core). La figure 10 représente, de façon schématique, la structure de l'EHDV, les différentes protéines structurales et les segments d'ARN db. La capside externe est composée de 2 protéines structurales majeures : 60 trimères (180 molécules) de VP2 et 180 trimères (360 molécules) de VP5 (Maan et al., 2010), représentant 43% de la masse totale des protéines.

La protéine VP2, codée par le segment 2, constituant majeur de la capside externe, est la protéine la moins conservée et constitue l'antigène spécifique du type (Mertens et al., 1989, 2005; Savini et al., 2011). La VP2 est responsable de l'attachement viral à la cellule et de sa pénétration dans la cellule hôte (Anthony et al., 2009; Savini et al., 2011). Des études réalisées sur la VP2 du BTV ont démontré que la VP2 s'attache à des récepteurs cellulaires dans lesquels se trouve de l'acide sialique. Cette étape est suivie par une endocytose contrôlée par des molécules de clathrine (Hassan and Roy, 1999).

La protéine VP5, codée par le segment 6, est plus conservée que la VP2. Sa position externe en fait le deuxième déterminant sérotypique du virus (Mertens et al., 1989, 2005; Savini et al., 2011). Les trimères de VP5 sont étroitement liés aux trimères VP2, qui les recouvrent en partie, interagissant dans la reconnaissance des anticorps neutralisants (Anthony et al., 2009a,b). La VP5 serait une protéine de pénétration membranaire qui permettrait la décapsidation de la capside externe (grâce à ses propriétés de déstabilisation à pH=5) et la libération des particules virales dans le cytoplasme. Ces deux protéines de capside externe sont responsables d'une production importante d'anticorps neutralisants en cohérence avec leur emplacement (Alshaikhahmed and Roy, 2016). D'autres auteurs ont montré que la VP5 améliorerait la réponse en anticorps neutralisants induits par la VP2 seule (Patel et Roy, 2014).

La capside interne ou core du virion est, quant à elle, composée de deux protéines structurales majeures, 120 copies décamères de VP3 et 780 copies trimères de VP7 (Maan et al., 2010) et du complexe de transcription formé des trois protéines mineures, VP1, VP4 et VP6 (Le Blois et al., 1991; Maan et al., 2010).

La protéine VP7, codée par le segment 7, est la protéine la plus conservée parmi les différents sérotypes. Elle est spécifique du séro groupe EHDV. La VP7 est le constituant majeur de la capside interne de l'EHDV (Mecham et al., 2003) et joue un rôle important dans la structure et le maintien du core : elle forme la couche du noyau externe et fournit une surface pour la fixation de la VP2 et de la VP5 (Anbalagan et al., 2014). La protéine VP7 est stable génétiquement, et est utilisée en tant qu'antigène pour le développement des méthodes de diagnostics par ELISA (Mecham et Wilson, 2004 ; Saif, 2011 ; OIE, 2014) et par RT-PCR (Anthony et al., 2007).

La protéine VP3, codée par le segment 3, forme une base interne sur laquelle la protéine

VP7 se pose. De même, la protéine VP3 sert de support aux protéines VP1, VP4 et VP6 (ou complexe de transcription) ainsi qu'aux dix segments d'ARN doubles brin linéaire (Prasard et al., 1992 ; Zhang et al., 2010). Elle joue aussi un rôle dans l'auto-assemblage des virions, le contrôle de la taille et de l'organisation de la structure de la capsid (Anthony et al., 2009a).

La protéine VP1, codée par le segment 1, est une ARN-polymérase virale qui, à partir du brin positif de l'ARN virale, synthétise l'ARN db du virus (Anthony et al., 2009a ; Mecham and Dean, 1988 ; Savini et al., 2011).

La protéine VP4, codée par le segment 4, est l'enzyme de coiffage des ARN messagers précoces (Anbalagan et al., 2014).

La protéine VP6, codée par le segment 9, est considérée comme l'hélicase virale et possède une activité de fixation à l'ATP et d'ATP ase ARN-dépendante (Anthony et al., 2009a; Mecham and Dean, 1988 ; Savini et al., 2011 ; Anbalagan et al., 2014). Par analogie avec le BTV, la VP6 pourrait jouer un rôle dans la synthèse des ARNm (transcriptase) et dans l'encapsidation des ARN db (Matsuo et Roy, 2009). La VP6 qui est une protéine conservée, représente un antigène spécifique du sérotype, utilisé dans la mise au point des RT-PCR quantitatives qui peuvent détecter toutes les souches d'EHDV (indépendamment de l'origine géographique / topotype / sérotype) (Maan et al., 2016).

### 1.2.3 Les protéines non structurales

Les 4 protéines non structurales, NS1, NS2, NS3/NS3A (Mertens et al., 2005, Savini et al., 2011, Anbalagan et al., 2014) (Figure 10) sont des protéines produites uniquement au cours de la multiplication virale dans la cellule infectée (Huismans and Van Dijk, 1990 ; Anthony et al., 2009a) et ne sont pas incorporées aux virions. Elles semblent participer au contrôle de la réplication, de la maturation et de l'exportation du virion hors de la cellule infectée.

La protéine non structurale NS1, codée par le segment 5 synthétisée dans le cytoplasme de la cellule infectée, sous forme de microtubules. Le rôle de ces derniers n'est pas connu précisément mais leur association aux protéines structurales suggère leur participation dans les mécanismes de transfert intracellulaire. Des études récentes sur le virus de la FCO suggèrent également que la protéine NS1 joue un rôle primordial dans la régulation et la synthèse virales (Matsuo et Roy, 2013 ; Boyce et al., 2012).

La protéine NS2, codée par le segment nucléotidique 8, est le constituant majeur des corps d'inclusion cytoplasmique observés 4 à 8 heures après la pénétration du virus dans les cellules, lesquels se transforment en usines d'assemblage de virions. Les particules du core viral une fois assemblées, quittent ensuite ces corps d'inclusion pour être transportées sur des vésicules d'exocytose.

D'autre part on sait, par analogie avec le BTV, que NS2 permet le recrutement de VP3, jouant ainsi un rôle essentiel dans la réplication et l'assemblage des particules virales (Kar et al., 2007). Elle est impliquée dans le recrutement de l'ARNm viral pour le processus d'encapsidation (Butan et al., 2010).

Les protéines NS3 et NS3A sont codées par le segment 10. Par analogie avec le virus AHSV, elles sont associées à la membrane qui est impliquée dans le relâchement du virion par altération de la perméabilité de la membrane cellulaire (Meiring et al., 2009). Par analogie avec le BTV, une première étude a montré que ces protéines sont peu présentes dans les cellules de mammifères et surexprimées dans les cellules d'insectes, ce qui suggérerait que le vecteur joue un rôle important dans le cycle viral (Guirakhoo et al., 1995). Ces protéines ont un rôle dans la virulence du virus (Feenstra et al., 2014). Elles seraient associées aux derniers stades de la morphogénèse des virions (Hyatt et al., 1991) et interviendraient dans la circulation intracellulaire puis dans le relargage des nouveaux virions (Celma and Roy, 2009), selon deux mécanismes : dans les cellules de mammifères, il semblerait qu'elles agissent comme des viroporines améliorant la perméabilité de la membrane cytoplasmique (Roy, 1992 ; Roy, 2008 ; Han and Harty, 2004) tandis que dans les cellules d'insectes, elles induisent un bourgeonnement de cette membrane, n'entraînant que peu ou pas d'effet cytopathique (Van Gennip et al., 2014 ; Hyatt et al., 1993 ; Wirblich et al., 2006). Les propriétés de modulation de ces protéines dans la production d'interférons suite à l'infection par le virus de la FCO ont été reconnues (Chauveau et al., 2013).

Les gènes codant pour les protéines NS 1 à 3 sont très conservés dans le séro groupe EHD ce qui en font de bonnes cibles pour les techniques de PCR (Wilson, 1994a, b ; Jensen et al., 1994 ; Jensen et Wilson, 1995 ; Anthony et al., 2009a).

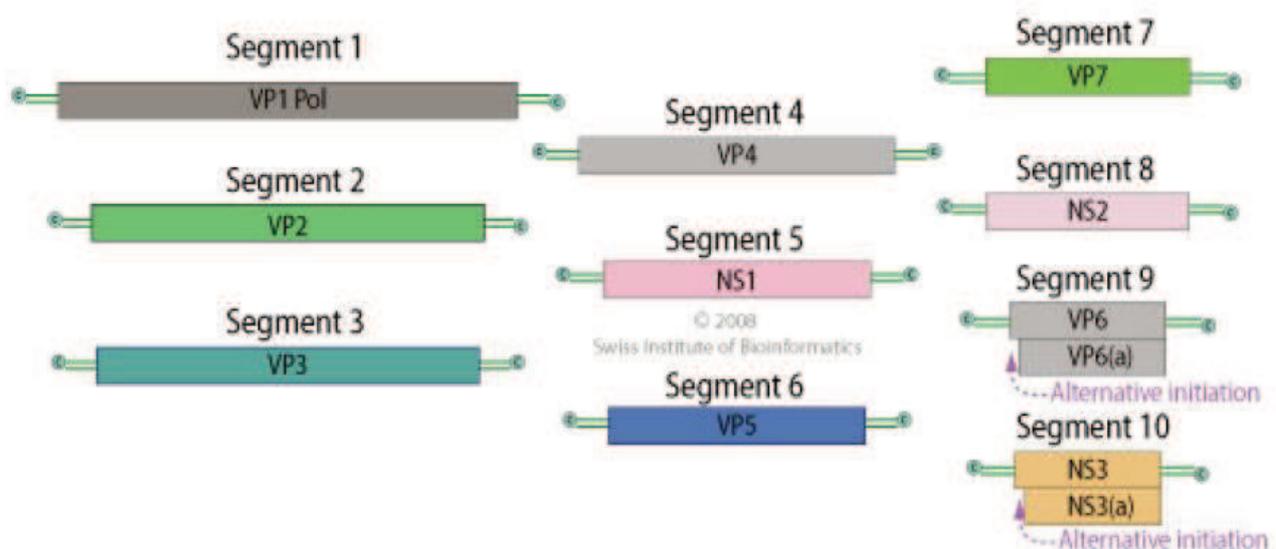


Figure 10 : Protéines virales codées par les différents segments d'ARN  
(Swiss Institute of Bioinformatics, 2010)

#### 1.2.4 Variabilité sérotypique de l'EHDV

Dans leurs études, les auteurs n'étaient pas d'accord sur le nombre de sérotypes existant (Savini et al., 2011). En 1986, Campbell et St Georges avaient identifié huit sérotypes.

En 1991, Gorman comptait 10 sérotypes existant à travers le monde: Le sérotype 1, le premier à avoir été isolé aux Etats-Unis, (New Jersey en 1955), le sérotype 2 isolé au Canada (Alberta en 1962), les sérotypes 3 et 4 furent isolés au Nigéria (à Ibadan) respectivement, en 1967 et 1968. Un autre sérotype a été isolé en Afrique du sud à une époque que impossible à préciser en l'absence d'études comparatives pour savoir s'il s'agit d'un nouveau sérotype ou d'un sérotype déjà existant. Enfin, 5 autres sérotypes (2, 5, 6, 7, 8) ont été isolés en Australie, respectivement en 1977, 1981 et 1982 (St Georges et al., 1983) (Tableau 3). Dans la dernière décennie, le nombre de sérotypes a été fixé à 10: les sérotypes 1 à 8, l'EHDV-318, et l'Ibaraki (IBAV) (Mertens et al., 2005). Les analyses génétiques et phylogénétiques des protéines de capsid externe responsables de la spécificité des sérotypes VP2 et VP5 ont conduit à une proposition de réduction de la classification des sérotypes d'EHDV à sept sérotypes seulement (Anthony et al., 2009 abc, King et al., 2012; Maan et al., 2010).

L'EHDV de sérotype 3 (souche : Ib Ar 22 619) et le sérotype 1 (EHDV-1 isolé au New Jersey) étaient similaires et pouvaient être considérés comme un seul sérotype (Anthony et al., 2009a et 2009b), la souche EHDV-318 a été considérée comme EHDV-6 et la souche Ibaraki (IBAV) initialement classée comme EHDV-7 est maintenant classée comme EHDV-2 (Anthony et al., 2009b; Maan et al., 2010). Par conséquent, le nombre de sérotypes serait réduit à 7 (Anthony et al., 2009 a,b,c; EFSA, 2009; Savini et al., 2011; Maclachlan et al., 2015; King et al., 2012;). Plus récemment, un huitième sérotype identifié comme EHDV-9 (pour éviter toute confusion avec souches classées EHDV-1 à EHDV-8) a été isolé à partir d'un Alpaga à Montagu en Afrique du sud (Wright, 2013; Maan et al., 2016) (Tableau 4).

Les tableaux 3 et 4 ci-dessous dressent la liste des souches de référence la plus largement acceptée.

Tableau 3 : Les souches de référence constituant les 7 sérotypes de l'EHDV

(Campbell and St Georges, 1986 ; Savini et al., 2011)

<b>Sérotypes</b>
EHDV-1 New Jersey
EHDV-2 Alberta, Ib and CSIRO 439
EHDV-3 Ib Ar 22619a
EHDV-4 Ib Ar 33853
EHDV-5 CSIRO 157
EHDV-6 CSIRO 753
EHDV-7 CSIRO 775
EHDV-8 DPP 59

L'EHDV-3 est le même que l'EHDV-1.

Tableau 4 : Les huit souches de référence constituant les 8 sérotypes de l'EHDV connues actuellement

(Anthony et al, 2009b; Wright, 2013)

Sérotypes	Origines	numéro de référence CRO b	Numéro d'Accession Segment-9	Numéro d'Accession Segment-2
Souches de référence <sup>a</sup>				
EHDV-1	Australia	AUS1995/02	-	HM156728
EHDV-1	USA	USA1955/01	AM744985	AM744978
EHDV-1	Nigeria	NIG1967/01	AM745015	AM745008
EHDV-2	Canada	CAN1962/01	AM745005	AM744998
EHDV-2	Japan	JAP1959/01	AM745085	AM745078
EHDV-2	Australie	AUS1979/05	AM744995	AM744988
EHDV-4	Nigeria	NIG1968/01	AM745025	AM745018
EHDV-5	Australie	AUS1977/01	AM745035	AM745028
EHDV-6	Australie	AUS1981/07	AM745045	AM745038
EHDV-6	Bahrain	BAR1983/01	AM745075	AM745068
EHDV-7	Australie	AUS1981/07	AM745055	AM745048
EHDV-7	Israel	ISR2006/013	-	HM156731
EHDV-8	Australie	AUS1982/06	AM745065	AM745058
EHDV-9	RSA	Not available	-	-

<sup>a</sup> Ensemble de huit souches de référence EHDV (Anthony et al, 2009b; Wright, 2013).

<sup>b</sup> Collection de référence *Orbivirus* (CRO), Institut Pirbright.

## 1.2.5 Propriétés et variabilité génétique du virus

Les analyses phylogénétiques basées sur les segments 3 et 9 montrent que les souches d'EHDV peuvent être séparées en deux lignées topotypiques distinctes: l'une <<orientale>> (Asie et Australie) et l'autre <<occidentale>> (Amérique, Afrique, Bassin méditerranéen) (Anthony et al., 2009b; Allison et al., 2010; Maclachlan et al., 2015). Le segment du virus d'Ibaraki qui est génétiquement et sérologiquement proche de l'EHDV-2 isolé en Alberta et au Canada partage une homologie avec le segment 2 de l'EHDV-2 d'Amérique du nord. Les segments 3 et 7 du virus d'Ibaraki codés par les protéines VP3 et VP7 de capsid interne sont similaires à ceux des souches d'EHDV-2 australiennes (Kitano, 2004; Uchino et al., 2003, Ohashi et al., 2002; Wilson et al., 2009). Cette similarité entre les segments des gènes de noyau (VP3 et VP7) montre que ces souches australiennes et Ibaraki sont inclus dans le topotype asiatique qui est maintenant désigné par le topotype oriental basé sur l'analyse phylogénétique comparative du segment 9 (VP6) (Anthony et al., 2009 et Maan et al., 2010; 2016).

### 1.2.5.1 Variabilité de l'expression clinique

Aucune corrélation ne semble possible entre la virulence du virus et son sérotype. Par exemple, le virus Ibaraki qui est une souche d'EHDV-2 (Sugiyama et al., 1989) présente une forte homologie avec les segments de gènes de la souche canadienne EHDV-2 (Uchinuno et al., 2003; Ohashi et al., 1999; Iwata et al., 2001). Cette souche Ibaraki, japonaise, est connue pour être virulente (Omori et al., 1969) alors que la souche américaine, de même sérotype ne l'est pas chez les cervidés. De même, l'EHDV-318, qui est une souche d'EHDV-6, et l'EHDV-7 peuvent induire des signes cliniques chez les bovins, comme observé en Afrique du Nord et en Israël, alors que des souches de même sérotype ne provoquent pas de maladie au Soudan et en Australie (Allison et al., 2012).

En général, il semble que les souches occidentales soient plus pathogènes que les souches orientales (Anthony et al., 2009c).

Bien que certaines souches d'EHDV soient plus virulentes pour les bovins que d'autres, notamment le virus d'Ibaraki (EHDV-2) et les souches EHDV-2, 6 et 7 qui ont causé des maladies chez les bovins du bassin méditerranéen et à la Réunion, ces souches ne causent pas de maladie significative chez les bovins dans d'autres régions endémiques du monde (Savini et al., 2011).

### 1.2.5.2 Relation phylogénétique avec le virus de la FCO

Le virus responsable de la fièvre catarrhale ovine (FCO) et celui responsable de l'EHDV sont deux virus extrêmement proches par leur structure et par le tableau clinique qu'ils développent (Zientara et al., 2011). Cette ressemblance est à l'origine des difficultés rencontrées lorsqu'il s'agit de diagnostic différentiel (Stalleknecht et al., 1991).

Les études phylogénétiques des différentes protéines qui structurent ces deux virus ont permis de comprendre ces similitudes par la proximité séquentielle de leurs génomes (Wilson et al., 2009b).

### 1.2.5.3 Propriétés physico-chimiques de l'EHDV

Les propriétés physico-chimiques de l'EHDV sont similaires à celles des autres *Orbivirus* (Coetzer et Guthrie, 2004). La récente publication de Savini et al. (2011) décrit l'EHDV comme instable à des températures élevées : il est inactivé à 50°C pendant 3 heures et à 60°C pendant 15 minutes. Il est aussi facilement inactivé par un pH inférieur à 6 et par la bêta-propiolactone, à 2% du glutaraldehyde, par les acides, les alcalins (2% sodium hydroxide), à 2-3% de l'hypochlorite de sodium, à 2-3% des composés phénoliques iodofores. Par contre, il est relativement stable à un pH alcalin (6-8). Il est résistant aux solvants des lipides tels que l'éther et le chloroforme. L'infectiosité de l'EHDV dans le sang et dans les tissus est remarquablement stable à 4°C. La congélation à une température comprise entre -20°C et -30°C provoque une perte significative du titre. Ceci ne se produit pas lors de la lyophilisation ou à une température inférieure à -70°C (Coetzer et Guthrie, 2004). En raison de son double brin ARN génomique, il est résistant à l'irradiation UV et gamma (Savini et al., 2011).

### 1.2.6 Le cycle viral

Les *Orbivirus* présentent tous le même cycle de réplication/multiplication au sein de la cellule hôte (hématopoïétique et endothéliale) chez les ruminants (Figure 11). La réplication est considérée comme rapide : le virus se détecte dans le surnageant d'une culture cellulaire au bout de 8 à 10 heures après son inoculation à une température de 37°C. La réplication virale s'effectue dans le cytoplasme de la cellule infectée (Zientara, 2003). Dans un premier temps, le virion s'attache à la membrane cellulaire par l'intermédiaire de la protéine VP2 de la capsid externe. L'interaction entre la VP2 et son récepteur cellulaire d'acide sialique (Hassan and Roy, 1999 ; Zhang et al., 2010) déclencherait une internalisation du virus par endocytose dépendant de la clathrine (Forzan et al., 2007 ; Mohl and Roy, 2014). Les vésicules d'endocytose, nouvellement

formées, fusionnent avec des endosomes et permettent ainsi l'activation d'une transcriptase virale (Huismans et al., 1987a).

L'induction de la transcription s'effectue dans les virions décapsidés. Dans la particule virale, les ARN bicaténaires (ARN db) sont associés aux complexes de transcription constitués par les protéines VP1, VP4 et VP6. Selon l'étude d'Urbano et Urbano en 1994, la réplication de l'ARN s'effectue au niveau de ces complexes et les ARN néo-synthétisés sont libérés par les pores situés au sommet de la particule icosaédrique. La protéine VP1, constituant l'ARN polymérase, ARN-dépendante du virus, transcrit les brins négatifs d'ARN db en ARN messagers précoces coiffés et polyadénylés par la VP4 (Le Blois et al., 1991), qui serviront à la synthèse des protéines et de matrice à la synthèse des ARN négatifs. La protéine VP6 possède des séquences en acides aminés communes aux hélicases et pourrait jouer un rôle dans l'encapsidation des ARNdb (Roy, 1992a). La protéine NS2 se fixe aux ARN simple brin et interviendrait dans la réplication. Une traduction d'ARNm tardifs, non coiffés, se met alors en place et aboutit à la synthèse des protéines structurales. Les protéines VP3 synthétisées forment, dans le cytoplasme, une particule instable à géométrie icosaédrique dans laquelle se situent les segments d'ARN. Les protéines VP1, VP4 et VP6 vont stabiliser cette structure. La protéine VP7, organisée sous forme de trimères, se fixe à la surface de l'assemblage précédent et en rigidifie la structure. Enfin, les protéines VP2 et VP5 s'assemblent pour former la capsid externe (Albina et al., 2007). Les protéines NS3 et NS3A sont ancrées dans les membranes des vésicules intracellulaires et dans la membrane plasmidique. Ces protéines permettraient la fixation et le transport des particules virales dans les compartiments membranaires de la cellule et favoriseraient la libération des virions par bourgeonnement dans une cellule d'insecte (Hyatt et al., 1993 ; Beaton et al., 2002 ; Wirblich et al., 2006) ou par effet cytopathique dans une cellule de mammifère (Han and Harty, 2004).

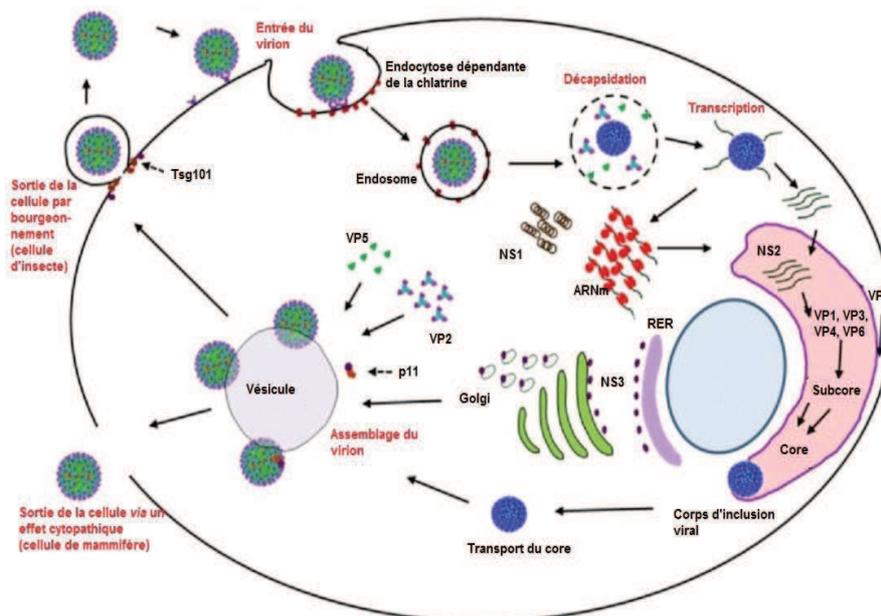


Figure 11 : Représentation schématique du cycle de réplication des Orbivirus, adapté de (Mohl and Roy, 2014)

### 1.2.7 Réassortiment génétique

Une propriété génétique des *Orbivirus*, liée à la nature segmentée du génome, est la possibilité pour deux sérotypes distincts de la même espèce (séro groupe) infectant la même cellule, d'échanger des segments d'ARN porteurs de gènes homologues (Allison et al., 2012). Ce réassortiment a été mis en évidence sur le terrain à plusieurs reprises dans le cas de l'EHDV. On citera par exemple le cas de l'EHDV-6 réassorti, isolé en Indiana en 2006, puis de façon répétée chaque année, jusqu'en 2012 (Allison et al., 2012 ; Anbalgan et al., 2014). Son séquençage et la comparaison avec d'autres souches isolées précédemment dans la région ont permis de montrer qu'elle était issue du réassortiment entre l'EHDV-2 endémique en Indiana (souche de l'Alberta) et l'EHDV-6 exotique. Le réassortiment joue un rôle important dans l'évolution génétique des *Orbivirus* (Karabatsos, 1985). Il contribue à un niveau élevé de variation génétique dans les souches virales individuelles, en particulier, dans les zones où plusieurs sérotypes circulent (Maan et al., 2016) et au niveau de la descendance (Nomikou et al., 2015) et peut augmenter la virulence du virus (Batten et al., 2008 ; Cowly and Gorman, 2010).

## 1.3 Interactions entre l'hôte et le pathogène

### 1.3.1 Pathogénie

La pathogénie de l'EHDV est la même que celle du BTV. Après une inoculation classique sous cutanée, par une femelle *Culicoides* infectée, l'EHDV pénètre dans l'organisme pour se répliquer. La réplication virale se déroule en deux phases: une réplication primaire avec une faible charge virale et une réplication secondaire avec une phase de virémie persistante (Figure 12).

La réplication primaire se déroule pendant 2 à 3 jours dans les cellules endothéliales des vaisseaux et des nœuds lymphatiques régionaux qui drainent le site de l'infection (Sohn et Yuill, 1991). Après cette première phase, les cellules infectées par le virus (lymphocytes, monocytes, cellules dendritiques et macrophages) rejoignent la circulation sanguine et sont véhiculées jusqu'à la rate, aux poumons, au foie, à des nœuds lymphatiques et à d'autres organes où aura lieu la réplication secondaire du virus (les phagocytes mononucléaires, les cellules endothéliales et hématopoïétiques). La durée de cette réplication secondaire est de 4 à 20 jours : pendant cette période, le virus est étroitement lié aux cellules mononuclées, aux plaquettes et aux érythrocytes dans lesquelles, il présente le titre le plus élevé pendant la plus longue période (Gibbs et Lawman, 1977 ; Aradaib et al., 1997). Cette association du virus aux érythrocytes, cellules sanguines à longue durée de vie, permet la protection du virus par l'action d'anticorps neutralisants qui peuvent expliquer la virémie prolongée (Aradaib et al., 1997).

Selon l'espèce animale considérée et le sérotype viral impliqué, la virémie varie; chez les bovins, elle est détectable à partir de 8 à 10 jours environ et semble disparaître au-delà de 2 mois (Gibbs et Lawman, 1977 ; Aradaib et al., 1994 ; Abdy et al., 1999). Chez les cervidés à queue blanche infectés expérimentalement avec un sérotype 2 de l'EHDV, la virémie était détectée, chez certains individus, à partir du deuxième jour post-infection, durée pouvant se prolonger au-delà de 59 jours. A partir du quatrième jour, tous les individus étaient virémiques. Le pic virémique était atteint au sixième jour et les signes cliniques étaient observés entre le sixième et le quatorzième jour (Gaydos et al., 2002c). Dans une précédente étude utilisant également le sérotype 2, le délai d'apparition et la durée de la virémie étaient similaires, et le pic virémique était atteint en moyenne entre 4 et 10 jours post-infection (Quist et al., 1997).

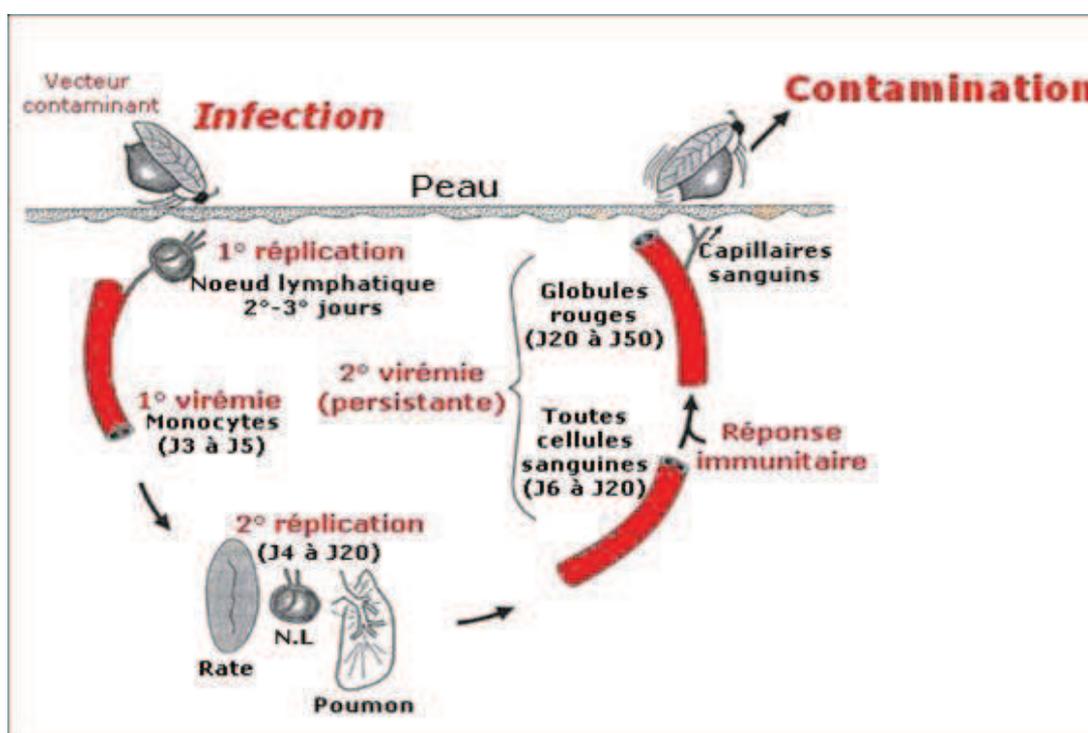


Figure 12 : Pathogénie de l'infection par l'EHDV (adaptée de l'infection du BTV (site du CIRAD 2009-2010))

### 1.3.2 Infection par le virus et effet sur l'immunité

#### 1.3.2.1. Réponse immunitaire

L'infection par l'EHDV est associée à l'induction d'interféron gamma, qui revêt une grande importance dans la stimulation de la réponse innée (Quist et al., 1997). Dès le quatrième jour post-infection, les animaux infectés produiraient de forts taux d'interféron gamma jusqu'à l'apparition

d'anticorps neutralisants au dixième jour post-infection (Quist et al., 1997). Sa présence permettrait de limiter la propagation du virus dans l'organisme, sans influencer sa durée de vie.

Concernant la réponse à médiation humorale, l'infection par l'EHDV déclenche une production rapide d'anticorps qui prend naissance dans les nœuds lymphatiques drainant la région du point d'inoculation. La production d'anticorps neutralisants est détectée dès le dixième jour post-infection (Gibbs et Lawman, 1977; Quist et al., 1997). Ces anticorps sont majoritairement dirigés contre la protéine de capsid externe VP2, principale responsable de la détermination sérotypique. Les anticorps non neutralisants sont également produits, parfois même plus tôt après l'infection (anticorps dirigés contre la protéine de la capsid interne VP7, par exemple, recherchés lors de tests sérologiques). Ces anticorps persistent ensuite dans le sang à des taux élevés pendant environ 3 mois, et resteraient protecteurs pendant plusieurs mois, voire plusieurs années. Les anticorps ne sont pas capables d'éliminer complètement le virus, car celui-ci peut se loger dans les invaginations et les replis membranaires des érythrocytes, à l'abri de l'action des anticorps neutralisants, ce qui expliquerait la persistance de la virémie.

La réponse immunitaire à médiation cellulaire limite la diffusion virale dans les premières étapes de l'infection en limitant la réplication virale par lyse des cellules infectées (lymphocytes T cytotoxiques). La durée de cette réponse immunitaire n'est pas connue et pourrait trouver ses limites dans les phases tardives, où les lymphocytes T utilisés par le virus comme site de réplication. Il est intéressant de noter que cette réponse ne semble pas spécifique d'un seul sérotype et permet plus facilement une protection croisée que la réponse humorale.

#### **1.3.2.2. Protection immunitaire**

Chez les jeunes faons dont les mères ont été infectées par l'EHDV, des anticorps maternels neutralisants sont retrouvés dans le sérum jusqu'à 17 à 18 semaines d'âge. L'immunité passive, acquise suite à une primo-infection par un sérotype, ne permet pas de prévenir une nouvelle infection par le même sérotype, ni d'empêcher la virémie qui s'ensuit. Cependant, elle est capable de la limiter, donc de protéger contre la forme clinique aiguë et sévère de la maladie (Gaydos et al., 2002c). Ainsi, suite à l'épizootie due au virus Ibaraki au Japon en 1959, une baisse des taux de morbidité et de mortalité observée dans les épisodes d'épizooties qui sont survenus l'année suivante dans le même secteur géographique (Omori et al., 1969).

Pour ce qui est de la protection croisée entre deux sérotypes différents, quelques observations et études ont révélé qu'elle était également existante mais limitée. En Amérique du Nord où sévissent les sérotypes 1 et 2, une protection croisée partielle, probablement due à des similarités antigéniques, a été mise en évidence par Gaydos et al. (2002c). Cependant, cette protection partielle n'empêche ni la contamination, ni la virémie.

L'existence éventuelle de protections croisées entre d'autres sérotypes, ou même entre les virus de l'EHD et de la FCO, n'est pour le moment pas documentée.

Enfin, une étude a révélé l'existence de résistances « innées » de certaines sous-espèces de cerfs à queue blanche vis-à-vis du sérotype 1. Le virus était retrouvé à des taux équivalents chez tous les individus, mais ceux de la sous-espèce résistante ne développaient que peu de signes cliniques, sans gravité (Gaydos et al., 2002b).

### **1.3.3 Signes cliniques et lésions**

#### **1.3.3.1. Chez les cervidés**

Les signes cliniques observés chez les cervidés présents en Amérique du Nord (cerfs à queue blanche) (*Odocoileus virginianus*), sont très proches des signes cliniques de la FCO chez les ovins (EFSA, 2009). Généralement, ils apparaissent après une incubation du virus, de 4 à 10 jours, chez l'hôte. Trois formes cliniques en ont été décrites : une forme suraigüe, aigüe et chronique.

Dans la forme suraigüe, le tableau clinique est caractérisé par une forte fièvre, un manque d'appétit, une dyspnée, des oedèmes sévères, une hypertrophie de la langue, une conjonctivite et l'émission de matières fécales sanguinolentes. Les animaux sont prostrés. La mort survient en quelques heures et leur cadavre est souvent retrouvé près des points d'eau (EFSA, 2009 ; Zientara et al., 2011).

Dans la forme aigüe, on observe des symptômes identiques à ceux présentés précédemment mais avec une moindre intensité (EFSA, 2009). Dans ces deux formes, la mortalité est élevée : 90% de létalité chez les cervidés de Virginie (Noon et al., 2002a).

Dans la forme chronique, les cerfs restent malades pendant plusieurs semaines et récupèrent progressivement. La mortalité, à ce stade, est faible. Après récupération, peuvent persister des séquelles plus ou moins graves. Les animaux ne sont généralement plus virémiques (EFSA, 2009).

#### **1.3.3.2. Chez les bovins**

Les signes cliniques observés chez les ruminants domestiques, essentiellement les bovins, sont généralement moins graves que ceux observés chez les cervidés (EFSA, 2009). Le cours de la maladie n'évolue que très rarement de manière fatale (Savini et al., 2011).

Les sérotypes 2, 6 et 7 ont montré leur capacité à provoquer des épidémies avec des signes cliniques pouvant être de modérés à sévères, avec une morbidité de quelques

pourcentages chez les bovins mais avec des diminutions importantes de la production laitière (Savini et al., 2011).

La première épidémie chez les bovins a été rapportée, au Japon, en 1959. L'infection par le sérotype 2, souche Ibaraki, proche génétiquement de l'EHDV-2 (Sugiyama et al., 1989), a causé une morbidité de 12.6% et une létalité de 10.3% (Omori et al., 1969). Les signes cliniques observés : une hyperthermie fugace, une anorexie, un abattement et une chute de la production laitière. Les signes cliniques les plus fréquemment observés sur le terrain sont : la raideur, des manifestations oculaires (larmolement, conjonctivite, congestion oculaire, congestion conjonctivale) (Figure 13a, 13b), nasales (jetage, congestion du mufle, érosions) et buccales (congestion de la cavité buccale, ptyalisme) (13e, 13f). Des lésions de la mamelle (congestion des trayons) (Figure 13g) et des lésions cutanées sont également fréquentes. Lors des nouvelles épidémies survenues au Japon en 1997, des avortements, des malformations foetales et des mises à bas prématurées ont été observées (Ohashi et al., 1999).

En Amérique du Nord, le sérotype 2 a été retrouvé dans quelques cas cliniques, chez les bovins (House et al., 1998), et était responsable de virémies mais sans signe clinique (Thompson et al., 1988). C'est le génotype de l'hôte et non le sérotype qui caractérise la virulence d'une souche (Allison et al., 2012).

Des épidémies d'EHDV-6, chez les bovins ont été rapportées sur l'île de la Réunion, au Maghreb et en Turquie et des épidémies d'EHDV-7 ont été rapportées en Israël. Le sérotype 6 a provoqué, au Maghreb, une morbidité comprise entre 8% (pour l'Algérie) et 18% (au Maroc), et une mortalité apparente entre 0.5% (en Algérie) et 2.2% au Maroc (OIE, 2006). A La Réunion, la morbidité de l'infection est de 7% (Breard et al., 2004) et la mort survenait 8 à 10 jours après l'apparition des signes cliniques. Le sérotype 7 en Israël a causé une morbidité de 5 à 80% et une létalité de 1% (Yadin et al., 2008).

Les symptômes cliniques étaient généralement semblables à ceux déclarés lors de l'épidémie du sérotype 2 au Japon. A ce tableau clinique s'ajoutent, les conséquences zootechniques (infertilité, avortement à moyen terme et amaigrissement) et économiques sur la production des élevages, en particulier la production de lait (Breard et al., 2004; Botner et al., 2009).

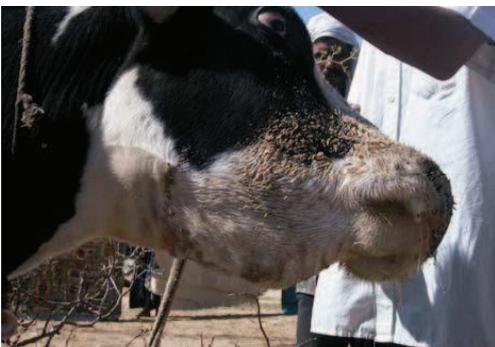
	
<p>a) Jetage, salivation et congestion oculaire chez une vache Prim'Holstein en début d'infection par le virus EHD. (Photo R. Lancelot / B. Malivert, janvier 2009)</p>	<p>b) Conjunctivite, larmoiement, hypersalivation (Centre National de Veille Zoosanitaire, 2010) (Photo Hammami, 2006)</p>
	
<p>c) Oedème de l'auge, (Centre National de Veille Zoosanitaire, 2010), (Photo Baccar, 2006)</p>	<p>d) Congestion conjonctivale d'une vache atteinte d'EHD, (Temizel et al., 2009)</p>
	
<p>e) Erosions et ulcères du mufle, chez une vache Prim'Holstein atteinte d'EHD. (Brunschwig et al., 2009), (Photo R. Lancelot / B. Malivert, janvier 2009)</p>	<p>f) Lésions érosives sur lacavité buccale d'une vache atteinte d'EHD, (Temizel et al., 2009)</p>
	
<p>g) Congestion des trayons (Centre National de Veille Zoosanitaire, 2010), (Photo Hammami, 2006)</p>	<p>h) Oedème et ecchymosesdu bourrelet coronaire (Yadin et al., 2008)</p>

Figure 13 : Signes cliniques détectés chez les bovins

### 1.3.3.3. Autres espèces potentiellement sensibles à l'EHDV

Les caprins paraissent non sensibles à l'infection par l'EHDV. Néanmoins, des détections d'anticorps sont rapportées à la fois dans les conditions du terrain où le virus était présent. Au cours de l'épidémie de l'EHDV-7, en Israël, en 2006, dans le voisinage de bovins infectés à forte séroprévalence (Kedmi et al., 2011), seuls les caprins, originaires de régions infectées par l'EHDV, avaient développé des anticorps (Kedmi et al., 2011). Des anticorps anti-EHDV ont été détections par le test d'AGID sur des caprins, élevés dans des régions où la maladie EHD avait été présente (Al Busaidy et Mellor., 1991). En Indonésie, lors d'une étude sérologique effectuée par séroneutralisation, seul un caprin sur 88, a révélé la présence d'anticorps anti-EHDV-5. La séroconversion a été observée chez les chèvres et les bovins après une épidémie naturelle (Nol et al., 2010). L'espèce caprine demeure insensible à l'infection mais pourrait constituer un réservoir à virus.

Les ovins n'ont jamais présenté de signes cliniques d'EHDV. Cependant, des anticorps ont été détections à la fois dans des études expérimentales sur des races ovines européennes (Gibbs and Lawman, 1977 ; Tomori, 1980) et dans les conditions du terrain (Al-Busaidy et Mellor, 1991), alors que cela n'a pas été le cas en Israël (Kedmi et al., 2010). Le rôle de réservoir serait incertain.

En ce qui concerne la faune sauvage : les chevreuils et les ovins croisés avec la race Suffolk paraissent non concernés par les signes cliniques. Cependant les chevreuils, lors d'une étude expérimentale, ont développé une virémie détections (Gibbs et Lawman, 1977). Les cerfs rouges, les daims élevés en plein air paraissent non sensibles à l'EHDV. Cependant, lors d'une enquête sérologique effectuée, entre les années 2000 et 2002 dans six parcs nationaux allemands, les mêmes animaux élevés en plein air n'ont pas produit d'anticorps anti-EHDV (Frolich et al., 2006). Des études récentes ont montré que les bisons d'Amérique du Nord (Dudley, 2012), les yaks (Van Campen et al., 2013) et les cerfs de Brocket (Favero et al., 2013) sont sensibles à l'infection par l'EHDV et peuvent développer des anticorps suite à une infection.

Pour ce qui est du dromadaire, on manque encore considérablement d'informations, tant sur la sensibilité à l'infection par l'EHDV, que sur son rôle épidémiologique. L'espèce de dromadaires connue, en Amérique du Sud, sous le nom « d'alpaga » peut développer des anticorps anti-EHDV (USDA, 2013).

Lors de l'épidémie d'EHDV en Amérique du Nord, en 2006, qui a entraîné des mortalités importantes chez les cervidés, le bison américain a été découvert de façon tout à fait accidentelle comme infecté alors qu'il n'avait développé aucun signe clinique (Nol et al., 2010).

L'épidémie de 2012 a montré que la morbidité peut atteindre 7% chez le bison qui peut être considéré comme un pourcentage important chez les espèces en voie de disparition (Stevens et al., 2015).

## 1.4 DIAGNOSTIC

Le diagnostic clinique est établi par l'éleveur ou le vétérinaire à la vue de symptômes cliniques pouvant laisser suspecter l'apparition de la maladie dans un cheptel. Cette observation doit nécessairement être confirmée par des examens de laboratoire pour obtenir confirmation. Le diagnostic différentiel de l'EHDV doit se faire avec d'autres maladies virales dont les tableaux cliniques sont plus ou moins similaires, telles la stomatite vésiculeuse, la fièvre aphteuse, l'ecthyma contagieux et la Bluetongue et seuls les examens de laboratoire permettent de confirmer le diagnostic.

### 1.4.1 Diagnostic sérologique

Ce type de diagnostic repose sur des techniques recommandées par l'OIE, à savoir : l'immunodiffusion en gélose, la séroneutralisation et le test ELISA. Ces différentes techniques utilisent les sérums d'animaux récupérés par prélèvements sanguins dans des tubes secs. Le but en est de révéler la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre l'EHDV. Si cette présence d'anticorps est confirmée, cela signifie que la séroconversion s'est déjà produite et l'on sait qu'elle se produit 14 jours environ après la virémie (Afshar et al., 1992; Eschbaumer et al, 2012; Quist et al, 1997). La persistance d'anticorps semble pouvoir durer de plusieurs mois à plusieurs années.

#### 1.4.1.1. Test d'immunodiffusion en gélose ou test AGID

C'est une technique de diffusion du virus sur un milieu gélosé (c'est-à-dire sérologiquement neutre), d'un sérum testé et d'une préparation contenant des antigènes viraux. Une fois que le sérum contient des anticorps spécifiques, des complexes immuns formés précipitent et deviennent visibles dans la gélose après 24 heures d'incubation (Aradaib et al., 1994). Le test d'AGID a été largement utilisé pour la détection d'anticorps spécifiques à l'EHDV à partir du sérum d'animaux infectés (Stallknecht et al., 1991 ; Dunbar et al., 1998 ; Deem et al., 2004 ; Dubay et al., 2004). Il peut détecter des anticorps de 5 à 15 jours après l'infection et jusqu'à deux ans, voire plus (Pearson, 1992). C'est une technique simple, économique et fiable mais elle est moins sensible que la technique ELISA. Ce test est déconseillé quand l'EHDV et le BTV circulent dans la même zone. Il est d'ailleurs progressivement abandonné en raison de son manque de spécificité (il peut détecter des anticorps d'autres *Orbivirus*).

#### 1.4.1.2. La séroneutralisation

Cette technique permet de déterminer l'identité du sérotype contre lequel sont dirigés les anticorps neutralisants. Ce test nécessite l'accès aux sérums des souches de référence des différents sérotypes et requiert un temps d'incubation d'une semaine et plus avant la lecture du résultat. La séroneutralisation constitue la technique la plus fiable mais son interprétation en est rendue difficile par la multiplicité des sérotypes auxquels l'animal a pu être exposé (Maan et al., 2010; OIE, 2014). Son utilisation dans le cadre d'une surveillance, sur un nombre important de prélèvements est lourde et difficile

#### 1.4.1.3. Test ELISA

Plusieurs techniques d'ELISA ont été développées par les industriels en utilisant comme antigène, à la fois la particule virale entière et les protéines recombinantes (Afshar et al., 1992; Thevasagayam et al., 1996). L'antigène spécifique du groupe, la VP7, a été notamment utilisée pour la réalisation de tests sérologiques, après avoir été clonée puis exprimée (en système Baculovirus) dans des cellules d'insecte SF9 (OIE, 2014). Une fois la VP7 purifiée, elle était utilisée pour mettre au point différentes techniques Elisa commercialisées (Mecham and Wilson, 2004 ; Luo and Sabara, 2005). Ce type de test ELISA est le test le plus développé à l'heure actuelle et recommandé par l'OIE (OIE, 2014) pour détecter spécifiquement les anticorps anti-VP7 de l'EHDV et s'affranchir des réactions croisées avec d'autres *Orbivirus*.

### 1.4.2 Diagnostic virologique

Ce diagnostic repose sur des techniques permettant de retrouver directement le virus ou son génome, qui peuvent être réalisées sur des prélèvements biologiques de différentes natures : le sang, la rate, les poumons, les nœuds lymphatiques de carcasses infectées (Savini et al., 2011).

#### 1.4.2.1. Test d'isolement viral

L'isolement des souches virales à partir de prélèvements biologiques repose sur l'inoculation intraveineuse à des œufs de poule embryonnés de 9/11 jours. Le virus, présent dans le prélèvement se multiplie et provoque la mort de l'embryon entre 2 et 7 jours post inoculation. Les œufs sont alors ouverts et des lésions hémorragiques plus ou moins importantes (selon les sérotypes et les souches) sont observées sur les embryons (Breard et al., 2004). La présence du virus peut alors être confirmée par inoculation des embryons homogénéisés à des cellules de

mammifères (BHK-21 (cellules rénales de jeunes hamsters), Vero (cellules rénales de singe vert africain) ou BSR) jusqu'à observation d'effets cytopathiques.

L'isolement viral peut également être réalisé par inoculation de sangs hémolysés sur cellules d'insectes (C6/36 - cellules d'*Aedes.albopictus* ou KC (cellules variipennis)). Après amplification du virus sur culture de cellules d'insecte, celles-ci sont également inoculées à des cellules de mammifères, La réplication du virus dans les cellules de mammifères se traduit par l'apparition d'un effet cytopathique (l'apoptose, déclenchée par l'infection par le virus) après incubation des cellules à 37°. L'inconvénient de cette technique est son délai de réponse très long à obtenir (de 15 jours à 1 mois). Une fois isolé, le sérotype de la souche virale est identifié par le test de neutralisation virale comme décrit dans l'étude (Pearson et al, 1992) ou par le test d'inhibition de la fluorescence (Stott et al., 1978. Blacksell et al., 1994). Plusieurs méthodes de RT-PCR spécifiques du groupe ont été développées pour la détection de l'ARN viral (Aradaib et al., 1998, 2003).

#### 1.4.2.2. Test par PCR

La technique utilisée est appelée réaction de polymérisation en chaîne, PCR, et permet la détection de l'ARN de l'EHDV lors d'une PCR conventionnelle ou d'une PCR en temps réel. Des séquences conservées entre les différents sérotypes sont utilisées comme cibles après rétro-transcription lors de l'étape de RT. Il s'agit de séquences des segments 5, 3, 6 et 10 codant VP3, VP5, VP6 et NS3 (Aradaib et al. 1998; Clavijo et al., 2010; Wilson, 1994; Wilson et al., 2009).

Une PCR conventionnelle spécifique ciblant le segment 2 de l'ARN viral a été développée et a permis la distinction entre les différents sérotypes (Aradaib et al., 1995a; Brodie et al., 1998; Maan et al., 2010). Cette technique a pu détecter et identifier le sérotype en parfait accord avec le test de neutralisation du sérum, rapide, sensible (Maan et al., 2010) et pourrait constituer un outil précieux au cours des infections aiguës et des émergences du virus. (Savini et al., 2011)

Différentes PCR en temps réel ont été développées pour détecter l'EHDV en ciblant soit les séquences du segment 6 soit celles du segment 10 (VP5 et NS3) (Wilson et al., 2009). Une PCR en temps réel et en mode duplex a été développée en ciblant les séquences des segments 2 et 6 (VP2 et VP5) qui permet la distinction entre les sérotypes BTV et EHDV (Aradaib et al., 2003; Wilson et al., 2009; Yin et al., 2010). Ce diagnostic permet de réaliser, dans un seul tube, la détection des génomes viraux des 7 sérotypes et la détection d'un ARN issu d'un gène de l'animal hôte ( $\beta$  actine) ce qui permet d'écarter les faux négatifs (échantillons présentant des inhibiteurs de la PCR) et de vérifier l'intégrité des ARNs extraits). Des kits commerciaux de RT-PCR en temps réel basés sur le segment 9 du génome sont disponibles et largement utilisés. Ils détectent tous les sérotypes connus d'EHDV, dès le 2<sup>e</sup> jour post-infection (Batten et al., 2012, OIE, 2014).

Récemment, une RT-PCR en temps réel duplex détectant le segment 2 a été développée par Viarouge et al. en 2015 pour permettre la détermination rapide des sérotypes viraux de souches de terrain. Cette RT-PCR duplex amplifie simultanément la cible d'EHDV (S9 et S2) pour les 7 EHDV et le gène de contrôle endogène Beta-actine. Récemment, une RT-PCR quantitative ciblant le segment 9 (VP6) a été développée rendant possible la détection des différentes souches d'EHDV quels qu'en soient le sérotype et le topotype (Maan et al., 2016).

Ces outils de diagnostic moléculaire remplacent les outils traditionnels tels que la neutralisation virale pour déterminer le sérotype lors de l'émergence de l'EHDV.

## **1.5 PROPHYLAXIE**

### **1.5.1 Définition**

La prophylaxie consiste en la mise en œuvre d'un ensemble de mesures visant à prévenir l'apparition de la maladie dans les régions indemnes. Dans les régions où la maladie est déjà déclarée, les mesures doivent se borner à en limiter l'extension en combinant des mesures de prophylaxie médicale (vaccination) et sanitaire.

### **1.5.2 La prophylaxie sanitaire**

Elle consiste en un ensemble de mesures non médicales ayant pour but d'éviter l'introduction du virus dans une zone indemne, de circonscrire l'épizootie, d'en isoler les foyers et d'assurer l'éradication de la maladie (Beringer et al., 2000). Selon Stallneckt et Howerth, en 2004, ces mesures de prophylaxie sanitaire sont différentes que l'on se situe en zone indemne ou en zone infectée.

#### **1.5.2.1. En zone indemne**

Comme pour la FCO, ces mesures consisteront en une interdiction de toute commercialisation d'animaux, du transport de leur semence ou d'embryons en provenance des zones infectées. Des opérations de désinsectisation sérieuse des moyens de transport seront effectuées (EFSA, 2007). L'éradication de la maladie est possible par dépistage sérologique et abattage des animaux séropositifs (Abdy et al., 1999).

### **1.5.2.2. En zone infectée**

Les mesures sanitaires à mettre en place lors d'une épizootie d'EHD sont : la restriction des mouvements d'animaux présentant des signes cliniques ; la lutte contre les vecteurs par désinsectisation pour en diminuer le nombre et enfin, le confinement des troupeaux pendant les périodes d'activité vectorielle.

D'autres mesures extrêmes sont applicables : comme l'abattage des animaux malades ou infectés et la destruction de leurs cadavres (Carpenter et al., 2008). Ces mesures limitent l'expansion de la maladie mais ne permettent pas son éradication. Seule la vaccination, comme dans le cas de la FCO, pourrait permettre une prophylaxie efficace.

### **1.5.3 Vaccination**

La vaccination est indispensable en zone d'enzootie (zone menacée ou zone infectée). Elle consiste en une immunisation active permettant d'enrayer l'avancée de la maladie. Seuls deux pays, les Etats Unis d'Amérique, grâce à l'appui de l'Association nationale des éleveurs de cervidés, et le Japon, ont développé des vaccins pour les cervidés et les bovins. Quant à nous, la recherche est très active depuis ces dernières années.

#### **1.5.3.1. Les vaccins disponibles**

##### **1.5.3.1.1. En Amérique du Nord**

Deux vaccins de type inactivé, dirigés contre le virus de l'EHDV-1 et celui de l'EHDV-2, ont été fabriqués en Amérique du Nord et sont utilisés par les éleveurs du Missouri (OIE, 2014; Kitano, 2004; Mc Vey and Maclachlan et al., 2015). Ces vaccins inactivés sont constitués de particules virales tuées par exposition de l'isolat d'EHDV, provenant d'animaux morts ou malades, à un agent physique (chaleur, UV) ou chimique (formol, hydroxylamine, éthylènimine binaire). Deux injections sont nécessaires : l'une de primo-vaccination et l'autre dans un intervalle de 2 à 4 semaines, suivies d'un rappel tous les ans. (Botner et al., 2009; Savini et al., 2011).

##### **1.5.3.1.2. Au Japon**

Au Japon, deux vaccins existaient, l'un inactivé et l'autre atténué, pour lutter contre le virus d'Ibaraki. Le vaccin à virus atténué a été développé à partir de la souche virale de l'EHDV-2 par passages successifs sur oeufs embryonnés ou sur cultures cellulaires et utilisé suite aux épizooties de 1980, pendant la période d'inactivité vectorielle. Ce vaccin a prouvé son efficacité

puisqu'il n'a pas été retrouvé de virus sur les bovins sentinelles vaccinés dans les années qui ont suivi l'épidémie en question.

Cette immunisation par le vaccin atténué fut observée jusqu'en 1997, date à laquelle une nouvelle épizootie, caractérisée cette fois-ci, par un nombre important d'effets sur le processus de reproduction (avortements et mort de nouveau-nés) (Ohashi et al., 1999).

Actuellement, malgré une petite différence au niveau de la séquence de l'acide aminé de la VP2 de la souche Ibaraki et la souche isolé en 2013 (KS-7/E/13), la vaccination par les vaccins inactivés ou atténués reste encore efficace pour la prévention de la maladie Ibaraki (Hirachima et al., 2015) et est réalisée si les éleveurs la demandent (Savini et al., 2011; OIE, 2014).

Des études récentes indiquent que le vaccin vivant atténué contre le virus Ibaraki ne traverse pas le placenta après administration à des bovins gravides (Savini, communication personnelle). Mais selon d'autres auteurs les vaccins inactivés ou atténués présentent les mêmes avantages et inconvénients que ceux du BTV. Cela signifie tout d'abord, que les souches vaccinales atténuées qui peuvent être transmises verticalement et horizontalement par les moucheron vecteurs (Maclachlan et al., 2015 ; Mc Vey and Maclachlan., 2015) chez les bovins rendent impossible la distinction entre un animal naturellement infecté et l'animal vacciné.

#### **1.5.3.1.3. En Europe**

S'il fallait envisager l'éventuelle survenue d'une épizootie d'EHD en Europe, l'utilisation d'un vaccin atténué serait probablement proscrite. En effet, son innocuité sur les ruminants n'est pas prouvée dans les conditions d'élevage de l'Europe. Le risque de sa transmission par des *Culicoides* rendrait impossible la distinction entre les élevages infectés par une souche sauvage et ceux immunisés avec une souche vaccinale (Brunschwig et al., 2009).

Il serait donc plus probable qu'un vaccin inactivé soit choisi, comme cela l'a été dans la lutte contre la FCO. Ce vaccin serait plus sûr et ne risquerait pas d'être transmis par les *Culicoides*. Cependant, il serait plus coûteux à produire et nécessiterait des rappels (l'immunité induite étant de plus courte durée).

Il nous faut également rappeler que quelque soit le type de vaccin choisi, l'absence de preuve concernant une éventuelle protection croisée obligerait à fabriquer un vaccin par sérotype rencontré. C'est également ce qui s'est produit avec le virus de la FCO (Brunschwig et al., 2009).

### 1.5.3.2. Vaccins en cours de développement

Certains chercheurs travaillent à la découverte d'un vaccin à faible coût permettant d'adopter une stratégie DIVA induisant une immunité large contre plusieurs sérotypes d'EHDV et autant que possible en une seule injection (Alshaikhahmed and Roy, 2016).

Comme pour le BTV, les dernières études se sont orientées vers le développement d'un vaccin contre l'EHDV qui est un assemblage de protéines virales en VLP (pour virus-like particules) ou en CPL (corps particules virales). Les VLPs pour le virus du BTV et de l'EHDV sont obtenues en utilisant un système de production de protéines eucaryotes (cultures de cellules d'insectes infectés par un baculovirus codant le gène d'intérêt): Les protéines du virus sont ainsi produites en grande quantité, et assemblées pour former une VLP. Cet assemblage de protéines possède une forme identique à la particule virale, ce qui permet de présenter les protéines virales au système immunitaire dans une conformation identique au virus. De plus cette particule ne possédant pas de matériel génétique, aucun risque de réversion vers la virulence ou vers le réassortiment.

Cependant en raison de la grande complexité du virus de l'EHDV ou du BTV, il est suffisant d'utiliser les 4 protéines structurales majeures (VP2, VP3, VP5, VP7) du virus (Roy et al., 2009).

Ces vaccins à base de protéines synthétiques se sont révélés très efficaces mais n'ont jamais été commercialisés du fait notamment de leur coût important (Stewart et al., 2012, 2013).

De même, leur efficacité a été reconnue pour l'EHDV induisant une réponse immunitaire plus importante et de plus longue durée pour plusieurs sérotypes différents: Les VLPs pour les sérotypes EHDV-1 ont présenté des anticorps neutralisants contre les sérotypes EHDV-1 composant le vaccin, mais également des réactions croisées avec d'autres sérotypes, EHDV-2 et EHDV-6. Des VLPs d'EHDV-2 pourraient être générés rapidement en utilisant les protéines VP2 et VP5 d'EHDV-2 associées avec celles de la capsid interne (VP3 et VP7) d'EHDV-1 (Alshaikhahmed and Roy, 2016). Ces VLPs sont des vaccins conformes DIVA en raison de l'absence de protéines structurales et enzymatiques efficaces pour un certain nombre d'*orbivirus* (Roy et al., 1992, Stewart et al., 2013) qui pourraient être développés rapidement en cas d'apparition d'un nouveau sérotype (Alshaikhahmed and Roy, 2016).

## 2 Objectifs du travail de thèse

Les maladies virales transmises par les arthropodes représentent une menace continue pour la santé animale. En 2006, l'émergence inattendue de l'EHDV en Tunisie, et, au même moment, l'observation de foyers d'EHDV-6 au Maroc et en Algérie, a suscité une vive inquiétude dans le monde agricole tunisien, qui avait déjà eu à faire face à la survenue d'épizooties de BTV en 1999. La persistance du virus de la FCO, avec la présence du BTV-2 isolé en 2003, puis l'apparition d'autres sérotypes (BTV-1 en 2006 et BTV-4 en 2009), était un exemple évident de la possibilité qu'une maladie réputée exotique puisse émerger et devenir endémique.

Très peu de données existent sur l'origine de la maladie EHD en Tunisie. Ce travail a donc été réalisé pour, modestement, tenter d'améliorer les connaissances sur le virus responsable de l'infection des bovins en 2006 ayant entraîné l'apparition de signes cliniques semblables à ceux du BTV.

Les objectifs de ce travail étaient:

- De confirmer l'hypothèse supposée que le sérotype 6 de l'EHDV était responsable du tableau clinique présenté par les bovins malades de Tunisie, ne serait-ce que par voisinage avec l'Algérie et le Maroc qui avaient fait l'objet d'épizooties dues à ce sérotype cette même année.
- De rechercher une présence éventuelle du virus EHDV en Tunisie - avant et après 2006 - chez les bovins comme espèce sensible à ce virus.
- De déterminer si l'espèce dromadaire connue dans la littérature comme sensible au BTV pourrait, éventuellement, jouer pour le virus de l'EHD, un rôle de réservoir potentiel.
- De déterminer avec des captures de *Culicoïdes* la présence de l'EHDV
- Parallèlement à ces recherches sur le virus de l'EHD, la recherche de la présence du virus de la Bluetongue à partir des échantillons de dromadaires et de bovins tunisiens.

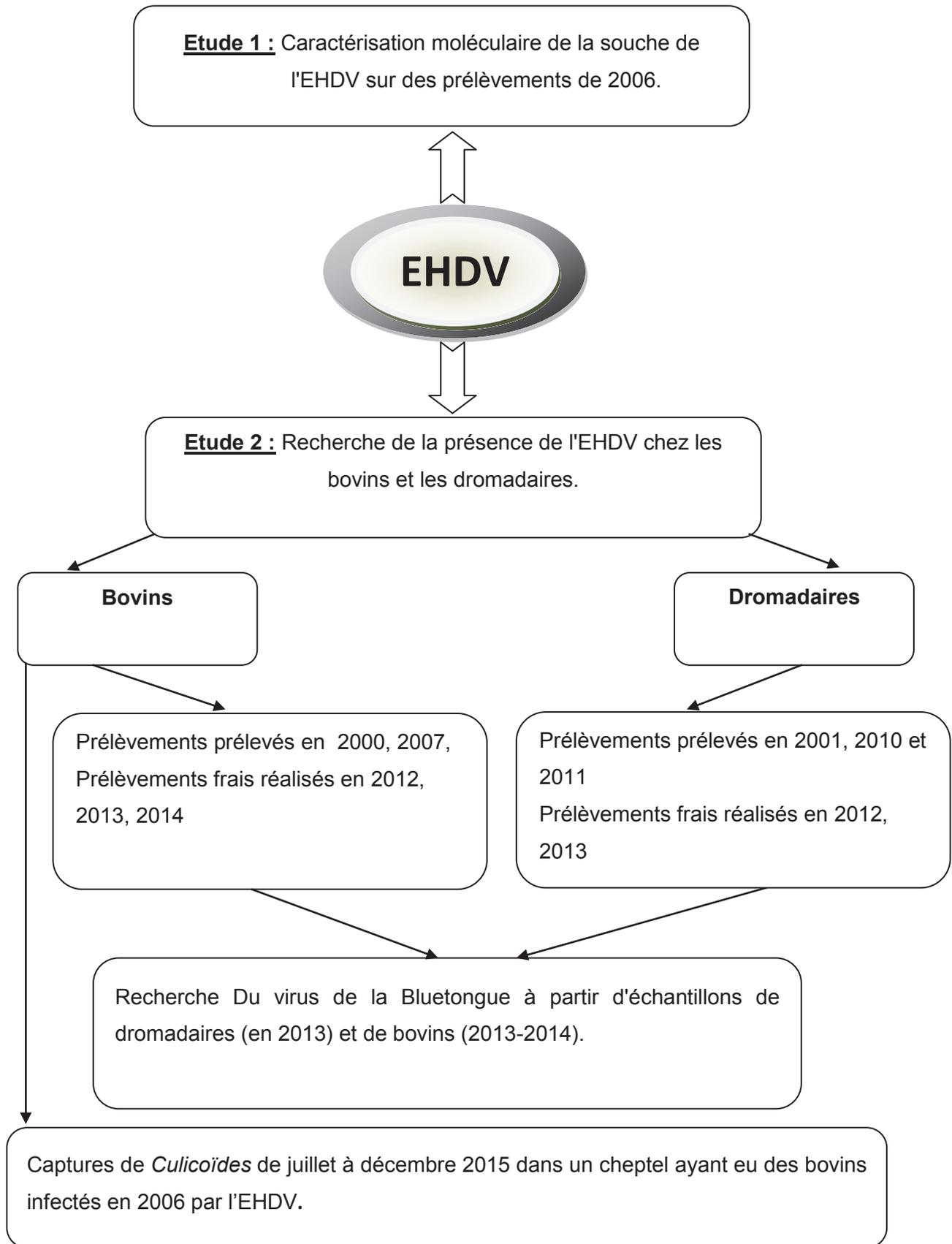


Figure 14 : Schéma représentatif des études réalisées

## **CHAPITRE II**

### **MATERIELS ET METHODES**

### 3 Matériels et méthodes

Deux études ont été réalisées au cours de ce travail de thèse. Une première étude de caractérisation moléculaire du virus de l'EHDV (qui a circulé en Tunisie en 2006), qui s'appuyait sur un échantillonnage de prélèvements de sang/EDTA, et de surnageants issus d'essais d'isolement (sur œufs embryonnés et cellules BHK-21) et également de *Culicoïdes* piégés. Le tout étant conservé à -80°C à la sérothèque de l'IRVT.

Une deuxième étude de recherche de présence du virus réalisée chez les bovins et les dromadaires avec des échantillons prélevés et/ou conservés à l'IRVT, dans les années 2000 à 2015 et issus de différentes régions de la Tunisie (Figure 15). Il nous a paru également judicieux, étant donné les similitudes entre ces deux *Orbivirus*, de nous intéresser à la Bluetongue et aux vecteurs de ces *Orbivirus* : les *Culicoïdes*. Les matériels et méthodes pour chaque étude sont détaillés ci-dessous.

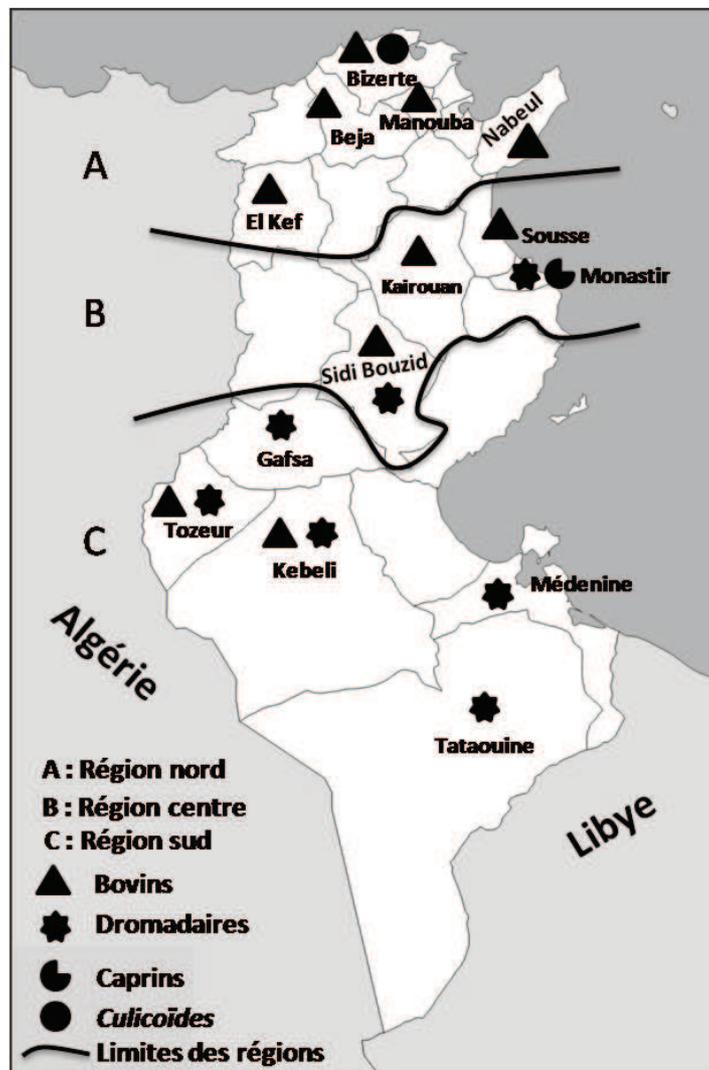


Figure 15 : Carte de la Tunisie montrant les sites d'échantillonnage de 2000 à 2015

### 3.1 Echantillons

#### 3.1.1 Echantillons prélevés en 2006 pour l'étude de la caractérisation moléculaire de l'EHDV

Cette étude a été réalisée à partir d'échantillons de sang de bovin, sur des *Culicoides* (type *Imicola*) et des surnageants d'essais d'isolement sur des œufs embryonnés et sur cellules BHK-21 conservés à la sérothèque de l'IRVT depuis l'année 2006.

Les prélèvements de sang sur EDTA, ont été faits sur une centaine de bovins (identifiés par leur boucle auriculaire) qui présentaient des signes cliniques suspects d'EHDV ou de BTV, répartis aléatoirement sur des foyers cliniques localisés dans toute la Tunisie. Seulement 49 prélèvements de sang, issus de différents bovins testés séropositifs en Elisa EHD (décrits dans l'article de Hammami et al. 2007) ont servi à notre étude. Ces prélèvements avaient été traités et aliquotés dans des cryotubes.

Des cultures cellulaires de BHK-21 avaient été inoculées initialement avec le sang d'un bovin suspecté d'être infecté par l'EHDV car présentant les signes cliniques de la maladie. Cet animal était situé dans la région centre de la Tunisie, gouvernorat de Kairouan, délégation de Hajeb Layoun. Le surnageant de culture était aliquoté dans des cryotubes de 1.5 ml, conservé à --80°C.

Des œufs embryonnés avaient été inoculés avec le sang d'un seul bovin originaire de la région sud, gouvernorat de Tozeur, fébrile, séropositif, présentant des signes cliniques évocateurs de l'EHDV. Les surnageants avaient été aliquotés dans des cryotubes de 1.5ml et conservés à -20°C.

#### 3.1.2 Echantillons de 2000 et 2007 : étude rétrospective

Un total de 586 sérums a fait l'objet d'une enquête sérologique rétrospective pour rechercher une éventuelle circulation virale d'EHDV avant et après l'épidémie de 2006. Ces prélèvements se composaient de 569 sérums recueillis sur des bovins de l'année 2000 issus de différentes fermes de la région nord-ouest de la Tunisie (gouvernorat de Beja) et de 17 bovins, prélevés en 2007 et issus d'une ferme de la région nord (gouvernorat de Manouba). Ces prélèvements ont été aliquotés et conservés à -80°C à la sérothèque de l'IRVT.

#### 3.1.3 Echantillons de bovins prélevés en 2012

Dans le cadre d'un travail prospectif, une campagne de prélèvements a été réalisée en mai 2012, sur 577 bovins ne présentant aucun signe clinique de la maladie, appartenant à une ferme

d'Etat de la région nord, gouvernorat de Bizerte et âgés de 10 à 15 mois. Dans l'histoire de cette ferme, des manifestations cliniques d'EHDV avaient été observées en 2006.

Pour chaque bovin, deux tubes de 4 ml ont été utilisés, l'un pour prélever du sang sur anticoagulant (EDTA) par ponction jugulaire et l'autre sur tube sec pour prélever les sérums. Chaque prise de sang était accompagnée d'une fiche précisant le sexe, l'âge de l'animal et le lieu du prélèvement. Les antécédents cliniques éventuels ont également été notés pour les bovins. Les tubes secs ont été centrifugés à 2500 g pendant 10 min à + 4°C, le plasma aliquoté dans des cryotubes stériles et a été ensuite conservé à -20°C. Les aliquotes de sang total d'un volume de 2 ml ont été conservés à -80°C.

### 3.1.4 Echantillons bovins collectés en 2012 pour un suivi sentinelle

Neuf fermes ont été incluses dans notre étude selon un critère essentiel : existence de cas cliniques confirmés lors de l'épizootie d'EHDV en 2006. Ces fermes sont réparties sur trois grandes régions de la Tunisie : le nord, le centre et le sud (Figure 15). Dans le nord, l'enquête a été menée sur des fermes des gouvernorats de Nabeul, Bizerte, Beja et El Kef ; dans le centre, sur des fermes des gouvernorats de Sousse, Sidi Bouzid et Kairouan et dans le sud-ouest, sur des fermes des gouvernorats de Kebeli et Tozeur. Dans chaque ferme, un troupeau de 10 à 20 bovins a été sélectionné. Chaque bovin était identifié par sa boucle auriculaire (Tableau 5 et Figure 15 et Figure 16).



Figure 16 : Sites visités mensuellement de bovins sentinelles (photos prises par Sofien Sghair)

L'âge des bovins sélectionnés était aléatoire et dépendait de la composition des troupeaux. L'échantillonnage a commencé en juin 2012 et s'est terminé en novembre de la même année. Les prélèvements, au niveau de chaque ferme, ont été effectués en une prise mensuelle, de juin à août 2012 et bimensuellement de septembre à novembre 2012 (période du pic d'activité des vecteurs). Pour chaque bovin, deux tubes de 4 ml ont été utilisés, l'un pour prélever du sang sur anticoagulant (EDTA) par ponction jugulaire et l'autre sur tube sec pour prélever les sérums. Chaque prise de sang était accompagnée d'une fiche précisant le sexe, l'âge de l'animal et le lieu de prélèvement. Les antécédents cliniques éventuels ont également été notés pour les bovins. Les tubes secs ont été centrifugés à 2500g pendant 10 min à + 4°C. Ainsi, le plasma a été aliquoté dans des cryotubes stériles et a ensuite été conservé à -20°C. Les aliquotes de sang total d'un volume de 2 ml ont été conservés à -80°C.

Enfin, un suivi clinique a été réalisé chaque mois, par le vétérinaire examinateur des troupeaux de la ferme visitée. Le suivi clinique comprenait une notation des changements observés selon une fiche-type (Tableau 6).

Tableau 5: Régions, gouvernorats, nombre des prélèvements bovins et mois d'échantillonnage 2012

	Gouvernorat	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre
Région nord	Bizerte	22	22	22	22	22	22
	Nabeul	20	19	20	20	20	20
	Beja	-	-	12	12	12	12
	El Kef	-	-	13	13	13	13
Région centre	Sidi Bouzid	15	17	15	17	17	17
	Kairouan	-	10	10	10	10	10
	Sousse	14	15	15	16	16	16
Région sud	Tozeur	19	15	20	20	20	20
	Kebeli	20	20	20	20	20	20
	Total	110	118	147	149	149	149

Tableau 6 : Fiche de suivi clinique

Signes cliniques	Interprétation
Comportement	Normal
	Apathique
	Déprimé
Œdèmes	Face
	Auge
	Paupières°
Congestion	Légère
	Sévère
Locomotion	Boiterie
	Raideur
Respiration	Jetage nasal léger
	Jetage nasal important, croûtes
	Dyspnée
	Toux
Digestion	Diarrhée
Ophtalmologie	Conjonctivite
	Larmoiement
Cavité buccale	Hypersalivation
	Stomatite légère
	Stomatite sévère
Température	40 à 41°
	41 à 42°
	>42°C
Amaigrissement	

### **3.1.5** Echantillons de bovins sentinelles prélevés en 2013 et 2014

Dans la ferme d'Etat du gouvernorat de Bizerte un suivi sentinelle a été réalisé sur 50 génisses âgées d'1 à 3 ans, laissées au milieu du troupeau, que ce soit dans les pâturages ou à l'intérieur de l'étable. Ces animaux étaient identifiés, depuis leur naissance, par leur boucle auriculaire. Les prélèvements ont été effectués mensuellement de juin à août 2013 et bimensuellement de septembre à novembre 2013 (période supposée de pic d'activité des vecteurs), puis de nouveau mensuellement de février à avril 2014 (période supposée d'inactivité vectorielle).

Le statut négatif des animaux en sérologie et en virologie vis-à-vis de l'EHDV avait été confirmé respectivement par Elisa anti-VP7 et par RT-PCR (détection de tous les sérotypes de l'EHD) une semaine avant le début de l'échantillonnage (mai 2013).

Pour chaque génisse, des prélèvements de sang sur tube sec et gélosé ont été récoltés. Ensuite, ils ont été envoyés au laboratoire de virologie de l'IRVT.

Les prélèvements de sang récoltés sur tubes secs ont été centrifugés et des aliquots de sérum sont utilisés pour réaliser les sérologies. Des aliquotes de sang total, d'un volume de 2 ml, ont été conservés à -80°C et ont été analysés en PCR. Enfin, un suivi sur fiche clinique a été réalisé chaque mois par le vétérinaire examinateur des troupeaux de la ferme (Tableau 6).

### **3.1.6** Echantillons de dromadaires prélevés entre 2001 et 2013 pour la recherche d'EHDV

Quatre vingt quatre sérums avaient été prélevés sur des dromadaires de la région sud-est de la Tunisie en 2001 (gouvernorat de Médenine). Les prélèvements ont été aliquotés et conservés à -80°C à la sérothèque de l'IRVT.

Cent quatre vingt quatre sérums ont été prélevés dans la période de 2010 à 2011 sur des dromadaires provenant des gouvernorats des régions sud-est (Gafsa), sud-ouest (Kebeli), centre (Sidi Bouzid) et centre-est (Monastir). Ces prélèvements ont été aliquotés et conservés à -20°C dans la sérothèque de l'IRVT (Tableau 7).

Tableau 7 : Localisation et répartition des échantillons de dromadaires dans la période 2010-2011

	Région	Gouvernorat	2010	2011	Total sérums par région
Dromadaires	Centre	Sidi Bouzid	60	30	90
		Monastir	30	11	41
	Sud	Gafsa	13	-	13
		Kebeli	40	-	41
Total			143	41	184

En 2012, soixante huit sérums de dromadaires ont été prélevés dans la région sud-est de la Tunisie (gouvernorat de Médenine). Les prélèvements de sang en tube sec et en tube gélosé ont été réalisés.

Enfin, en 2013, un total de 417 dromadaires (dont 50 âgés de 1 à 4 ans et 367 âgés de 5 à 24 ans) a été inclus dans notre étude.

Ces dromadaires étaient issus de troupeaux localisés dans le gouvernorat de Monastir (région centre), au gouvernorat de Kebeli (station touristique de Douz), à Tozeur, sur les parcours de Hazoua et Nafta proches de la frontière algérienne et à Tataouine (région sud) sur le parcours de Remada proche de la frontière libyenne (Figure 17, Tableau 8). L'échantillonnage a commencé en octobre, à Kebeli, et s'est achevé en novembre 2013 dans les autres localités (Monastir, Tataouine, Tozeur).

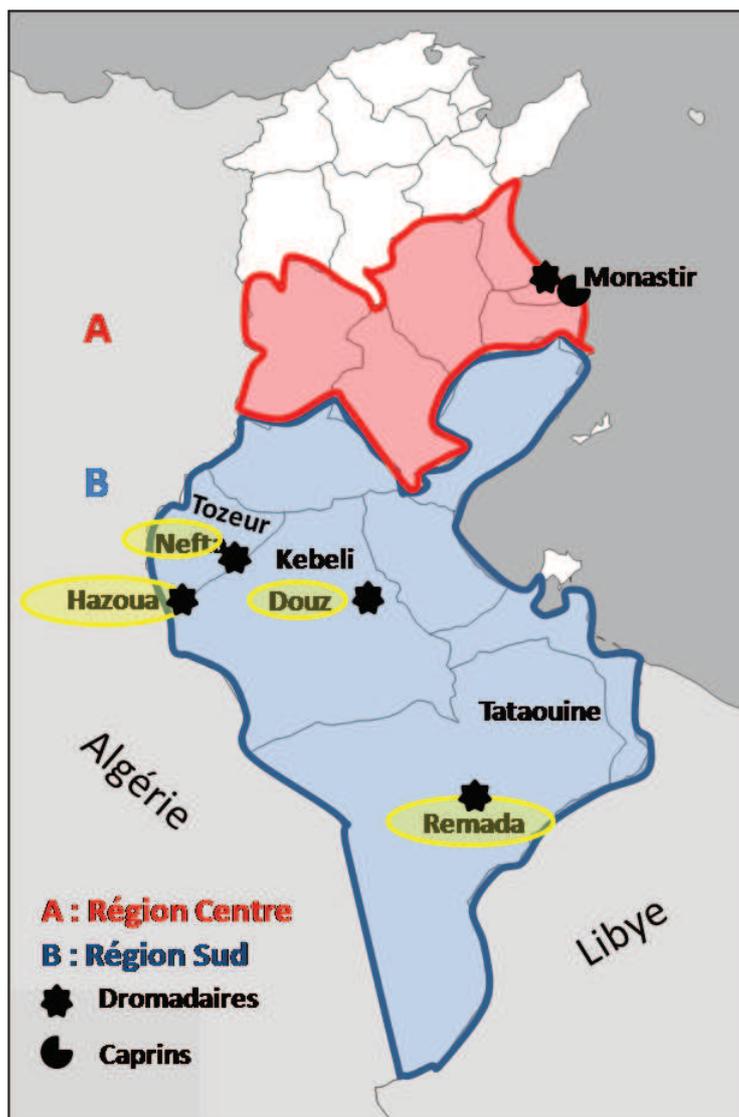


Figure 17 : Site d'échantillonnages des dromadaires à l'intérieur de la Tunisie et sur la frontière algéro-tunisienne et libyo-tunisienne.

Tableau 8 : Localisation et répartition des échantillons de 2013

Région	Gouvernorat	2013
Centre	Monastir	36
Sud	Kebili	51
	Tozeur	120
	Tataouine	210
Total		417

Un prélèvement de sérum et de sang a été fait sur l'animal en position dite baraquée dans laquelle le cou est replié contre le corps. La zone de prélèvement se trouve sur la veine jugulaire, repérable surtout après une pression, même légère, exercée à la base du cou ou à mi-distance entre le thorax et la tête, comme pour les bovins. Pour chaque animal, des prélèvements de sang ont été recueillis en tubes secs et tubes gélosés. Ensuite, ils ont été envoyés au laboratoire de virologie de l'IRVT. Pour la sérologie : le sang est centrifugé et des aliquots de sérum sont utilisés pour réaliser les tests sérologiques qui ont été ensuite conservés à -20°C. Les aliquotes de sang total sont conservés à -80°C.

### 3.1.7 Echantillons de *Culicoïdes imicola* collectés en 2015

Pour connaître l'espèce de *Culicoïdes*, circulant dans la ferme d'Etat (qui avait connu en 2006 un épisode de la maladie EHD), une surveillance entomologique a été menée de juin à décembre 2015. Pour cela, nous avons organisé des opérations de piégeage : relevé mensuel d'un piège pour juillet, août et décembre 2015 et bimensuel pour les mois de septembre et novembre de la même année. Le piège était posé à hauteur d'homme, dans l'étable, une heure avant le coucher du soleil et relevé vers 6h du matin.

Le piège lumineux utilisé est de type OVI, conçu en Italie et commercialisé par « Istituto Zooprofilattico Sperimentale ». Ces pièges fonctionnent sur secteur (220 V), ou avec une batterie (12 V). Le piège comprend un tube néon fluorescent de 30 cm, de 8 Watts et 240 volts. Le tube est accroché sous un «couvercle» métallique bleu. La lumière permet d'attirer les insectes la nuit. Une moustiquaire à mailles serrées ne permet l'entrée qu'aux tout petits insectes. Un ventilateur électrique (12cm x 12cm) les aspire lorsqu'ils virevoltent autour du piège, attirés par la lumière puis, ils sont guidés et propulsés vers le pot collecteur en plastique rempli pour 1/3 d'eau savonneuse dans laquelle les insectes se noient. Une batterie de 12 volts fait fonctionner le piège avec une autonomie suffisante pour assurer trois nuits successives de capture.

L'eau savonneuse est aspirée à la pipette et remplacée par de l'alcool à 90 pour éviter la dégradation des insectes par la chaleur. Il est recommandé de stocker les insectes recueillis à l'abri de la lumière, du soleil et de toutes formes de chaleur. Les *Culicoïdes* collectés sont récupérés le matin, tamisés puis transférés dans un pot dûment labélisé (date, heure de pose, heure de récolte, nom du site, emplacement et type de piège). Les échantillons ainsi collectés sont conservés dans l'alcool à 90°, transportés au laboratoire et gardés à l'abri de la lumière jusqu'à identification.

### 3.1.8. Autres prélèvements

En 2013, 6 chèvres, âgées de 9 ans en moyenne, ont été incluses dans l'étude de recherche de l'EHDV et du BTV. Ces animaux provenaient d'un élevage situé dans un rayon de 5 km autour du foyer de dromadaires, de la région centre-est, gouvernorat Monastir et délégation Sahline. Les prélèvements ont été collectés par ponction jugulaire sur tubes secs et tubes EDTA. Les sérums ont été aliquotés et conservés à -20°C. Les sangs ont été, par la suite, conservés à -80°C.

## 3.2 Recherche de l'EHDV

### 3.2.1 Préparation d'aliqots de broyat de *Culicoïdes*

Les *Culicoïdes* (femelles *Imicola* gorgées de sang) ont été broyés manuellement à l'aide d'un pilon stérile dans un volume de 300 µl de PBS (phosphate Buffer Saline) supplémenté en antibiotiques. Après centrifugation, 100 µl de surnageant étaient prélevés pour extraction des ARN totaux puis à la recherche du génome de l'EHDV (ou du BTV) par RT-qPCR.

### 3.2.2 Extraction des ARN et RT-qPCR des échantillons de sang de 2006

Afin de mettre en évidence le génome viral de l'EHDV dans les différents échantillons et prélèvements, une RT-qPCR spécifique vis-à-vis de l'EHDV (pour la détection de tous les sérotypes d'EHDV) a été réalisée sur les ARNs issus de prélèvements de sang, des broyats de *Culicoïdes* (femelles *Imicola* gorgées de sang) et de surnageants d'œufs embryonnés ou de cellules BHK-21.

L'extraction a été réalisée à partir de 100µl de sang/EDTA, les ARN totaux ont été extraits grâce au kit commercial QIAamp viral RNA et élués dans 50µl d'eau.

Un total de 100 µl de broyat de *Culicoïdes Imicola* a été ajouté à 750 µl Trizol LS Reagent et à 200 µl chloroforme, puis vortexés et centrifugés à 12000g pendant 15min à +4°C. Trois cent µl de la phase aqueuse sont prélevés et transférés dans un tube contenant 300 µl d'isopropanol. Le tout est incubé pendant 10 mn à température ambiante puis centrifugé à 12000 g pendant 10mn à + 4°C afin de précipiter les ARN viraux. Ces derniers ont été ensuite lavés une première fois avec 1 ml d'éthanol à 70%. Les ARN précipités ont été ensuite séchés à température ambiante et sous hotte pendant 20 mn et élués dans 30µl d'eau.

Les surnageants des œufs embryonnés et des cultures de cellules BHK-21 ont été centrifugés et 100 µl de surnageant ont été prélevés pour réaliser l'étape d'extraction. Les ARN totaux ont été extraits grâce au kit QIAamp viral RNA et élués dans 50 µl d'eau.

Cinq µl d'ARN dénaturé ont ensuite été testés par RT-PCR EHDV selon le protocole fourni par le fabricant (le kit Duplex TaqVet Epizootique Hemorrhagic Disease virus).

### **3.2.3 PCR EHDV conventionnelles pour l'amplification des segments 2, 3, 5, 7 et 10**

Des amorces spécifiques dérivées des données de séquences de nucléotides des segments génomiques de l'EHDV disponibles dans GenBank (décrites dans le tableau 12) ont été utilisées lors de RT-PCR classiques avec le Kit RT-PCR (One Step, Qiagen, Courtaboeuf, France) pour amplifier les segments 2, 3, 5, 7 et 10. Deux microlitres et demi d'ARN (dénaturé en présence de DMSO (à 10%) pendant 3 minutes à 95°C) ont été ajoutés à un mélange contenant 15,2 µl d'eau de RNase, 5 µl de tampon 5X, 1 microlitre de mélange de dNTP (400 µM de chaque dNTP), 0,6 µM de chaque amorce, 1 µl de QIAGEN One-Step RT-PCR enzyme. L'amplification a été effectuée selon les paramètres de cycle suivants : 50°C pendant 30 min, 95°C pendant 15 min, suivi par 40 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 56°C et 1 min à 72°C.

#### **3.2.3.1. Sélection des amorces pour l'amplification des segments**

Pour l'étude phylogénétique, nous avons choisi de séquencer les gènes des segments 2, 3, 5, 7 et 10 codant respectivement les protéines VP2, VP3, VP5, VP7 et NS3. La protéine variable VP2 est responsable de la production d'anticorps neutralisants et elle est à l'origine de la détermination des sérotypes EHDV sur la base de réactions de séroneutralisation croisée. Différentes amorces chevauchantes ont été dessinées pour amplifier le gène S2, en partant des séquences des segments homologues d'EHDV déjà disponibles dans les banques de données (Tableau 9).

Tableau 9 : Les amorces utilisées pour l'amplification des segments 2, 3, 6, 7 et 10 du génome de l'EHDV

Segment	Sens	Nom des amorces	Séquence	Localisation	Température
2	Sens	Tu EHD6 P1	GTAAATTGTTCCAGGATG	1-19	50.2°c
		Tu EHD6 P2	CATCAATGGCGAATGGC	1483-1499	52.8°c
		Tu EHD6 P3	CGAAGGTGCGGAAGCG	2229-2245	60
	Anti-Sens	Tu EHD6 M1	CAAGAATGTGATACGAGC	418-401	51.4
		Tu EHD6 M2	GGCTAACTGGCACAATC	2384-2368	52.8
		Tu EHD6 M3	CCAGGTAATCTCTGTCC	2957-2970	53.7
3	Sens	VP3 F 1	AATTTCCRGAGCGATGGC	5-22	
		VP3 F 2	CGTGCTTACCDACAGGAG	895-912	
		VP3 F 3	WGATATGCAGCAGATGGC	1846-1864	
	Anti-Sens	VP3 F 4	TACCATTTTCATATGGTCCG	1570-1588	
		VP3 R 1	TGGRTCCATTCTTTTCRCCC	1112-1094	
		VP3 R 2	TGYGAATGCGCTARATCCA	1984-1966	
6	Sens	EHDV 6 S6 F	GTAAAAAGATCCAGTGCCG	1-21	58°c
		EHDV 6 S6 F2	GGAGATAGCTGGCATGAG	682-699	58°c
	Anti-Sens	EHDV 6 S6 R	TTCGGTTGTATTTTCGGCG	870-851	58°c
		EHDV6 R2	AAGTTGAAGATCCGAATACC	1640-1620	58°c
7	Sens	VP7 F1	TTTGGTGAAGATGGACAGC	8-27	
	Anti-Sens	VP7 R1	AAGTTGAATTTGGGAAGACG	1160-1141	
10	Sens	EHDV S10 F	GTAAAAAGAGGTTGGCGTC	1-21	58°c
	Anti-Sens	EHDV S10 R	AAGTGTGTCGGAGGATGGC	808-782	58°c

### 3.2.3.2. Révélation des produits amplifiés

Les produits PCR sont ensuite soumis à une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose pour permettre la visualisation des produits amplifiés. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire numéro VII (DNA Molecular Weight Marker VI \_ roche®) établit une échelle de 2.1 Kpb sur le gel de migration pour le positionnement de l'ADN du témoin positif et celui des échantillons. Pour préparer 1l du tampon TAE, 20 ml de la solution était dilué 50 fois. Cent millilitres ont été utilisés à la préparation du gel, le reste était utilisé comme tampon d'électrophorèse. L'agarose utilisée pour ce gel a été préparée à une concentration finale de 2% en tampon Tris-borate d'EDTA (TBE) (2 gr d'agarose pour 100 ml de TBE). La solution était chauffée au four à micro-ondes jusqu'à la dissolution de l'agarose. Les 100 ml de gel sont coulés dans la plaque en verre, disposée bien à plat et équipée d'un peigne. Le gel était laissé à refroidir durant 15 min, ensuite le peigne était retiré délicatement. L'ensemble est placé horizontalement dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE.

Dans chaque puits, 6.2 µl d'échantillon étaient déposés (5 µl de produit de PCR et 1,2 µl de tampon de charge bromothymol). Le temps de migration était d'1 heure, sous un voltage de 120 voltmètres. Le gel était ensuite baigné dans une solution de bromure d'éthidium (BET), fluorescent aux U.V., se fixant sur les molécules d'ADN et permettant ainsi de visualiser les bandes d'ADN en ultraviolet au moyen d'une caméra reliée à un ordinateur. La taille des produits amplifiés était vérifiée avec le marqueur de poids moléculaire.

### 3.2.4 Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage a été réalisé par le laboratoire Eurofins MWG Operon (Allemagne). La réaction de séquençage se fait selon la méthode de Sanger. Les séquences de la souche tunisienne d'EHDV obtenues ont été analysées et assemblées au moyen du programme SeqMan (logiciel Lasergene-DNA Star). Ensuite, les séquences obtenues ont été alignées, à l'aide du programme Clustal V (logiciel DNA Star), sur leurs séquences homologues publiées dans GenBank. Finalement, les arbres phylogénétiques ont été construits et visualisés grâce à l'utilisation respective des programmes Neighbour-joining, MegaAlign et Bootstrap Trials.

### **3.3 Recherche du génome du BTV dans les prélèvements de dromadaires et de bovins en 2013**

La présence d'ARN viral dans les échantillons de sang a été recherchée par PCR en temps réel après une étape de transcription inverse RT pour la détection de tous les sérotypes de BTV (RT-qPCR de groupe). Cette RT-qPCR de groupe consiste à amplifier une séquence du segment 10, conservée au sein des différents sérotypes du BTV (Adiavet BTV Realtime A352 (Adiagene, France)).

Après extraction, réalisée à l'aide d'un kit commercial (Qlamp Viral RNA Mini kit, Qiagen), un aliquot de 5 µL d'ARN dénaturé était ajouté au mix Adiavet BTV Real-time A352, et placé dans un thermocycleur (10 min à 45°C ; 10 min à 95°C ; 40 cycles (15 sec à 95°C + 60 sec à 60°C). L'étape de dénaturation de l'ARN était réalisée en présence de DMSO (10%) pendant 3 minutes à 95°C.

### **3.4 Isolement viral**

#### **3.4.1 Sur œufs embryonnés**

L'isolement du virus a été réalisé sur les échantillons du sang qui ont présenté des résultats positifs en RT-PCR. Afin d'inoculer le sang, un vaisseau sanguin était repéré sur des œufs embryonnés de 9 à 11 jours. Puis un morceau de coquille était ôté, en regard du vaisseau sanguin, et 100 µl d'inoculum sont injectés directement dans le vaisseau. Ensuite, les œufs inoculés étaient incubés à 35°C pendant une période de 2 à 7 jours. Les œufs morts, dans les premières 24 heures, étaient jetés, ceux qui mouraient entre le 2ème et le 7ème jour étaient récoltés quotidiennement, et ceux qui étaient vivants au-delà de cette période étaient alors tués par congélation. Les embryons étaient ensuite broyés dans un milieu de culture cellulaire (MEM stérile supplémenté en antibiotiques (Streptomycine et Pénicilline, 100UI/ml)) et centrifugés à 2500g à 4°C pendant 10 min pour enfin récolter un homogénat qui peut ensuite être inoculé à des cellules BHK-21, KC, à de nouveaux œufs, ou utilisé pour des RT-PCR (Figure 18 a et b).

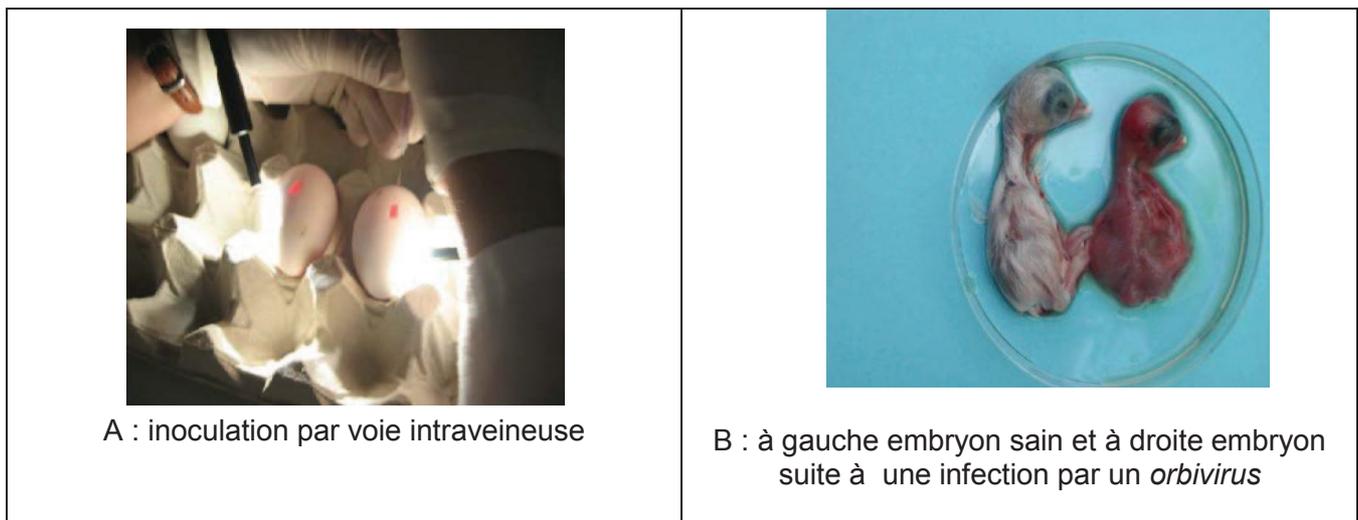


Figure 18 : Isolement sur œufs embryonnés (source ANSES)

### 3.4.2 Sur BHK-21

Pour cet isolement, il fallait tout d'abord obtenir des boîtes de culture monocouche de cellules BHK-21 de 24H. Ensuite, on y incorporait l'inoculum en préparant une boîte comme témoin négatif. On laissait les boîtes incuber à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, et quotidiennement, on observait les monocouches au microscope pendant une semaine en recherchant des effets cytopathiques. En l'absence d'effet cytopathique après 8 jours, les boîtes de cellules sont conservées à 4°C (si le tapis cellulaire est détruit à plus de 80%) ou à -80°C (dans le cas où il recouvre 20% ou plus de la surfaceensemencée. Un aliquot de culture cellulaire de ce premier passage (surnageant et débris de cellules) est inoculé à un tapis de cellules BHK-21 (de 24h) (cette étape constituant son second passage viral). Les échantillons étaient considérés comme négatifs si aucun effet cytopathique n'était observé après trois passages. La mortalité observée sur œufs embryonnés et celle de l'effet cytopathique sur BHK-21 est confirmée par RT-PCR réalisée sur les surnageants de culture cellulaire (Figure 19).



Figure 19 : Isolement du virus de l'EHDV sur culture cellulaire

### **3.4.3** Sur KC cells (cellules de *Culicoïdes*)

L'isolement de virus sur KC cells (des cellules de larves *C. sonorensis*) était décrit dans l'article (Bréard et al., 2013). Des boîtes de cellules KC sont entretenues à 27°C en milieu de culture composé de milieu Schneider et de 10% de sérum de veau fœtal. Ces cellules ont été inoculées avec 100 µl d'inoculum en RT-PCR EHDV et incubées à 27°C pendant 10 jours. Après incubation, le surnageant des boîtes KC était recueilli pour extraction d'ARN et analyse par RT-PCR EHDV.

## **3.5** Etude sérologique

### **3.5.1** Elisa de compétition EHDV

Dans un premier temps, tous les sérums étaient testés par Elisa de compétition EHDV (Lsi Vet EHDV compétition, Lsi, France) pour la détection des anticorps dirigés contre la protéine VP7. Les résultats étaient exprimés en pourcentages de compétition ou d'inhibition (IP) de la densité optique du sérum négatif de référence, comme suit :  $(DO \text{ échantillon} / DO \text{ contrôle négatif}) \times 100$ . Conformément aux recommandations du fabricant, les sérums avec un IP supérieur à 60% étaient considérés comme positifs.

### **3.5.2** Elisa de compétition BTM

La recherche des anticorps anti-VP7 spécifiques du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) dans les sérums de bovins, de camélidés et de caprins a été réalisée par ELISA (cElisa, ID-Screen Blue Tongue kit, ID VET, France). Le test était validé avec une valeur moyenne de DO des contrôles négatifs (DOCN) supérieure à 0.7 et une valeur moyenne de DO du contrôle positif (DOcp) inférieure à 30% du (DOCN). Conformément aux recommandations du fabricant, les sérums présentant un pourcentage de compétition (IP) inférieur à 35% étaient considérés positifs.

### **3.5.3** Séroneutralisation

Les sérums positifs en Elisa de compétition EHDV ont été testés par séroneutralisation. Ce test a pour but de détecter les anticorps neutralisants (anti-VP2) pour EHDV. Le virus était dilué dans des tubes de 10 en 10, de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>. Les sérums à typer ont été mis dans un incubateur à 56°C pendant 30 min. Les sérums à tester étaient placés sur des plaques de 96 puits et dilués dans un volume de 50µl de milieu MEM, du 1/2 jusqu'au 1/64<sup>ème</sup>. Les 50µl de sérum dilué sont

ensuite mis en contact avec 50µl de MEM contenant 100 doses cytopathiques 50% (DCP50%) de virus EHDV-6.

Après une heure d'incubation à 37°C, 20 000 cellules BSR (dérivées de rein de bébé hamster (BHK-21)) sont ajoutées dans chaque puits avec 100µl de MEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 2% d'acides aminés non essentiels et 2% de pyruvate de sodium. Après une incubation de 7 à 8 jours à 37°C, les plaques sont ensuite colorées et lues.

### 3.6 Tri et identification des *Culicoïdes* piégés en 2015

Les insectes capturés dans les pièges lumineux ont été mis dans l'alcool à 90° pour faciliter ainsi le pré-tri. Les insectes ont été examinés sous loupe binoculaire pour procéder à leur identification.

Le pré-tri, première étape, consiste à séparer les *Culicoïdes* des autres insectes grâce à leur morphologie générale (notamment une taille inférieure à 5 mm et des pièces buccales plus petites que la tête). Les *Culicoïdes* sont différenciés des autres genres de la famille des *Ceratopogonidae* grâce à la forme générale de leur corps.

L'identification, deuxième étape délicate et fastidieuse, consiste en la reconnaissance des différents groupes et espèces aidée par l'observation au microscope et à la loupe binoculaire si nécessaire. Dès lors, les critères porteront sur la taille et la forme de l'appareil génital et le nombre de sensilles coeloconiques sur les articles antennaires (Figure 20).

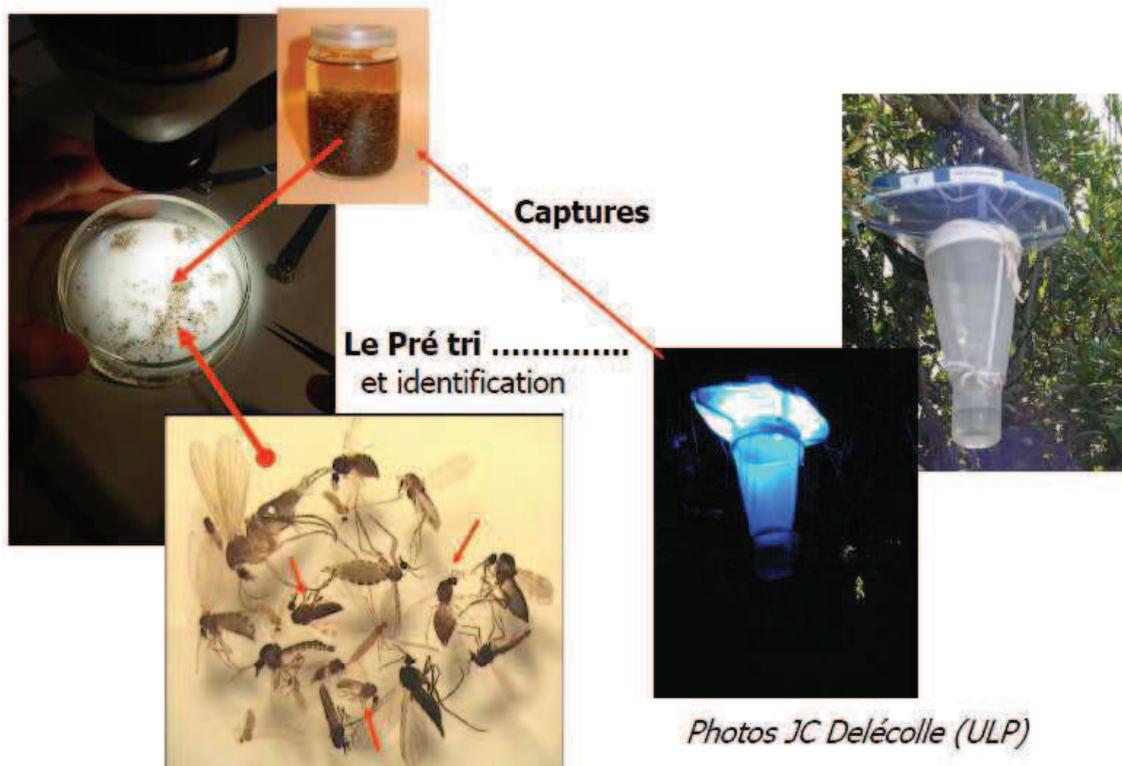


Figure 20: Le piégeage, tri et identification des *Culicoïdes* [Dufour (2008)]

## **CHAPITRE III**

# **R E S U L T A T S**

## 4 RESULTATS

### 4.1 Détection et caractérisation moléculaire de l'EHDV-6

Les échantillons collectés pendant l'épizootie de 2006 de type sang-EDTA de bovins ont été analysés pour la détection du génome de l'EHDV et l'isolement du virus.

Ces prélèvements ont été recueillis sur 49 bovins élevés dans des fermes dans lesquelles l'EHDV avait été détecté (sérums EHD positifs par test cElisa). Ces échantillons de sang total, décrits dans l'étude de Hammami et al., en 2007, ont été stockés (sans traitement ou lavage) à -80°C jusqu'à leur utilisation en 2012.

L'extraction des ARNs a été réalisée puis, la présence d'ARN viral recherchée par PCR en temps réel, après une étape de transcription inverse (RT), pour la détection de tous les sérotypes de l'EHDV (RT-PCR de groupe amplifiant une portion du segment 9 codant la protéine VP6).

A partir des 49 échantillons de sang sur EDTA, le génome de l'EHDV a été détecté seulement dans deux échantillons, issus de deux bovins élevés dans les régions sud-ouest (gouvernorat de Tozeur) et nord (gouvernorat de Zaghuan). Les valeurs de CT étaient respectivement de 28 et 34. A partir de l'échantillon positif dont la valeur de CT était de 28, nous avons réalisé des RT-PCR conventionnelles pour amplifier 5 gènes codant pour les protéines VP2, VP5, VP3, VP7 et NS3. Les produits de RT-PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier la taille attendue des fragments amplifiés avec les couples d'amorces complémentaires aux séquences du segment 2, 3, 6, 7, et 10.

Les séquences des cinq segments génomiques obtenus à partir des produits d'amplification ont été assemblées, analysées puis enregistrées dans GenBank, sous les numéros d'accès suivants: KC986822 (S2), KC 986 823 (S5), KC 986 825 (S3), KC 986 824 (S7) et KC 986 826 (NS3).

Les séquences nucléotidiques codantes ont été comparées aux séquences disponibles dans GenBank pour déterminer l'homologie génétique entre la souche EHDV tunisienne et d'autres souches d'EHDV isolées dans le monde. Les résultats de ces comparaisons sont présentés sous forme d'arbres phylogénétiques et de tableaux donnant les pourcentages d'homologie entre les souches d'EHDV.

#### 4.1.1 Séquences des segments génomiques

##### 4.1.1.1. Le segment 2 de l'EHDV-6

Le segment 2 complet comprend 2971 pb. Six couples d'amorces ont été nécessaires pour amplifier et obtenir sa séquence codante de 2919pb (Tableau10). La RT-PCR a été suivi d'une révélation par électrophorèse sur gel d'agarose qui a permis la visualisation des fragments de segments 2 amplifiés. La figure 21 illustre l'amplification de 3 fragments du segment 2 de 417pb, 728 pb, et 901 pb.

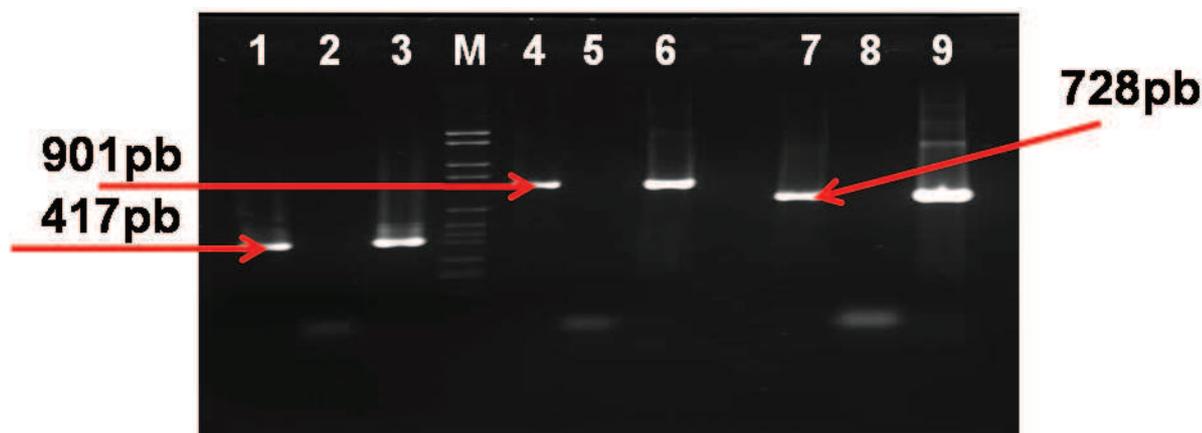


Figure 21 : Gel d'agarose après migration d'1h des produits d'amplification du segment 2. Les pistes 1, 4, 7 présentent les amplifications issues des échantillons de la Tunisie. Les pistes 3, 6, 9 celles des témoins positifs (EHDV 6 souche marocaine) et les pistes 2, 5, 8 sont issus de témoins négatifs. M désigne le marqueur de la taille moléculaire.

L'arbre phylogénétique réalisé avec différents segments 2 permet de visualiser les relations entre les souches EHD de même sérotype. Les résultats des comparaisons, qu'ils soient présentés en tableau (Tableau 10) ou sous forme d'arbre phylogénétique (Figure 22), reflètent une étroite parenté de la souche tunisienne avec les souches marocaine et algérienne, et un pourcentage d'homologie nucléotidique qui est respectivement de 99.9 et 100%. Les données de séquence ont également montré que les génomes de l'EHDV-6 tunisien, marocain, algérien, sud africain, réunionnais et bahreïnais sont très proches et possèdent une homologie qui varie entre 96.7 à 97.2%. Ces pourcentages d'homologie nucléotidique (%NT) diminuent considérablement avec les souches EHDV-6 de la Guadeloupe (Caraïbes), d'Australie ou des USA, avec des valeurs respectives de 67.9%, 68.0% et 68.1%. Le sérotype 8 australien est relativement proche de ce groupe avec un % NT de 65.4% avec la souche EHDV-6 tunisienne. Les cinq autres sérotypes de l'EHDV, l'EHDV-1 (USA, Nigéria), 2 (Japon, Canada, Australie), 4 (Nigéria), 5 (Australie) et 7 (Israël, Australie) montrent une homologie avec la séquence S2 tunisienne de 34.5 à 36.4%.

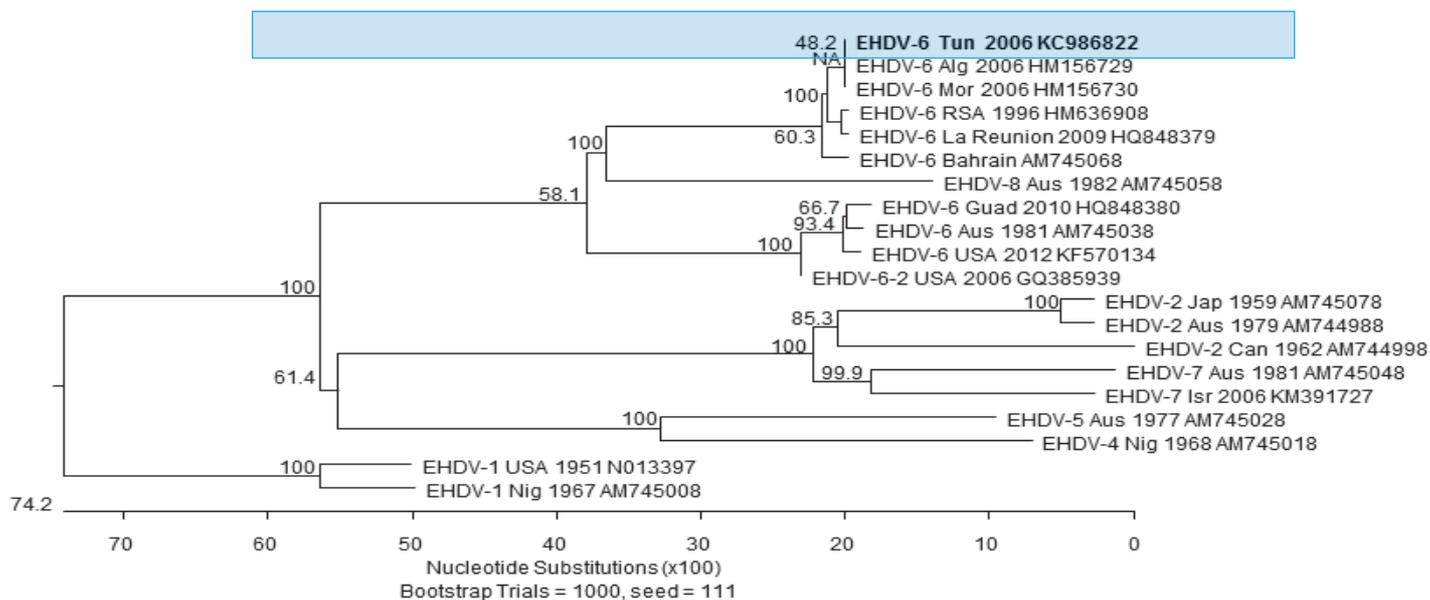


Figure 22. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 2 du virus tunisien et d'autres EHDV.

Les comparaisons de séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star. Les numéros d'accèsion dans GenBank sont les suivants : EHDV-6 (Alg): HM156729 ; EHDV-6 (Mor) : HM156730 ; EHDV-6 : (Tun): KC986822; EHDV-6 (SA) : HM636908 ; EHDV-6 (Bahrein): AM745068 ; EHDV-6 (Guad) : (848380) ; EHDV-8 (Aus) : AM745058 ; EHDV-5 (Aus) : AM745028 ; EHDV-4 (Nig) : AM745028 ; EHDV-2 (Jap): AM744988 ; EHDV-2 (Aus) : AM744998 ; EHDV-7 (AUS) : AM745048 ; EHDV-713 (Isr) : HM156731 ; EHDV-1 (USA) : NC013397 ; EHDV-1 (Nig) : AM745008.

Tableau 10 : Comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et d'acides aminés du S2 de l'EHDV-6 tunisien avec d'autres S2 issus de souches EHDV isolées dans le monde.

Percent Identity																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1	█	96.8	67.6	67.9	96.4	37.1	34.7	33.7	33.5	34.5	37.2	35.7	37.1	68.2	68.1	67.9	67.8	97.2	62.9	35.0	1	EHDV-6 Guad 2010 H0848380
2	3.3	█	70.6	71.4	98.8	41.6	38.1	36.4	35.4	35.7	40.4	39.6	40.4	71.2	71.0	71.4	71.3	98.1	64.5	40.1	2	EHDV-6-2 USA 2006 GQ385939
3	36.2	32.4	█	97.2	67.9	36.0	34.3	34.9	33.2	34.8	37.3	36.9	36.4	98.8	96.5	97.2	97.1	67.8	65.1	34.5	3	EHDV-6 RSA 1996 HM636908
4	35.8	31.1	2.9	█	68.0	36.0	34.7	34.5	33.4	34.5	37.5	35.3	36.4	97.2	96.7	100.0	99.9	68.1	65.4	34.7	4	<b>EHDV-6 Tun 2006 KC986822</b>
5	3.6	1.2	35.6	35.4	█	37.7	35.0	33.5	33.9	34.7	37.1	35.8	37.8	68.5	67.9	68.0	67.9	93.4	62.9	35.2	5	EHDV-6 USA 2012 KFS70134
6	79.1	70.0	80.0	79.8	79.0	█	33.4	34.5	32.4	34.7	35.1	35.2	87.6	36.5	36.1	36.1	36.1	37.5	35.7	33.6	6	EHDV-1 USA 1951 N013397
7	92.2	83.2	93.5	91.8	92.6	101.6	█	64.5	62.6	64.3	34.1	33.5	33.7	34.4	34.2	34.7	34.7	34.9	34.7	71.2	7	EHDV-7 Aust 1981 AM745048
8	94.0	83.0	89.7	89.4	95.5	95.1	39.3	█	66.3	92.4	34.2	35.5	33.8	34.9	34.3	34.5	34.5	33.8	33.2	65.1	8	EHDV-2 Japon1959 AM745078
9	97.3	84.5	94.9	91.9	96.7	95.0	42.9	38.6	█	66.5	32.7	34.0	33.5	33.2	33.3	33.4	33.4	33.8	34.7	63.2	9	EHDV-2 Can1962 AM744998
10	93.2	82.3	90.4	90.1	93.5	95.7	39.7	4.7	38.0	█	34.4	34.2	34.3	35.0	34.5	34.5	34.4	34.6	33.1	64.9	10	EHDV-2 Aus1979 AM744988
11	85.8	82.0	82.4	82.8	84.0	89.9	100.0	97.5	102.1	98.1	█	58.0	35.6	37.6	36.8	37.5	37.4	36.9	37.9	33.5	11	EHDV-5 Aust 1977 AM745028
12	89.5	80.0	85.9	85.6	89.4	88.7	100.6	96.7	101.2	98.6	48.7	█	34.3	36.9	36.5	35.3	35.3	35.9	36.8	33.6	12	EHDV-4 Niger 1968 AM745018
13	80.2	74.2	79.0	78.7	79.3	12.8	100.4	96.4	97.2	95.5	88.5	90.7	█	36.7	36.4	36.4	36.4	37.4	34.6	34.0	13	EHDV-1 Nigeria 1967 AM745008
14	35.6	31.5	1.2	2.9	35.0	79.5	92.6	89.7	93.8	90.0	81.9	85.8	77.9	█	96.5	97.2	97.1	68.4	65.2	34.4	14	EHDV-6 La reunion 2009 H0848379
15	35.8	31.5	3.5	3.4	35.7	79.4	92.1	89.9	93.1	90.4	83.4	86.9	78.7	3.5	█	96.7	96.6	68.1	65.4	34.4	15	EHDV-6 Bahrain AM745068
16	35.8	31.1	2.9	0.0	35.4	79.7	91.8	89.4	91.9	90.1	82.7	85.5	78.6	2.9	3.3	█	99.9	68.1	65.4	34.7	16	EHDV-6 Alg 2006 HM156729
17	35.8	31.2	2.9	0.1	35.4	79.7	91.8	89.4	92.0	90.1	82.7	85.4	78.7	2.9	3.4	0.1	█	68.0	65.4	34.5	17	EHDV-6 Mor 2006 HM156730
18	2.8	1.9	35.8	35.6	2.5	78.3	92.5	94.6	97.6	93.0	84.9	88.6	79.3	35.1	35.7	35.6	35.6	█	63.3	34.7	18	EHDV-6 Aus 1981 AM745038
19	42.8	39.6	39.4	38.9	42.6	83.4	95.4	94.9	94.9	95.5	85.0	88.7	84.3	39.5	39.4	38.9	38.9	42.4	█	34.2	19	EHDV-8 Aus 1982 AM745058
20	93.1	78.5	89.8	89.1	92.8	95.3	32.3	39.1	42.8	39.6	102.7	98.5	96.7	89.7	90.1	89.1	89.0	94.1	95.9	█	20	EHDV-7 Isr 2006 KM391727
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		

#### 4.1.1.2. Le segment 6 de l'EHDV-6

Le segment 6 complet de l'EHDV-6 comprend 1641pb. Nous avons séquencé 1584 pb de sa partie codante avec deux paires d'amorces (Tableau 11). La séquence du segment 6 de la souche tunisienne a été comparée avec les souches qui ont fait l'objet de publications dans GenBank parmi lesquelles les souches isolées au Bahrein et en Afrique du Sud (Tableau 11 et Figure 23).

Les résultats présentés sous forme d'arbre phylogénétique ont permis d'établir clairement un positionnement de la souche tunisienne proche de la souche sud-africaine (EHDV-6 RSA 1996 HM 636912) et de la souche de Bahrein. Les résultats de cette comparaison montrent une homologie de 97.3% avec la souche sud-africaine et de 96.1% avec celle de Bahrein de même sérotype. Avec d'autres souches, comme l'EHDV-6 USA (sauvage ou réassortie) ou l'EHDV-6 australien, l'homologie au niveau des nucléotides diminue faiblement, avec des pourcentages allant de 78.7 à 78.2%. Le pourcentage d'homologie du segment 6 diminue jusqu'à des valeurs variant de 56.4% à 64.3% avec d'autres sérotypes comme EHDV-1 (Nigéria, USA), EHDV-2 (Australie, Canada), EHDV-4 (Nigéria) et EHDV-5 (Australie). Le pourcentage d'homologie le plus faible est observé avec l'EHDV-8 australien (34.% NT).

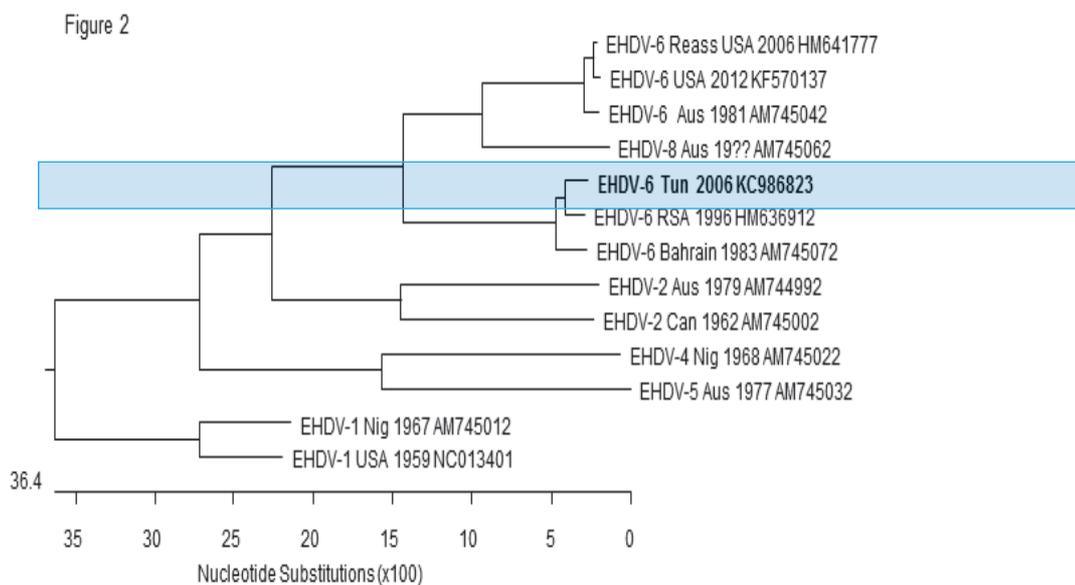


Figure 23. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 6 du virus tunisien et d'autres EHDV.

Les comparaisons des séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star. Les numéros d'accès dans GenBank sont les suivants : EHDV-6 (Aus) : AM745042 ; EHDV-6 (Reass) : HM641777 ; EHDV-6 (USA) : KF570137 ; EHDV-6 (Bahrein) : AM745072 ; EHDV-6 (Tun) : KC986823 ; EHDV-2 (Aus) : AM744992 ; EHDV-2 (Can) : AM745002 ; EHDV-4 (Nig) : AM745022 ; EHDV-5 (Aus) : AM745032.

Tableau 11: comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S6 d'EHDV-6 tunisien avec d'autres S6 issus de souches d'EHDV isolées dans le monde.

Percent Identity														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	█	58.6	61.0	77.5	54.9	54.9	63.2	63.5	63.1	63.1	64.0	63.4	1	EHDV-2 Aus 1979 AM744992
2	50.0	█	90.0	59.0	55.7	58.1	57.1	59.8	57.0	56.9	59.8	60.0	2	EHDV-1 Nig 1967 AM745012
3	45.6	10.9	█	60.9	57.0	56.9	58.0	58.7	57.9	57.4	58.5	58.6	3	EHDV-1 USA 1959 NC013401
4	24.7	48.7	45.9	█	55.9	55.8	63.1	64.1	63.2	63.6	64.3	64.1	4	EHDV-2 Can 1962 AM745002
5	54.6	52.3	51.8	52.3	█	72.7	56.2	56.7	57.3	57.1	56.4	56.5	5	EHDV-4 Nig 1968 AM745022
6	54.0	48.4	51.0	52.6	30.7	█	56.8	56.6	57.1	56.9	56.8	56.6	6	EHDV-5 Aus 1977 AM745032
7	41.5	51.3	49.0	41.5	51.9	51.7	█	78.6	98.2	97.9	78.1	78.4	7	EHDV-6 Aus 1981 AM745042
8	41.1	47.7	49.0	40.4	50.3	52.1	23.6	█	78.3	78.6	96.1	96.4	8	EHDV-6 Bahrain 1983 AM745072
9	41.4	51.4	49.3	41.5	50.7	51.8	1.8	24.0	█	99.4	78.2	78.2	9	EHDV-6 Reass 2006 HM641777
10	41.3	51.6	49.8	40.9	50.9	52.2	2.2	23.5	0.6	█	78.7	78.7	10	EHDV-6 USA 2012 KF570137
11	39.9	47.2	48.5	39.8	50.3	51.9	24.2	4.1	24.1	23.4	█	97.3	11	EHDV-6 Tun 2006 KC986823
12	41.1	46.9	48.7	40.1	50.9	52.2	23.7	3.7	24.0	23.3	2.8	█	12	EHDV-6 RSA 1996 HM636912
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

#### 4.1.1.3. Le segment 7 de l'EHDV-6

Le segment 7 complet comprend 1145 pb. Un couple d'amorces a été nécessaire pour l'obtention de la séquence codante qui comprend 1050 pb (Tableau 12). Les résultats d'homologie présentés sous forme d'arbre phylogénétique ont permis le positionnement de la souche tunisienne dans le même locus que l'EHDV-6 de la Réunion, de l'Afrique du Sud et du Bahrein (% NT variant entre 97.3% et 98.7%) (Figure 24). Le segment 7 de l'EHDV-2 des USA montre une identité de l'ordre de 90.7% à 91.4% avec le segment 7 de l'EHDV-6 tunisien. Les S7 de l'EHDV-2 (Japon, Australie), EHDV-1 (Etats-Unis), EHDV-4 (Nigéria) et EHDV-7 (Israël) montrent des pourcentages d'homologie nucléotidique entre 75.8 à 79.5 avec le S7 de l'EHDV-6 tunisien.

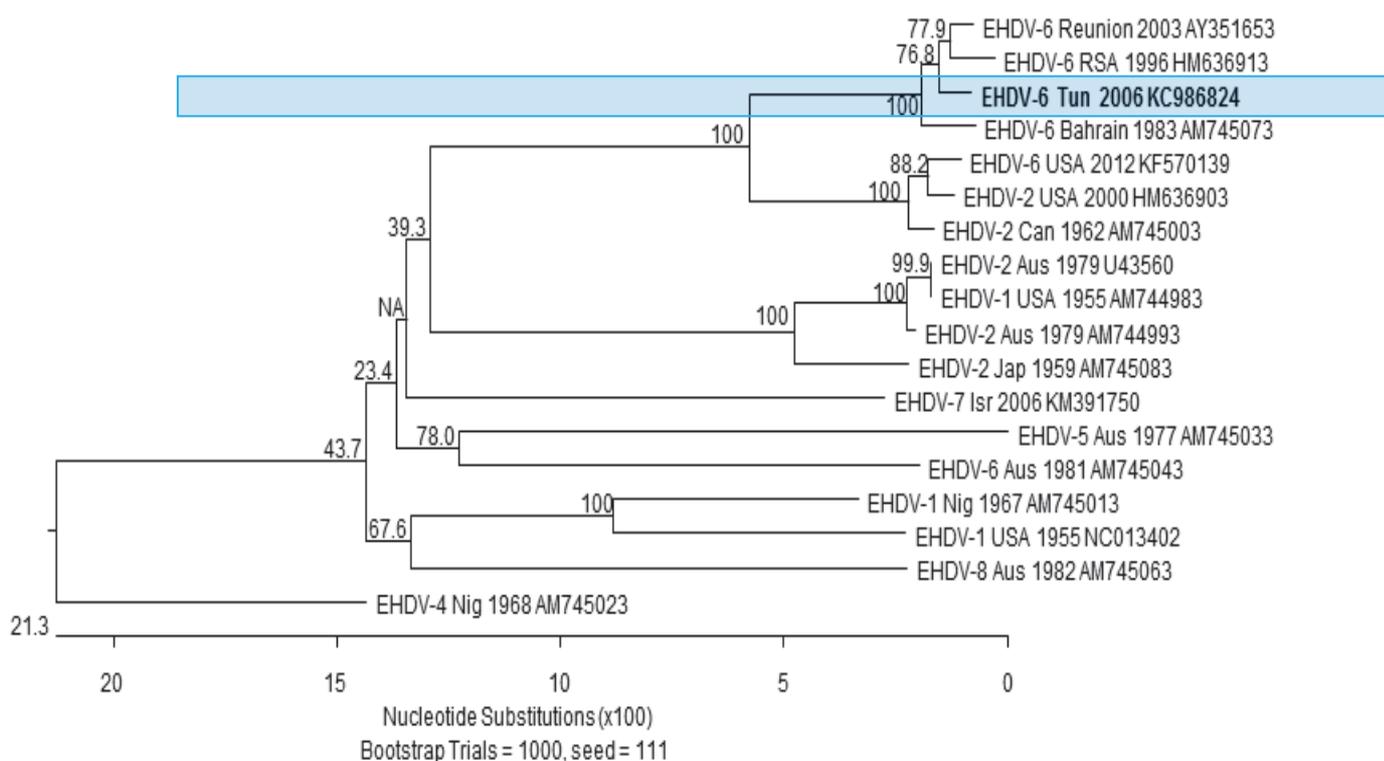


Figure 24. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 7 du virus tunisien et d'autres EHDV.

Les comparaisons des séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star. Les numéros d'accès dans GenBank sont les suivants : EHDV-2 (Aus) : U43560 ; EHDV-2 (Aus) : AM744993 ; EHDV-2 (Jap) : AM745083 ; EHDV-7 (Aus) : AM745053 ; EHDV-5 (Aus) : AM745033 ; EHDV-6 (Aus) : AM745043 ; EHDV-6 (Réunion) : AY351653 ; EHDV-6 (Tun) : KC986824 ; EHDV-6 (SA) : HM636913 ; EHDV-6 (Bahrein) : AM745073 ; EHDV-2 (USA) : AM745003 ; EHDV-2 (USA) : HM636903 ; EHDV-7 (Isr) : JQ070183 ; EHDV-1 (USA) : NC013402 ; EHDV-1 (USA) : AM744983 ; EHDV-1 (Nig) : AM745013 ; EHDV-8 (Aus) : AM745063.

Tableau 12 : Comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S7 d'EHDV-6 tunisien avec d'autres S7 issus de souches EHDV isolées dans le monde.

Percent Identity																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
1	█	79.1	77.1	79.1	76.9	98.1	80.1	76.1	80.4	98.7	76.0	76.6	90.9	78.4	90.6	90.9	89.8	79.2	1	EHDV-6 USA 2012 KF570139
2	23.1	█	77.6	100.0	76.1	79.4	98.8	77.8	94.1	79.0	74.0	76.6	78.3	78.6	78.3	78.1	78.6	79.2	2	EHDV-2 Aus U43560
3	25.0	24.2	█	77.6	88.7	76.8	78.5	81.6	78.3	77.2	77.4	76.7	77.5	78.2	79.0	78.0	77.7	80.5	3	EHDV-1 Nig 1967 AM745013
4	23.1	0.0	24.2	█	76.1	79.4	98.8	77.8	94.1	79.0	74.0	76.6	78.3	78.6	78.3	78.1	78.6	79.2	4	EHDV-1 USA 1955 AM744983
5	25.7	25.7	12.0	25.7	█	77.0	77.0	80.2	77.0	77.0	76.4	76.2	77.6	78.2	77.1	77.1	76.7	78.2	5	EHDV-1 USA 1955 NC013402
6	1.9	22.4	25.8	22.4	26.0	█	80.4	77.1	80.5	98.7	76.0	77.4	91.8	78.0	91.4	91.9	90.8	79.0	6	EHDV-2 Can 1962 AM745003
7	22.4	0.8	23.7	0.8	25.2	21.7	█	78.4	94.7	80.0	74.7	77.5	79.0	79.1	79.0	78.8	79.2	79.7	7	EHDV-2 Aus 1979 AM744993
8	26.5	24.2	21.1	24.2	22.3	25.2	24.2	█	78.7	77.0	75.3	75.1	76.4	78.6	76.2	75.9	75.9	78.5	8	EHDV-8 Aus 1982 AM745063
9	22.1	5.6	24.2	5.6	25.5	21.6	5.4	23.6	█	79.9	74.5	78.4	79.0	79.3	78.7	78.9	79.5	80.6	9	EHDV-2 Jap 1959 AM745083
10	1.4	23.0	25.0	23.0	25.5	1.4	22.2	25.5	22.5	█	76.3	76.8	91.0	78.1	90.7	91.0	89.8	79.0	10	EHDV-2 USA 2000 HM636903
11	25.4	27.5	23.8	27.5	25.9	25.4	27.4	26.6	27.4	25.0	█	74.5	76.0	75.4	75.8	75.7	74.9	75.8	11	EHDV-4 Nig 1968 AM745023
12	26.2	25.2	26.2	25.2	26.2	25.2	24.4	27.3	23.7	25.9	28.1	█	75.7	78.7	75.9	75.7	75.3	77.4	12	EHDV-5 Aus 1977 AM745033
13	9.8	23.7	25.4	23.7	25.3	8.7	23.5	26.5	23.5	9.7	26.4	27.3	█	77.6	97.3	98.1	97.4	79.7	13	EHDV-6 Bahrain 1983 AM745073
14	24.4	23.2	23.9	23.2	23.9	24.8	23.0	23.6	22.9	24.7	26.5	22.6	25.6	█	77.8	77.6	77.7	79.2	14	EHDV-6 Aus 1981 AM745043
15	10.2	23.5	23.5	23.5	26.0	9.0	23.3	26.8	23.9	10.1	26.1	27.0	2.7	25.0	█	98.7	97.8	79.5	15	EHDV-6 Tun 2006 KC986824
16	9.8	24.0	24.7	24.0	25.9	8.4	23.8	27.1	23.7	9.7	26.3	27.2	1.9	25.4	1.4	█	98.6	79.6	16	EHDV-6 Reunion 2003 AY351653
17	10.9	23.5	25.1	23.5	26.6	9.5	23.3	27.1	23.0	10.8	27.3	27.7	2.6	25.3	2.2	1.4	█	79.2	17	EHDV-6 RSA 1996 HM636913
18	23.3	23.0	21.1	23.0	23.4	23.4	22.8	23.4	21.4	23.6	25.8	25.0	22.6	22.5	22.7	22.7	23.1	█	18	EHDV-7 Isr 2006 KM391750.seq
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			

#### 4.1.1.4. Le segment 10 de l'EHDV-6

Le segment 10 de l'EHDV-6 comprend 822 pb. Pour l'obtention de sa séquence codante de 687 pb, un seul couple d'amorces a été nécessaire (décrit dans le Tableau 13). Cette séquence du segment 10 de la souche tunisienne a été comparée avec les différentes S10 déposés dans Genbank.

Le pourcentage d'homologie nucléotidique avec EHDV-6 (Bahrein, Réunion) et EHDV-7 (Israël) varie entre 95.1 et 95.3% (Figure 25, Tableau 13). Le pourcentage d'homologie nucléotidique diminue jusqu'à des valeurs allant de 86.8 à 87.2% en comparaison avec les EHDV-1, 2 et 6 isolés aux USA et de 72.5 à 74.2% avec d'autres souches isolées en Australie, au Japon et au Nigéria.

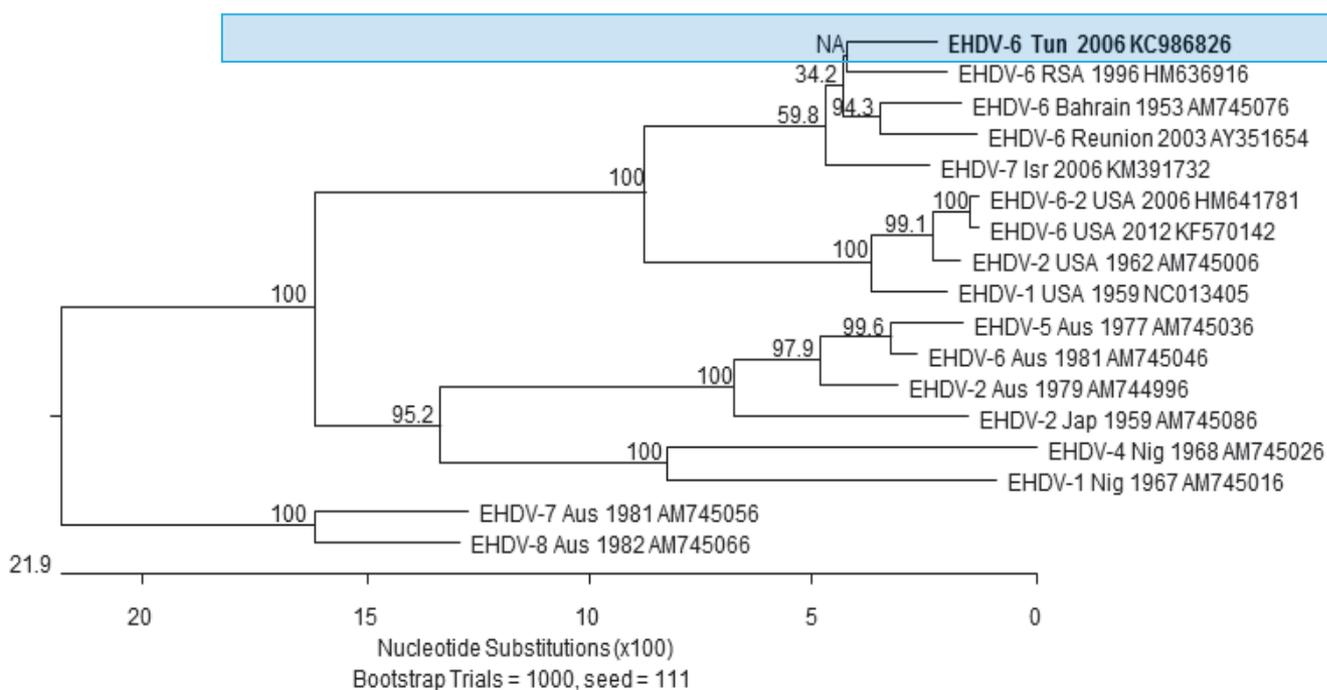


Figure 25. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 10 du virus tunisien et d'autres EHDV.

Les comparaisons des séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star.

Les numéros d'accès dans GenBank sont les suivants : EHDV-6 (Aus) : AM745046 ; EHDV-6 (Aus) : EU928896 ; EHDV-5 (Aus) : AM745036 ; EHDV-2 (Aus) : AM744996 ; EHDV-2 (Jap) : AM745086 ; EHDV-4 (Nig) : AM745026 ; EHDV-1 (Nig) : AM745016 ; EHDV-6 (Bahrein) : AM745076 ; EHDV-6 (Réunion) : L29023 ; EHDV-6 (Tun) : KC986826 ; EHDV-7 (Isr) : JQ070186 ; EHDV-2 (USA) : AM745006 ; EHDV-6 -2 (USA) : HM641781 ; EHDV-1 (USA) : NC013405.

Tableau 13 : Comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S10 de l'EHDV-6 tunisien avec d'autres S10 issus de souches EHDV isolées dans le monde.

Percent Identity																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
1	■	78.3	72.5	73.4	77.3	71.2	79.0	72.6	72.6	73.4	72.6	72.2	85.7	78.9	72.6	72.5	71.8	1	EHDV-4 Nig 1968 AM745026
2	23.2	■	73.2	74.8	91.3	72.3	97.8	74.8	74.8	75.5	72.5	72.3	77.6	95.2	74.7	71.9	71.0	2	EHDV-5 Aus 1977 AM745036
3	30.6	29.2	■	96.8	72.6	87.9	74.1	95.8	72.8	72.5	87.2	86.6	72.6	74.7	95.8	87.5	87.9	3	EHDV-1 USA 1959 NC013405
4	29.5	27.3	3.3	■	74.5	87.0	75.1	98.4	73.7	73.7	86.9	86.6	72.9	76.0	98.4	87.3	87.2	4	EHDV-2 USA 1962 AM745006
5	25.3	9.4	29.8	27.8	■	73.4	91.1	73.2	73.4	73.4	73.5	73.4	77.3	91.1	73.4	73.8	72.2	5	EHDV-2 Jap 1959 AM745086
6	31.5	29.7	13.1	14.2	28.4	■	73.1	86.9	73.1	73.4	95.2	96.2	73.8	74.5	86.9	94.6	95.5	6	EHDV-6 Bahrain 1953 AM745076
7	22.1	2.2	28.1	26.6	9.4	28.6	■	75.5	74.5	75.5	73.4	73.2	77.7	95.9	75.4	73.4	71.9	7	EHDV-6 Aus 1981 AM745046
8	30.7	27.3	4.4	1.6	29.2	14.4	26.2	■	73.2	73.1	86.8	86.5	72.3	74.7	99.7	87.3	87.2	8	EHDV-6-2 USA 2006 HM641781
9	30.4	27.1	29.7	28.8	29.1	29.5	27.6	29.5	■	93.7	73.2	73.5	71.8	73.1	73.1	74.4	73.5	9	EHDV-7 Aus 1981 AM745056
10	29.4	26.5	29.4	28.5	30.1	29.2	26.5	29.4	6.7	■	73.4	73.2	71.5	74.1	72.9	74.4	74.1	10	EHDV-8 Aus 1982 AM745066
11	30.1	30.3	13.4	14.0	28.5	4.7	28.7	14.2	29.2	29.1	■	95.1	73.9	74.2	86.8	95.3	95.6	11	<b>EHDV-6 Tun 2006 KC986826</b>
12	30.8	30.5	14.6	14.6	28.6	3.9	28.8	14.8	29.0	29.7	5.1	■	73.7	74.1	86.5	94.6	94.9	12	EHDV-6 Reunion 2003 L29023
13	15.7	24.3	29.8	29.8	25.1	29.0	24.1	30.6	31.4	31.6	28.6	29.0	■	77.4	72.3	74.1	74.4	13	EHDV-1 Nig 1967 AM745016
14	21.7	4.9	26.9	25.5	9.4	26.5	4.1	26.9	29.0	28.3	27.5	27.4	24.1	■	74.5	73.9	72.8	14	EHDV-2 Aus 1979 AM744996
15	30.7	27.3	4.4	1.6	28.8	14.4	26.2	0.3	29.5	29.9	14.2	14.8	30.6	27.3	■	87.3	87.2	15	EHDV-6 USA 2012 KF570142
16	30.4	30.8	13.5	13.9	28.2	5.7	28.6	14.1	27.6	27.6	4.6	5.7	28.6	27.9	14.1	■	94.9	16	EHDV-7 Isr 2006 KM391732
17	31.5	32.2	12.9	14.0	30.1	4.7	30.5	14.0	28.9	28.3	4.2	5.4	27.8	29.3	14.0	5.2	■	17	EHDV-6 RSA 1996 HM636916
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		

#### 4.1.1.5. Le segment 3 de l'EHDV-6

Le segment 3 de l'EHDV-6 comprend 2770pb. Quatre couples d'amorces ont été nécessaires pour l'obtention de sa séquence codante de 2700 pb (Tableau 14).

La séquence nucléotidique du segment 3 d'EHDV-6 tunisien a été comparée à 16 autres séquences similaires disponibles dans GenBank (Figure 26, Tableau 14). Les résultats de cette comparaison sont présentés sous forme d'arbre phylogénétique. La souche tunisienne apparaît proche des souches de l'EHDV-4 et de l'EHDV-1 du Nigéria, de même sérotype, avec une homologie nucléotidique la plus élevée variant de 97.0% à 95.5%. Avec les souches de l'EHDV-7 d'Israël et d'EHDV-6 détectées au Bahrein et en Afrique du Sud, l'homologie nucléotidique varie entre 92.9% et 92.0%.

Proches de ces valeurs, les pourcentages d'identité obtenus avec les souches d'EHDV-1 et 2 isolées aux Etats-Unis varient entre 91.1% et 90.9%. Cependant, le pourcentage d'homologie le plus bas est observé avec les souches isolées en Australie et au Japon avec un pourcentage d'identité (entre 78.2 et 78.9) avec la séquence nucléotidique du segment 3 tunisien.

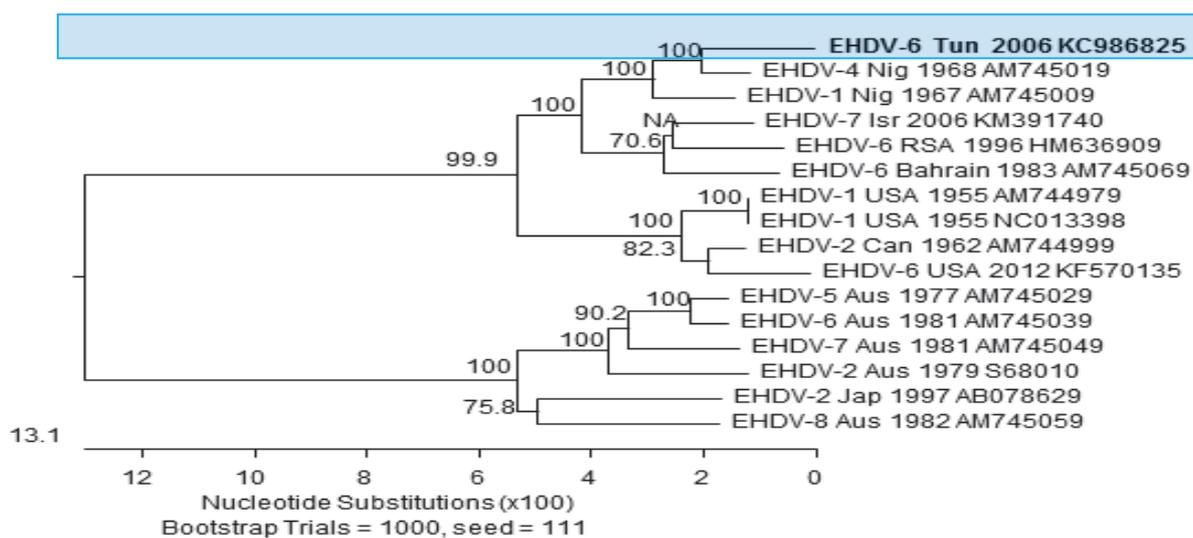


Figure 26. Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 3 du virus tunisien et d'autres EHDV.

Les comparaisons des séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star. Les numéros d'accès dans GenBank sont les suivants : EHDV-4 (Nig) : AM745019 ; EHDV-6 (Tun) : KC986825 ; EHDV-1 (SA) : HM636909 ; EHDV-7 (Isr) : JQ070179 ; EHDV-6 (Bahrein) : AM745069 ; EHDV-1 (USA) : M744979 ; EHDV-1 (USA) : NC013398 ; EHDV-2 (USA) : AM744999 ; EHDV-5(Aus) : AM745029 ; EHDV-6 (Aus) : AM745039 ; EHDV-7 (Aus) : AM745049 ; EHDV-2 (Aus) : S68010 ; EHDV-2 (Jap) : AB078629 ; EHDV-8(Aus) : AM745059.

Tableau 14 : comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique et en acides aminés du S3 de l'EHDV-6 tunisien avec d'autres S3 issus de souches EHDV isolées dans le monde.

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
<b>1</b>	█	94.5	91.9	91.9	91.6	78.2	78.7	78.3	96.4	78.4	96.6	78.8	78.8	92.9	90.4	94.2	<b>1</b>	EHDV-7 Isr 2006 KM391740
<b>2</b>	5.7	█	92.4	92.4	92.7	78.0	78.7	78.2	94.2	78.3	93.9	78.4	78.1	95.5	91.4	97.1	<b>2</b>	EHDV-1 Nig 1967 AM745009
<b>3</b>	8.5	7.9	█	100.0	98.2	77.6	78.1	78.1	91.8	78.0	91.4	77.8	78.6	91.1	96.0	92.1	<b>3</b>	EHDV-1 USA 1955 AM744979
<b>4</b>	8.5	7.9	0.0	█	98.2	77.6	78.1	78.1	91.8	78.0	91.4	77.8	78.6	91.1	96.0	92.1	<b>4</b>	EHDV-1 USA 1955 NC013398
<b>5</b>	8.6	7.6	1.8	1.8	█	77.9	77.9	78.2	91.5	78.1	91.4	77.7	78.5	90.9	97.6	92.3	<b>5</b>	EHDV-2 Can 1962 AM744999
<b>6</b>	23.7	24.1	24.1	24.1	23.7	█	92.5	95.3	77.5	95.4	78.3	95.4	92.5	78.3	77.9	78.1	<b>6</b>	EHDV-2 Aus S68010
<b>7</b>	23.1	23.3	23.5	23.5	23.8	7.7	█	93.2	78.3	93.3	78.6	92.5	93.8	78.5	77.6	78.5	<b>7</b>	EHDV-2 Jap 1997 AB078629
<b>8</b>	23.6	23.9	23.6	23.6	23.5	4.8	7.0	█	77.4	98.7	78.5	96.3	93.1	78.9	78.3	78.5	<b>8</b>	EHDV-5 Aus 1977 AM745029
<b>9</b>	3.7	5.9	8.5	8.5	8.9	24.8	23.7	24.9	█	77.4	95.9	77.9	77.9	92.4	90.6	94.0	<b>9</b>	EHDV-6 Bahrain 1983 AM745069
<b>10</b>	23.6	23.8	23.8	23.8	23.7	4.7	6.9	1.3	24.9	█	78.6	96.4	93.4	78.8	78.1	78.7	<b>10</b>	EHDV-6 Aus 1981 AM745039
<b>11</b>	3.4	6.3	8.8	8.8	8.9	23.7	23.3	23.6	4.2	23.6	█	78.7	78.6	92.0	90.1	93.5	<b>11</b>	EHDV-6 RSA 1996 HM636909
<b>12</b>	23.1	23.7	24.0	24.0	24.0	4.8	7.8	3.8	24.4	3.6	23.4	█	92.8	78.6	77.9	78.3	<b>12</b>	EHDV-7 Aus 1981 AM745049
<b>13</b>	23.0	24.0	23.0	23.0	23.0	7.8	6.5	7.2	24.2	7.0	23.3	7.7	█	78.2	78.5	78.0	<b>13</b>	EHDV-8 Aus 1982 AM745059
<b>14</b>	7.5	4.5	9.3	9.3	9.4	23.6	23.5	23.0	8.0	23.1	8.3	23.3	23.8	█	90.0	97.0	<b>14</b>	EHDV-6 Tun 2006 KC986825
<b>15</b>	9.8	8.9	4.1	4.1	2.5	23.7	24.1	23.4	9.8	23.6	10.3	24.0	23.1	10.3	█	91.1	<b>15</b>	EHDV-6 USA 2012 KF570135
<b>16</b>	6.1	3.0	8.2	8.2	8.0	24.0	23.4	23.5	6.3	23.4	6.7	23.8	24.2	2.9	9.3	█	<b>16</b>	EHDV-4 Nig 1968 AM745019.seq
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>		

## **4.2 Isolement du virus**

### **4.2.1 Sur œufs embryonnés**

Cent µl de sang positif en RT-PCR EHDV ont été inoculés à 6 œufs embryonnés par voie veineuse. Un seul cas de mortalité a été enregistré le 3ème jour après inoculation. L'embryon semi hémorragique a été broyé dans un milieu de culture cellulaire MEM stérile, supplémenté en antibiotiques (Streptomycine et Pénicilline avec un volume de 100UI/ml), puis centrifugé à 2500g à 4°C pendant 10 min. L'homogénat a été testé par RT-qPCR en temps réel. Le génome de l'EHDV n'a pas été détecté.

### **4.2.2 Sur BHK-21**

Cent µl de sang positif ont été inoculés à des cellules BHK-21 en monocouche. L'observation des cellules au microscope, durant une semaine, n'a pas montré d'effet cytopathique. Le surnageant des boîtes a été recueilli pour l'extraction d'ARN et l'analyse des RT-PCR EHDV. Le génome n'a pas été détecté.

### **4.2.3 Sur KC cells**

Deux flasques de cellules KC ont été inoculées avec 100 µl de sang positif en RT-PCR EHDV et incubées à 27°C pendant 10 jours. Après incubation, le surnageant des boîtes KC a été recueilli pour l'extraction d'ARN et analyse par RT-PCR EHDV. Le génome n'a pas été détecté.

## **4.3 Recherche de la présence de l'EHDV en Tunisie hors épizootie de 2006**

### **4.3.1 Chez les bovins**

#### **4.3.1.1. Résultats sérologiques collectés en 2000 chez les bovins**

Dans le but de vérifier la présence potentielle de l'EHDV sur le territoire tunisien avant l'épidémie de 2006, nous avons analysé, par test d'Elisa de compétition, 569 sérums bovins collectés en 2000, conservés à la sérothèque de l'IRVT et issus des différentes fermes de la région nord-ouest de la Tunisie, gouvernorat de Beja. Tous ces sérums se sont révélés négatifs en anticorps EHDV.

#### 4.3.1.2. Résultats sérologiques et moléculaires chez les bovins prélevés après 2006

Nous avons analysé 17 sérums collectés en 2007, issus de bovins du gouvernorat de Manouba et conservés à la sérothèque de l'IRVT. Leur analyse sérologique par test Elisa EHDV s'est révélée négative.

A partir de l'année 2012, nous avons réalisé des prélèvements (sérums et sangs) sur 577 bovins d'1 an et demi dans une ferme d'Etat appartenant au gouvernorat de Bizerte. Leur analyse par Elisa EHDV a montré que 31 sérums se révélaient positifs. L'identification du sérotype de ces derniers, par test de séroneutralisation, fut réalisée et deux sérums ont révélé la présence d'anticorps neutralisants anti EHDV-6 avec des titres sériques de 20 et 80. Tous les échantillons de sang prélevés ont été analysés par RT-PCR EHDV. L'ARN viral n'a été détecté dans aucun échantillon. La recherche du génome viral par RT-qPCR a été réalisée sur les 577 échantillons de sang prélevés et s'est révélée négative.

Suite à ces résultats évoquant la présence d'EDV-6 en Tunisie, nous avons cherché une éventuelle présence du virus auprès des troupeaux de bovins de différentes régions de la Tunisie.

A partir de juin 2012, nous avons établi un suivi sentinelle sur 10 à 20 bovins dans des cheptels répartis sur 9 exploitations. Un total de 971 sérums a été collecté, au rythme d'environ 149 prélèvements (sérums et sangs) par mois, pour la période allant de juin à août 2012 et 298 prélèvements mensuels pour la période allant de septembre à novembre 2012.

La recherche d'anticorps anti-VP7 sur les 149 prélèvements de novembre 2012, a montré leur présence chez 13 bovins parmi lesquels : 10 bovins étaient âgés de 8 et 9 ans (appartenant aux gouvernorats d'El Kef et de Tozeur), un bovin âgé de 3 ans, originaire de Kebeli et deux veaux âgés de 14 mois appartenant aux gouvernorats de Beja et Bizerte (Tableau 15).

Le suivi sérologique mensuel, par Elisa EHDV, a montré que les 10 bovins ont été positifs sur toute la période allant de juin à novembre 2012. Les autres, positifs en novembre 2012, avaient été séroconvertis en septembre 2012. Ensuite, nous avons eu recours au test de séroneutralisation pour la détection des anticorps neutralisants d'EHDV-6 de ces bovins positifs. Le résultat était négatif pour les 3 bovins (de 3 ans et 14 mois).

En mai 2013, nous sommes retournés à la ferme d'Etat de Bizerte pour un suivi sentinelle de génisses âgées de 1 à 3 ans. 50 génisses, négatives en Elisa EHDV, ont été suivies pendant la période allant de juin 2013 à avril 2014. 600 (sérums et sangs) ont été collectés, au rythme mensuel de 50 prélèvements pour la période allant de juin à août 2013, de 100 prélèvements pour celle allant de septembre à novembre 2013 et enfin de 50 prélèvements pour celle allant de février à avril 2014.

Le diagnostic sérologique, par Elisa EHD, a montré que seule 1 génisse d'un an était devenue positive en novembre 2013 et l'était encore en février, mars et avril 2014. La recherche d'anticorps neutralisants anti-EHDV-6, par séroneutralisation, s'est révélée négative.

Tous les échantillons de sang prélevés dans la période de juin 2013 à avril de 2014 ont été analysés par RT-PCR EHDV. L'ARN viral n'a été détecté dans aucun échantillon.

Tableau 15 : Résultats de la recherche d'anticorps chez les bovins, en fonction de la région et de l'âge

Prélèvements par région		Classe d'âge des bovins sentinelles						Total
		Gouvernorat	Résultats positifs	Nombre de bovins d'âge :				
				7 mois - 2 ans	2-3 ans	3-6 ans	6-9 ans	
Région nord	Nbre de sérums	Bizerte	1 (14 mois)	21	1	0	0	22
		Nabeul	0	20	0	0	0	20
		Beja	1 (14 mois)	12	0	0	0	12
		El Kef	4 (8-9 ans)	0	0	13	4	17
Région centre	Nbre de sérums	Kairouan	0	10	0	0	0	10
		Sidi-Bouzyd	0	17	0	0	0	17
		Sousse	0	15	0	0	0	15
Région sud	Nbre de sérums	Kebeli	1 (3 ans)	6	0	0	14	20
		Tozeur	6	0	0	0	6	20

#### **4.3.2 Présence de l'EHDV chez les dromadaires**

Nous nous sommes demandé si l'espèce dromadaire avait pu être infectée par l'EHDV et dans ce cas, jouerait-elle le rôle de réservoir pour ce virus, de la même façon qu'elle le fait pour le BTV ?

##### **4.3.2.1. Résultats sérologiques chez les dromadaires avant 2006**

Dans le but de vérifier la potentielle présence d'EHDV chez les dromadaires, avant l'épidémie de 2006, nous disposions de 86 sérums de dromadaires, du gouvernorat de Médenine, collectés en 2001, et conservés à la sérothèque de l'IRVT. L'analyse sérologique par test d'Elisa de compétition a montré que tous les sérums étaient dépourvus d'anticorps anti-EHDV.

##### **4.3.2.2. Résultats sérologiques et moléculaires chez les dromadaires après 2006.**

Dans un travail prospectif, 184 sérums de dromadaires, prélevés dans la période de 2010 à 2011 et provenant de la région centre (Monastir, Sidi Bouzid) et de la région sud (Gafsa et Kebeli) ont été testés par ELISA EHDV. Seulement 4 sérums provenant de la région centre (gouvernorat de Sidi Bouzid) se sont avérés positifs en ELISA EHDV. Ces sérums ont été testés par neutralisation virale en utilisant le virus de l'EHDV-6 de la Réunion mais tous se sont avérés négatifs.

Dans une seconde étude, en 2012, 68 prélèvements (sérums et sangs) ont été collectés sur des dromadaires provenant du gouvernorat de Médenine. Tous les tests se sont révélés négatifs en Elisa EHDV.

En 2013, dans une troisième étude, 417 sérums de dromadaires, recueillis dans la région centre-est (gouvernorat de Monastir) et dans la région sud (gouvernorats de Kebeli, de Tozeur et de Tataouine) ont été testés par Elisa EHDV. Seul un dromadaire du gouvernorat de Kebeli s'est avéré positif. Ce dernier a été testé par neutralisation virale, vis à vis du virus d'EHDV-6 de la Réunion, et s'est révélé négatif. Tous les échantillons de sang prélevés en 2013 ont été analysés par RT-PCR EHDV. Cependant, l'ARN viral n'a été détecté sur aucun échantillon.

#### 4.3.3 Recherche de l'EHDV chez les *Culicoïdes*

Nous nous sommes intéressés à la recherche du virus chez les *Culicoïdes*, vecteurs de l'EHDV. Nous nous sommes demandés, dans un premier temps, si le virus était présent chez cet insecte lors de l'épizootie de 2006. Nous avons alors analysé, par RT-PCR, le surnageant du broyat de *Culicoïdes* piégés en 2006 et issus des fermes ayant hébergé des bovins séropositifs en EHDV. L'ARN viral n'a pas été détecté.

En 2015, nous avons choisi de piéger des *Culicoïdes* dans une ferme d'Etat. Les captures ont été réalisées de juillet à décembre 2015, au rythme d'un piégeage mensuel.

Avec le seul piège lumineux utilisé, nous avons récolté 888 *Culicoïdes* dont 163 femelles *Imicola* gorgées et non gorgées de sang (Tableau 16). D'une façon générale, les effectifs de *Culicoïdes* en juillet étaient modestes ; un pic de leur nombre a été enregistré entre octobre et novembre et une chute d'effectifs en décembre 2015. Cette chute était peut être liée aux conditions météorologiques défavorables à la densité de leur population. L'identification des femelles *Imicola*, gorgées et non gorgées du sang, était possible avec une loupe et une lampe frontale par la forme arrondie de leur abdomen.

Environ 1/4 de la population des *Culicoïdes* répertoriés (163/888) fut identifié comme *Imicola*. Les broyats des deux types d'*imicola* et des *Culicoïdes* non identifiés ont été analysés par RT-PCR. Les résultats étaient négatifs.

Tableau 16 : Détails de l'échantillonnage de *Culicoïdes* et *C.imicola* piégés entre juillet et décembre 2015

Mois	Juillet 2015	Août 2015	Septembre 2015	Octobre 2015	Novembre 2015	Décembre 2015
<i>Culicoïdes</i>	65	37	98	410	268	10
<i>C. Imicola</i>	21	15	21	58	44	4

## 4.4 Recherche de la Bluetongue

### 4.4.1 Chez les bovins

Parallèlement au travail d'investigation sur l'EHDV, nous nous sommes posés la question de savoir si le virus de la Bluetongue était présent dans les prélèvements de bovins sentinelles, collectés de juin 2013 à avril 2014, ainsi que chez les dromadaires et chez les caprins de 2013.

Dans un premier temps, nous avons exploité les 601 prélèvements réalisés sur les 50 génisses sentinelles. Leur analyse sérologique, par Elisa de compétition BTV, a montré que seuls 2 sérums se sont avérés positifs. Le génome du BTV a été détecté sur ces derniers par RT-PCR de BTV. Les valeurs de CT étaient de 24.36 pour une première génisse en octobre 2013 et de 28.05 pour une deuxième génisse en novembre 2013. Ces deux valeurs ont permis de confirmer avec la RT-PCR quantitative en temps réel que le BTV-1 était présent dans le cheptel.

### 4.4.2 Chez les dromadaires

En 2013, dans le but de détecter la présence ou l'absence de la Bluetongue chez les dromadaires, nous avons testé 417 prélèvements (sérums et sangs) issus de dromadaires originaires du sud tunisien (Tozeur, Kebeli, Tataouine) et du centre-est (Monastir). Les sérums ont été analysés par Elisa de compétition BTV. Une séroprévalence de 100% de BTV a été trouvée à Monastir et une faible prévalence dans le sud, de l'ordre de 0.5 à 7.8% (Tableau 17). Le génome viral n'a pas été détecté par RT-PCR.

Tableau 17: Résultats sérologiques d'Elisa BTV

417 sérums								
Maladie	Kebeli		Tozeur		Tataouine		Monastir	
	+(%)		+(%)		+(%)		+(%)	
BTV	7.8%	51	0.8	120	0.5	210	100	36

### 4.4.3 Chez les caprins

En 2013, six prélèvements sur des chèvres de 9 ans ont été analysés positifs par Elisa BTV de compétition. Le diagnostic moléculaire par RT-PCR en temps réel pour les six animaux a donné un résultat négatif pour la détection du génome.

## **CHAPITRE IV**

### **D I S C U S S I O N**

## 5 Discussion

### 5.1 Génétique de la souche d'EHDV qui circulait en Tunisie en 2006

Dans une première publication (Ben Dhaou et al., 2016), nous avons caractérisé moléculairement le virus de l'EHD circulant en Tunisie en septembre 2006. L'étude a comparé génétiquement la souche virale tunisienne de 2006 avec des souches virales circulant, à la même époque, dans les pays voisins (Maroc et Algérie), ou encore avec d'autres souches isolées dans le reste du monde en précisant le lien qui existait entre elles. Pour cela, nous avons réalisé une étude sur des échantillons collectés dans la période de l'épizootie (été 2006), qui provenaient de bovins présentant des signes cliniques (Hammami et al., 2007) et des résultats sérologiques positifs au moyen du test ELISA spécifique développé par Thevasagayam et al. (1996). Toutefois, aucun essai de détection du génome de l'EHDV n'avait pu être réalisé à ce moment-là à l'IRVT de Tunis en l'absence d'outils moléculaires.

Dans le cadre de cette étude, nous avons disposé de 49 échantillons de sang-EDTA. Le génome de l'EHDV a été recherché par RT-qPCR sur tous les prélèvements. Le génome a été détecté seulement sur deux prélèvements : l'un issu d'un bovin de la région sud (gouvernorat de Tozeur) et l'autre d'un bovin issu de la région nord (gouvernorat de Zaghuan). Les quantités de génome viral dans le prélèvement sont illustrées par les valeurs de CT (cycle threshold ou seuil de cycle) à l'issue de la RTqPCR en temps réel, étaient de l'ordre de 28 et de 34 pour ces 2 échantillons. A partir de l'échantillon de sang du bovin originaire de Tozeur, présentant une valeur de CT de 28, nous avons procédé à l'extraction des ARN. Ensuite, nous avons réalisé des RT-PCR conventionnelles pour amplifier cinq segments génomiques (2, 3, 6, 7 et 10). Le séquençage a ciblé ces 5 segments génomiques pour différentes raisons : les segments 2 et 6 ont été choisis pour caractériser le sérotype et la capsid externe du virus (Cheney et al., 1996). Le segment génomique 3 a été étudié pour identifier les origines géographiques possibles (topotype du BTV) (Gould, 1987; Pritchard et al., 1995, 2004 ; Wilson et al., 2015 ). Quant au segment 7, il était censé donner des informations sur le topotype puisque la protéine VP7 était identifiée comme une protéine de fixation de l'insecte vecteur (Xu et al., 1997; Wilson et al., 2000 ; Wilson et al., 2015). Le segment 10 a été séquençé pour donner des informations complémentaires sur l'origine géographique (Balasuriya et al., 2008).

Les séquences codantes obtenues après assemblage par le programme SeqMan et alignement à l'aide du programme Clustal V avec leurs homologues publiées dans Genbank, ont permis de construire des arbres phylogénétiques.

Les comparaisons phylogénétiques ont permis de déterminer, par homologie avec des séquences codantes du segment 2 et du segment 6, l'appartenance de la souche EHDV tunisienne au sérotype 6.

L'arbre phylogénétique comparant la séquence codante du segment 2 de l'EHDV-6 tunisien avec d'autres séquences codantes du segment 2 de l'EHDV montre également 4 groupes de sérotype d'EHDV:

- un premier groupe contenant les segments 2 (S2) d'EHDV-6 et les S2 de l'EHDV-8,
- un deuxième groupe rassemblant les S2 de l'EHDV-2 et de l'EHDV-7,
- un troisième groupe réunissant les S2 de l'EHDV-5 et de l'EHDV-4 et
- un quatrième groupe pour l'EHDV-1.

Dans le premier groupe, deux sous-divisions sont observées : une première sous-division qui comprend les séquences codantes des S2 de six souches d'EHDV-6 détectées en Afrique du Sud, au Maghreb, à Bahreïn et à la Réunion.

Une deuxième sous-division qui englobe les souches d'EHDV-6 isolées en Australie, aux Etats-Unis et aux Caraïbes. La comparaison de la séquence codante du segment 6 de l'EHDV-6 de la souche tunisienne avec ces homologues nous a permis d'observer la même classification. Nos résultats d'analyse phylogénétique des séquences codantes pour les segments de protéine de capsid externe sont compatibles, et suggèrent que les souches d'EHDV-6 isolées en Afrique, dans la Péninsule Arabique et l'Océan Indien ont une origine commune alors que celles isolées en Australie, en Amérique du Nord et dans les Caraïbes en ont une autre.

Nous pouvons dire que notre classification ne correspond pas à la classification Est/Ouest décrite par Anthony et al., (2009b) : Est, pour les souches EHDV-6 ayant leur implantation géographique en Australie et en Asie et Ouest, pour les souches implantées dans la Péninsule Arabique, l'Afrique et l'Amérique du Nord.

Une étude d'Allison et al., 2012 portait sur le topotype de l'EHDV-6 de l'Amérique du Nord (Indiana) et sur les relations phylogénétiques entre les différentes souches isolées dans le monde. Les séquences codantes des segments 2 et 6 montraient deux origines possibles : une première serait africaine et une seconde issue d'Amérique et d'Australie. Nos résultats sont donc en accord avec les résultats de cette étude d'Allison, plutôt qu'avec ceux issus des travaux d'Anthony.

L'alignement de la séquence codante du segment 10 de l'EHDV-6 avec leurs homologues déposées dans Genbank nous a permis de mettre en évidence une forte homologie de la souche tunisienne d'EHDV-6 avec celles de Bahrein, de l'île de la Réunion, d'Israël (sérotype 7) et d'Afrique du Sud. Cet embranchement est également retrouvé lorsqu'on aligne la séquence codante du segment 7, montrant un embranchement qui regroupe les EHDV-6 de la Tunisie, de l'île de la Réunion, de Bahreïn et de l'Afrique de Sud. Ces segments permettent de montrer une origine africaine et moyenne orientale de la souche tunisienne.

Une forte homologie entre le segment 10 de l'EHDV-6 de la souche tunisienne et le segment 10 de l'EHDV-7 israélien a été trouvée. En effet, Wilson en 2015, a suggéré que la

souche EHDV-7 qui a touché Israël en 2006 pourrait être liée aux épidémies survenues, la même année, au Maghreb ce qui nous semble aller dans le sens de notre résultat et d'autre part, Kedmi en 2011, émet l'hypothèse que l'EHDV-7 n'a pas émergé en Israël avant 2006.

Les résultats de la comparaison phylogénétique des séquences codantes du segment 3 de l'EHDV-6 montrent une division en sous groupes selon l'origine géographique des souches : groupement des souches africaines, moyennes orientales et américaines (Tunisie, EHDV-4/EHDV-1 Nigéria, EHDV-7 Israël, EHDV-6 Afrique du Sud, EHDV-6 Bahrein), ces résultats sont également observés dans l'étude d'Anthony et al. (2009c) pour l'EHDV et le BTV.

D'autre part, ces séquences nucléotidiques du segment 3 du virus tunisien et d'autres EHDV sont réunies selon des divisions en sous-groupes géographiques : un groupement Afrique-Moyen Orient, un groupement Asie-Australie, et un groupement des souches d'Amérique ceci étant en accord avec la classification est/ouest des travaux (d'Anthony et al., 2009a) et de (Cheney et al., 1995).

L'analyse phylogénétique des séquences codantes des segments 3 (VP3) de la nucléocapside interne montre également que la souche tunisienne est étroitement liée aux souches de l'EHDV-4 et l'EHDV-1 nigérianes. Cette homologie suggère que l'EHDV-6 tunisien est probablement de même origine que les souches sub-sahariennes.

Autre fait intéressant, l'analyse de la séquence codante du segment 3 (Tunisie) de l'EHDV-6 a montré une homologie importante avec le segment 3 de l'EHDV-7 d'Israël, ce qui est en accord avec l'étude de Wilson et al., 2015, qui suggère que la souche israélienne est d'origine africaine et méditerranéenne et que l'épidémie de 2006, en Israël, aurait un lien avec les épidémies survenues en Afrique du Nord au cours de la même année.

L'analyse de la séquence du segment 2 a montré que la souche EHDV-6 qui circulait en Tunisie en 2006 avait la même origine que l'EHDV-6 qui circulait au Maroc et en Algérie en 2006.

Dans leur ensemble, les résultats des comparaisons des 5 segments (2, 3, 6, 7 et 10) d'EHDV-6 tunisien suggèrent que cette souche a une origine commune avec celles de l'EHDV isolées en Afrique, au Moyen Orient, dans la Péninsule arabique et dans l'Océan Indien.

Cette étude montre aussi qu'il est important de créer une base de données de séquences génomiques EHDV afin de mieux caractériser les virus et d'apporter des informations complémentaires qui contribueraient à améliorer la surveillance de l'EHDV. Il serait ainsi intéressant de comparer les séquences nucléotidiques des segments 3, 6, 7 et 10 d'EHDV-6 isolés dans les pays du Maghreb (ces données n'étant pas disponibles dans GenBank) afin de déterminer si les séquences de l'EHDV-6 algérienne et marocaine sont homologues à celles de l'EHDV-6 tunisienne.

## 5.2 Recherche de la présence de l'EHDV en Tunisie avant et après l'épizootie de 2006

L'apparition de l'EHDV chez les bovins tunisiens a surpris les autorités vétérinaires et le monde agricole tunisiens. L'EHDV-6, caractérisé plus tard, était le responsable des signes cliniques de 2006. Dans cette étude, nous avons recherché la présence potentielle d'EHDV sur des prélèvements de bovins et de dromadaires avant et après 2006.

### 5.2.1 Chez les bovins

La recherche de la présence de l'EHDV chez les bovins a fait l'objet d'une publication (Mejri et Ben Dhaou et al.,) dans le *Veterinaria Italiana*. Ce travail a été effectué sur des sérums prélevés dans les années 2000 et 2007 et sur une collecte de prélèvements (sérums et sangs) réalisée par nous-mêmes en 2012, 2013 et 2014 (Tableau 18).

Nous avons utilisé le test Elisa de compétition pour détecter les anticorps dirigés contre la protéine VP7 sur 569 sérums de l'année 2000 et 17 sérums de l'année 2007 conservés à l'IRVT. Tous les sérums se sont avérés négatifs. Nous n'avons donc pas détecté d'anticorps, témoins d'une infection due à l'EHDV sur ces sérums, suggérant que le virus de l'EHDV-6 n'avait pas circulé avant 2000.

Pour la période comprise entre 2001 et 2005, aucun prélèvement n'a été collecté, il nous est donc impossible de formuler une hypothèse sur une quelconque circulation du virus avant 2006.

A partir de l'année 2012, nous avons commencé à évaluer la circulation virale de l'EHDV en temps réel, sur des prélèvements frais. Pour cela, une collecte de sérums et sangs a été réalisée sur 577 bovins âgés d'un an et demi appartenant à la ferme d'Etat de la région nord de la Tunisie, gouvernorat de Bizerte. Les anticorps anti-EHDV ont été détectés sur 31 bovins. Seulement, deux sérums ont révélé la présence d'anticorps neutralisant l'EHDV-6 avec des titres de 20 et 80.

Plusieurs hypothèses peuvent alors être formulées pour expliquer ces résultats : une première hypothèse suggèrerait une non spécificité du test Elisa. Une seconde nous amène à penser qu'il aurait peut-être fallu faire le test de séroneutralisation des autres virus en ne se cantonnant pas au seul sérotype 6, mais nous ne disposons pas, alors, d'un volume suffisant de sérum de ces animaux pour tester les 6 autres sérotypes et par ailleurs, seul le sérotype 6 a été décrit dans ces régions africaines. Nous avons alors déduit de nos résultats que nous étions face à une circulation à très bas bruit de l'EHDV-6 (Elisa et SN positif).

Suite à cela, nous avons élargi le champ de la recherche pour maximiser nos chances de détecter le virus. En juin 2012, nous avons procédé à la recherche d'EHDV chez des bovins sentinelles dans les trois grandes régions de Tunisie (le nord, le centre et le sud). Un total de 971 prélèvements (sérum et sang) avait été collecté de juin à novembre 2012 sur une population dont l'âge se situait entre 1 et 10 ans. Les troupeaux sentinelles ont été choisis dans des régions caractérisées par la circulation de l'EHDV en 2006. Treize sérums ont été trouvés positifs en 2012 chez 10 vaches dont l'âge se situait entre 8 et 9 ans et chez 3 bovins dont deux étaient âgés de 14 mois et le dernier de 3 ans. Parmi ces 3 bovins positifs, les deux d'1 an et 2 mois appartenaient à la région nord (gouvernorat de Bizerte et Beja) et le bovin de 3 ans appartenait à la région sud (gouvernorat de Kebeli). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats :

La détection, dans les sérums des 10 vaches âgées de 8 à 9 ans, est pour nous le témoin d'une infection ancienne par l'EHDV-6 pendant l'année 2006.

Les anticorps anti-EHDV, détectés chez les bovins de 14 mois et 3 ans, témoignent d'une infection récente.

Pour confirmer la spécificité de leur action contre l'EHDV-6, nous avons réalisé un test de séroneutralisation à l'aide du virus de l'EHDV-6 marocain qui n'a pas prouvé ce que nous voulions démontrer. Ces résultats suggèrent, pour nous, un manque de spécificité du test Elisa.

A partir du sang de ces animaux séropositifs en Elisa, nous n'avons jamais pu mettre en évidence la présence de virus ce qui est troublant !

De même, Bumbarov et al., 2016 ont trouvé des preuves sérologiques d'une circulation probable du virus chez des bovins âgés de plus de 8 mois nés après 2009 ou 2010 sans détecter le génome de l'EHDV, malgré des dizaines de tests PCR EHDV effectués chaque année depuis 2006.

Dans le but de détecter et d'isoler le virus de l'EHDV chez les bovins chez lesquels nous avons émis l'hypothèse d'une circulation virale à bas bruit, nous avons suivi 50 génisses sentinelles âgées de 1 à 3 ans.

Les anticorps anti-EHDV ont été détectés chez une seule génisse d'un an. La séroconversion s'est réalisée au mois de novembre 2013 et était encore effective aux mois de février, mars et avril 2014. Pour confirmer que les anticorps étaient bien dirigés contre le sérotype 6, nous avons effectué un test de séroneutralisation à l'aide du virus de l'EHDV-6 de la Réunion. Et, une fois de plus, nous n'avons pas mis en évidence la présence d'anticorps neutralisant l'EHDV-6. Comme précédemment, ces résultats suggèrent, pour nous un résultat « faux positif » avec le test Elisa. Le plus troublant est que sur le sang de cet animal, nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence la présence du génome du virus.

Chez les bovins, nous avons détecté, pour la première fois en 2012, une circulation silencieuse d'une forme d'EHDV-6 sans tableau clinique. Nos résultats sont en accord avec la

plupart des travaux réalisés au Soudan (Mohammed et Mellor, 1990), en Australie (St George et al., 1983; Uren, 1986) et en Guadeloupe (Wilson et al., 2015) chez des bovins et des cervidés qui ont été infectés sans présenter de tableau clinique.

Tableau 18 : Récapitulatif des échantillons de bovins de 2000 à 2014

Années	Sérum bovin	Sang bovin	Elisa	Séroneutralisation	RT-PCR
2000	569	0	Négative	-	-
2001	-	-	-	-	-
2002	-	-	-	-	-
2003	-	-	-	-	-
2004	-	-	-	-	-
2005	-	-	-	-	-
2006	Epizootie (EHDV-6) (Ben Dhaou et al., 2016)				
2007	12	-	Négative	-	-
2008	-	-	-	-	-
2009	-	-	-	-	-
2010	-	-	-	-	-
2011	-	-	-	-	-
Mai 2012	577	577	31	2	Négative
Juin à novembre 2012	971	971	13	Négative	Négative
Juin-novembre 2013	450	450	1	Négative	Négative
Février-avril 2014	150	150	1	Négative	Négative

### 5.2.2 Chez les dromadaires

Pourquoi nous intéresser au dromadaire ? Une étude algérienne (Madani et al., 2011) a montré que le dromadaire joue un rôle de réservoir pour de nombreuses maladies et, en particulier, dans la Bluetongue dont on sait que son virus est très semblable à celui de l'EHDV.

Pour nous, le dromadaire est aussi le ruminant le plus présent dans les régions sahariennes, tout en rappelant qu'étant donné son mode d'élevage nomade une localisation certaine des troupeaux ne pourrait être assurée.

La recherche de l'EHDV chez les dromadaires a fait l'objet de deux articles en cours de publication dans le journal *Veterinaria Italiana* (Mejri et Ben Dhaou et al.,) et (Ben Dhaou et al.,).

Le premier article consiste en une étude portant sur des prélèvements faits dans le cadre de diagnostics de routine, envoyés et conservés à la sérothèque de l'IRVT dans les années 2001, 2010 et 2011 sur des troupeaux issus de plusieurs gouvernorats.

Dans le second, nous avons relaté les résultats de nos recherches sur les prélèvements réalisés en 2012, sur des dromadaires de Médenine, et en 2013 sur des dromadaires de Tozeur, Kebili, Tataouine et Monastir.

Tous les sérums collectés avant 2006, étaient négatifs en EHDV. Le même résultat a été décrit dans les études des pays voisins, la circulation virale n'a pas été détectée chez les dromadaires en Algérie en 2008 (Madani et al., 2011) de même qu'au Maroc entre 2003 et 2009 (Touil et al., 2012).

Cinq sérums positifs en ELISA EHDV ont été détectés après l'épidémie de 2006 localisés comme suit : 4 dromadaires de (Sidi Bouzid) en 2010-2011 et un dromadaire en 2013 (Kebeli) se sont avérés séropositifs par Elisa de compétition EHDV. Tous les sérums ont été testés négatifs en séroneutralisation. Tous les sangs ont été testés négatifs en RT-qPCR.

Des résultats similaires ont été également trouvés chez les dromadaires des Emirats Arabes Unis (Wernery et al., 2013). Ainsi, l'infection par l'EHDV n'a jamais été prouvée à ce jour chez les dromadaires qui semblent donc ne pas être impliqués dans la transmission de la maladie.

### 5.2.3 Les *Culicoïdes*

Le faible nombre de *Culicoïdes* recueillis dans le cadre de notre étude ne nous autorise pas à tirer des conclusions définitives.

Avec le seul piège lumineux utilisé, dans le même emplacement à l'intérieur de l'étable à coté des bovins, nous avons récolté 888 *Culicoïdes* dont 163 *Imicola* gorgés et non gorgés de sang. D'une façon générale, les effectifs de *Culicoïdes* ont été en juin et juillet modestes, un pic de *Culicoïdes* a été enregistré entre octobre et novembre et une chute d'effectif et pourcentage *Imicola* en décembre 2015. Cette chute était peut être liée aux conditions météorologiques défavorables. La reconnaissance des femelles *Imicola*, gorgées et non gorgées de sang, était possible à l'aide d'une loupe et d'une lampe frontale en constatant la forme arrondie de leur abdomen.

Presque 1/4 de la population des *Culicoïdes* (163/888) était identifié comme *Imicola*. Toutes ces femelles provenaient d'un groupe d'insectes en contact avec des vaches, ce qui explique qu'elles se soient trouvées gorgées de sang.

La recherche du virus a été réalisée par RT-qPCR sur des *Culicoïdes* femelles de différentes espèces. Les résultats étaient négatifs. Des *Culicoïdes Imicola*, témoins positifs, ont obtenu des valeurs de CT nettement positives permettant de valider les techniques d'extraction et de RT-PCR utilisées. Nous pouvons néanmoins souligner le fait que ce résultat bien que négatif est unique en son genre. Ce travail est en accord avec le travail de Chaker et al., 2005 qui montre que l'espèce *Imicola* existe autour de cheptel bovin, responsable de la transmission de BTV.

### 5.3 La recherche du BTV

Cette recherche du génome de la Bluetongue ne constituait pas, pour nous, un objectif majeur de travail mais disposant, en quantités, de prélèvements de sérums/sangs issus de bovins, de caprins et de dromadaires, nous nous sommes demandé si, en l'absence du génome de l'EHDV chez ces animaux, nous ne serions pas plutôt en face du génome de la Bluetongue ?

Les résultats d'analyse de 601 sérums récoltés sur 50 génisses (de juin à avril 2014) ont montré que seules 2 génisses se sont avérées positives en Elisa de compétition BTV. La RT-PCR de type réalisée sur les sangs des bovins séropositifs a montré qu'il s'agissait bien d'une infection par le BTV 1.

En ce qui concerne la recherche de BTV sur les 417 dromadaires, les résultats ont montré, pour la première fois, une positivité de 100 % chez les 37 dromadaires du gouvernorat de Monastir dont on sait qu'il constitue la première localisation du BTV chez les moutons et varie de 0,5% à 0,8% dans les gouvernorats du sud (Kebeli, Tozeur et Tataouine) ce qui est équivalent à 1.57% dans la région du sud. Chez les caprins localisés dans un rayon de 5 km autour de ces dromadaires, la recherche des anticorps BTV s'est révélée positive chez 7 animaux.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Madani et al., 2011; Touil et al., 2012 qui ont montré que le dromadaire pouvait être un réservoir pour le BTV et son rôle dans le cas de l'EHDV n'est pas encore clair.

## **Conclusion et perspectives**

## 6 Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse aimeraient pouvoir ajouter, bien modestement, quelques éléments à la somme des connaissances déjà acquises sur l'*Orbivirus* EHDV qui présente un fort potentiel d'émergence en Europe.

Les travaux de notre première étude, ont montré que, lors de l'épizootie de 2006 qui a sévi en Tunisie, le sérotype responsable des cas cliniques semblables à la Bluetongue était l'EHDV-6, identique à celui qui avait été isolé au Maroc et en Algérie (OIE, 2006 a et b ; Maan et al., 2010).

Selon les analyses phylogénétiques, la souche tunisienne se présente dans le même locus que celui de Bahrein (EHDV 318), celui d'Afrique du Sud (EHDV-6) et de la Réunion (EHDV-6). Seuls 2 bovins prélevés en 2006 présentaient une virémie due à l'EHDV-6 et à partir du sang de l'un de ces bovins, nous avons pu heureusement caractériser 5 des 10 séquences codantes du génome viral mais, les essais d'isolement viral sur cellules d'insectes et œufs embryonnés sont restés infructueux.

Les travaux de la deuxième étude qui consistait en la recherche de l'EHDV chez différentes espèces : bovins, dromadaires et *Culicoïdes* de 2000 à 2015, ont montré que les analyses sérologiques des sérums de bovins et dromadaires avant 2006 n'ont pu mettre en évidence la présence du virus, et nous pourrions également admettre que le virus n'est pas présent avant 2000-2001 chez les bovins et les dromadaires en Tunisie.

Les analyses sérologiques et moléculaires à partir de 2012 des sérums et sangs collectés lors d'un suivi sentinelle chez les bovins ont pu mettre en évidence par le test Elisa et le test de séroneutralisation (SN) une circulation à très bas bruit de l'EHDV-6. Cependant, le génome n'a pu être détecté par les analyses moléculaires.

Ces études, ont montré qu'en 2006, l'EHDV-6 en Tunisie chez les bovins a été associé à des signes cliniques. En 2012, nous avons détecté une nouvelle circulation à très bas bruit d'EHDV-6 chez les bovins sans signe clinique.

En 2013, la recherche du virus chez 601 dromadaires n'a pas pu mettre en évidence les anticorps témoins d'une infection récente par l'EHDV ni de présence du génome dans le sang ce qui suggère que les dromadaires ne semblent pas jouer le rôle potentiel de réservoir pour cet *orbivirus* bien que nos travaux sur 417 dromadaires aient confirmé ce rôle potentiel pour le BTV avec une séroprévalence de 100% à Monastir et de 1.57 % dans les gouvernorats du sud (Kebeli, Tozeur et Tataouine). Ces derniers résultats s'expliquent peu être par l'abondance de *Culicoides Imicola* à Monastir (Centre-Est) (Chaker et al., 2005) qui sont connus comme vecteurs efficaces pour la transmission du BTV (Purse et al., 2005). Ces données sérologiques doivent être examinées avec prudence car le nombre de sérums de dromadaires collectés à Monastir était faible par rapport à ceux échantillonnés dans le sud de la Tunisie.

L'EHDV étant un *arbovirus*, notre étude sur les *Culicoïdes* était nécessaire malgré notre manque de matériel. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de *C.imicola*,

espèce située en première position pour son rôle de vecteurs dans l'EHDV et le BTV dans les régions africaines (Paweska, 2003 ; Purse, 2005); 1/4 de la population piégée de type *imicola* et les autres 3/4 de type *Culicoïdes* non identifiés et ceci est particulièrement limité par la grande diversité des espèces du genre, leur petite taille et le manque d'accès à l'information taxonomique et par le manque d'experts dans le domaine (Agosti, 2006).

Les analyses moléculaires de broyat de *Culicoïdes imicola* piégés en 2006, 2013 et 2015 n'ont pas mis en évidence le génome du virus. Nous ne sommes pas en mesure de tirer des hypothèses à partir de ces résultats.

Quoiqu'il en soit, les voies d'introduction de l'EHDV-6 en Tunisie et la propagation à l'intérieur du pays restent inconnues. Différentes perspectives peuvent être envisagées dès le moment où l'on confirme qu'il s'agit bien d'EHDV-6 circulant à très bas bruit, nous suggérons de travailler sur le long terme sur des groupes d'animaux sentinelles (bovins, dromadaires, caprins) dont la taille serait à définir ultérieurement. Une fois ces groupes constitués, il faudrait établir un calendrier de prélèvements à envoyer et à conserver à la sérothèque de l'IRVT dans le but de détecter, en temps réel, le moment d'apparition du virus et l'isoler. Les périodes de prélèvement des échantillons sanguins devront coïncider avec la virémie. Il est entendu que le nombre de prélèvements devrait être assez conséquent pour être significatif. Ces travaux présenteraient l'avantage de délimiter les périodes de virémies sur un temps long.

Si nous nous référons à l'analogie qui existe entre les modes de transmission de la Bluetongue et de l'EHDV et à l'existence, en Tunisie, de la Bluetongue et des *Culicoïdes imicola* depuis l'année 2000, comme décrit dans l'étude de Chaker et al, 2005, il nous faudrait peut-être alors travailler sur un champ beaucoup plus étendu et sur des quantités de *Culicoïdes* beaucoup plus importantes pour arriver à détecter le virus et être en capacité de dresser un inventaire de tous les spécimens circulant en Tunisie. N'oublions pas que le réchauffement climatique dont les spécialistes parlent depuis quelque temps, participerait à leur prolifération et à la multiplication des espèces. Ces difficultés d'identification sont encore renforcées par des caractéristiques morphologiques très semblables. Peut-être que d'autres espèces de *Culicoïdes* non encore identifiées en Tunisie jouent un rôle dans la transmission de l'EHD, du BTV, et du virus de la peste équine ?

Mais ce programme ambitieux ne peut être réalisé sans le soutien d'une politique nationale d'épidémiologie-surveillance et d'une sensibilisation des éleveurs et des personnels spécialisés dont seul l'Etat a les moyens, à condition qu'il en ait la volonté.

## Références

## Références

1. Abdy, M. J., Howerth, E. E., Stallknecht, D. E. (1999) Experimental infection of calves with epizootic hemorrhagic disease virus. *American Journal of Veterinary Research*, **60**, 621-626.
2. Afshar, A., Eaton, B. T., Wright, P. F., Pearson, J. E., Anderson, J., Jeggo, M., Trotter, H. C. (1992a) Competitive ELISA for serodiagnosis of bluetongue: evaluation of group-specific monoclonal antibodies and expressed VP7 antigen. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, **4**(3), 231-237.
3. Agosti, D. (2006) Biodiversity data are out of local taxonomists' reach. *Nature*, 439,392.
4. Albayrak, H., E. Ozan, and S. Gur, 2010: A serologic investigation of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in cattle and gazella subgutturosa subgutturosa in Turkey. *Tropical Animal Health and production*, **42**, 1589–1591.
5. Al-Busaidy, M and Mellor, P. S. (1991) Epidemiology of bluetongue and related orbiviruses in the Sultanate of Oman. *Epidemiology and Infection*, **106**, 167-178.
6. Albina, E., Zientara, S., Sailleau, C. and al. (2007) La Fièvre Catarrhale Ovine (Bluetongue) : quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie*. **11**, 63-74.
7. Allison, A. B., Goekjian, V. H., Potgieter, A. C., Wilson, W. C., Johnson, D. J., Mertens, P. P. et Stallknecht, D. E. (2010) Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in the USA containing RNA segments derived from both exotic (EHDV-6) and endemic (EHDV-2) serotypes. *Journal of general Virology*, **91**, 430-439.
8. Allison, A. B., Holmes, E. C., Potgieter, A. C., Wright, I. M., Sailleau, C., Breard, E., Ruder, M. G. and Stallknecht, D. E. (2012) Segmental configuration and putative origin of the reassortant orbivirus, epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 strain Indiana. *Virology*, **424**, 67–75.
9. Anbalagan, S., Cooper, E., Klumper, P., Simonson, R. R. & Hause, B. M. (2014) Whole genome analysis of epizootic hemorrhagic disease virus identified limited genome constellations and preferential reassortment. *Journal of general Virology*, **95**, 434 - 441.
10. Anthony, S., Jones, H., Darpel, K. E., Elliott, H., Maan, S., Samuel, A et al. (2007) A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *Journal of Virological Methods*, **141**, 188-197.
11. Anthony, S. L., Maan, N., Maan, S., Sutton, G., Attoui, H and Mertens, P. P. C. (2009a) Genetic and phylogenetic analysis of the outer capsid proteins VP2 and VP5 of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV). *Virus Research*, **145**, 200-210.
12. Anthony, S. J., Maan, N., Maan, S., Sutton, G., Attoui, H and Mertens P. P. C. (2009b) Genetic and phylogenetic analysis of the core proteins VP1, VP3, VP4, VP6 and VP7 of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV). *Virus Research*, **145** (2), 187-199.
13. Anthony, S. J., Maan, S., Maan, N., Kgosana, L., Bachanek-Bankowska, K., Batten, C., Darpel, K. E., Sutton, G., Attoui, H. and Mertens, P. P. (2009c) Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup. *Virus Research*, **145**, 200–210.

14. Anthony, S. J., Darpel, K. E., Maan, S., Sutton, G., Attoui, H and Mertens , P. P.C. (2010) The evolution of two homologues of the core protein VP6 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV), which correspond to the geographical origin of the virus. *Virus Research*, **145**, 211–219.
15. Aradaib, I. E., Akita, G. Y. and Osburn, B. I. (1994) Detection of epizootic hemorrhagic disease virus serotypes 1 and 2 in cell culture and clinical samples using polymerase chain reaction. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, **6**, 143-147.
16. Aradaib, I. E., Mc Bride, J. W., Wilson, W. C., Osburn, B. I. (1995a) Development of polymerase chain reaction for specific identification of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 1. *Archives of Virology*, **140**, 2273-2281.
17. Aradaib, I. E., Brewer, A. W., Osburn, B. I. (1997) Interaction of epizootic hemorrhagic disease virus with bovine erythrocytes in vitro: electron microscope study. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, **20** (3), 281-283.
18. Aradaib, I. E., Wilson, W. C., Schore, C. E., Mohammed, M. E., Yilma, T. D., Cullor, J. S., Osburn, B. I. (1998) PCR detection of North American and Central African isolates of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) based on genome segment 10 of EHDV serotype 1. *Journal of Clinical Microbiology*, **36** (9), 2604-2608.
19. Aradaib, I. E., Smith, W. L., Osburn, B. I., and Cullor, J. S. (2003) A multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of North American serotypes of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses. *Comparative Immunology Microbiology and Disease*, **26**, 77-87.
20. Aradaib, I. E., Ali, N. (2004) Current status and future prospects of epizootic hemorrhagic disease of deer – a review. *Veterinarski Arhiv*, **74** (1), 63-83.
21. Attoui, H., P. P. C. Mertens, J. Becnel, S. Belaganahalli, M. Bergoin, C. P. Brussaard, J. D. Chappell, M. Ciarlet, M. del Vas, T. S. Dermody, P. R. Dormitzer, R. Duncan, Q. Fang, R. Graham, K. M. Guglielmi, R. M. Harding, B. Hillman, A. Makkay, C. Marzach\_1, J. Matthijnssens, R. G. Milne, F. Mohd Jaafar, H. Mori, A. A. Noordeloos, T. Omura, J. T. Patton, S. Rao, S. Maan, D. Stoltz, N. Suzuki, N. M. Upadhyaya, C. Wei, and H. Zhou, (2012): Reoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and L. A. Ball (eds), *Virus Taxonomy, IX Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*, pp. 509–606. Elsevier/Academic Press, London.
22. Balasuriya U.B., Nadler S.A., Wilson W.C., Pritchard L.I., Smythe A.B., Savini G., Monaco F., De Santis P., Zhang N., Tabachnick W.J. & Maclachlan N.J. (2008) The NS3 proteins of global strains of bluetongue virus evolve into regional topotypes through negative (purifying) selection. *Vet Microbiol*, **126**, 91-100.
23. Balenghien, T. and Delecolle, J. C. (2009) Les Culicoides mouchérons vecteurs du virus de la fièvre catarrhale ovine. *Insectes*, **154**, 25-30.
24. Batten, C. A., Maan, S., Shaw, A. E., Maan, N. S., Mertens, P. P. (2008) A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. *Virus Research*, **137** (1), 56-63.
25. Batten, C. A., Henstock, M. R., Bin-Tarif, A., Steedman, H. M., Waddington, S., Edwards, L. and Oura C. A. (2012) Bluetongue virus serotype 26: infection kinetics and pathogenesis in Dorset Poll sheep. *Veterinary Microbiology*, **157** (1-2), 119–124.

26. Beaton, A. R., Rodriguez, J., Reddy, Y. K., Roy, P. (2002) The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, **99**, 13154 - 13159.
27. Ben Dhaou, S., Sailleau, C., Babay, B., Viarouge, C., Sghaier, S., Zientara, S., Hammami, S. and Bréard E. (2016) Molecular characterisation of Epizootic Haemorrhagic Disease virus associated with a Tunisian outbreak among cattle in 2006. *Acta Veterinaria Hungarica*, **64**, (2), 250-262.
28. Beringer, J., Hansen, L. P and Stallknecht, D. E. (2000) An epizootic of hemorrhagic disease in white-tailed deer in Missouri. *Journal of Wildlife Diseases*, **36** (3), 588-591.
29. Blacksell, S. D., Lunt, R. A., Newberry, K. M. (1994a) Identification of epizootic hemorrhagic disease of deer virus serotypes using a fluorescence inhibition test. *Journal of virological Methods*, **46** (2), 251-254.
30. Boorman, J. (1991) A review of culicoides subgenus Avaritia species (Insecta, Diptera, Ceratopogonidae), vectors of viruses of sheep, cattle and horses, with particular reference to culicoides imicola in Europe and the Mediterranean region. *Report prepared for The overseas Development Administration*, 1-54pp.
31. Borkent, A. (2014) World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). RBC Museum. *British Columbia, Canada* 238 pp.
32. Botner, A., Broom, D., Doherr, M. G, Domingo, M., Hartung, J., Keeling, L. (2009) Scientific opinion on epizootic hemorrhagic disease. *EFSA Journal*, **7** (12), n°1418.
33. Boyce, M., Celma C.C., Roy P. (2012) Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Virology*, **9** , 178.
34. Boyce, M., McCrae, M.A., Boyce, P., and Kim, J.T. (2016) Inter-segment complementarity in orbiviruses: a driver for co-ordinated genome packaging in the Reoviridae? *J. Gen. Virol.* **97**, 1145-1157.
35. Breard, E., Sailleau, C., Hamblin, C., Graham, S. D., Gourreau., J. M and Zientara, S. (2004) Outbreak of epizootic hemorrhagic disease on the island of Reunion. *Veterinary Record*, **155**, 422-423.
36. Bréard, E., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A. and Zientara, S. (2010a). La maladie hémorragique des cervidés, une arbovirose proche de la FCO aux frontières de l'Europe. *Bulletin épidémiologique de l'AFSSA*, n°36, 16.
37. Bréard, E., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A. and Zientara, S. (2010b). Maladie hémorragique du cerf : une menace ? *Le point vétérinaire*, 306, 11.
38. Breard E, Belbis G, Viarouge C, Riou M, Desprat A, Moreau J, et al. (2013) Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 experimentation on adult cattle. *Res Vet Sci* 95(2),794–798. Epub 2013/08/01. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.026 PMID: 23899717.
39. Braverman, Y. (1994) Nematocera (Ceratopogonidae, Psychodidae, Simuliidae and Culicidae) and control methods: *Scientific and Technic review of international Office of Epizootics*, **13(4)**, 1175-1199.
40. Brodie, S. J., Bardsley, K. D, Diem. K., Mecham, J. O, Norelius, S. E, Wilson, W. C. (1998) Epizootic hemorrhagic disease: analysis of tissues by amplification and in situ Hybridization

- reveals widespread orbivirus infection at low copy numbers. *Journal of Virology*, **72** (5), 3863-3871.
41. Brunschwig, P., Lancelot, R. and Zanella, G. (2009) Expertise sur la mortalité des bovins laitiers à la Réunion. Paris : Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, *Direction Générale de l'Alimentation*, 55p.
  42. Bumbarov, V., Golender, N., Rotenberg D and Brenner J. (2016) Unusual clinical manifestations in Israeli ruminant populations infected with Orbiviruses. *Veterinaria Italiana*, **52** (3-4), 343-351. doi: 10.12834/VetIt.641.3154.2
  43. Burgu, I., Akca, Y., Hamblin, C and Kitching, P. (1991) Epizootic hemorrhagic-disease virus-antibodies in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, **23**, 261-262.
  44. Campbell, C. H. and St George, T. D. (1986) A preliminary report of a comparison of epizootic hemorrhagic disease viruses from Australia with others from North America, Japan and Nigeria. *Australian Veterinary Journal*, **63**, 233.
  45. Caporale, G. (2009) Scientific review on epizootic hemorrhagic disease, *scientific report submitted to EFSA*, p112.
  46. Carpenter, S., Mellor, P. S and Torr, S. J. (2008) Control techniques for Culicoides biting midges and their application in the UK and northwestern Palaearctic. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 175 - 187.
  47. Carpi, G., Holmes, E. C. and Kitchen, A. (2010) The evolutionary dynamics of bluetongue virus. *Journal of Molecular Evolution*, **70**, 583-592.
  48. Celma, C. C. P. and Roy, P. (2009). A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *Journal of Virology*, **83** (13), 6806–6816.
  49. Centre National de Veille Zoosanitaire de la République Tunisienne. (3 Mai 2010) Maladie hémorragique des cervidés : nécessité de faire un diagnostic avec la Bluetongue. In: *Flash Zoosanitaire du Ministère de l'Agriculture, des Ressources Hydrauliques et de la Pêche, 27ème Congrès Maghrébin vétérinaire en Tunisie (Hammamet, Tunisie, 10-11 (avril 2010)*, **25**, 3.
  50. Cêtre-Sossah, C., Balhengien, T., Martinez, D., Albina, E., Garros, C., Giovannini, A and al. (2010) Strengthening cooperation on vector borne diseases in Europe. *Veterinary Record*, **166** (13), 386-387.
  51. Chaker E, Sarif M., Rabhi M., Rouis M., Babba H. Azaiez R. (2005) Note faunistique sur les Culicoides (diptera, ceratopogonidae) gouvernorat de monastir (Tunisie). *Parasite*, **12**, 359-361.
  52. Chalmers, G. A., Vance, H. N. and Mitchell, G. J. (1964). An outbreak of hemorrhagic epizootic disease in wild ungulates in Alberta. *Journal of Wildlife Diseases*, **15**, 1-6.
  53. Cheney et al., 1995, I.W., Larson, M.D., Mecham, and W. Wilson. 1995. Geographical genetic variation in the gene encoding VP3 from the Alberta isolate of epizootic hemorrhagic disease virus. *Virus Research*, **36**, 279-286;
  54. Cheney, I. W., Yamakawa, M., Roy, P., Mecham, J. O. and Wilson, W. C. (1996) Molecular characterization of the segment 2 gene of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 2: Gene sequence and genetic diversity. *Virology*, **224** (2), 555-560.
  55. Chauveau, E., Doceul, V., Lara, E., Breard, E., Sailleau, C., Vidalain, P. O., Meurs, E.

- F., Dabo, S., Schwartz-Cornil, I., Zientara, S. and Vitour, D. (2013) NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *Journal Virology*, **87**, 8241-8246.
56. Clavijo, A., Sun, F., Lester, T., Japerson, T. L. and Wilson, W. C. (2010) An improved real time reverse transcription polymerase chain reaction for the simultaneous detection of all serotypes of epizootic hemorrhagic disease virus. *Journal of Veterinary of Diagnostic Investigation*, **22**(4), 588–593.
  57. Coetzer, J. A . W. and Guthrie, A. J. (2004) African Horse Sickness. Infectious Diseases of Livestock, Second edition, by Coetzoer J A W and Tustin, R C pp. 1231-1246. *Oxford University Press southern Africa, Cape Town*.
  58. Cowley, J. A., Gorman, B. M (1989) Cross-neutralization of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21. *Veterinary Microbiology*, **9**(1), 37-51.
  59. Deem, S. L., Noss, A. J, Villarroel, R., Uhart, M. M. and Karesh, W. B. (2004) Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in the Gran Chaco, Bolivia. *Journal of Wildlife Diseases*, **40**(1), 92-98.
  60. Delecolle, J. (1985) Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des 576 espèces du genre *Culicoides*, (Diptéra): (Cératopogonidae) du Nord-Est de la France 577 Strasbourg: Delecolle (J-C).
  61. Delécolle, J. C. and Schaffner, F., Vecteurs des arboviroses. In : Lefèvre PC, Blancou J, Chermette R. (2003) Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes. Paris : Tec and Doc Lavoisier, 123-128.
  62. Dubay, S. A., Devos, J. C., Noon, T. H., and Boe, S. (2004) Epizootiology of hemorrhagic disease in mule deer in central Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, **40** (1), 119-124.
  63. Dudley, R. (2013) Report of the Committee on Bluetongue and Related Orbiviruses, in 116th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, October 18-24, Greensboro, NC. *In Press*.
  64. Dufour B. (2008), Fièvre catarrhale ovine « Blue Tongue » (FCO). In : Conférence pour les GTV Junior, ENVA.
  65. Dunbar, M.R., Cunningham, M. W., Roof, J. C. (1998) Servalence of selected disease agents from freeranging black bears in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*. **34**(3), 612–619.
  66. EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Scientific Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on request from the European Commission on bluetongue vectors and vaccines. *The EFSA Journal*, **479**, 1–29.
  67. Efsa. (2009) Scientific Opinion on Epizootic Hemorrhagic Disease 1. *EFSA Journal*, **7**, 1418. 1467.
  68. Eschbaumer, M., Wernike, K., Batten, C. A., Savini, G., Edwards, L., Di Gennaro, A., Teodori, L., Oura, C. A., Beer, M. & Hoffmann, B. (2012). Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 in European cattle and sheep: diagnostic considerations and effect of previous BTV exposure. *Vet Microbiol* .**159**, 298–306.
  69. Fajardo T, Jr., Sung PY and Roy P. (2015). Disruption of Specific RNA-RNA Interactions in a Double-Stranded RNA Virus Inhibits Genome Packaging and Virus Infectivity. *PLoS pathogens* **11**:e1005321.

70. Fajardo Jr T., AlShaikhahmed K., and Roy P. (2016). Generation of infectious RNA complexes in Orbiviruses: RNA-RNA interactions of genomic segments. *Oncotarget*, **7**, No. 45, 72559-72570.
71. Favero, C. M., Matos ACD., Campos FS., Candilo MV., Costa EA., Heinemann MB., Barbosa-Stancioli EF., and Labato Z. (2013) Epizootic hemorrhagic disease in Borket deer, Brazil, *Emerging infectious Disease*, **19**, 346.
72. Feenstra, F., Van Gennip, R.G., Maris-Vel dhuis, M., Verheij, E., Van Rijn, P. A. (2014) Bluetongue virus without NS3/NS3a expression is not virulent and protects against virulent virus challenge. *Journal of General Virology*. **95**, 2019-2029.  
doi: 10.1099/vir.0.065615-0.
73. Forzan M., Marsh M., Roy P. (2007) Bluetongue virus entry into cells. *J. Virol*, **81** (9), 4819-4827.
74. Foster, N. M., Breckon, R. D., Luedke, A. J and Jones, R. H. (1977) Transmission of two strains of epizootic hemorrhagic disease virus in deer by *Culicoides Variipennis*. *Journal of Wildlife Diseases*, **13** (1), 9-16.
75. Frölich, K., Hamblin, C., Parida, S., Tuppurainen, E., Schettler, E. (2006) Serological Survey for Potential Disease Agents of Free-ranging Cervids in Six Selected National Parks from Germany. *Journal Wildlife Disease*, 836-843 .
76. Gard, G. P and Melville, L. F. (1991) Results of a decade's monitoring for orbiviruses in sentinel cattle pastured in an area of regular arbovirus activity in Northern Australia. In Bluetongue, African horse sickness, and related orbiviruses. *New-York, CRC Press: T. E. Walton, B. I. Osburn*, 85-89.
77. Garrett, E. F., Po. E., Bichi, E. R., Hexum, S. K., Melcher, R., Hubner, A. M. (2015) Clinical disease associated with epizootic hemorrhagic disease virus in cattle in Illinois. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **247**(2), 190-195.  
doi: 10.2460/javma.247.2.190.
78. Gaydos, J. K., Allison, A. B., Hanson, B. A., Yellin, A. S. (2002a) Oral and fecal shedding of epizootic hemorrhagic disease virus, serotype 1 from experimentally infected white-tailed deer. *Journal Wildlife Disease*, **38** (1), 166-168.
79. Gaydos, J.K., Davidson.W.R., Elvinger.F., Mead. D.G., Howerth. W.E and Stallknecht D.E. (2002b). Innate resistance to epizootic hemorrhagic disease in white-tailed deer. *Journal Wildlife Disease*. **38**, 713-719.
80. Gaydos, J. K., Davidson, W.R., Elvinger, F., Howerth, E. W., Stallknecht, D. E. Murphy M, Stallknecht, D. E . (2002c) Cross-protection between epizootic hemorrhagic disease virus sérotypes 1 and 2 in white-tailed deer. *Journal Wildlife Disease*, **38** (4), 720-728.
81. Gerbier G., Sailleau C, Bréard E, Viarouge C , Desprat A, Lasne L, Gouyet L, Desvars A, Baldet T, Biteau F, Delécolle JC, Garros C, Roger F, Zientara S. (2010) Épidémiologie comparée des orbivirus en Guadeloupe et à la Réunion. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 43/Sécial DOM-TOM*.
82. Gibbs, E. P and Lawman, M. J. (1977) Infection of British deer and farm animals with epizootic hemorrhagic disease of deer virus. *Journal of Comparative Pathology*, **87**, 335-343.
83. Gibss P-E-J., Greiner C. (1994) the epidemiology of bluetongue. *Comparative Immunology Microbiology. Infect. Dis*, **17**(3-4), 207-220.

84. Gould A.R. 1987. The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the United States of America, and with other orbivirus isolates. *Virus Res*, **7**, 169-183.
85. Gould AR et Hyatt AD. (1994) The Orbivirus genus, diversity, structure, replication and phylogenetic relationships, *Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Diseases*, **17**, 163-188.
86. Guirakhoo, F., Catalan, J.A, Monath, T.P. 1995 Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles. *Archive Virology*, **140** (5), 967–974.
87. Gumm, I. D., Taylor, W. P., Roach, C. J., Alexander, F. C., Greiner, E. C., Gibbs, E. P. (1984) A Serological survey of ruminants in some Caribbean and South countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. *Veterinary Record*, **114**, 635–638.
88. Hammami, S., Sghaier, S., Chérif, N., Berguaoui, R., Hammami, M., Ben, Hassen, S. and El Haddouchi, S. (2007) Première incursion du virus de la maladie hémorragique épizootique (EHDV) en Tunisie. *Bulletin vétérinaire*, **25**, 6 -7.
89. Hirashima, Y., Kato, T., Yamakawa, M., Shirafuji, H., Okano, R., Yanase, T. (2015) Reemergence of Ibaraki disease in southern Japan in 2013. *Journal of Veterinary Medical Science*. **77**(10), 1253-1259. doi: 10.1292/jvms.15-0039.
90. House, C., Shipman, L. D and Weybright, G. (1998) Serological diagnosis of epizootic hemorrhagic disease in cattle in the USA with lesions suggestive of vesicular disease. *Tropical Veterinary Medicine*, **849**, 497-500.
91. Huismans, H., Van Dijk, A. A. (1990) Bluetongue virus structural components. In: Roy, P., Gorman, B.M. (Eds.), *Current Topics in Microbiology and Immunology: Bluetongue Viruses*. Springer-Verlag, **162**, 21- 41.
92. Hassan, S.S., Roy, P. (1999) Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *Journal of virology*, **73** (12), 9832–9842.
93. Huismans, H., Van Dijk, Aa and Els, H. j. (1987a) Uncoating of parental Bluetongue to core and subcore particules in infected L-cells, *Virology*, **157**, 180-188.
94. Hyatt A-D., Gould A-R., Coupar B., Eaton B-T. (1991) Localization of the non structural protein NS3 in bluetongue virus infected cells, *Journal of General Virology*, **72**, 2263-2267
95. Hyatt A.D., Zhao Y., Roy P. (1993) Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV non-structural protein NS3/NS3A. *Virology*, **193** (2), 592-603.
96. Han Z., HARTY R-N. (2004), The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties, *Journal of Biological Chemistry*, **279** (41), 43092-43097.
97. Iwata, H., Manabe, S., Yoshida, A., Pereira, E. M., Inoue, T. (2001) The complete nucleotide sequences of L3 and S7 segments of Ibaraki virus encoding for the major inner capsid proteins, VP3 and VP7. *Journal of Veterinary Medical Science*, **63** (1), 73-78.
98. Jensen, M. J., Cheney, I. W., Thompson, L. H., Mecham, J. O., Wilson, W. C., Yamakawa, M., Roy, P. and Gorman, B. M. (1994) The smallest gene of the orbivirus, epizootic hemorrhagic disease, is expressed in virus-infected cells as two proteins and the

expression differs from that of the cognate gene of bluetongue virus. *Virus Research*, **32** (3), 353-364.

99. Jensen, M. J and Wilson, W. C. (1995) A model for the membrane topology of the ns3 protein as predicted from the sequence of segment-10 of epizootic hemorrhagic-disease virus serotype-1. *Archives of Virology*, **140** (140), 799-805.
100. Kar, A. K., Bhattacharya, B., Roy, P. (2007) Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Molecular Biology*, **8**, 4.
101. Kedmi, M., Van Straten, M., Ezra, E., Galon, N. Klement, E. 2010a. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **93**, 2486–2495.
102. Kedmi, M., Levi, S., Galon, N., Bomborov, V., Yadin, H., Batten, C., Klement, E., (2011) No evidence for involvement of sheep in the epidemiology of cattle virulent epizootic hemorrhagic disease virus. *Veterinary Microbiology*, **148**, 408 – 412.
103. King A.M., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J. (eds) (2012). – Virus taxonomy, 9th Ed. Academic Press, San Diego.
104. Kitano Y. (2004). – Ibaraki disease in cattle. In Infectious diseases of livestock, 2nd Ed. (J.A.W Coetzer & R.C. Tustin, eds). *Oxford University Press, New York*, 1221– 1226.
105. Krabatsos, N. (1985) International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrate, San Antonio, Texas: *The American Society of tropical Medicine and Hygiene*, 3rd edition.
106. Komarov, Goldsmith., 1951. A disease, similar to BT in cattle, sheep in Israel. *Refuah Veterinarith*, **8** (3), 96–100.
107. Krzysiak, M.K., Iwaniak W., Kezsi-Maliszewska, J., W. Olech, W and Larska, M. (2016) Serological Study of Exposure to Selected Arthropod-Borne Pathogens in European Bison (*Bison bonasus*) in Poland. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi:10.1111/tbed.12524
108. Le Blois, H., Fayard, B., Urakawa, T., Roy, P. (1991) Synthesis and characterization of chimeric particles between epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus: functional domains are conserved on the VP3 protein. *Journal Virology*, **65** (9), 4821-4831.
109. Linley J.R. (1979) Nutrient agar mixtures for culture of food organisms for predaceous *Culicoides* larvae (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **16**, 171-172.
110. Luo, L., Sabara, M. I. (2005) Production of a recombinant major inner capsid protein for serological detection of epizootic hemorrhagic disease virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12** (8), 904-909.
111. Maan, N. S., Maan, S., Nomikou, K., Johnson, D. J., El Harrak, M., Madani, H., Yadin, H., Incoglu, S., Yesilbag, K., Allison, A. B., Stallknecht, D. E., Batten, C., Anthony, S.J., Mertens, P. P. C. (2010) RT-PCR assays for seven serotypes of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus and their use to type strains from the mediterranean region and North America. *PLoS ONE*, **5**, e12782.

112. Maan, S., Maan, N. S., Ross-smith, N., Batten, C. A., Shaw, A. E., Anthony, S. J., Samuel, A. R., Darpel, K. E., Veronesi, E. & other authors (2008). Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology*, **377**, 308–318.
113. Maan, N.S., Maan S., Potgieter, A. C., Wright, I. M., Belaganahalli, M and P. P. C. Mertens. (2016) Development of Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi:10.1111/tbed.12477
114. Maclachlan, N. J. and Osburn , B. I. (2004) Epizootic hemorrhagic disease of deer. *Infectious diseases of livestock*, **2**, 1227-1230.
115. Maclachlan, N.J., Guthrie AJ ( 2010) Re-emergence of bluetongue , African Horse sickness, and others orbivirus disease. *Veterinary Research*, **41**, n°35.
116. Madani, H., Casal, J., Alba, A., Allepuz, A., Cêtre-Sossah, C., Hafsi, L., Kount- Chareb, H., Bouayed-Chaouach, N., Saadaoui, H. & Napp S. (2011) Animal diseases caused by orbiviruses, Algeria. *Emerging Infectious Diseases*, **17**, 2325-2327.
117. Mathieu, B. 2011. Les espèces de culicoides du sous genre Avaritia (Diptera: Ceratopogonidae) dans le monde: Révision systématique et taxonomique des espèces d'intérêt dans la transmission d'orbivirus. thèse de doctorat des sciences du vivant, Université de strasbourg.
118. Matsuo, E., Roy, P. (2009) Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation .*Journal of Virology*, **83** (17), 8842-8848.
119. Mastuo, E., Roy. P. (2013). Minimum requirements for bluetongue virus primary replication in vivo. *Journal of Virology*. **87**, 882-889.
120. McVey D.S. & Maclachlan N.J. (2015) Vaccines for prevention of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in livestock: a North American perspective. *Vector Borne Zoonotic Disease*, **15**, 385–396.
121. Mecham, J. O., Stallknecht, D., and Wilson, W. C. (2003) The S7 gene and VP7 protein are highly conserved among temporally and geographically distinct American isolates of epizootic hemorrhagic disease virus. *Virus Research*, **94**, 129-133.
122. Mecham, J. O., Wilson, W. C. (2004) Antigen capture competitive enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed antigens for diagnosis of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 518-523.
123. Mecham, J.O., Dean, V.C., 1988. Protein coding assignment for the genome of epizootic haemorrhagic disease virus. *Journal General virology*, **69**, 1255–1262.
124. Mellor PS, Jennings M, Boorman JP. (1984) Culicoides from Greece in relation to the spread of bluetongue virus. *Rev Délevage Médecine Vét Pays Trop*, **37**(3), 286-289.
125. Mellor PS. (2000) Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *Journal Comparative of Pathology*. **123**(4), 231-47.
126. Mellor P., Boorman J, Baylis M.(2000) Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual revue of entomology*, **45**(1), 307-40.

127. Mellor PS.(1990) The Replication of Bluetongue Virus in Culicoides Vectors. In : MSc PR, MSc BMG, éditeurs. *Bluetongue Viruses [Internet]. Springer Berlin Heidelberg, [cité 13 190 juill 2014]. p. 143-61.* Disponible sur : [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-75247-6\\_6](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-75247-6_6)
128. Meiring, T. L., Huismans H., Van Staden V. (2009) Genome segment reassortment identifies non-structural protein NS3 as a key protein in African horsesickness virus release and alteration of membrane permeability. *Archive Virology*. **154**(2), 263-71. doi: 10.1007/s00705-008-0302-8. Epub 2009 Jan 20.
129. Meiswinkel, R, Nevill, E. M and Venter, G. J. (1994) Vectors: Culicoides spp. In: Infectious diseases of Livestock with special reference to southern Africa (eds. Coetzer, JAW., Thomson, G.R and Tustin, R.C), *Oxford University Press*, Oxford, 68–89.
130. Mertens PP, Sangar DV. (1985) Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. *Progress in Clinical and Biological Research*, **178**, 371-387.
131. Mertens PPC, Burroughs JN, Anderson J.(1987) Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology*, **157**(2), 375-86.
132. Mertens, P. P., Pedley, S., Cowley, J., Burroughs, J. N., Corteyn, A. H., Jeggo, M. H., Jennings, D. M. & Gorman, B. M. (1989) Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, **170**, 561–565.
133. Mertens, P.P.C., Maan, S., Samuel.A.R., Attoui.,H. (2005). Orbivirus : Reoviridae.pp.446-483 In C.M. Fauquet,M. A. Mayo, J. Maniloff, U.Deassselberger, and L.A.Ball (eds). *Virus Taxonomy: VIII Report of ICTV. Elsevier/Academic Press, London.*
134. Mertens PC, Attoui H and Banford DH. (2010) The RNAs and Proteins of dsRNA Viruses: Coding assignments and virion locations of rotavirus proteins and 3D structure of the rotavirus particle. (available as a Word file).
135. Mohammed, M. E. H and Mellor, P. S. (1990) Further-studies on bluetongue and bluetongue-related orbiviruses in the Sudan. *Epidemiology and Infection*, **105**, 619-632.
136. Mohammed, M. E, Aradaib., I. E., Mukhtar, M. M, Ghalib, H. W., Riemann, H. P., Oyejide, A., Osburn, B. I. (1996) Application of molecular biological techniques for detection of epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV-318) recovered from a sentinel calf in central Sudan. *Veterinary Microbiology*, **52** (3-4), 201-208.
137. Mohl BP., Roy, P. (2014) Bluetongue virus capsid assembly and maturation. *Viruses*. **21**,6(8), 3250-3270. doi: 10.3390/v6083250.
138. Murphy, M. D., Howerth, E. W., Maclachlan, N. J and Stallknecht, D. E. (2005) Genetic variation among epizootic hemorrhagic disease viruses in the southeastern United States: 1978-2001. *Infection Genetics and Evolution*, **5** (2), 157-165.
139. Murphy, M. D, Hanson, B.A, Howerth, E. W and Stallknecht, D. E. (2006) Molecular characterization of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 1 associated with a 1999 epizootic in white-tailed deer in the eastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, **42**, 616-624.
140. Noon, T. H., Wesche, S., L, Cagle., D, Mead, D. G., Bicknell, E. J, Bradley, G. A, Riplog-Peterson, S, Edsall, D and Reggiardo, C. (2002a) Hemorrhagic disease in bighorn sheep in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*, **38**, 172-176.
141. Nol, P., Kato, C., Reeves, W. K., Rhyan, J., Spraker, T., Gidlewski, T., Vercauteren, K., Salman, M.(2010) Epizootic hemorrhagic disease outbreak in a captive facility housing white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), bison (*Bison bison*), elk (*Cervus elaphus*),

- cattle (*Bos taurus*), and goats (*Capra hircus*) in Colorado, USA. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **41**, 510–515.
142. Nomikou, K., J. Hughes, R. Wash, P. Kellam, E. Breard, S. Zientara, M. Palmarini, R. Biek, and P. Mertens, 2015: Widespread reassortment shapes the evolution and epidemiology of Bluetongue virus following European invasion. *PLoS Pathog.* **11**, e1005056.
  143. Office International Epizooties (OIE), (2006a). Disease Information, 2 November 2006, vol. **19**, No. 44. Available from: [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS\\_78.HTM#Sec1](http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_78.HTM#Sec1).
  144. Office International Epizooties (OIE), 2006b. Disease Information, 28 December 2006, vol. **19**, No. 52. Available from: [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/A\\_CURRENT.HTM#Sec4](http://www.oie.int/eng/info/hebdo/A_CURRENT.HTM#Sec4).
  145. Office International Epizooties (OIE), (2006c). Disease Information, vol. **19**, No. 51. Available from: [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS\\_65.HTM#Sec11](http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_65.HTM#Sec11).
  146. Office International Epizooties (OIE), (2006d). Disease Information, 28 September 2006, vol. **19**, No. 39. Available from: [http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS\\_77.HTM#Sec8](http://www.oie.int/eng/info/hebdo/AIS_77.HTM#Sec8).
  147. Office International Epizooties (OIE), 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE Standards Commission (Eds.), sixth ed.
  148. OIE. (2014) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
  149. OIE. (2015) WAHID (World Animal Health Information Database), weekly disease information **28**(40) [edited] [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Review\\_report/Review?page\\_refer=Map Full Event Report & reportid=18766](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Review_report/Review?page_refer=Map%20Full%20Event%20Report%20&reportid=18766).
  150. Ohashi, S., Yoshida, K., Yanase, T. & Tsuda, T. (2002) Analysis of intratypic variation evident in an Ibaraki virus strain and its epizootic hemorrhagic disease virus serogroup. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 3684–3688.
  151. Ohashi, S, Yoshida, K, Watanabe, Y and Tsuda, T. (1999) Identification and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 3800–3803.
  152. Omori, Inaba., Y, Morimoto., T, Tanaka., Y, Ishitani, H. and Kurogi. (1969) Ibaraki virus, an agent of epizootic disease of cattle resembling bluetongue. I. Epidemiologic, clinical and pathologic observations and experimental transmission to calves. *Japanese Journal of Microbiology*, **13** (2), 139–157.
  153. Patel, A., and P. Roy, (2014) The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Res.* **182**, 5–20.
  154. Paweska, J.T., Venter, G.J., Hamblin, C. (2005) A comparison of the susceptibility of *Culicoides imicola* and *C. bolitinos* to oral infection with eight serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus. *Medical and Veterinary Entomology*, **19**, 200–207.
  155. Pearson, J. E., Gustafson, G. A., Shafer, A. L., Alstad, A. D. In: T.E. Walton and B. I. Osburn. (1992) Editors, Bluetongue, African horse sickness and related Orbiviruses, *CRC Press, Boca Raton, FL* .pp. 533–546.
  156. Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P.C., Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 171–181.

157. Prasad BV, Yamaguchi S, Roy P. (1992) Three-dimensional structure of single-shelled bluetongue virus. *Journal Virology*, 66(4), 2135–42.
158. Pritchard, L. I., Gould, A. R., Wilson, W. C., Thompson, L., Mertens, P. P. & Wade-Evans, A. M. (1995) Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. *Virus Research*, **35**, 247–261.
159. Pritchard, L. I., Gould, A. R., Wilson, W. C., Thompson, L., Mertens, P. P. & Wade-Evans, A. M. (1995). Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. *Virus Research* , **35**, 247–261.
160. ProMED-mail (2015) Epizootic hemorrhagic disease, b.-T., Archive no. 20151002.3687272 ProMED-mail.
161. Quist, C. F., Howerth, E. W., Stallknecht, D. E., Brown, J., Pisell, T., Nettles, V. F. (1997) Host defense responses associated with experimental hemorrhagic disease in white-tailed deer. *Journal Wildlife Diseases*, **33** , 584-99.
162. Roy, P. (1992a) Bluetongue virus proteins. *Journal of general Virology*, **73**, 3051-3064.
163. Roy, P. (2008) Functional mapping of bluetongue virus proteins and their interactions with host proteins during virus replication. *Cell Biochem Biophys*, **50**(3), 143-157.
164. Roy, P. (2013) Orbiviruses. In: Fields Virology, Sixth Edition, (eds.: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., and Roizman, B.), pp. 1402-1423. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
165. Saif, L. J. (2011) Reoviridae. In: Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition, MacLachlan N.J. & Dubovi, E.J., eds. *Academic Press, London, UK*.
166. Sabin AB. (1959) Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described, *Science*, **20** , 1387-1389.
167. Savini, G., Afonso, A., Mellor, P., Aradaib, I., Iyadn, H., Sanaa, M., Wilson W., Monaco, F. and Domingo M. (2011) Epizootic haemorrhagic disease. *Research in Veterinary Science*, **91**(1), 1–17.
168. Swiss Institute of Bioinformatics. Viral Zone. (2010). Orbivirus. In Viral Zone. Retrieved September 8th, 2010, from [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/106.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/106.html)
169. Shope, R. E., MacNamara, L. G., Mangold, R. (1955) Deer mortality-Epizootic Haemorrhagic Disease of deer. New-Jersey. *Outdoor*, **6**, 21.
170. Sailleau, C., Zanella, G., Breard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Vitour, D., Adam, M., Lasne, L., Martrenchar, A., Bakkali-Kassimi, L., Costes, L. and Zientara, S. (2012) Co-circulation of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island. *Veterinary Microbiology*, **155**, 191-197.
171. Sailleau, C., Zanella, G., Breard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Vitour, D., Adam, M., Lasne, L., Martrenchar, A., Bakkali-Kassimi, L., Costes, L., Zientara, S. (2011) Co-circulation of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island. *Veterinary Microbiology*.

172. Sohn, R., Yuill, and T. M. (1991) Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in wild ruminants. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*, **16**, 17–24.
173. Sugiyama, M., Hirayama, N., Sasaki, H., Sugimura, T., Minamoto, N., Kinjo, T. (1989) Antigenic relationship among strains of Ibaraki virus and epizootic haemorrhagic disease virus studied with monoclonal antibodies. *Research in Veterinary Science*, **46**, 283 - 285.
174. Shope, R. E., MacNamara, L. G., Mangold, R. (1960) A virus induced epizootic hemorrhagic disease of the Virginia white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Experimental Medicine*, **111**, 155–170.
175. Stallknecht, D. E., Kellogg, M. L., Blue, J. L., Pearson, J. E. (1991) Antibodies to bluetongue and epizootic hemorrhagic-disease viruses in a barrier-island white-tailed deer population. *Journal of Wildlife Diseases*, **27**, 668–674.
176. Stallknecht, D. E and Howerth, E. W. (2004) Epidemiology of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in wildlife: surveillance methods. Bluetongue, Proceedings of the third International Symposium. *Veterinaria italiana* , **40** (3-4), 203-207.
177. St George, T. D., Cybinski, D. H, Standfast, H. A., Gard, G. P. and Della-Porta, A. J. (1983) The isolation of five different viruses of the epizootic hemorrhagic disease of deer serogroup. *Australian Veterinary Journal*, **60**, 216-217.
178. Stewart M, Dovas CI, Chatzinasiou E, Athmaram TN, Papanastassopoulou M, Papadopoulos O, et al. (2012) Protective efficacy of Bluetongue virus-like and subvirus-like particles in sheep: presence of the serotype-specific VP2, independent of its geographic lineage, is essential for protection. *Vaccine*, **30**(12), 2131–9.
179. Stewart M, Dubois E, Sailleau C, Breard E and others. (2013) Bluetongue virus serotype 8 virus-like particles protect sheep against virulent virus infection as a single or multi-serotype cocktail immunogen. *Vaccine*, **31**, 553–558.
180. Stewart, M., A. Hardy, G. Barry, R. M. Pinto, M. Caporale, E. Melzi, J. Hughes, A. Taggart, A. Janowicz, M. Varela, M. Ratnier, and M. Palmarini, (2015) Characterisation of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *Journal General Virology*, **96**, 3280–3293
181. Stott, J. L., Barber, T. L. and Osburn, B. I. (1978) Serotyping bluetongue virus: a comparison of plaque inhibition (disc) and plaque neutralization methods. Proceedings, 21st Annual Meeting of the American Association of Veterinary Diagnosticians, 399-410.
182. Sellers R.F. (1981) Bluetongue and related diseases. In: Gibbs E.P.J. ed. *Virus Diseases of Food Animals*. London, UK: Academic Press. pp. 567-584.
183. Sellers, R. F., Maarouf, A. R. (1989) Trajectory analysis and bluetongue virus serotype 2 in Florida 1982. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **53**, 100–102.
184. Sellers F R, Mellor P. (1993) Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides* spp. during adverse conditions. *Revue Scientifique et technique L'Office Int Epizoot*, **12**, 733-55.
185. Thompson, L. H., Mecham, J. O., Holbrook, F. R. (1988) Isolation and characterization of epizootic hemorrhagic-disease virus from sheep and cattle in Colorado. *American Journal of Veterinary Research*, **49**, 1050–1052.

186. Touil, N., Cherkaoui, Z., Lmrabih, Z., Loutfi, C., Harif, B and El Harrak, M. (2012) Emerging viral diseases in dromedary camels in the Southern Morocco. *Transboundary Emerging Diseases*, **59**, 177-182.
187. Temizel, E., M, Yesilbag, K., Batten, C., Senturk, S., Maan, N. S., Clement-Mertens, P. P and Batmaz, H. (2009) Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerging Infectious Diseases Journal*, **15** (2), 317-319.
188. Thevasagayam, J. A., Woolhouse, T. R., Mertens, P. P., Burroughs, J. N. and Anderson, J. (1996) Monoclonal antibody based competitive ELISA for the detection of antibodies against epizootic hemorrhagic disease of deer virus. *Journal of Virological Methods*, **57** (2), 117-126.
189. Tomori, O. (1980) Bluetongue and Related Viruses in Nigeria - Experimental-Infection of West- African Dwarf Sheep with Nigeria Strains of the Viruses of Epizootic Hemorrhagic-Disease of Deer and Bluetongue. *Veterinary Microbiology*, **5** (3), 177-185.
190. Uchinuno, Y., Ito, T., Goto, Y., Miura, Y., Ishibashi, K., Itou, T., Sakai, T. (2003) Differences in Ibaraki virus RNA segment 3 sequences from three epidemics. *Journal of Veterinary Medical Science* , **65**(11), 1257–1263.
191. Urbano, P. and Urbano, F. G. (1994) The Reoviridae family, *Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease*, **17**, 157-161.
192. Uren M. F.(1986) Clinical and pathological responses of sheep and cattle to experimental infection with five different viruses of the epizootic haemorrhagic disease of deer serogroup. *Australian of Veterinary Journal*, **63**, 199-201.
193. USDA, (2013) Orbiviruses, Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease: Gap Analysis Workshop Report. 2013. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Washington, DC. <http://go.usa.gov/BJ5F>
194. Van Campen H, Davis C, Flinchum JD, Bishop JV, Schiebel A, Duncan C, Spraker T. (2013) Epizootic hemorrhagic disease in yaks (*Bos grunniens*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **25** (3), 443-446.
195. Van Gennip RG, van de Water SG, van Rijn PA. (2014). Bluetongue virus nonstructural protein NS3/NS3a is not essential for virus replication. *PLoS One*. **20**, 9 (1).
196. Van Staden., Huismans H.(1991) A comparison of the genes which encode non-structural protein NS3 of different orbiviruses. *Journal of General Virology*, **72** (5), 1073-1079.
197. Viarouge, C., Lancelot, R., Rives, G., Breard, E., Miller, M., Baudrimont, X. and al. (2014) Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. *Veterinary Microbiology*, **174**, 78 – 85.
198. Viarouge, C., Breard, E., Zientara, S., Vitour, D., Sailleau, C. (2015) Duplex Real-Time RT-PCR Assays for the Detection and Typing of Epizootic Haemorrhagic Disease Virus. *Plos one*, **10**, 10(7):e0132540. doi: 10.1371.
199. Walzer, B. (2009) Les insectes du genre Culicoides, vecteurs de maladies animales. Thèse Médecine Vétérinaire, Alfort, n°017, 203p.
200. Wernery, U., Thomas, R., Raghavan, R., Syriac, G. (2013) Serological evidence of epizootic haemorrhagic disease and schmallenberg virus in dromedaries. *Journal of camel praction and research*, **20**, 135-137.
201. Wilson W.C., Ma H.C., Venter E.H., van Dijk A.A., Seal B.S. & Mecham J.O. 2000. Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. *Virus Res*, **67**, 141-151 (Erratum 173:201-202).

202. Wilson, W. C. (1994) Sequence analysis of the non-structural protein 2 from epizootic hemorrhagic disease viruses. *Virus Research*, **34** (1), 63-68.
203. Wilson, W. C. (1994a) Development of a nested-PCR test based on sequence analysis of epizootic hemorrhagic disease viruses' non-structural protein 1 (NS1). *Virus Research*, **31**(3), 357- 365.
204. Wilson, W. C., Hindson, B. J., O'Hearn, E. S., Hall, S. J., Tellegren-Roth, C., Torres, C., Mecham, J. O and Lenhoff, R. J. (2009a) A Multiplex Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Bluetongue virus and Epizootic Hemorrhagic Disease serogroups. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **21**, 760-770.
205. Wilson, W. C., O'Hearn, E. S., Tellegren-Roth, C., Stallknecht, D. E., Mead, D. G. and Mecham, J. O. (2009) Detection of all eight serotypes of Epizootic hemorrhagic disease virus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **21** (2), 220- 225.
206. Wilson WC, Ruder MG, Klement E, Jaspersen DC, Yadin H, Stallknecht DE, Mead DG, Howerth E. (2015) Genetic characterization of epizootic hemorrhagic disease virus strains from cattle in Israel. *Journal of General Virology*, **96**( 6),1400-10. doi: 10.1099/vir.0.000089.
207. Wilson, W. C., P. Daniels, E. N. Ostlund, D. E. Johnson, R. D. Oberst, T. B. Hairgrove, J. Mediger, and M. T. McIntosh, (2015) Diagnostic tools for bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses applicable to North American veterinary diagnosticians. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **15**, 364–373.
208. Wirblich, C., Bhattacharya, B., Roy, P. (2006) Nonstructural protein 3 of bluetongue virus assists virus release by recruiting ESCRT-I protein Tsg101. *Journal of Virology*, **80** (1), 460-473.
209. Wright, I. M. 2013: Serological and Genetic Characterisation of Putative New Serotypes of Bluetongue Virus and Epizootic Haemorrhagic Disease Virus Isolated From an Alpaca. North-West University, South Africa.
210. Xu, G., Wilson, W., Mecham, J., Murphy, K., Zhou, E. M. & Tabachnick, W. (1997). VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *Journal of General Virology*, **78**, 1617–1623.
211. Yadin, H., Brenner, J., Bumbrov, V., Oved, Z., Stram, Y., Klement, E., Perl, S., Anthony S., Maan, S., Batten, C. and Mertens P. P. C. (2008) Epizootic hemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel, *Veterinary Record*, **162** (2), 53-56.
212. Yin, H., Zhang, H., Shi, L., Yang, S., Zhang, G., Wang, S., Zhang, J. (2010) Detection and quantitation of bluetongue virus serotypes by a TaqMan probe-based real-time RT-PCR and differentiation from epizootic hemorrhagic disease virus. *Journal of Virological Methods*, **108**, 237–241.
213. Zhang X, Boyce M, Bhattacharya B, Schein S, Roy P, Zhou ZH. (2010) Bluetonguevirus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proceeding of the National Academy of Sciences of U S A*, **107**(14), 6292–6297.

214. Zientara, S. (2003) La peste équine. In: Lefevre, P. C, Blancou, J., Chermette, R. principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes. *Paris : Tec et Doc Lavoisier*, 687-705.
215. Zientara, S., MacLachlan, N. J., Calistri, P., Sanchez-Vizcaino, J. M., Savini, G. (2010) Bluetongue vaccination in Europe. *Expert Rev Vaccines*, **9**, 989–991. <http://dx.doi.org/10.1586/erv.10.97>.
216. Zientara, S., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Belbis, G., Bréard, E. (2011) la maladie hémorragique épizootique des cervidés succèdera-t-elle à la fièvre catarrhale ovine ? *le point vétérinaire*, 110-114.

# Article

## MOLECULAR CHARACTERISATION OF EPIZOOTIC HAEMORRHAGIC DISEASE VIRUS ASSOCIATED WITH A TUNISIAN OUTBREAK AMONG CATTLE IN 2006

Sameh BEN DHAOU<sup>1,2,4</sup>, Corinne SAILLEAU<sup>1</sup>, Besma BABAY<sup>2</sup>, Cyril VIAROUGE<sup>1</sup>,  
Soufien SGHAIER<sup>2</sup>, Stephan ZIENTARA<sup>1</sup>, Salah HAMMAMI<sup>2,3</sup> and Emmanuel BRÉARD<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Anses, INRA, ENVA, UPEC, UMR 1161 Virology, 23 avenue du général du Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France; <sup>2</sup>IRVT, Tunis-La Rabta, Tunisia; <sup>3</sup>ENMV, Sidi Thabet, Tunis, Tunisia – under the tutelage of Manouba University, Tunisia; <sup>4</sup>Faculty of Sciences of Bizerte, Jarzouna Bizerte, Tunisia – under the tutelage of Carthage University, Tunisia

(Received 9 March 2015; accepted 28 October 2015)

In 2006, epizootic haemorrhagic disease (EHD) outbreaks were recorded in the Maghreb (Tunisia, Morocco and Algeria) among cattle, resulting in severe repercussions on herds (oedema of the head, necrotic lesions of the oral mucosa, hyperthermia of the teats, accompanied by anorexia and respiratory distress) and economic losses. The present study gives new information on the molecular characterisation of the EHD virus (EHDV) that had circulated in Tunisia. Genome segments 2, 3, 6, 7 and 10 of EHDV, corresponding to the VP2, VP3, VP5, VP7 and NS3/NS3A proteins, respectively, were amplified from the blood of one animal by RT-PCR and sequenced. Nucleotide sequence comparisons of these five segments with sequences available in the GenBank demonstrated that an EHDV serotype 6 (EHDV-6) had been present in Tunisia in 2006. The possible origin of this strain is discussed.

**Key words:** Epizootic haemorrhagic disease virus, serotype 6, RT-PCR, sequencing, phylogenetic tree

Epizootic haemorrhagic disease (EHD) is an infectious, non-contagious disease of ruminants. It is caused by EHDV, which belongs to the genus *Orbivirus* and the family *Reoviridae* (Mertens et al., 2005). The disease was initially identified and reported in white-tailed deer in New Jersey (USA) in 1955 (Shope et al., 1960).

The genus *Orbivirus* includes other viruses of veterinary interest such as bluetongue virus (BTV) or African horse sickness virus (AHSV) (Bréard et al., 2013). EHDV shares structural, antigenic and molecular similarities with BTV (MacLachlan and Osburn, 2004). Both viruses are transmitted to their host range (ruminants) by the bites of *Culicoides* midges. The clinical signs caused by EHDV

---

\*Corresponding author; E-mail: emmanuel.breard@anses.fr; Phone: 0033 (149) 772-707

are considered difficult to distinguish from those due to BTV (Savini et al., 2011). Since their discovery, these two viruses have been proven to produce similar clinical diseases in cattle in all respects. Co-infection by the two viruses (BTV and EHDV) has been demonstrated in different studies (Sailleau et al., 2012; Schroeder et al., 2013; Toye et al., 2013; Viarouge et al., 2014). The use of specific diagnostic tools is essential to differentiate between infections with these two viruses.

Twenty-seven BTV and seven EHDV serotypes have been identified so far (Anthony et al., 2009b; Zientara et al., 2014). EHDVs (serotypes 1, 2 and 6) are endemic in North America but only induce clinical signs in certain species of deer (MacLachlan and Osburn, 2004). Several strains of EHDV-2, 6 and 7 can also cause a severe disease in cattle (Ohashi et al., 2002; Bréard et al., 2004; Yadin et al., 2008; Sailleau et al., 2012). Since 2006, in countries close to Europe, EHDVs have been detected in cattle showing clinical signs (Temizel et al., 2009). More precisely, during 2006, outbreaks of EHDV-6 were reported in cattle from Turkey, Morocco, Algeria, and Jordan (European Food Safety Authority, 2007). The infected animals presented clinical signs similar to those described for EHD in Japan, with low case fatality. During the autumn of 2006, the identification of an EHDV-7 causing significant clinical signs in cattle was reported in Israel for the first time (Yadin et al., 2008). This virus is now generally recognised as a potential threat for the cattle breeding industry.

EHDV is an icosahedral virus composed of 10 segments of double-stranded RNA that encode seven structural (VP1-VP7) and four non-structural (NS1-NS3/NS3a) proteins (Mertens et al., 2005). The smallest genome segment (S) 10 (S10) encodes the NS3 viral protein that mediates the release of virus particles from infected cells and plays a role in virulence and vector competence. VP2 and VP5 (encoded by S2 and S6, respectively) are components of the EHDV outer capsid (Huismans et al., 1979; Mecham and Dean, 1988). VP2 is principally involved in virus attachment and penetration of the host cell during infection (Kahlon et al., 1983; Roy, 1989). VP2 is the most variable of the viral proteins (Huismans et al., 2004; Singh et al., 2004; Maan et al., 2007) and determines the serotype (Huismans et al., 1987; Mertens et al., 1989, 2005). The virus core is made up of VP1, VP3, VP4, VP6 and VP7, encoded by genome S1, 3, 4, 9 and 7, respectively (Huismans et al., 1979; Mecham and Dean, 1988). VP3 forms the innermost subcore capsid shell and controls the organisation of the capsid structure (Mertens and Diprose, 2004). VP7 is the main immunodominant viral protein in each of the *Orbivirus* species, and therefore represents an efficient target for group-specific serological diagnosis (Thevasagayam et al., 1996; Mecham and Jochim, 2000; Luo and Sabara, 2005).

In early September 2006, an emerging disease causing significant morbidity in cattle was observed in Tunisia. Serological analyses suggested that these animals were infected by EHDV (Hammami et al., 2007). Some blood samples were collected from cattle and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until 2012. The main objectives

of this study were to demonstrate that an EHDV was circulating in Tunisia in 2006, to determine its serotype and the nucleotide sequence of 5 RNA segments, and to compare them with EHDV sequences available in GenBank.

## Materials and methods

### *Blood samples*

In 2006, 49 EDTA blood samples were collected from cattle in farms found EHDV positive by ELISA (Hammami et al., 2007) and these whole blood samples were stored (without treatment or washing) at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The serological status of these animals was unknown.

### *Nucleic acid sample preparation, RT-PCR reactions and sequencing*

Total RNA was extracted from 100  $\mu\text{l}$  of the 49 bovine blood samples using the QIAcube robot (QIAGEN) and the QIAamp Viral Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Finally, the RNAs were eluted with 60  $\mu\text{l}$  of ultrapure water and used in a specific EHDV real-time RT-PCR (RT-qPCR).

### *EHD group-specific RT-qPCR*

The EHDV RT-qPCR was performed using a commercial RT-qPCR kit (VetMax EHDV, Life Technologies, France) according to the manufacturer's instructions. This kit allows detection of all EHDV serotypes (by amplifying the EHD S9 encoding VP6) and does not cross-react with bluetongue virus. Five  $\mu\text{l}$  of eluted RNA was denatured by heating ( $95^{\circ}\text{C}$ , 3 min) in the presence of 10% DMSO and added to 20  $\mu\text{l}$  of VetMax EHDV mix.

### *EHDV segments 2, 3, 6, 7 and 10 RT-PCRs*

Specific primer pairs (sequences described in Table 1), derived from the nucleotide sequence data of genome segments of EHDV available in GenBank, were used in conventional RT-PCR using the One-step RT-PCR Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Briefly, 2.5  $\mu\text{l}$  of denatured RNA were added to a mixture containing 15.2  $\mu\text{l}$  of RNase-free water, 5  $\mu\text{l}$  of 5X QIAGEN One-Step RT-PCR buffer, 1  $\mu\text{l}$  of dNTP mix (400  $\mu\text{M}$  of each dNTP), 0.6  $\mu\text{M}$  of each primer, and 1  $\mu\text{l}$  of QIAGEN One-Step RT-PCR Enzyme. The amplification was carried out according to the following cycling parameters:  $50^{\circ}\text{C}$  for 30 min,  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 min, followed by 40 cycles of 1 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $56^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . An aliquot of 6  $\mu\text{l}$  of the RT-PCR product was analysed by electrophoresis on a 2% agarose gel.

### Sequencing

Amplified RT-PCR products were sequenced directly, in both directions, using the primer pairs indicated in Table 1. The sequence obtained was then aligned and compared to the corresponding sequences using the Clustal Megalign software (Higgins et al., 1988). Sequences were assembled by SeqMan (DNASTAR programs, Lasergene) and compared (Blastn 2.2.23) to the sequences available in GenBank. Sequence alignments were performed using the MegAlign Clustal V method (DNASTAR software) and bootstrap analysis.

**Table 1**

Sequence of primers used for amplification and sequencing of segments 2, 3, 6, 7 and 10 of the Tunisian EHDV-6 strain

Segment	Sense	Names of primers	Sequence	Localisation
2	Sense	Tu EHD6 P1	GTAAATTGTTCCAGGATG	1–19
		Tu EHD6 P2	CATCAATGGCGAATGGC	1483–1499
		Tu EHD6 P3	CGAAGGTGCGGGAAGCG	2229–2245
	Antisense	Tu EHD6 M1	CAAGAATGTGATACGAGC	418–401
		Tu EHD6 M2	GGCTAACTGGCACAATC	2384–2368
		Tu EHD6 M3	CCAGGTAATCTCTGTAC	2957–2970
3	Sense	VP3 F 1	AATTTCCRGAGCGATGGC	5–22
		VP3 F 2	CGTGCTTACCDACAGGAG	895–912
		VP3 F 3	WGATATGCAGCAGATGGC	1846–1864
		VP3 F 4	TACCATTTCATATGGTCCG	1570–1588
	Antisense	VP3 R 1	TGRTCCATTCTTTTCRCCC	1112–1094
		VP3 R 2	TGYGAATGCGCTARATCCA	1984–1966
		VP3 R 3	GTAAGTGTATTYCCRGTC	2768–2750
		VP3R 4	CTAGCTTGGTGCCACC	2700–2684
		VP3 R 5	AAGGCAACCCTATCCACC	2031–2014
		6	Sense	EHDV 6 S6 F
EHDV 6 S6 F2	GGAGATAGCTGGCATGAG			682–699
Antisense	EHDV 6 S6 R		TTCGGTTGTATTTTCGGCG	870–851
	EHDVS6 R2		AAGTTGAAGATCCGAATACC	1640–1620
7	Sense	VP7 F1	TTTGGTGAAGATGGACACG	8–27
	Antisense	VP7 R1	AAGTTGAATTTGGGAAGACG	1160–1141
10	Sense	EHDV S10 F	GTAAAAAAGAGGTTGGCGTC	1–21
	Antisense	EHDV S10 R	AAGTGTGTCGGAGGATGGC	808–782

### Virus isolation

Isolation assays were performed in embryonated chicken eggs (ECEs) or KC cells (*C. sonorensis* larvae cells) as described previously (Bréard et al., 2013). Briefly, five ECEs were intravenously inoculated with 100 µl of EHDV

RT-qPCR positive blood samples and incubated for 7 days at 35 °C. The embryos were then homogenised in a sterile MEM medium, centrifuged at 2500 g for 3 min and then tested by EHDV RT-qPCR.

KC cells were also inoculated with 100 µl of EHDV RT-qPCR positive samples and incubated at 27 °C for 10 days. After incubation, KC cells and supernatants were collected for EHDV RT-qPCR analyses.

## Results

### *EHD RT-PCR and isolation*

After RNA extraction from the 49 blood samples, only 4 contained non-degraded RNA (data not shown). Two out of these 4 blood samples were found to be EHDV RT-qPCR positive (with Ct values of 28 and 34).

From one of the EHD RT-qPCR positive blood samples (from cattle located in the Tozeur area and having a Ct value of 28), amplification products of 5 genes encoding VP2, 5, 3, 7 and NS3 were obtained by conventional RT-PCR. The complete coding sequences of these 5 virus segments were submitted to GenBank. The assigned accession numbers are KC986822 (for S2), KC 986823 (S6), KC 986825 (S3), KC 986824 (S7), and KC 986826 (S10).

Unfortunately, isolation, by passage of the virus through KC cells or ECE, failed.

### *Sequencing*

The nucleotide sequences of these five coding segments were compared to sequences available in GenBank to determine genetic heterogeneity between the EHDV Tunisian strain and other EHDV strains.

*Segment 2 (VP2)*. The nucleotide (NT) sequence of the Tunisian EHDV S2 belongs to serotype 6 (Fig. 1, Table 2). More specifically, this sequence is close to the EHDV Moroccan or Algerian S2 (99.9 and 100% of NT homology, respectively). Sequence data showed that the Tunisian, South African, Reunion Island and Bahrain EHDV-6 strains are also close (between 96.7 and 97.2% of NT sequence homology). These degrees of homology decrease considerably with the EHDV-6 strains from Guadeloupe (the Caribbean), USA and Australia (67.9, 68.0 and 68.1%, respectively).

The S2 of the EHDV-8 (from Australia) is also included in this 'EHDV-6 cluster', showing 65.4% of NT identity with the S2 Tunisian EHDV-6 strain. The S2 of the five other serotypes shows only between 34.5 and 36.4% of NT homology with the Tunisian EHDV-6 S2 sequence.

*Segment 6 (VP5)*. Phylogenetic analysis of EHDV S6 sequences shows distinct clusters at nucleotide level (Fig. 2, Table 2). The Tunisian S6 coding se-

quence shares similar levels of identity with the South African or Bahrain EHDV-6 strains (97.3 and 96.1% NT homology). With other EHDV-6 serotypes from the USA (wild or reassortant strains) or from Australia, the NT homologies decrease to between 78.7 and 78.2%. A similar percentage of NT identity was obtained with the EHDV-8 from Australia (76.9%). Regarding the S6 from other EHDV serotypes, the percentage of NT identity decreases to levels ranging from 56.4 to 64.3%.

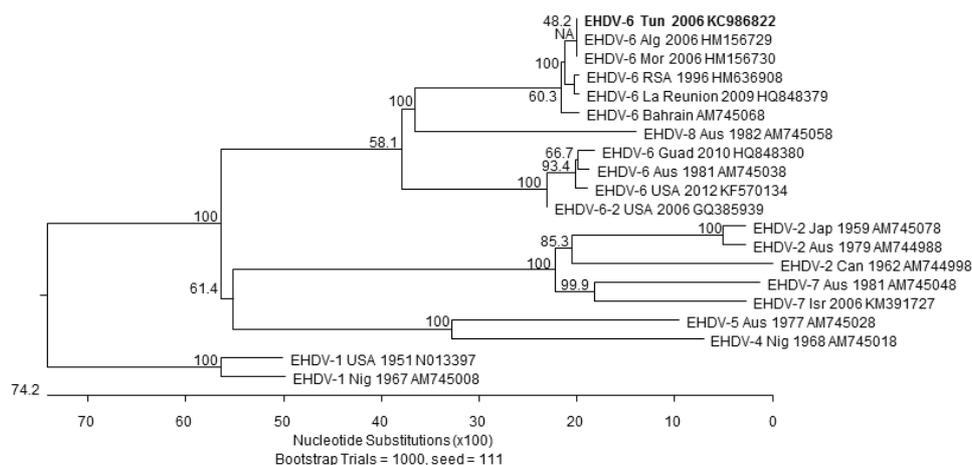


Fig. 1. Phylogenetic tree of nucleotide-coding sequences of segment 2 showing relationships between EHDV serotypes. The serotype, country of origin, years of isolation and the accession number are indicated in each sequence name. The Tunisian sequences are indicated in bold

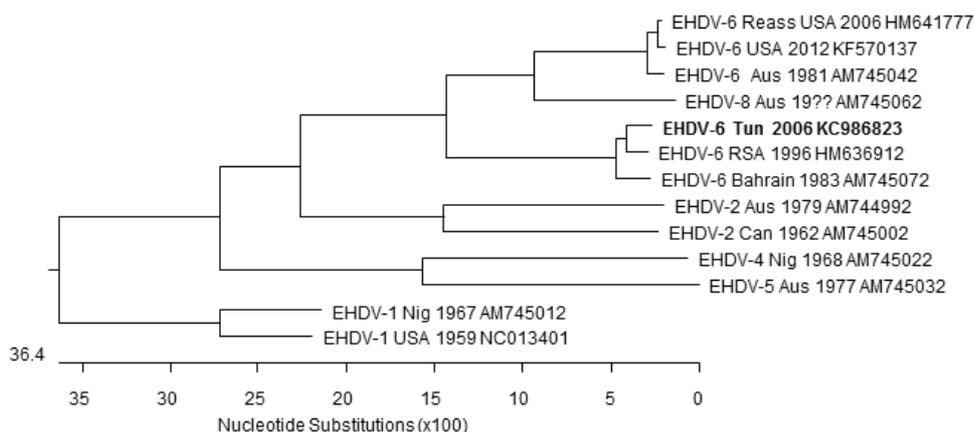


Fig. 2. Phylogenetic tree of nucleotide-coding sequences of segment 6 showing relationships between EHDV serotypes. The serotype, country of origin, years of isolation and the accession number are indicated in each sequence name. The Tunisian sequences are indicated in bold

**Table 2**  
List of EHDV strains used for phylogenetic analyses

Serotype	Country	Year of isolation	Name of strain
EHDV-1 USA	USA	1955	New Jersey
EHDV-1 USA	USA	1955	New Jersey
EHDV-1 USA	USA	1959	New Jersey
EHDV-1 Nig	Nigeria	1967	IbAr 22619
EHDV-2 USA	USA	2000	CC 126-00
EHDV-2 AUS	Australia	1979	439
EHDV-2 AUS	Australia	1991	Australian serotype2
EHDV-2 Can	Canada	1962	Alberta
EHDV-2 Can	Canada	1962	Alberta
EHDV-2 Jap	Japan	1959	Ibaraki Jap 1959/01
EHDV-2 Jap	Japan	1997	KSB-14/E/97
EHDV-4 Nig	Nigeria	1968	IbAr 33853
EHDV-5 Aus	Australia	1977	CSIRO 157
EHDV-5 Aus	Australia	1977	CSIRO 157
EHDV-6 Mor	Morocco	2006	A113/06
EHDV-6 Alg	Algeria	2006	2006/02
EHDV-6 Tun	Tunisia	2006	Tunisia 2577
EHDV-6 Bahrain	Bahrain	1983	Strain 318
EHDV-6 Reunion	Reunion Island	2003	EHDV-6/2003
EHDV-6 Reunion	Reunion Island	2009	EHDV-6/09.01
EHDV-6 Guad	Guadeloupe Island	2010	Guadeloupe 5124
EHDV-6 Aus	Australia	1981	CSIRO 753
EHDV-6 USA	USA	2012	C/Cervidae/OHIO/12-3437-8/2012
EHDV-6 RSA	South Africa	1996	M44/96
EHDV-6/ EHDV-2 Reassortant	USA	2006	CC 304-06
EHDV-7 Isr	Israel	2006	ISR 2006/13
EHDV-7 Isr	Israel	2006	Isr 2006/04
EHDV-7 Isr	Israel	2006	Isr 2006/02
EHDV-7Aus	Aus	1981	CSIRO 775
EHDV-8 Aus	Australia	1982	CPR 3961A

*Segment 7 (VP7)*. The Tunisian EHDV-6 S7 belongs to the same cluster as the S7 of EHDV-6 detected in Reunion Island, South Africa and Bahrain (NT identity ranged from 98.7 to 97.3%; see Fig. 3 and Table 2). S7 of the North

American EHDV-2 strains shows 90.7% and 91.4% NT identity with the Tunisian S7. The S7 from EHDV isolated in Japan, Australia, USA (serotype 1), Nigeria or Israel shows 79.5 to 75.8% NT identity with the Tunisian S7.

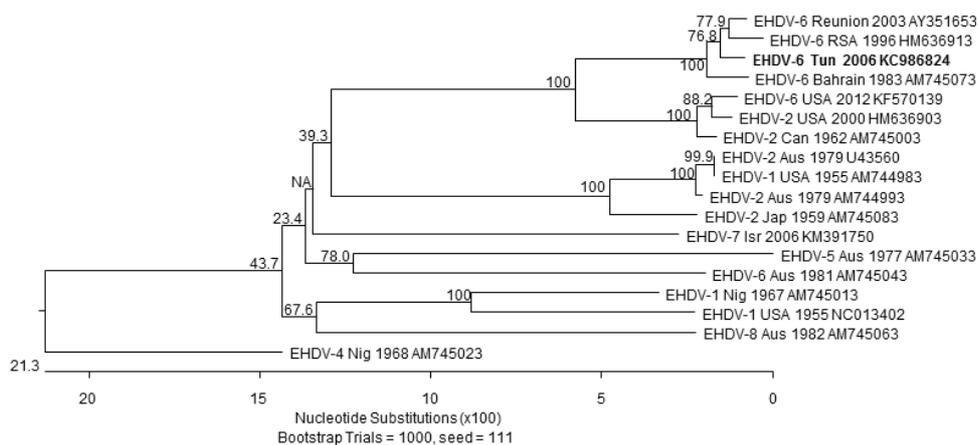


Fig. 3. Phylogenetic tree of nucleotide-coding sequences of segment 7 showing relationships between EHDV serotypes. The serotype, country of origin, years of isolation and the accession number are indicated in each sequence name. The Tunisian sequences are indicated in bold

*Segment 10 (NS3)*. As performed with S7, the Tunisian EHDV S10 sequence was compared with EHDV S10 available in GenBank (Fig. 4, Table 2). The Tunisian EHDV S10 clusters with S10 of EHDV-6 from Reunion Island, Bahrain and EHDV-7 from Israel (NT homology between 95.1 and 95.3%). These percentages of similarity decrease with EHDV-1, 2 and 6 detected in North America (NT homology ranged from 86.8 to 87.2%). With other strains isolated in Australia, Japan and Nigeria, the NT identity of their EHDV S10 ranged between 72.5 and 74.2% when compared with the Tunisian EHDV S10.

*Segment 3 (VP3)*. Segment 3 nucleotide sequence of Tunisian EHDV-6 was compared with 16 other similar sequences available in GenBank (Fig. 5, Table 2). The Tunisian EHDV-6 S3 topotypes strongly according to its geographical origin, independently of the EHDV serotype. The highest percentages of NT identity were observed with S3 of the Nigerian EHDV-4 and EHDV-1 strains (97.0 and 95.5%, respectively). With EHDV-7 and 6 detected in Israel, Bahrain and South Africa, the percentage of NT identity decreases (ranging from 92.9 to 92.0%). High NT identity (ranging from 91.1 to 90.9%) is also observed with EHDV strains (serotype 1 or 2) isolated in North America. The lowest percentages of homology were observed with EHDV strains isolated in Australia or Japan (between 78.2 and 78.9% of NT identity with the Tunisian S3 nucleotide sequence).

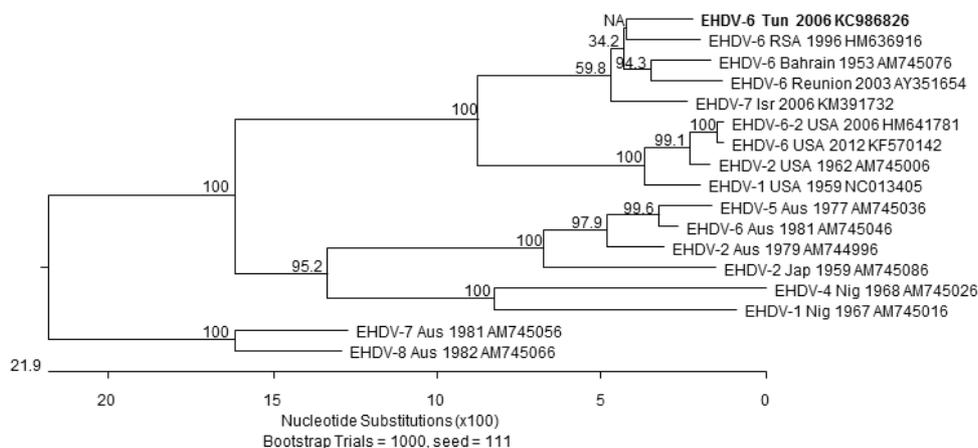


Fig. 4. Phylogenetic tree of nucleotide-coding sequences of segment 10 showing relationships between EHDV serotypes. The serotype, country of origin, years of isolation and the accession number are indicated in each sequence name. The Tunisian sequences are indicated in bold

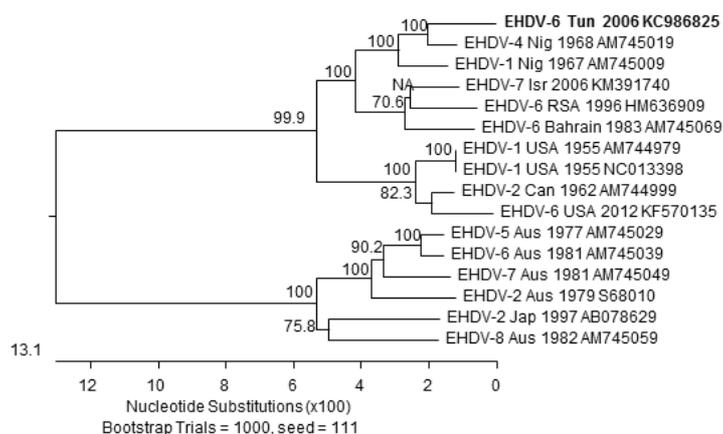


Fig. 5. Phylogenetic tree of nucleotide-coding sequences of segment 3 showing relationships between EHDV strains. The serotype, country of origin, years of isolation and the accession number are indicated in each sequence name. The Tunisian sequences are indicated in bold

## Discussion

In September 2006, a novel disease syndrome in cattle was observed in Tunisia (Hammami et al., 2007). A specific EHDV ELISA developed by Thevasagayam et al. (1996) was performed on sera from cattle showing clinical signs, and the results showed that 68% (24/35) of these sick animals were EHDV ELISA positive (Hammami et al., 2007). However, no EHDV genome detection was performed at that time.

Blood samples from 49 cattle on 24 affected farms, which had been stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , were analysed in 2012 by RT-qPCR. One of the two positive RT-qPCR blood samples showed levels of RNA sufficient to amplify five different RNA genome segments of EHDV. The serological status of the 49 animals was unknown and no ELISA could be performed on these frozen blood samples. Assays to isolate the virus by passage through KC cells or ECE were unsuccessful, possibly due to the storage of this blood for 8 years at  $-80^{\circ}\text{C}$ . However, the molecular results demonstrate the presence of EHDV-6 in Tunisia in 2006.

The nucleotide coding sequence of the EHDV Tunisian S2 demonstrates that it belongs to serotype 6. As observed by Anthony et al. (2009b), phylogenetic analyses of EHDV nucleotide S2 sequences shows four groups. The group containing the different EHDV-6 S2 also contains the S2 from serotype 8. In this group, two clusters are observed: one contains six EHDV-6 strains, each detected in Africa (South Africa and the Maghreb) or close to Africa, i.e. the Arabian Peninsula (Bahrain) and the Indian Ocean (Reunion Island), while the second cluster contains four other EHDV-6 strains isolated in Australia, USA and the Caribbean. These two clusters do not reflect East/West groupings corresponding to those described by Anthony et al. (2009b), but it seems that the S2 of the EHDV-6 isolated in Africa, the Arabian Peninsula and the Indian Ocean have a common origin while the Australian, North American and Caribbean strains have a different one. Similar data were obtained by S6 sequence comparisons: EHDV-6 S6 strains isolated in Africa or the Arabian Peninsula form a cluster separate from those detected in Australia or North America. Altogether, comparisons of all EHDV genome segments 2 and 6 (encoding the outer coat proteins of the virus particle) suggest only two different origins for these two segments, which determine the EHD serotype 6.

As already observed for BTV and EHDV (Anthony et al., 2009c), S3 sequences topotype very strongly in accordance with their eastern or western origins and there is also some clustering of segment 3 into finer geographic subgroups (Cheney et al., 1995; Anthony et al., 2009a). Interestingly, the S10 alignment also suggests a 'geographical' subgroup, with S10 of EHDV detected in Tunisia, Bahrain, Reunion Island and Israel (serotype 7) showing high NT homology. Alignment of S7 of EHDV strains also shows a cluster for the EHDV-6 isolated in Tunisia, Reunion Island, Bahrain, and South Africa.

Segment 2 sequence analyses indicate that the EHDV-6 strain circulating in Tunisia in 2006 likely had the same origin as the EHDV-6 that circulated in Morocco and Algeria during 2006. It would be of interest to compare the S3, 6, 7 and 10 nucleotide sequences of these EHDV-6 strains isolated in the Maghreb: these data were not available in GenBank. Altogether, the S2, 3, 6, 7 and S10 comparison results suggest that these 5 EHDV-6 Tunisian segments have a common origin with EHDV strains isolated in the same geographic area (Africa, Arabian Peninsula and Indian Ocean).

This study also suggests that it is important to build a database of EHDV genome sequences in order to characterise the viruses and to enable molecular epidemiology studies.

### Acknowledgements

We thank the veterinarians and technicians participating in this study, who collected blood samples in the field and performed the serological analyses. We also thank the PHC Utique programme (No. 24849SB) for their financial support. The authors declare no conflicts of interest with respect to the research, authorship and publication of this article.

### References

- Anthony, S. J., Maan, N., Maan, S., Sutton, G., Attoui, H. and Mertens, P. P. C. (2009a): Genetic and phylogenetic analysis of the core proteins VP1, VP3, VP4, VP6 and VP7 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV). *Vir. Res.* **145**, 187–199.
- Anthony, S. J., Maan, N., Maan, S., Sutton, G., Attoui, H. and Mertens, P. P. C. (2009b): Genetic and phylogenetic analysis of the outer capsid proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV). *Vir. Res.* **145**, 200–210.
- Anthony, S. J., Maan, N., Maan, S., Sutton, G., Attoui, H. and Mertens, P. P. C. (2009c): Genetic and phylogenetic analysis of the non-structural proteins NS1, NS2 and NS3 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV). *Vir. Res.* **145**, 211–219.
- Bréard, E., Sailleau, C., Hamblin, C., Graham, S. D., Gourreau, J. M. and Zientara, S. (2004): Outbreak of epizootic haemorrhagic disease on the island of Reunion. *Vet. Rec.* **155**, 422–423.
- Bréard, E., Belbis, G., Viarouge, C., Riou, M., Desprat, A., Moreau, J., Laloy, E., Martin, G., Sarradin, P., Vitour, D., Batten, C., Doceul, V., Sailleau, C. and Zientara, S. (2013): Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 experimentation on adult cattle. *Res. Vet. Sci.* **95**, 794–798.
- Cheney, I. W., Larson, M. D., Mecham, J. O. and Wilson, W. C. (1995): Geographical genetic variation in the gene encoding VP3 from the Alberta isolate of epizootic hemorrhagic disease virus. *Vir. Res.* **36**, 279–286.
- European Food Safety Authority (2007): Scientific opinion on epizootic hemorrhagic disease [cited 2007 Oct 21]. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1418.pdf>
- Hammami, S., Sghaier, S., Chérif, N., Berguaoui, R., Hammami, M., Ben Hassen, S. and El Haddouchi, S. (2007): Première incursion du virus de la maladie hémorragique épizootique (EHDV) en Tunisie, *Bulletin Vétérinaire de l'Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunis* **25**, 6–7.
- Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1988): CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* **73**, 237–244.
- Huismans, H., Bremer, C. W. and Barber, T. L. (1979): The nucleic acid and proteins of epizootic haemorrhagic disease virus. *Onderst. J. Vet. Res.* **46**, 95–104.
- Huismans, H., van der Walt, N. T., Cloete, M. and Erasmus, B. J. (1987): Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. *Viol.* **157**, 172–179.
- Huismans, H., van Staden, V., Fick, W. C., van Niekerk, M. and Meiring, T. L. (2004): A comparison of different orbivirus proteins that could affect virulence and pathogenesis. *Vet. Italia* **40**, 417–425.

- Kahlon, J., Sugiyama, K. and Roy, P. (1983): Molecular basis of bluetongue virus neutralization. *J. Virol.* **48**, 627–632.
- Luo, L. and Sabara, M. I. (2005): Production of a recombinant major inner capsid protein for serological detection of epizootic haemorrhagic disease virus. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **12**, 904–909.
- Maan, S., Maan, N. S., Samuel, A. R., Rao, S., Attoui, H. and Mertens, P. P. C. (2007): Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J. Gen. Virol.* **88**, 621–630.
- MacLachlan, N. J. and Osburn, B. I. (2004): Epizootic haemorrhagic disease of deer. In: Coetzer, J. A. W. and Tustin, R. C. (eds) *Infectious Diseases of Livestock, Volume 2*. Second edition. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa. pp. 1227–1230.
- Mecham, J. O. and Dean, V. C. (1988): Protein coding assignment for the genome of epizootic haemorrhagic disease virus. *J. Gen. Virol.* **69**, 1255–1262.
- Mecham, J. O. and Jochim, M. M. (2000): Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to epizootic hemorrhagic disease of deer virus. *J. Vet. Diag. Invest.* **12**, 142–145.
- Mertens, P. P. and Diprose, J. (2004): The bluetongue virus core: a nano-scale transcription machine. *Virus Res.* **101**, 29–43.
- Mertens, P. P. C., Maan, S., Samuel, A. R. and Attoui, H. (2005): Orbivirus: Reoviridae. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. (eds) *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press, London. pp. 466–483.
- Mertens, P. P. C., Pedley, S., Cowley, J., Burroughs, J. N., Corceyn, A. H., Jeggo, M. H., Jennings, D. M. and Gorman, B. M. (1989): Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology* **170**, 561–565.
- Ohashi, S., Yoshida, K., Yanase, T. and Tsuda, T. (2002): Analysis of intratypic variation evident in an Ibaraki virus strain and its epizootic hemorrhagic disease virus serogroup. *J. Clin. Microbiol.* **4**, 3684–3688.
- Roy, P. (1989): Bluetongue virus genetics and genome structure. *Virus Res.* **13**, 179–206.
- Sailleau, C., Zanella, G., Bréard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Vitour, D., Adam, M., Lasne, L., Martrenchar, A., Bakkali-Kassimi, L., Costes, L. and Zientara, S. (2012): Co-circulation of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses in cattle in Reunion Island. *Vet. Microbiol.* **23**, 191–197.
- Savini, G., Afonso, A., Mellor, P., Aradaib, I., Yadin, H., Sanaa, M., Wilson, W., Monaco, F. and Domingo, M. (2011): Epizootic haemorrhagic disease. *Res. Vet. Sci.* **91**, 1–17.
- Schroeder, M. E., Johnson, D. J., Ostlund, E. N., Meier, J., Bounpheng, M. A. and Clavijo, A. (2013): Development and performance evaluation of a streamlined method for nucleic acid purification, denaturation, and multiplex detection of Bluetongue virus and Epizootic haemorrhagic disease virus. *Vet. Sci.* **38**, 133.
- Shope, R. E., MacNamara, L. G. and Mangold, R. (1960): A virus-induced epizootic hemorrhagic disease of the Virginia white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Exp. Med.* **111**, 155–170.
- Singh, K. P., Maan, S., Samuel, A. R., Rao, S., Meyer, A. J. and Mertens, P. P. (2004): Phylogenetic analysis of bluetongue virus genome segment 6 (encoding VP5) from different serotypes. *Vet. Italia* **40**, 479–483.
- Temizel, E. M., Yesilbag, K., Batten, C., Senturk, S., Maan, N. S., Mertens, P. P. C. and Batmaz, H. (2009): Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerg. Inf. Dis.* **15**, 317–319.
- Thevasagayam, J. A., Woolhouse, T. R., Mertens, P. P. C., Burroughs, J. N. and Anderson, J. (1996): Monoclonal antibody based competitive ELISA for the detection of antibodies against epizootic haemorrhagic disease of deer virus. *J. Virol. Meth.* **57**, 117–126.
- Toye, P. G., Batten, C. A. and Kiara, H. (2013): Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease virus in local breeds of cattle in Kenya. *Res. Vet. Sci.* **94**, 769–773.

- Viarouge, C., Lancelot, R., Rives, G., Bréard, E., Miller, M., Baudrimont, X., Doceula, V., Damien Vitour, D., Zientara, S. and Sailleau, C. (2014): Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012. *Vet. Microbiol.* **174**, 78–85.
- Yadin, H., Brenner, J., Bumbrov, V., Oved, Z., Stram, Y., Klement, E., Perl, S., Anthony, S., Maan, S., Batten, C. and Mertens, P. P. C. (2008): Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel. *Vet. Rec.* **162**, 53–56.
- Zientara, S., Sailleau, C., Viarouge, C., Höper, D., Beer, M., Jenckel, M., Hoffmann, B., Romey, A., Bakkali-Kassimi, L., Fablet, A., Vitour, D. and Bréard, E. (2014): Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg. Inf. Dis.* **20**, 2123–2125.

## Abstract

The epizootic hemorrhagic disease (EHD) is an arthropod-borne virus that is on the OIE's list (World Animal Health Organisation, formerly Office international des épizooties), this disease is mainly transmitted to wild (mainly deer) as well as domestic (primarily cattle) ruminants, by the bites of minute size midges, the *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) also known as biting midges. In the beginning of the 21st century, EHD was emerged in Maghreb (North Africa) and in the Middle East (Turkey, Israel, Jordan), causing severe losses for the farmers and ranchers.

The unexpected emergency of EHDV in Tunisia in 2006, simultaneously with the observation of EHDV-6 cases in Morocco and Algeria, has aroused great concern in the Tunisian agricultural sector, which had already to face the occurrence of other animal diseases *orbivirus*: African horse sickness in 1966 and bluetongue in 1999 giving examples of the possibility that deemed exotic disease could emerge and become endemic (case bluetongue).

This project was carried out to raise the knowledge on the EHDV virus causing the infection in Tunisia in 2006, which led to the appearance of clinical signs similar to those of BTV.

First, we prepared a sampling of various samples of cattle, *Culicoides* type *imicola* collected in 2006 and stored at the serum bank of IRVT. So, we searched therefore the genome of the EHDV by RT-PCR in order to characterize and isolate the virus. Results showed that EHDV-6 was actually the serotype circulating in Tunisia in 2006. This part of the job was published in *Acta Veterinaria Hungarica*.

The second working paper concerned the potential presence of the EHDV-6 in Tunisia before and after the epidemic of 2006 in two animal species: cattle and camels. For this we looked for antibodies or viral genome from field samples collected from 2000 to 2014 cattle and camels. Following this study, we detected a possible circulation of EHDV-6 at a very low level of intensity among the cattle. The found results were discussed and made the subject of a publication to be in the newspaper *Veterinaria italiana*.

Regarding the study on the dromedary species sensitive to BTV, we wanted to examine its potential role as a reservoir species for EHD virus. All serological and virological results of our study indicate that this species does not seem to play a role in the epidemiology of EHD.

Finally, alongside these researches on EHD virus, we have investigated the presence of Bluetongue Virus in Tunisian samples from camels and cattle. The results were discussed.

All these studies contribute to a better knowledge of EHDV-6 present in Tunisia and allows taking into account some species that are potentially reservoir. Some presented researches could be pursued to assess the role of the camel as a reservoir for *Orbivirus* and better identify species of the faunal inventory of *Culicoides* involved in transmission of *orbivirus*.

## Keywords

*Orbivirus* - virus EHD - *arbovirus* - vector disease - Bluetongue - vector - *Culicoides* - ruminants - cattle - dromedary - Maghreb.

## Résumé

La maladie épizootique hémorragique (EHD) est une arbovirose inscrite sur la liste de l'OIE (organisation mondiale de la santé), qui affecte aussi bien les ruminants sauvages (essentiellement les cervidés) que les ruminants domestiques (les bovins) par la morsure de petits moucheron hémato-phages, les *Culicoïdes* (*Diptera: Ceratopogonidae*). Au début du 21<sup>ème</sup> siècle, cette maladie a émergé au Maghreb et au Moyen Orient (Turquie, Israël et Jordanie), générant de lourdes pertes économiques pour les éleveurs.

L'émergence inattendue de l'EHDV en Tunisie en 2006, simultanément avec l'observation de foyers d'EHDV-6 au Maroc et en Algérie, a suscité une vive inquiétude dans le monde agricole tunisien, qui avait déjà eu à faire face à la survenue d'épizooties d'autres orbivirus : la peste équine africaine en 1960 et de la fièvre catarrhale ovine en 1999 donnant l'exemple qu'une maladie, réputée exotique, puisse émerger et devenir endémique (cas pour la fièvre catarrhale ovine).

Ce projet a donc été réalisé pour améliorer les connaissances sur le virus de l'EHDV responsable de l'infection en Tunisie, en 2006, qui entraînait l'apparition de signes cliniques semblables à ceux du BTV.

Dans un premier temps, nous avons disposé d'un échantillonnage de différents prélèvements de bovins, *Culicoïdes* de type *imicola* collectés en 2006 et conservés à la sérothèque de l'IRVT. Nous y avons donc recherché le génome de l'EHDV par RT-PCR afin de le caractériser et d'isoler le virus. Les résultats ont démontré que l'EHDV-6 était bien le sérotype qui circulait en Tunisie en 2006. Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication dans *Acta Veterinaria Hungarica*.

Le deuxième travail exposé s'est intéressé à la recherche d'une présence éventuelle de l'EHDV-6 en Tunisie avant et après l'épidémie de 2006 dans deux espèces animales : les bovins et les dromadaires. Pour cela, nous avons recherché les anticorps ou le génome viral à partir de prélèvements de terrain réalisés de 2000 à 2014 sur des bovins et des dromadaires. A l'issue de cette étude, nous avons détecté une possible circulation à très bas bruit de l'EHDV-6 chez les bovins. Les résultats obtenus sont discutés et ont fait l'objet d'une publication en cours de publication dans le journal *Veterinaria Italiana*.

Concernant l'étude réalisée chez le dromadaire, espèce sensible au BTV, nous voulions évaluer son rôle de réservoir potentiel pour le virus de l'EHD. L'ensemble des résultats sérologiques et virologiques de notre étude nous indique que cette espèce ne semble pas jouer un rôle dans l'épidémiologie de l'EHD.

Enfin, parallèlement à ces recherches sur le virus de l'EHD, nous avons mené une enquête sur la présence du virus de la Bluetongue à partir des échantillons de dromadaires et de bovins tunisiens. Les résultats ont été discutés. L'ensemble de ces études contribue à une meilleure connaissance de l'EHDV-6 présent en Tunisie, et permet de rendre compte des espèces potentiellement réservoirs. Certains travaux présentés pourraient être poursuivis pour évaluer le rôle du dromadaire comme réservoir d'*Orbivirus* et mieux déterminer les espèces de l'inventaire faunique des *Culicoïdes* impliquées dans la transmission des *Orbivirus*.

## Mots clés

*Orbivirus*- virus de la maladie épizootique hémorragique - arbovirose - maladie vectorielle - fièvre catarrhale ovine – vecteur – *Culicoïdes* – ruminant – bovin – dromadaire – Maghreb.