

Contribution à la biologie du virus de Schmallenberg chez les ruminants

Contribution to the Schmallenberg virus biology in
ruminants



Calixte BAYROU

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Vétérinaires

Année académique 2019-2020



UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DE MORPHOLOGIE ET PATHOLOGIE
SERVICE PATHOLOGIE ET AUTOPSIES

**Contribution à la biologie du virus de Schmallenberg
chez les ruminants**

Contribution to the Schmallenberg virus biology in ruminants

Calixte BAYROU

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Sciences Vétérinaires**

ANNEE ACADEMIQUE 2019-2020

Remerciements

Car les fruits récoltés en cheminant vers cette thèse auront si largement dépassé le champ de la science qu'il y a bien peu de chances que ces remerciements soient à la hauteur de ma dette. Ils seront probablement anarchiques, incomplets et peu compréhensibles, mais c'est avant tout de votre faute. Il ne fallait pas être si nombreux !

Si je veux commencer par le début, rien de tout cela ne serait arrivé si, courant de l'été 2009, je n'avais eu l'idée - que dis-je l'idée, le coup de génie - de passer saluer mon ami Martin qui *thésait* alors en pathologie. Mon cher ami, quand je pense aux bénéfices énormes de cette simple visite je me demande pourquoi je ne fais pas le siège de ta maison, histoire d'assurer tranquillement l'abondance pour le reste de ma vie... Merci pour ça, et pour le reste.

Passé l'acte fondateur, il fallut ensuite aboutir à mille choses et une thèse. Mais le service de Pathologie-et-Autopsies et tous ses habitants avaient cette folie entraînante. Je leur dédie à tous cette thèse. Ils en sont tous les co-auteurs.

A Daniel, mon promoteur, que je remercie pour sa direction libérale dans laquelle il ménage une place pour les détours, les courbes, et les richesses inattendues qui peuvent surgir à l'écart d'une ligne droite. Elle permet aux assistants de s'investir pleinement dans cet art circassien qu'est la mission universitaire. Car il en va du personnel universitaire comme des jongleurs : celui qui ne voudrait pas laisser à terre l'une de ses missions (enseignement, recherche, service à la communauté) se voit contraint d'en lancer en permanence une ou deux en l'air, le temps de s'occuper de la troisième ; mais pas trop longtemps, de peur que les autres ne se fracassent sur le sol. Cette direction libérale n'était cependant pas sans but. Voyez plutôt. Daniel Desmecht est un de ces hommes de caractère qui ne permettent pas qu'on leur indique où ils devraient aller et qui, pour la direction qu'ils prennent, demandent rarement la permission. Les fréquenter donne donc lieu à des échanges, plaisants le plus souvent, parfois rudes mais toujours enrichissants. D'autant que tout ce qui est de la mécanique biologique l'intéresse et qu'il vous en transmet l'essence avec une verve organisée et choisie. Le choix des mots m'aura marqué. Et si j'ai essayé de puiser quelque chose dans cette personnalité peu commune, c'est bien cette capacité à saisir l'essentiel et l'original dans un phénomène pour faire ensuite, d'un morceau de science, une histoire captivante.

A Nathalie, son bras droit dans cette aventure, que je remercie pour son implication plus qu'active. Sherlock Holmes de l'orthographe, traquant d'instinct la faute, elle est aussi capable de réconcilier la trajectoire courbe avec l'administratif. Ses qualités auront fait d'elle une alliée redoutable dans l'accomplissement de ce travail.

A Mutien, ce collègue étonnant qu'on croit d'abord fait, comme nous, à deux tiers d'eau, mais dont on s'aperçoit rapidement qu'il est principalement composé de cette molécule si particulière qu'on appelle l'efficacité. Je le remercie pour sa collaboration scientifique fructueuse.

A Anne-Sophie, qui a déployé sa science pour traquer avec moi les molécules d'ARN quand elles se faisaient rares. Je savais qu'il existait un « sens clinique » qui fait la noblesse du praticien, j'ai découvert qu'il existe un « sens biochimique » tout aussi fascinant quand on le voit à l'œuvre.

A Annabelle, qui a eu la lourde tâche d'inculquer au praticien que j'étais que la médecine vétérinaire, si elle est un art, est aussi une science.

A Annabelle encore, qui ne pouvait pas mieux choisir ses collègues de bureau : une Karine, dont il faudra que je dise encore un mot, et un Hussein. Je ne savais pas, avant de le connaître, que la Syrie aussi avait ses Cyrano. Si Hussein n'a pas le nez du fameux gascon, il en a les vertus.

A mes collègues namurois schmallenbergophiles, scientifiquement et humainement au top.

A mes collègues qui scrutent la faune sauvage de Wallonie avec qui j'ai eu la joie de collaborer avant qu'ils ne soient tout entier absorbés dans leur combat, pied à pied, avec... la Peste (puisque il faut l'appeler par son nom).

A Dominique, qui cache habilement, sous ses col-roulés anodins, ses immenses épaules. Sa technique d'autopsie dépasse largement l'usage vétérinaire : il n'y a pas, à ma connaissance, de sujets que nous n'ayons disséqués, méthodiquement et joyeusement. Je suis assez d'accord avec Georges Brassens quand il dit que le temps ne fait rien à l'affaire... exception faite, cependant, de celui que vous pouvez passer avec elle. Car elle est un petit peu philosophe, vous l'aurez compris. Elle a créé son propre courant dans cette discipline : *l'improverbiologie*, la sagesse tirée des expressions populaires les plus improbables.

A Sandra, auprès de qui le Temps, ce ricanant dictateur, semble perdre de sa superbe, usé par tant d'énergie et de joyeuse passion. Elle m'a appris à regarder les organes alors que je ne faisais que les voir.

A Adrienne, pour son soutien joyeux et chocolaté. Elle qui n'est jamais aussi heureuse que plongée dans son foisonnement hennissant, aboyant, bêlant, miaulant, criant, chouinant... Un petit peu de repos dans la calme fraîcheur d'une salle de dissection c'est mérité. D'ailleurs, elle en prendra bien une deuxième, pour la route...

A Mélanie et Samuel, qui m'ont avantageusement remplacé en salle d'autopsie quand ce travail de thèse est devenu plus impérieux. C'est avec grand plaisir que je les ai vu adopter, et faire leur, cet outil de torture étudiante que j'affectionne et que l'on appelle *Photopsie*.

A Etienne puisque je parle de *Photopsie*, le plus ingénieur des vétérinaires, à notre plaisir complémentaire de la photographie.

A Carine, Nathalie (je pense à toute sa famille) *et Anne*, qui ont relu et retranscrit patiemment des centaines de mes rapports d'autopsie. A ce compte-là c'est presque une thèse mais en pièces détachées.

A Thierry, qui n'est jamais rassasié de rassembler les êtres humains. Avec lui, si tu ne viens pas à la mer du Nord, c'est la mer du Nord qui ira à toi : sous la forme d'anecdotes, de collections, de photos et de films, de salopettes jaunes et d'effluves marins (rappelant parfois l'époque révolue où les produits de la mer s'exportaient en char à boeufs). Je ne sais pas si l'expression « ami poule » pourrait s'utiliser mais comment décrire le souci qu'il a de ses amis ?

Aux archanges, les trois (saint) Michel : un mot, un geste et les archanges font le reste. *A Michaël*, l'orfèvre de l'histopathologie, la dentelle en couleur et l'art au carré. *A Michel*, le samouraï de la salle d'autopsie, qui découpe comme dans *Kill Bill* mais qui chante comme Tino Rossi. *A Michaël*, le Lucky Luke de la marche arrière, qui n'est pas loin de ramener les animaux avant même qu'on n'ait appelé pour les faire enlever.

A Mathieu, l'indispensable *PCRiste*, pour ses coups de pouce précieux, bien que sans appel, à l'intuition des pathologistes.

A tous ceux que je ne vais pas citer, de peur d'en oublier, mais que j'ai eu la joie de côtoyer.

A Aurore, François et Thomas parce que, tout de même...

A Etienne et la familiarité saisissante qu'il entretenait avec les molécules du vivant.

A toutes les personnalités riches et fortes avec qui je n'ai pas eu la chance de travailler, ou pas assez, mais qui ont fait de la Pathologie Liégeoise ce lieu unique qui m'a tant plu :

A Monsieur Coignoul qui était déjà un Aoûtien distingué à mon arrivée. A chacune de ses apparitions, les sourires larges et francs sur les visages de ceux qui l'avaient côtoyé me suggéraient qu'il y avait là une personnalité riche dont je n'avais pas pu profiter. Mais ne serait-ce que pour avoir placé sur ma route une Dominique et un Thierry, un immense merci.

A Monsieur Dewaele, que je n'ai croisé qu'une fois mais dont le nom résonne encore si souvent.

A tous les assistants, chercheurs et techniciens qui distillaient cette folie joyeuse qui forme les identités de groupe.

A tous mes collègues qui font le département clinique des animaux de production et qui m'ont accueilli et soutenu. Quelle aventure ! Passer du monde des morts à celui des vivants ; éduquer à nouveau mon regard pour voir à leur manière ; profiter de leur science, de leur passion, de leurs intuitions. Scruter de nouveaux personnages. Et partager tout, les réussites, les questions, les échecs et l'incroyable expédition humaine qui consiste à porter un projet ensemble. Merci à tous, à tous les étages.

A Saint-Séverin et tout ce que ça porte d'amitié et d'accueil.

Au Club du Lundi, que j'aimerais étendre au mardi, au mercredi et plus évidemment.

A ma famille enfin.

A mes parents, pour tout. Et encore, c'est peu dire. Si on avait su, ce jour d'août pour notre première visite, perdus dans le labyrinthe liégeois avec ses ponts, ses trémies et ses dérives à n'en plus finir... et ses panneaux indicateurs, absents. Si on avait su où cela finirait... on aurait ri à chaque impasse.

A ma mère, pour le soutien si précieux de Grand-Mère Babeth.

A mon père, pour sa vivante incitation à *enChurchiller* sa vie : « *We shall never surrender* ». Parce que les tâtonnements d'une thèse peuvent être longs. Et puis, tenir dans les petites choses, en espérant pouvoir tenir dans les grandes.

A ma fraternelle bande, au plaisir qu'on prend à démêler ce satané sac de noeuds qu'est la vie, histoire de comprendre un peu. On ne sait jamais trop si on comprend vraiment, mais c'est tellement bon de débobiner ensemble.

A ma jolie-famille, mon ancrage belge, solidement scellé, qui m'offre la stabilité de fondations en béton.

A mes enfants qui travaillent, sans le savoir, mais avec intensité, à faire de moi un papa. *A mon Abel* qui pétille en souriant, *à ma Talitha* qui rebondit, la bouche pleine de rire, *à ma Nathaëlle* qui regarde avidement et prépare, le sourire en coin, ce qu'elle sera.

A ma Karine que revoilà, pour cette discussion qui a commencé presqu'en même temps que cette thèse et qui j'espère ne finira jamais. *A ma Karine*, sans qui je ne serais jamais devenu ce que j'étais. *A ma Karine*, parce que, quand même, tout ça est fou et mystérieux.

A tous, pour cet improbable chemin de thèse, et tout ce qui en est sorti, merci !

Abréviations

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique	DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
AHS	<i>Arthrogryposis-hydranencephaly syndrome</i>	DMEM	<i>Dulbecco's minimal eagle medium</i>
AKAV	<i>Akabane virus</i>	DNA	<i>Deoxyribose nucleic acid</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché	dpi	<i>Day(s) post infection</i>
ARES	Académie de recherche et d'enseignement supérieur	EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ARN	Acide ribonucléique	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>	FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
BBB	Blanc-Bleu-Belge	FCS	<i>Fetal calf serum</i>
BHK	<i>Baby hamster kidney cells</i>	FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
BHM	Barrière hémato-méningée	FLI	<i>Friedrich-Loeffler-Institute</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>	FMV	Faculté de Médecine vétérinaire
BSE	<i>Bundle signaling element (Mx protein)</i>	GDS	Groupement de défense sanitaire
BST	<i>Bone marrow stromal antigen 2 or Tetherine</i>	GED	<i>GTPase effector domain (Mx protein)</i>
BTV	<i>Bluetongue virus</i>	GTP	Guanosine triphosphate
BVD	<i>Bovine viral diarrhea</i>	HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
BVDV	<i>Bovine viral diarrhea virus</i>	HIV	<i>Human immunodeficiency viruses</i>
CCHFV	<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>	HTNV	<i>Hantaan virus</i>
CNS	<i>Central nervous system</i>	IC	Intervalle de confiance
cRNA	<i>Complementary ribonucleic acid</i>	IFNAR	<i>Interferon alpha/beta receptor</i>
CSF	<i>Classical swine fever</i>		
Ct	<i>Threshold cycle</i>		

Abréviations

IHC	Immunohistochimie	RNP	Ribonucléoprotéine
IV	Intraveineuse	RVFV	<i>Rift Valley Fever Virus</i>
IWEPS	Institut wallon de l'évaluation, de la prospective et de la statistique	SAS	<i>Statistical analysis system</i>
KC	Cellules de culicoïdes (<i>Culicoides variipennis sonorensis</i>)	SBV	<i>Schmallenberg virus</i>
LACV	<i>La Crosse virus</i>	SC	Sous-cutané
MD	<i>Middle domain (Mx protein)</i>	SDS	Sodium dodecyl sulfate
MEM	<i>Minimal eagle medium</i>	SHAV	<i>Shamonda virus</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>	SIRS	<i>Susceptible-Infected-Recovered-Susceptible</i> (modèle épidémiologique)
NLS	<i>Nuclear localization signal (Mx protein)</i>	SNC	Système nerveux central
nt	Nucléotide	SNT	<i>Sero-neutralisation test</i>
NUTS	Nomenclature d'unités territoriales statistiques	SNWD	<i>Surveillance network of wildlife disease</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>	TTO	Transmission trans-ovarienne
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>	TULV	<i>Tula virus</i>
PBST	<i>Phosphate buffer saline + Tween 20</i>	VLP	<i>Virus like particles</i>
PE	Phycoérythrine	VNT	<i>Virus Neutralization test</i>
PI	Post-infection	vRNA	<i>Viral ribonucleic acid</i>
PUUV	<i>Puumala virus</i>	VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse
qRT-PCR	<i>Real time, reverse transcription, polymerase chain reaction</i>	WBD	<i>Whole body deformation score</i>
RdRp	<i>RNA dependent RNA-polymerase</i>		
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>		
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>		

Table des matières

ABREVIATIONS	5
TABLE DES MATIERES	9
RESUME – ABSTRACT	15
PREAMBULE	19
Au commencement	21
Réaction européenne	21
Origines et orientation du travail de thèse	21
INTRODUCTION	23
EPIDEMIOLOGIE	25
Découverte	25
Situation aux Pays-Bas	26
Espace européen	26
Vue générale	26
Caractéristiques de la dispersion européenne	28
A l'échelle des pays	31
Méthodologie	31
Europe continentale	32
Le cas particulier des îles Britanniques	38
Hôtes	41
Espèces domestiques	41
Faune Sauvage	44
Impact au niveau des troupeaux	47
Synthèse	47
LESIONS ET PATHOGENIE	49
Maladie de l'hôte	49
Fœtopathies	50
Passage transplacentaire	50
Lésions macroscopiques	52
Lésions microscopiques	54
Pathogénie	56
Diagnostic étiologique	58
CARACTERISTIQUES DU VIRUS ET CYCLE VIRAL	59
Virion	59
Gérome	59
Description	59
Réassortiment	60
Stabilité génétique	61
Protéines	62
ARN polymérase – L	62
Glycoprotéines – Gn/Gc	62
Protéine non-structurale – NSm	63
Nucléoprotéine – N	64
Protéine non-structurale – NSS	64
Cycle viral	66
Effet de la réPLICATION sur la cellule hôte	68
VECTEUR	69
Définition	69
Biologie du vecteur	70
Généralités	70

Facteurs de dispersion	71
Overwintering	72
IMMUNITE	74
Réponse innée	74
Réponse acquise	74
Réponse cellulaire	74
Réponse humorale	75
Protéine Mx	75
MxA humaine	75
Protéine Mx1 bovine	79
OBJECTIFS	81
SECTION EXPERIMENTALE	85
ÉTUDE 1	87
Préambule	89
Abstract	90
Introduction	91
Materials and Methods	92
Results	96
Detection and definition of SBV cases	96
Gross lesions at autopsy	96
Histopathology	102
Distribution of SBV-specific RNA	108
Discussion	110
Central nervous system	110
Skeletal muscles	112
Arthrogryposis	112
SBV biology	112
Laboratory diagnosis	113
Diagnosis on the field	114
Acknowledgements	115
ÉTUDE 2	117
Préambule	119
Abstract	120
Introduction	120
Materials and methods	121
Ethical statement	121
Serum samples	121
Antibodies detection	122
Statistical analysis	122
Results	122
Samples	122
Relative Se and Sp of the competitive ELISA	123
Seroprevalence and statistical analysis	124
Discussion	126
Studying wild ruminants	126
Main outcome: cyclical major circulations	126
Acquired immunity duration	126
Seroprevalence in juveniles	127
2012 Reemergence	127
2016 Reemergence	128
Low circulation years	128
Wild ruminants as SBV reservoirs	128

Roe deer sensitivity	129
ELISA Sensitivity	129
Acknowledgments	130
ÉTUDE 3	131
Préambule	133
Abstract	134
Introduction	134
Materials and Methods	136
Experimental design	136
Biochemical and biologic reagents	137
Cell expansion and transfection	138
Recombinant V5-Mx1 characterization by Western blotting	138
Recombinant V5-Mx1 characterization by immunocytology	138
<i>In vitro</i> assay of Mx1 anti-SBV activity	139
Data analysis	139
Results	140
Expression of recombinant V5-Mx1 proteins in HEK-293T cells	140
Effect of V5-Mx1 proteins on Schmallenberg virus NP synthesis	140
Comparative anti-SBV activity among different V5-Mx1 proteins	142
Discussion	144
Antiviral effect of a set of Mx1 proteins	144
A dose-response relationship is disclosed	145
About the underlying anti-SBV mechanism	146
Acknowledgements	147
DISCUSSION - PERSPECTIVES	149
PATHOGENIE	151
INSTALLATION DU VIRUS : ETAT ENDEMIQUE ?	153
PLAN DE LUTTE	154
SBV VS BTV-8 CHEZ LES RUMINANTS SAUVAGES	156
LA QUESTION DU « SENS »	157
Intérêt de la question	157
Hypothèses	157
Les protéines	159
Système digestif	160
Appareil reproducteur et transmission verticale	160
Système nerveux	161
PROTEINE MX1	162
BIBLIOGRAPHIE	165

Résumé – Abstract

Résumé

A l'automne 2011, le Friedrich Loeffler Institute (Allemagne) identifie le matériel génétique d'un virus jusqu'alors inconnu et l'associe à un syndrome de fièvre avec chute de lactation, combiné à de la diarrhée, observé dans les troupeaux de vaches laitières situés aux Pays-Bas et dans la partie nord-ouest de l'Allemagne. Baptisé virus de Schmallenberg, en référence à l'origine géographique des prélèvements qui ont servi à la découverte, ce nouveau virus appartient au genre Orthobunyavirus. C'est la première fois qu'un arbovirus de ce genre, circulant dans les populations de ruminants, est identifié en Europe. Cette émergence qui, par bien des aspects, fait écho à l'émergence du sérotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine en 2006, est l'une des preuves que la dynamique générale des maladies infectieuses en Europe de l'ouest est en pleine mutation. Il est donc particulièrement important d'étudier et de comprendre cette émergence.

Cette thèse s'inscrit dans cette optique et cherche à contribuer aux connaissances accumulées sur ce virus et sur la maladie qu'il induit. Elle regroupe trois études qui envisagent la problématique posée par le virus de Schmallenberg à trois niveaux.

*La première étude s'attache à décrire les lésions provoquées chez les fœtus bovins par le passage transplacentaire du virus. Elle confirme que les lésions se limitent aux systèmes neurologique et myo-arthro-squelettique. Les deux lésions caractéristiques de cette infection *in utero* sont une micromyélie associée à de l'arthrogrypose. L'étude suggère fortement que l'élément central de la pathogénie de ces lésions est la destruction des neurones moteurs de la moelle épinière.*

La seconde étude suit la séroprévalence du virus de Schmallenberg dans les populations de cervidés sauvages de Wallonie de 2012 à 2017. Cette étude corrobore l'hypothèse d'une installation dans un état d'hypo-endémie traversée de pulsations cycliques. Cet état a été observé pour les virus proches dans les autres parties du monde. Cet état se traduit par des saisons de circulation intense du virus après plusieurs années de circulation à très bas niveau. Par ailleurs, cette étude suggère que les cervidés sauvages participent à la circulation du virus mais n'en sont pas le réservoir principal.

*La troisième étude s'intéresse à l'impact d'un des principaux effecteurs de la réponse interféron, la protéine Mx1, sur le cycle du virus. En comparant, *in vitro*, l'impact de protéines Mx issues de différents mammifères (origines bovine, canine, équine, porcine), elle démontre un effet antiviral de toutes les protéines testées avec, cependant, un effet moins marqué de la protéine Mx1 d'origine canine. En outre, cette étude met en évidence un effet dose dépendant dans l'action de la protéine Mx1 qui n'avait, jusqu'ici, pas été observé.*

Ces trois études éclairent la question du virus de Schmallenberg sous différents angles qui, parce qu'ils sont complémentaires, permettent une vue assez large des problématiques que pose l'émergence de ce virus.

Summary

On the autumn 2011, the Friedrich Loeffler Institute (Germany) isolate the genetic material of a hitherto unknown virus which is associated with an unexplained syndrome of fever, drop of milk and diarrhea reported in the dairy farms from the Netherlands and Northwest Germany. The newcomer was named Schmallenberg virus based on the geographical origin of the first positive samples. It belongs to the Orthobunyavirus genus. For the first time in Western Europe, an arbovirus of this group circulates among ruminants. Such an emergence is, by many ways, similar to the type 8 Bluetongue virus emergence in 2006 and is one indication that the global infectious diseases dynamic is changing in Europe. Thus, understanding and documenting the Schmallenberg virus emergence, in that context, is of great importance.

The present thesis is part of this approach and aim to contribute to the knowledge and the understanding of the virus biology and the associated disease. It is comprised of three studies that investigate the problematic at three different levels.

The first study is a description of the lesions found in the bovine fetus after the transplacental passage of the virus. This study is a confirmation that the lesions are limited to the neurologic and myo-arthro-skeletal systems. The two characteristic lesions associated with the in-utero infection are the micromyelia and the arthrogryposis. The study strongly suggests that the key element of the pathogeny of these lesions is the virus-induced destruction of the spinal cord motoneurons.

The second study follows the seroprevalence of the virus in the wild deer populations in Wallonia from 2012 to 2017. The study substantiates the hypothesis of a hypo-endemic installation of the virus with cyclic pulsations. This particular endemic state has been described for close viruses. It is characterized by several years of low-level circulation followed by one year of higher circulation. Moreover, according to this study, deer are not the main reservoir of the virus. The populations of wild ruminants do participate to the circulation of the virus. Nevertheless, they have a minor impact on the global dynamic of the Schmallenberg virus circulation.

*The third study focuses on one of the main effectors of the interferon response, the Mx1 protein. The aim is to describe the effect of the latter on the viral cycle. By comparing, *in vitro*, Mx1 proteins from different mammals (bovine, canine, equine, porcine Mx proteins), the study shows an antiviral effect for the four tested proteins. However, the canine Mx1 is significantly less active. The second main result is the observation of a not previously described dose-dependent effect of the Mx antiviral effect.*

Those three studies, because they explore the Schmallenberg virus biology from different angles, provide a broad overview of the questions raised by the Schmallenberg virus emergence.

Préambule

Au commencement

Le 18 novembre 2011 (Loeffen *et al.*, 2012), le Friedrich-Loeffler-Institut (FLI - Allemagne) annonce la découverte d'un nouveau virus détecté dans des sérum de bovins prélevés en octobre 2011 dans une région du land de Rhénanie-du-Nord-Wesphalie située à proximité de la frontière néerlandaise. Ce virus est un *Orthobunyavirus* phylogénétiquement proche des virus du sérogroupe Simbu (taxonomie utilisée à l'époque de la découverte). Il est nommé virus de Schmallenberg (SBV) en référence à la localité à proximité de laquelle il a été découvert. La publication de la découverte s'accompagne des éléments de méthode permettant à tout laboratoire de biologie moléculaire de diagnostiquer ce nouveau virus par qRT-PCR.

Réaction européenne

Au moment de la découverte, le principal virus apparenté dont la pathogénie est bien décrite est le virus Akabane (AKAV). Les deux éléments majeurs de sa pathogénie sont : i) sa transmission par des insectes vecteurs, les culicoïdes ; ii) sa capacité à provoquer chez les foetus de ruminants des malformations du système nerveux central et du système ostéo-arthro-musculaire, le syndrome d'arthrogrypose-hydranencéphalie (AHS) (Zeller and Bouloy, 2000).

Dès lors, les systèmes de veille sanitaire des pays d'Europe du Nord se mettent en ordre de marche pour être en capacité de suivre l'épidémie, diagnostiquer les éventuels fœtus malformés et vérifier l'hypothèse d'une transmission par des arthropodes vecteurs et particulièrement les culicoïdes.

Origines et orientation du travail de thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre de cette veille sanitaire. Mon poste d'assistant au service de Pathologie de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège et mon activité quotidienne à la salle d'autopsie me plaçaient en situation idéale pour participer à la production de données sur la biologie de ce nouveau virus. Les études présentées dans ce manuscrit tentent donc de répondre à des questionnements basiques nés de la curiosité brute qui accompagne l'émergence d'un nouvel agent pathogène.

Ma première étude s'est, tout naturellement, attachée à décrire les lésions induites par le passage transplacentaire du virus dans l'espèce bovine et la pathogénie des malformations qui en découlaient.

Ma seconde étude a consisté à évaluer la nature endémique, ou non, de la post-émergence. La base de cette étude est une collaboration avec le Réseau de Surveillance sanitaire de la Faune sauvage animé par le Pr Linden (Faculté de Médecine vétérinaire, ULiège) : étude de séroprévalence à partir des sérum de cervidés sauvages collectés annuellement de 2012 à 2017.

Enfin, la troisième étude s'ancre dans le questionnement complexe de la spécificité d'hôte d'un virus. L'un des axes forts du laboratoire de Pathologie est la caractérisation d'un des effecteurs les plus puissants de la réponse interféron, la protéine Mx. J'ai donc eu l'occasion de tester l'hypothèse d'une spécificité d'hôte de SBV médiée par la protéine Mx.

L'introduction qui va suivre vise donc à donner une vue d'ensemble du sujet principal de cette thèse, le virus de Schmallenberg. Les plus grands développements seront destinés à éclairer particulièrement les trois questions de ce travail.

Les études qui ont suivi l'émergence de SBV sont, pour une large part, centrées sur l'étude de son vecteur, *Culicoides (Diptera ceratopogonidae)*. Environ 20% des publications consacrées à SBV dans Pubmed relèvent de cette matière. Il est évident que, dans cette thèse, la question du vecteur ne sera abordée que trop succinctement en regard de l'importance, capitale, pour un arbovirus, de la biologie de son insecte vecteur.

Introduction

Epidémiologie

Découverte

La découverte du virus de Schmallenberg a été relatée par Hoffmann et collègues en 2012.

Pour mettre ce virus en évidence, le FLI a travaillé à partir de trois sérum de vaches étudiées dans le cadre d'un syndrome d'allure épidémique, d'hyperthermie et de chute de lactation avec diarrhée rebelle à toute identification causale. Ces sérum ont été analysés en NGS et comparés à un sérum de vache asymptomatique. La première analyse a mis en évidence sept séquences absentes de l'échantillon contrôle et qui évoquaient la présence d'un *Orthobunyavirus*. Des re-séquençages ultérieurs ont permis d'obtenir 22 séquences supplémentaires.

Les fragments manquants du génome ont été comblés par séquençage du génome viral après isolement du virus en culture cellulaire. Parce que les séquences appartenaient à un *Orthobunyavirus*, l'isolement du virus s'est fait par un premier passage de 10 jours en cellules d'insectes KC (*Culicoides variipennis*). Le lysat des KC a été utilisé pour infecter un tapis de cellules BHK (*Baby Hamster Kidney cells*) où les effets cytopathogènes sont devenus évidents après cinq jours.

Le séquençage final a révélé trois segments d'ARN distincts, typiques d'un *Orthobunyavirus* : le segment S (830nt), le segment M (4415nt) et le segment L (6865nt). Une première analyse phylogénétique a montré que le segment S était très proche du segment S du virus Shamonda (SHAV) (97% d'homologie), le segment M du virus Aino (71%) et le segment L du virus Akabane (69%). Au vu du nombre assez faible de séquences d'*Orthobunyavirus* de ruminants disponibles dans la banque de données Genbank au moment de la découverte, l'équipe ne conclut pas à un virus réassorti mais confirme simplement l'appartenance de ce virus, nouvellement détecté en Europe, au sérogroupe Simbu.

Dans leur publication relatant la découverte du virus, Hoffman *et al.* associent à la description du virus une expérience qui plaide en faveur d'un respect des postulats de Koch : quatre veaux sont infectés par voie sous-cutanée (SC) ou intraveineuse (IV), avec un sérum positif ou par un lysat de cellules KC infectées. Les quatre veaux déclenchent une virémie de deux à cinq jours PI avec un Ct minimum de 21 à j4 PI. Deux des veaux présentent des signes cliniques (fièvre et diarrhée). Tous séroconvertissent après trois semaines.

Le virus est appelé virus de Schmallenberg en raison de l'origine géographique des sérum ayant servi à l'isolement de l'agent pathogène : une région à proximité de la ville de Schmallenberg.

Situation aux Pays-Bas

A la même époque, les services de santé animale néerlandais sont confrontés à un nombre grandissant de vétérinaires de terrain qui témoignent d'un syndrome d'hyperthermie, de diminution de la lactation et d'une diarrhée aqueuse profuse chez la vache laitière adulte. Malgré l'utilisation d'un panel de diagnostic très large, aucune étiologie connue n'a pu être associée à ce syndrome. Suite à la publication du FLI, les sérum prélevés dans les fermes néerlandaises atteintes sont testés (Muskens *et al.*, 2012) : 36% se révèlent positifs à la RT-PCR spécifique de SBV (quand 115 sérum issus de fermes non atteintes sont tous négatifs).

Espace européen

Vue générale

En cohérence avec le lieu de sa découverte, les pays les plus directement affectés par le virus de Schmallenberg ont été l'Allemagne, les Pays-Bas et la Belgique (Muskens *et al.*, 2012) (Hoffmann *et al.*, 2012) (Cay *et al.*, 2011). Les premiers cas de fœtus de ruminants malformés ont été détectés en décembre 2011 pour les agneaux et en janvier 2012 pour les veaux (Garigliany *et al.*, 2012).

La collecte des cas, au niveau européen, a été confiée à l'EFSA en coordination avec les autorités vétérinaires compétentes de chaque pays. La méthodologie et les difficultés associées à la collecte de données sanitaires dans les différents pays sont précisément décrites dans l'article rédigé par Afonso et collègues.

Brièvement, l'EFSA a travaillé sur base des Nomenclatures d'Unités Territoriales Statistiques (NUTS) de niveau 2 (1 NUTS = de 800 000 à 3 000 000 d'habitants). Chaque état membre était amené à rapporter de manière régulière (sans que cela soit obligatoire) les cas suspects ou avérés (suspect = signes cliniques compatibles pour fœtus ou adulte ; avéré = signes cliniques + détection d'ARN ou d'anticorps pour les adultes ; la détection de culicoïdes porteurs du génome viral n'est pas prise en compte).

Le fait le plus marquant concernant l'émergence de SBV est la rapidité avec laquelle il s'est disséminé à travers l'Europe (Fig. 1). En effet, moins d'un an après sa découverte, la quasi-totalité des pays membres de l'Union Européenne était atteinte. Plus de 5 000 fermes à travers l'Europe rapportaient la présence de fœtus malformés confirmés SBV positifs (Conraths *et al.*, 2013a). La distance moyenne entre deux régions affectées successivement est de 73-173 km, rarement au-delà de 200 km (données spatiales basées sur les NUTS). La mise en évidence de foyers particulièrement éloignés du foyer antérieur le plus proche (plus de 1 000 km en Finlande ou 868 km vers le sud de l'Espagne) suggère que, en plus de la dispersion des culicoïdes par les courants aériens, le transport de ruminants ou d'insectes infectés soit à l'origine d'une partie de la dissémination (Afonso *et al.*, 2014).

Il est intéressant de faire apparaître sur la carte réalisée par l'EFSA (Fig. 1), montrant avec force la dynamique spatio-temporelle de la dispersion du SBV, les détections les plus précoces réalisées par certains pays périphériques du foyer originel. Cela fait apparaître combien l'infection des culicoïdes précède les manifestations cliniques sur un territoire. Ce phénomène a déjà été décrit pour le virus Akabane (Kirkland, 2015). Sur cette carte, la sérologie la plus précoce publiée pour le foyer du sud de l'Espagne a été également ajouté : un cerf contrôlé séropositif en octobre 2011 (García-Bocanegra *et al.*, 2017). Si l'on compte un délai de deux à trois semaines entre infection et séroconversion, on peut considérer que SBV circulait en septembre 2011 dans la province de Cordoue, ce qui équivaut à une circulation quasi concomitante au foyer d'origine (distance Schmallenberg – Cordoue ~2 000km). Trois hypothèses peuvent expliquer ce cas particulier : soit un transport direct du virus depuis le foyer initial germano-néerlandais dans les premiers temps de l'émergence, soit, ce qui semble moins probable, une émergence sur le sol européen par deux voies différentes concomitantes, l'une au sud de l'Europe (Détriot de Gibraltar) et l'autre en Europe du Nord (Allemagne-Pays-Bas), soit, enfin, la découverte du virus a été réalisée très tardivement après l'introduction du virus sur le sol européen (cf. § présence du virus avant 2011). A ce jour, le lieu d'origine de la dissémination de SBV au cœur de l'Europe n'est pas connu. L'une des hypothèses, héritée des spéculations sur l'origine de l'épidémie européenne de BTV-8, serait le transport de fleurs en provenance des zones subsahariennes (Kupferschmidt, 2012). En effet, les régions subsahariennes sont connues pour héberger de nombreux arbovirus, et notamment des *Orthobunyavirus* très proches de SBV (Blomström *et al.*, 2014; Mathew *et al.*, 2015; Sibhat *et al.*, 2018). Or, l'importation de fleurs se fait, pour assurer la fraîcheur des produits, la nuit sous éclairage artificiel. Il est donc possible que l'importation de fleurs par avion s'accompagne de grandes quantités de diptères « piégés » par la lumière.

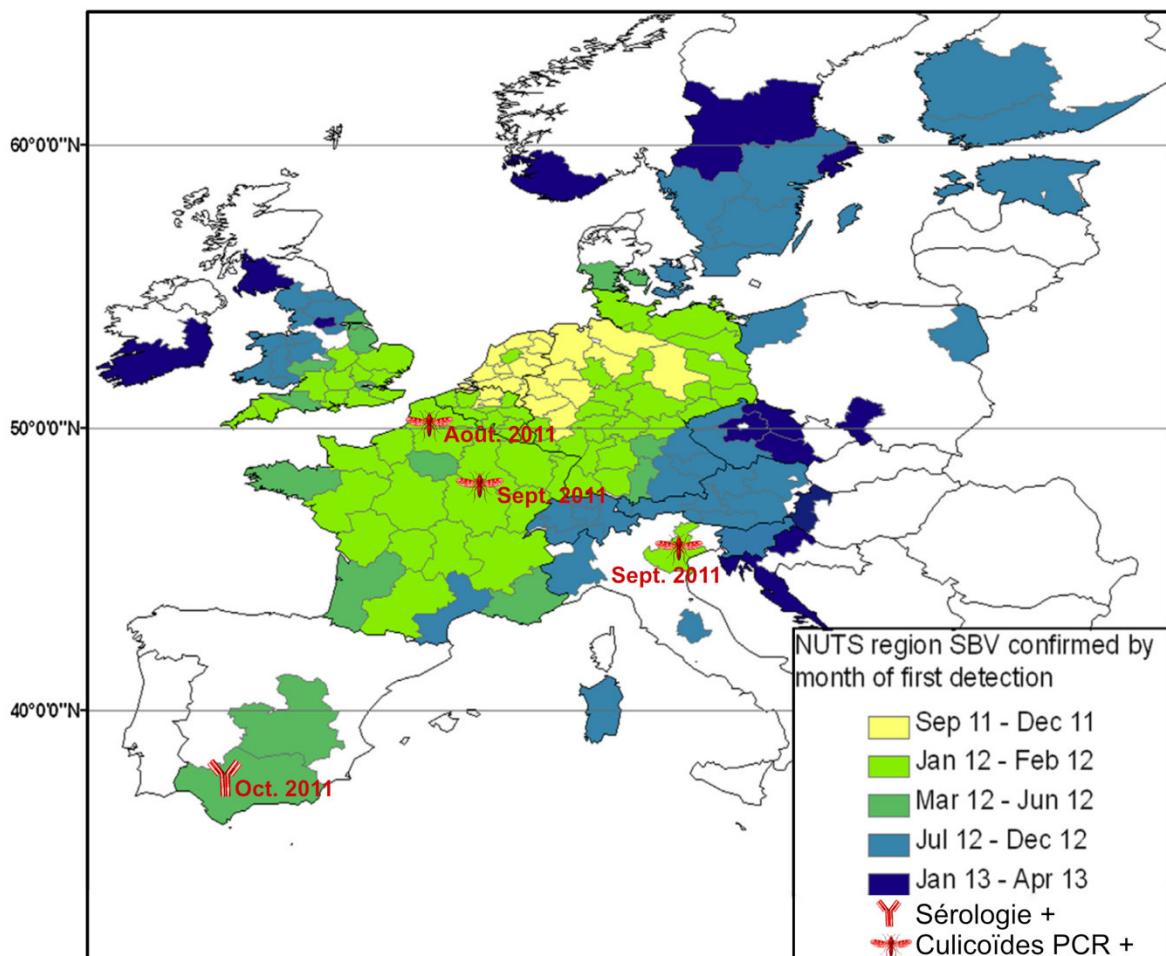


Figure 1: Carte montrant l'évolution spatio-temporelle des manifestations cliniques de l'infection à SBV (Afonso et al., 2014). Le « NUTS » est l'unité spatio-démographique utilisée. La carte a été complétée par l'ajout de détections précoces du virus dans des populations de culicoïdes : en France (Ségard et al., 2018) et Italie (Goffredo et al., 2013). La détection sérologique rapportée pour la région Cordoue en Espagne a été réalisée sur un cerf (*Cervus elaphus*) (García-Bocanegra et al., 2017).

Caractéristiques de la dispersion européenne

Les auteurs ayant travaillé sur l'apparition et la dissémination du virus BTV-8 au départ de la même région en 2006 ont très rapidement noté que la dispersion de SBV était bien plus dynamique que celle qui avait été observée pour le BTV (Elbers et al., 2012; Garigliany et al., 2012; Rossi et al., 2017). Cette comparaison a été modélisée de manière fine par Gubbins et al., en 2014 (Gubbins et al., 2014a, 2014b) et résumée dans une revue de l'EFSA (European Food Safety Authority, 2014). Les faits saillants de cette modélisation sont les suivants :

- le nombre de cas cumulés est 20 fois supérieur au BTV-8,
- la distance de dispersion du SBV est doublée.

Ces capacités accrues de transmission de l'*Orthobunyavirus* sont le résultat de plusieurs facteurs :

- une probabilité de transmission de l'hôte infecté vers le vecteur naïf plus élevée (SBV : 0,14 > BTV : 0,01),
- une période d'incubation plus courte (SBV 2j < BTV 5-7j),
- un effet de la température sur la période d'incubation extrinsèque favorable au SBV.

Ces effets cumulés surpassent largement les facteurs biologiques défavorables au SBV :

- une virémie beaucoup plus courte (SBV 3-4j < BTV 16-10j)¹,
- une probabilité de transmission du vecteur infecté à l'hôte naïf légèrement plus basse (SBV 0,76 < BTV 0,9).

Cette modélisation souligne donc l'importance du cycle viral vectoriel dans la transmission du SBV en Europe. Elle est l'expression mathématique du ressenti des entomologistes dès les premiers mois de cette émergence. Par exemple, le piégeage réalisé aux Pays-Bas en septembre et octobre 2011 dans le noyau primaire de l'émergence montre une prévalence de 0,56% soit 10 fois plus élevée que celle rapportée pour BTV-8 dans les espèces détectées comme vecteurs naturels (Elbers *et al.*, 2013).

L'efficacité du cycle vectoriel du SBV permet une dissémination extrêmement efficace dans les populations de ruminants avec des estimations du taux de reproduction de base intra-troupeau (R_0) dépassant, au maximum, 6 (Bovin : $\pm 6,2$) (Fig. 2). Ce R_0 est légèrement plus élevé chez le mouton ($\pm 7,6$) mais, dans tous les cas, nettement plus haut que le R_0 de BTV-8 (Gubbins *et al.*, 2014a). A titre de comparaison, le R_0 estimé de l'épidémie de « Grippe espagnole » de 1918 est de 3,75 (Chowell *et al.*, 2006).

¹ Ces estimations de virémies sont le résultat de modèles statistiques sur les données épidémiologiques collectées au cours des épidémies. Elles ont le mérite de fournir des ordres de grandeur et de permettre la comparaison entre virus mais n'ont pas, à mon sens, l'exactitude de données biologiques expérimentales (cf. section biologie du virus pour plus de détails).

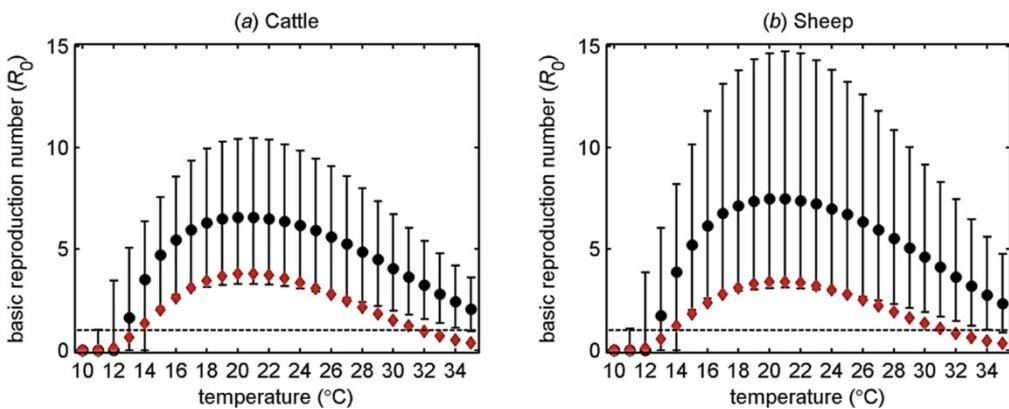


Figure 2: Estimations du taux de reproduction de base (R_0) de SBV en fonction de la température dans les espèces (a) bovine et (b) ovine (Gubbins et al., 2014a). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance au seuil de 95%. Les losanges rouges (♦) représentent le R_0 de BTV-8 en 2006 en fonction de la température extérieure (Gubbins Simon et al., 2008).

La conséquence directe d'un cycle vectoriel aussi favorable au virus est que la mesure classique d'immobilisation des cheptels qui est appliquée pour juguler les épidémies dans les espèces de production devient presque inutile. Gubbins et collègues estiment qu'avec SBV l'effet d'un blocage total des déplacements des ruminants ne réduirait que de 4% le nombre de cas au final.

Enfin, l'une des questions qui a accompagné l'émergence de SBV a été de savoir si le virus circulait à bas bruit avant l'année 2011, avant les premiers symptômes et sa découverte. Aucune des études ayant testé cette hypothèse n'a pu mettre en évidence de circulation antérieure à 2011 (Conraths et al., 2013b). Elles se basaient notamment sur l'analyse de sérums antérieurs à l'automne 2011. L'une d'elles s'est appuyée sur des collections de sérums de cervidés sauvages récoltés annuellement par le Réseau de Surveillance sanitaire de la Faune Sauvage (FMV, ULiège, Belgique). Les sérums récoltés pendant l'hiver 2010 étaient tous négatifs (Linden et al., 2012). De même, en travaillant à partir d'une collection de sérums prélevés dans le cadre d'une surveillance de maladies à tiques, dans une ferme située à ~9km de Schmallenberg à partir de mai 2011, l'équipe de diagnostic virologique du FLI n'a trouvé aucun sérum positif datant d'avant le mois d'octobre 2011 (Wernike et al., 2014). Enfin, le service de pathologie de Hanovre a testé par hybridation *in situ* 85 encéphales de ruminants avec encéphalite et 47 provenant de nouveau-nés malformés. Tous sont également revenus négatifs (Gerhauser et al., 2014). L'hypothèse la plus vraisemblable est donc que l'éclosion du SBV en Europe fasse suite à une importation du virus en 2011. Les modélisations de la transmission du virus après introduction dans un territoire indemne (Bessell et al., 2013; Gubbins et al., 2014b) montrent l'importance du moment d'introduction du virus en fonction de la saison des culicoïdes. Ainsi, l'introduction du virus après le 1^{er} septembre donne lieu à une épidémie de très faible amplitude (le nombre de cas cumulés diminuerait de plus de 90% et la distance de dispersion serait trois fois plus faible). Sur base de ces modèles, une introduction tardive dans la saison 2010 aurait pu entraîner une

dissémination très locale et de faible ampleur qui aurait pu préparer efficacement l'expansion de 2011 (une telle dissémination aurait probablement été indétectable pour les études *a posteriori* réalisées sur base d'échantillons initialement non destinés à cette fin). Les études publiées dans la littérature pour tester la présence du SBV avant 2011 ne semblent pas présenter la sensibilité nécessaire pour écarter ce scénario.

A l'échelle des pays

Méthodologie

Au niveau des pays, la surveillance de l'évolution de l'épidémie fut assez protéiforme : variation dans le design de l'étude, dans la méthodologie de détection, dans les espèces testées. Les deux moyens principaux de suivi de l'étude sont l'analyse de fœtus ou de veaux mort-nés malformés par les organes de gestion de la santé animale et les études sérologiques. Ces dernières sont les plus abondantes. Elles nécessitent d'être situées clairement dans le temps par rapport à la saison des culicoïdes (avril à octobre généralement), sans quoi le risque de sous-estimation peut être important (Valas *et al.*, 2015). En effet, avec le taux de reproduction de base très élevé de SBV, la différence entre des prises de sang effectuées en août et en octobre peut atteindre plusieurs dizaines de pourcents (Zanella *et al.*, 2013).

De plus, il est assez évident que la précision de ces études diminue avec l'étendue des pays. De fait, une analyse de quelques milliers d'échantillons suffit à mailler un territoire comme la Belgique (Méroc *et al.*, 2013) mais se révèle largement insuffisante pour un pays comme la France. Il est donc assez difficile d'avoir une image précise de l'épidémie de SBV en Allemagne ou en France. Dans ces pays plus vastes, les études sérologiques ont tendance à cibler certaines régions ou à favoriser le suivi de fermes sentinelles dans le temps.

De manière générale, les premières études sérologiques étaient basées sur des tests de neutralisation virale (VNT) mais rapidement les tests ELISA commerciaux ou développés en propre par les laboratoires ont remplacé les VNT pour des questions de coûts et de gain de temps. Pour les ruminants domestiques, ces différents tests ELISA ont montré des sensibilités et spécificités relatives (par rapport au VNT qui fait office de *gold standard*) très élevées qui justifient largement leur emploi (Bréard *et al.*, 2013; van der Heijden *et al.*, 2013; Näslund *et al.*, 2014). Cependant, une étude a récemment démontré que le test ELISA mis au point par IDEXX n'est pas apte à être utilisé quand la prévalence est très basse, comme dans le cas de pays indemnes (Pejaković *et al.*, 2018).

Certaines études, après en avoir démontré la faisabilité (Humphries and Burr, 2012), ont suivi l'épidémie en utilisant le lait de tank comme substrat pour leur test ELISA.

Enfin, un dernier paramètre majeur de variabilité des études est l'espèce étudiée. En effet, pour des raisons détaillées ci-dessous, la variabilité de la séroprévalence en fonction des espèces de ruminants est très importante.

Il est donc impossible, pour les raisons que l'on vient de citer, de retracer en parallèle l'épidémie dans chaque pays d'Europe. Cette revue se propose donc : (i) d'éclairer la problématique des différentes espèces servant d'assise aux études sérologiques, (ii) de détailler le cas de la Belgique qui est important, d'une part, parce que la Belgique est l'un des pays « noyau » de cette épidémie (Conraths *et al.*, 2013a) et, d'autre part, parce que la deuxième étude présentée dans ce manuscrit de thèse est un suivi au long cours de la prévalence du virus en Wallonie, (iii) de détailler le cas du Royaume-Uni et de l'Irlande à cause des éclairages qu'apporte l'originalité du déroulement de l'épidémie dans ces îles et (iv) de faire un état des lieux spécifique de la faune sauvage.

Europe continentale

Juste avant de décrire l'évolution européenne de l'épidémie avec un peu plus de détails, il est nécessaire de faire une précision sémantique. La plupart des auteurs décrivent les vagues de SBV dans leur pays en parlant de « émergence/ré-émergence », « saison 1/saison 2 », « épisode 1/épisode 2 », ... Or, une difficulté pour combiner ces données est qu'elles peuvent décrire tant la transmission vecteur/hôte que l'apparition de cas cliniques chez les nouveau-nés. Ces deux phénomènes rendent évidemment compte de la même épidémie sauf qu'ils appartiennent le plus souvent à deux années civiles différentes. Pour la description qui suit, il a été choisi de tout ramener à la transmission vecteur/hôte : ainsi la saison 1 fera référence à avril-octobre 2011 et la saison 2 à avril-octobre 2012, etc.

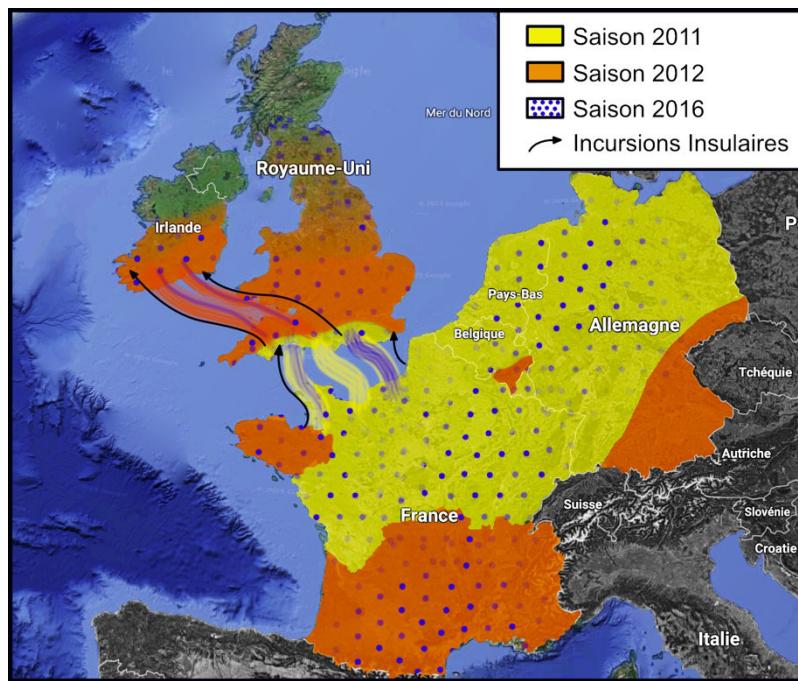


Figure 3: Schéma général des tendances principales de l'épidémie de SBV en Europe de l'Ouest. Ce schéma tente d'agrégier les données cartographiques disponibles dans la littérature et résumées ci-dessus. Quand des cartes sont disponibles (Conraths *et al.*, 2013a; Dominguez *et al.*, 2014; King *et al.*, 2015), elles sont reproduites. Quand elles ne sont pas disponibles ou pas assez détaillées (Barrett *et al.*, 2015; McGowan *et al.*, 2018; Mérac *et al.*, 2014), la reproduction des zones suit le plus fidélement possible les descriptions fournies.

De manière générale en Europe continentale de l'ouest, le virus s'est répandu sur deux saisons (Fig. 3). La première saison 2011 a eu pour limite la moitié nord de la France et vers l'est le virus a été principalement observé dans les 2/3 ouest de l'Allemagne. Cette limite n'est pas celle de la présence stricte du virus, elle est celle d'une présence suffisamment massive de SBV pour faire apparaître une vague de malformations congénitales qui sera largement atténuée l'année suivante. En effet, le schéma général que l'on peut tirer des différentes études est que, à l'issue de la saison 1, la séroprévalence est de l'ordre de 70-80% puis, de manière précoce à la saison classiquement décrite d'activité observée des culicoïdes (qui débute en avril) (Brugger *et al.*, 2016), une circulation à bas bruit amène le taux de séroprévalence à plus de 90% (Garigliany *et al.*, 2012; Zanella *et al.*, 2013). La majorité des foëtopathies sont observées en aval de la saison 1.

France

Ainsi, de manière évidente, en France (Dominguez *et al.*, 2014), les cas cliniques issus de l'infection des mères lors de la saison 2011 proviennent à 85% de la moitié nord alors que les cas cliniques issus de la saison 2012 proviennent à 80% de la moitié sud (Fig. 3). Cette cartographie démontre l'effet protecteur de l'immunité naturelle contre les atteintes du fœtus. Elle met également en évidence l'importance de la date d'arrivée du virus en regard de la saison d'activité des culicoïdes. En effet, les 15% de cas présents dans le sud du pays en saison 1 montrent que le virus était déjà

présent à cette époque mais que son arrivée tardive par rapport au nord n'a pas conduit à un nombre important de cas cumulés. Cette observation rejoint donc la modélisation de Bessel *et al.*, 2013.

Allemagne

En Allemagne, le même phénomène est décrit par Conraths *et al.*, 2013, avec la partie sud-est du pays plus fortement touchée en saison 2.

Pays-Bas

Au Pays-Bas, les études qui décrivent la séroprévalence à l'issue de la saison 1 montrent une atteinte de 72,5% au mois de janvier 2012 (Elbers *et al.*, 2012) dans les troupeaux laitiers. L'étude suivante (Veldhuis *et al.*, 2013), dont les prélèvements s'étalent jusqu'à la fin mars 2012, fait apparaître une réalité nettement différente pour les génisses laitières que pour les vaches non laitières. Chez les génisses laitières, la prévalence est de 63,4% alors que, chez les vaches non laitières, la prévalence culmine à 98,5%. A l'origine de cette différence, on retrouve un effet partiellement protecteur de l'élevage *indoor* (ce qui est particulièrement le cas pour les génisses laitières aux Pays-Bas), ce qui rejoint l'observation rapportée par Helmer *et al.*, 2013, dans son suivi des exploitations caprines. Avec un tel niveau d'immunité de troupeau, il n'est pas étonnant que l'étude réalisée au dernier trimestre de 2013 (Veldhuis *et al.*, 2017) ne démontre qu'une séroprévalence maximum de 1% parmi les jeunes bovins, compatible avec une circulation minime du virus (voire une absence de circulation).

Belgique

En Belgique, les bovins collectés à partir du mois de février jusqu'au 13 avril 2012 montrent une prévalence de 90,8%. L'étude illustre la circulation précoce du virus en saison 2 avec une sérologie de 87,8% en semaines 7 à 9, et de 93% en semaines 12 à 16. Ces niveaux de prévalence rejoignent ceux décrits précédemment chez les vaches non-laitières aux Pays-Bas. Cela n'est pas précisé dans l'étude mais, comme l'étude se base sur une paire de sérum mère/veau avant prise de colostrum, on peut en déduire que la majorité des prises de sang sont faites à l'issue d'une césarienne et donc proviennent de troupeaux BBB qui pâturent jusqu'à l'entrée de l'hiver. Il est donc logique que le niveau d'exposition de ces bovins aux culicoïdes infectés soit important. Les études réalisées par Mérac *et al.* évaluant les troupeaux bovins (Mérac *et al.*, 2013) et ovins (Mérac *et al.*, 2014) sur des périodes similaires mais pour l'ensemble du pays présentent des résultats similaires (bovins : séroprévalence inter-troupeaux 99,8% - intra-troupeaux 86,3% ; ovins : séroprévalence inter-troupeaux 98,1% - intra-troupeaux 84,3%). Ces études mettent cependant en évidence une zone dans le sud du pays dans laquelle la circulation du virus a été beaucoup plus faible à l'issue de la saison 2011. Cette

région correspond à l'Ardenne belge, région dont l'altitude moyenne est plus haute et dont la densité en élevage diminue au profit d'étendues boisées.

De même qu'aux Pays-Bas, la Belgique a évalué l'intensité de la circulation du virus en saison 2 au moyen d'une étude de séroprévalence sur des bovins prélevés en janvier et février 2013 (donc potentiellement infectés en 2012). Les résultats montrent une très importante décélération de l'épidémie avec, notamment, pour le jeune bétail entre 6-12 mois, une prévalence qui passe de 64,9% en 2012 à 20,59% en 2013. Ce qui transparaît sérologiquement apparaît également au niveau de la surveillance syndromique avec une chute des déclarations d'animaux malformés (de 1282 à 831 pour les bovins et de 499 à 24 pour les ovins). Il est intéressant de remarquer que ce ralentissement de la circulation du virus se note partout dans le pays à l'exception de l'Ardenne pour laquelle le taux séroconversion est plus élevé en 2013 qu'en 2012 (jeunes entre 6-12 mois, 2012= 56,8% vs 2013=78,95%). Il y a donc un décalage d'une année dans l'épidémiologie de l'Ardenne par rapport au reste de la région. Ce « décalage » d'une année a été également décrit par Rossi *et al.*, 2017, qui étudie la séroprévalence en faune sauvage de 2011 à 2014. Dans les zones montagneuses de France, où l'élevage est moins présent, SBV atteint les populations d'animaux sauvages avec un an de décalage par rapport aux cas domestiques des zones de plaines situées à proximité. L'Ardenne belge, bien que ne culminant pas au niveau des massifs montagneux français, se range avec eux dans les barrières géologiques naturelles ralentissant la progression des arbovirus dont le cycle est lié aux culicoïdes.

Saisons 2012 à 2015

En Allemagne, la saison 2013 peut laisser penser à une disparition du virus mais, pendant la saison 2014, des signes d'une circulation plus intense sont détectés par le FLI, particulièrement dans les lands de l'est moins touchés par les premières vagues de circulation (Wernike *et al.*, 2015a).

L'évaluation de la circulation du SBV à l'issue de la saison 2015 est effectuée en Belgique sur base de prélèvements ovins (Sohier *et al.*, 2017a). La séroprévalence est alors estimée à 26%. La décroissance de 2012=84% à 2015=26% correspond à la décroissance naturelle de l'immunité dans un troupeau où l'agent pathogène ne circule pas et où le taux de renouvellement est de 25% (ce qui correspond au chiffre classiquement rapporté (Lievaart-Peterson *et al.*, 2015). Cependant, les auteurs notent qu'en Wallonie la séroprévalence intra-troupeau est la seule à augmenter de manière significative entre 2014 et 2015 (2014=32%, 2015=45%), et lient ce phénomène avec la réapparition de quelques cas SBV de nouveau-nés positifs en avril 2016 (Delooz *et al.*, 2017).

Saison 2016

Ces signes timides de réémergence en Wallonie lors de la saison 2015 étaient les prémisses d'une nouvelle vague de circulation pan-européenne du SBV. La saison 2016 s'est accompagnée d'une circulation intense du virus. En Allemagne, le nombre d'animaux virémiques diagnostiqués par

RT-PCR dans le cadre de l'export de bovins a fortement augmenté (Wernike and Beer, 2017) et le troupeau sentinelle suivi sur base annuelle par le même auteur a retrouvé une séroprévalence comparable à 2013 (Fig. 4) (Wernike *et al.*, 2018a). En France, le niveau de signalement de nouveaux malformés liés au SBV a été plus de dix fois supérieur à celui de l'année précédente (Gache *et al.*, 2018). En Angleterre, Stokes *et al.*, 2018, rapportent un épisode de circulation du virus dont l'impact dans la spéculation ovine a été équivalent à la circulation de 2011-2012. Enfin, en Belgique, la séroprévalence globale de la population ovine augmente progressivement de 25% au mois de juin, à 61% au mois de septembre avec une prévalence inter-troupeau qui atteint 96% (Sohier *et al.*, 2017a). Dans cette étude, l'augmentation significative de la séroprévalence se double d'une détection du virus dans des pools de culicoïdes de la région d'Anvers.

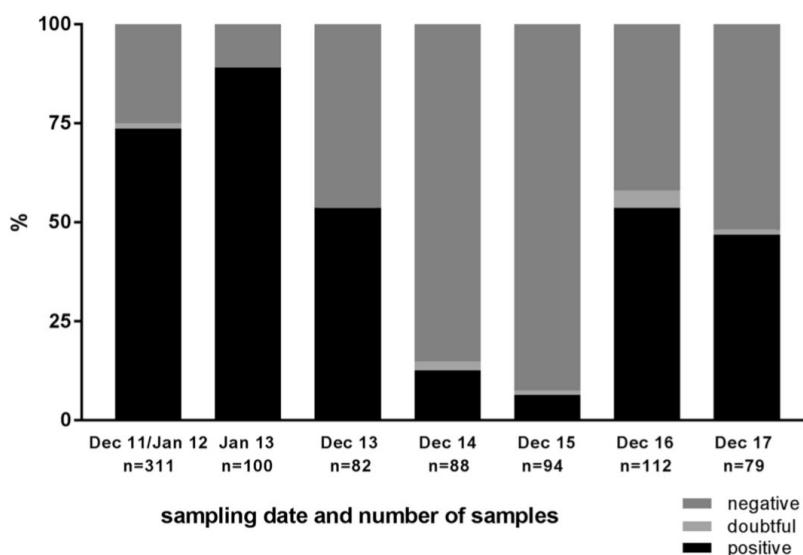


Figure 4: Niveaux de séroprévalence au sein du troupeau sentinelle suivi annuellement par Wernike et collaborateurs. Après la baisse régulière du taux de séroprévalence jusqu'à un seuil plancher fin 2015, le nombre d'animaux positifs dans le troupeau remonte nettement à l'issue de la saison 2016.

Il n'y a que peu d'études décrivant cette réémergence et leur niveau de précision est loin d'être comparable à celui des premières études qui ont suivi la saison 1. Il est donc difficile d'établir le niveau précis de son impact. Cependant, De Regge, 2017, présente une intéressante corrélation entre le nombre de cas d'atteinte fœtale et l'immunisation du troupeau. Dans cette figure (Fig. 5), on remarque que l'intensité d'atteinte des fœtus était beaucoup moins importante que lors de la première vague de l'épidémie de SBV. De Regge propose, pour expliquer la faible ampleur de cette réémergence, que les 25-30% d'animaux positifs restant dans la population ont limité la dispersion du virus.

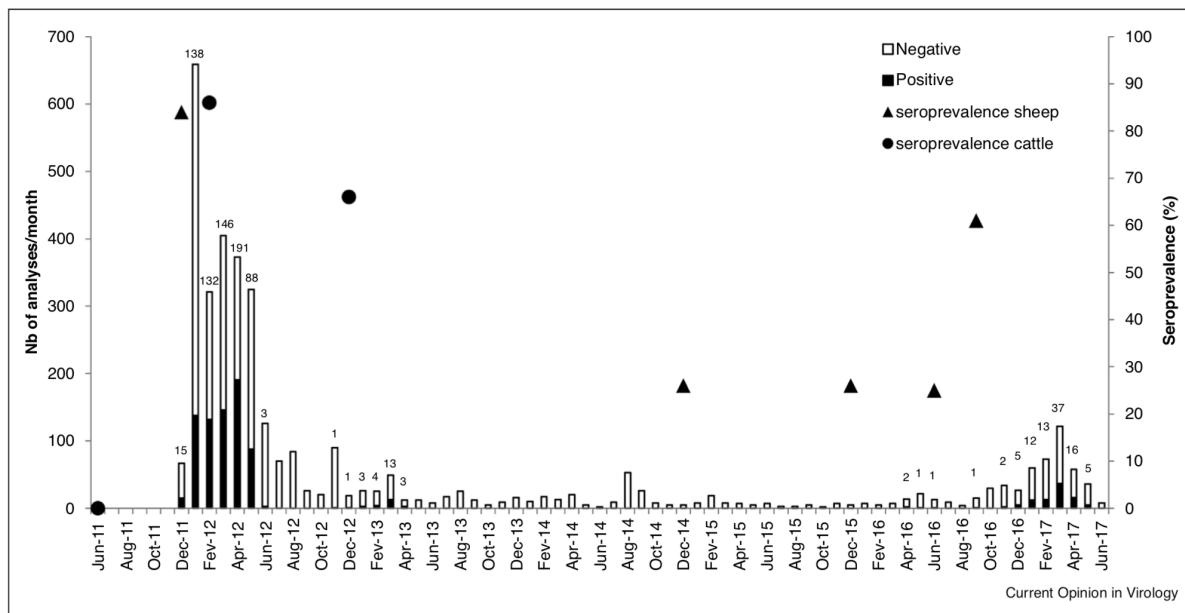


Figure 5: Relation entre le niveau de séroprévalence des troupeaux ovins et bovins en Belgique et le nombre de fœtopathies liées au SBV en Belgique (De Regge, 2017). Les séroprévalences sont issues des études belges rapportées précédemment. Les barres représentent le nombre d'échantillons issus de fœtus de ruminants soumis chaque mois au CODA-CERVA (SCIENSANO) pour test par RT-PCR. La déclaration des cas de SBV n'est pas obligatoire en Belgique mais, en revanche, dans le cadre de la surveillance de la Brucellose, tous les avortons et mort-nés devraient être référés pour examen post-mortem.

L'ensemble des auteurs s'accorde pour constater que l'Europe est probablement rentrée dans un cycle de réémergence de 4-5 ans comme cela est observé pour de nombreux virus phylogéniquement proches : virus Akabane, Aino et Peaton au Japon (Kato *et al.*, 2016) et en Australie (Geoghegan *et al.*, 2014). Cette cyclicité est la conséquence de la décroissance régulière de l'immunité collective dans les pays atteints. L'immunité qui s'installe après une infection par cette famille de virus est de longue durée. Dans le cas du SBV, il a été démontré qu'elle persiste au minimum six ans chez les bovins (Wernike *et al.*, 2018a) et au minimum quatre ans chez les ovins (Claine *et al.*, 2018) mais pourrait aussi persister la vie entière. L'origine de la diminution de l'immunité de troupeau est donc principalement le renouvellement des individus et non la nature évanescante de leur immunité. Le taux de renouvellement moyen, d'environ 25%, est en cohérence avec un cycle d'émergence de quatre à cinq ans. Dans ce cadre, la réémergence plus précoce signalée en Wallonie en 2015 pourrait être liée à une concentration plus importante de fermes de BBB (61% du cheptel BBB est en région Wallonne (Herd Book BBB)). En effet, l'importance de valoriser les vaches adultes assez jeunes en plus d'une limite pratique liée au nombre de césariennes augmente de manière importante le taux de renouvellement des troupeaux BBB qui peut dépasser 40% (Jacquet, 2019). Il est donc probable que l'immunité de troupeau en Wallonie ait diminué sensiblement plus rapidement dans les zones à forte densité de BBB.

Le cas particulier des îles Britanniques

Royaume Uni

Le cas particulier de l'évolution de l'épidémie dans ces îles européennes est intéressant parce qu'il présente des différences épidémiologiques avec le continent.

L'estimation de la date d'introduction sur le territoire anglais se base sur un sérum de mouton testé positif le 17 août 2011 (McGowan *et al.*, 2018), soit un passage du virus au début août 2011. McGowan *et al.*, 2018, présentent des éléments basés sur les modèles de dispersion des particules dans l'atmosphère montrant que les conditions étaient réunies au début du mois d'août 2011 pour un transport de culicoïdes depuis les côtes françaises (Normandie et Bretagne) vers le sud de l'Angleterre. Cette incursion depuis la France suite au transport de culicoïdes infectés est l'hypothèse la plus probable expliquant la propagation du virus en Angleterre, d'autant que l'incursion de BTV-8 en 2008 avait déjà suivi le même schéma (Gloster *et al.*, 2008; Tarlinton *et al.*, 2012).

Après cette introduction, le virus s'est modérément propagé, se limitant à la partie sud du pays (Fig. 3) et induisant, dans les troupeaux atteints, une séroprévalence intra-troupeau très variable, de 8,5% à 73,5% (ce qui reste, même pour les troupeaux les plus atteints, très inférieur à ce qui est décrit en Belgique à l'issue de la saison 1). L'année 2012 voit la circulation du virus continuer à faible intensité pendant les trois premiers trimestres, faisant augmenter la séroprévalence générale dans le pays de 1% fin 2011 à 32,4% (Fig. 6a). Le dernier trimestre est marqué par une recrudescence massive d'animaux séro-positifs (74,4%) (King *et al.*, 2015). Cette séroprévalence générale ne rend pas compte du gradient d'intensité nord-sud de la prévalence, avec pour les régions les plus au sud, une séroprévalence comprise entre 75 et 100% et dans le nord un pourcentage inférieur à 50% (Fig. 6b).

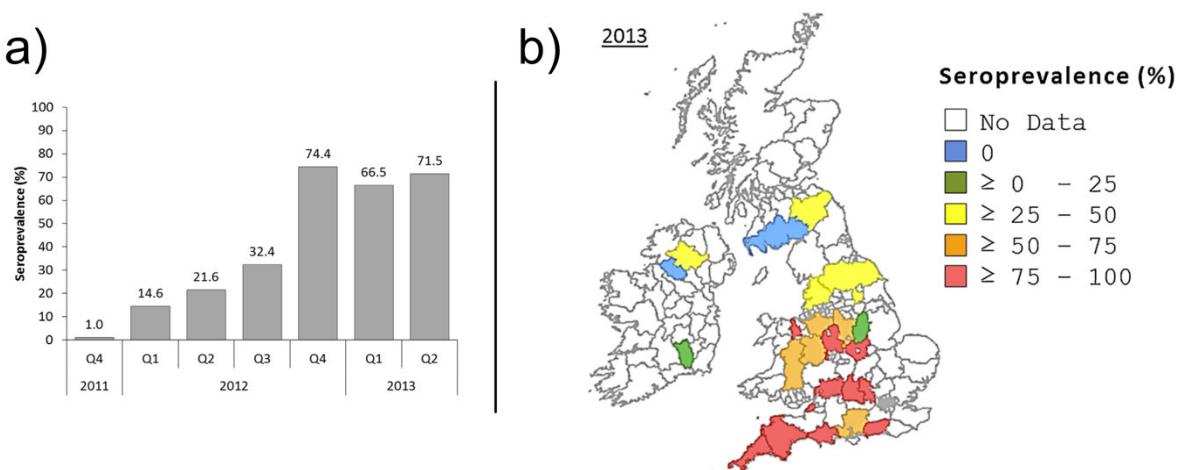


Figure 6: (King *et al.*, 2015)—a) diagramme représentant la séroprévalence au cours du temps dans les îles Britanniques ; l'augmentation de la séroprévalence aux trimestres 1 et 2 de 2012 est le signe d'une circulation hivernale du virus ; b) cartographie de la séroprévalence en 2013 qui met en évidence un net gradient nord/sud.

Compte tenu de ce qui a été observé dans les autres pays, et puisque les comtés du nord ont une séroprévalence faible, on peut s'attendre à retrouver des traces dans la littérature d'une troisième vague des cas correspondant à la saison 2013 des culicoïdes. Or Stokes *et al.* rapportent, en 2016, que, depuis les cas de malformations du premier trimestre 2013 (correspondant à la saison 2012), aucun cas n'a été rapporté au Royaume-Uni. Ils accompagnent ce constat d'une étude sérologique sur les troupeaux de moutons présents dans les comtés du sud en 2015, démontrant avec 95% de certitude que SBV ne circule pas à cette époque.

Enfin, la saison 2016 s'accompagne, comme sur le continent, d'une recrudescence de la circulation du virus, dont les premiers cas sont détectés dans le sud-ouest par sérologie et RT-PCR, mais qui s'étend jusqu'en Ecosse, comme l'attestent les cas de fœtus malformés détectés en 2017 (McGowan *et al.*, 2018). Cette réémergence a donc été plus intense que lors des deux premières saisons de circulation de SBV sur le sol anglais. Il est intéressant de noter que les auteurs présentent un arbre phylogénétique des virus circulant en 2016 montrant qu'ils forment un groupe à part des virus collectés en 2011-2012. McGowan *et al.* en déduisent que cette réémergence de SBV provient d'un passage de culicoïdes infectés depuis la France, à l'instar du premier passage du virus sur le territoire anglais.

Irlande

La situation au niveau de la République d'Irlande est comparable à l'Angleterre mais avec une saison de retard.

En se basant sur une étude sérologique rétrospective, McGrath *et al.* remontent jusqu'au 5 septembre 2012 avec un premier sérum de vache positif. Ils en déduisent que la première incursion du virus en Irlande s'est faite au début du mois d'août 2012. En se basant sur plusieurs modélisations de transport de particules, ils identifient plusieurs dates, mais avec une probabilité la plus forte pour le 10 août, pour lesquelles la conjonction des données météorologiques est favorable à un transport de culicoïdes depuis le sud de l'Angleterre (McGrath *et al.*, 2018). Or, comme décrit ci-dessus, les données montrent qu'à cette époque de l'année, la circulation du virus était intense dans le sud de l'Angleterre, menant au mouvement de séroconversion le plus massif à travers le Royaume-Uni.

Suite à l'introduction de SBV dans le sud, le virus se répand principalement dans une région limitée par une diagonale sud-ouest/nord-est (Barrett *et al.*, 2015), la partie nord-ouest restant très peu infectée, le vent dominant de sud-ouest étant l'un des facteurs pouvant expliquer cette distribution du virus.

De même qu'en Angleterre, alors que la moitié nord du pays n'est pas totalement infectée, on n'observe, la saison suivante, qu'une circulation virale minimale conduisant à une stabilisation des séroprévalences entre novembre 2012 (saison 1) et novembre 2013 (saison 2) : au niveau des

troupeaux 53% et au niveau des individus 36% (Collins *et al.*, 2016). Il ne semble donc pas que l'intrusion du SBV en Irlande soit suivie d'une épidémie totale comme sur l'Europe continentale.

Enfin, au même titre que l'Europe de l'ouest toute entière, l'Irlande subit pendant la saison 2016 une vague de circulation intense du SBV conduisant à une épidémie de même amplitude que la première circulation de 2012 (Collins *et al.*, 2017). Pour l'auteur de cet article, cette réémergence est forcément le fruit d'une réimportation du virus. En effet, comment pourrait-on expliquer qu'un virus qui ne circule pas sur un territoire, où une part importante des animaux sont séronégatifs, se mettrait à recirculer spontanément au même moment que partout ailleurs en Europe ? Par ailleurs, l'auteur développe un argumentaire montrant que l'importation d'un bovin positif est hautement improbable. Il priviliege donc l'hypothèse d'un nouveau déplacement de culicoïdes porteurs depuis l'Angleterre.

Constats et parallélisme avec le Japon

La situation des îles Britanniques est donc la suivante :

- l'arrivée du SBV dans les îles est la conséquence de longs déplacements, grâce aux courants aériens, de culicoïdes infectés depuis le continent ;
- les éléments nécessaires à la biologie du virus sont présents : densité de troupeaux ovins et bovins, présence importante de *Culicoides obsoletus* (Robin *et al.*, 2014) ;
- le virus circule suite à son introduction mais avec une ampleur modérée (en regard de la situation continentale) ;
- les réémergences ultérieures semblent être la conséquence de nouveaux déplacements sur longues distances de culicoïdes continentaux.

Le premier constat est qu'il en va des mers comme des montagnes, ces obstacles naturels sont tout relatifs pour un virus comme Schmallenberg, tout au plus imposent-ils une saison de décalage à l'installation de l'épidémie.

Le second est que la situation des îles Britanniques face au virus de Schmallenberg ressemble à la situation que connaît le Japon face au virus Akabane (AKAV). En effet, Kato *et al.*, 2016, décrivent la situation du virus Akabane au Japon avec les éléments suivants :

- le virus y est régulièrement détecté ;
- des épisodes de circulation virale accompagnés de malformation de fœtus y sont enregistrés régulièrement (2003-2004, 2008-2009) ;
- les populations de culicoïdes vecteurs sont présentes ;
- les différents épisodes sont vraisemblablement causés par de nouvelles incursions de culicoïdes portés par les courants aériens.

Même si ce parallélisme doit se confirmer sur de plus longues périodes, la similarité des situations est intéressante : dans les deux cas, le virus est capable de circuler dans ces îles mais il ne semble pas s'y implanter à long terme, les réémergences étant la conséquence de nouveaux déplacements de culicoïdes. Est-il possible que sur certaines îles un élément de la biologie du vecteur perturbe l'installation endémique de certains *Orthobunyavirus* ? Le mécanisme proposé par Kato *et al.*, pour expliquer la disparition du virus après la saison de culicoïdes au Japon, est un hiver trop rude qui ne permettrait pas au virus de passer l'hiver (Kato *et al.*, 2016). Si le parallélisme avec les îles Britanniques se confirmait, cette hypothèse d'un hiver intense devrait être abandonnée puisque, pour l'Angleterre, King *et al.*, 2015, décrivent nettement une circulation à bas bruit pendant l'hiver. Le mécanisme de la non-installation du virus sur le territoire ne serait donc pas l'impossibilité de « passer l'hiver » pour le virus. L'explication probable de ce phénomène réside dans un comportement différent du vecteur dans ces pays mais aucune différence de comportement des culicoïdes en conditions insulaires ou continentales n'est décrite. A peine peut-on rappeler que la combinaison de pluies et de vents est défavorable à l'activité des culicoïdes (Calzolari and Albieri, 2013).

Un dernier point à discuter sur l'épidémie dans les îles Britanniques est la différence entre la première conquête par le virus et la réémergence de 2016. En effet, l'épidémie de 2011 a été freinée par sa traversée successive des territoires marins alors qu'en 2016 l'infection dans les îles a suivi sans décalage le rythme continental. L'hypothèse la plus probable est liée à la modélisation de Bessel *et al.*, 2013, dans laquelle l'étendue de l'épidémie est dépendante de la période d'incursion du virus sur le territoire. En 2011, l'épidémie s'étendait sur le territoire français, la « charge virale » dans les populations de culicoïdes était donc faible et les incursions ultramarines ont donc été assez tardives (août) et de faible intensité. A l'inverse, en 2016, dès le début de la saison de culicoïdes, le virus s'amplifie rapidement sur le territoire français puisqu'il y est déjà implanté. Il en résulte une « charge virale » importante dans la population des culicoïdes « français » permettant des incursions précoces et massives sur le territoire anglais. L'incursion est alors suffisamment précoce pour permettre une grande diffusion du virus sur le territoire anglais et un passage « direct » vers l'Irlande, probablement à nouveau vers le mois d'août puisque l'amplitude de l'épidémie a été comparable à celle de 2012 (Collins *et al.*, 2017).

Hôtes

Espèces domestiques

Le virus de Schmallenberg, comme les autres *Orthobunyavirus* qui lui sont proches, infecte les ruminants (Yanase *et al.*, 2012).

Espèce équine

Les équidés ont été testés sans preuve d'une possible sensibilité (European Food Safety Authority, 2014).

Espèce canine

Pour le chien, les résultats sont un peu plus contradictoires mais s'orientent vers une non-sensibilité. D'un côté, une étude assez large analyse les sérum de 110 chiens, choisis parce qu'ils appartenaient à une région de forte circulation du virus mais ne détecte aucun positif (hormis un sérum douteux) (Garigliany *et al.*, 2013). De l'autre, deux *case reports* font état, pour l'un, d'une sérologie positive sur un chien en Suède (Wensman *et al.*, 2013) et, pour l'autre, d'une portée de chiots Bergers Allemands présentant des signes nerveux centraux congénitaux et pour lesquels la mère présente des anticorps SBV et, l'un des chiots, de l'ARN viral au niveau de l'encéphale (Sailleau *et al.*, 2013).

Espèce bovine

Au sein des ruminants domestiques, les bovins et les ovins présentent globalement une sensibilité similaire (Méroc *et al.*, 2013, 2014), la prévalence intra-troupeau atteignant pour les deux espèces 85 à 90%. En revanche, il se pourrait que les bovins soient les premiers infectés quand le virus envahit un territoire. En effet, dans une étude réalisée par les GDS en France pour évaluer l'épidémie à l'issue de 2011 (le pays n'étant alors que partiellement atteint), la prévalence intra-troupeau pour les bovins est de 90% alors qu'elle n'est seulement que de 30% pour les ovins (Gache *et al.*, 2013). Plusieurs aspects de la biologie de *Culicoides obsoletus*, le vecteur principal de SBV, peuvent expliquer ce phénomène : (i) les culicoïdes s'orientent préférentiellement vers les organismes dégageant le plus haut taux de CO₂, donc les ruminants les plus volumineux (Nelson, 1965), (ii) il est avéré que les femelles *C. obsoletus* prennent leur repas sanguin principalement chez les bovins (Lassen *et al.*, 2012), (iii) le cycle larvaire des culicoïdes est plus efficient dans les bouses compostées alors qu'il n'est jamais observé dans les matières fécales très sèches des petits ruminants (González *et al.*, 2013).

La durée de l'immunité colostrale dans l'espèce bovine est estimée à six mois (120 à 240 jours) (Elbers *et al.*, 2014).

Espèce ovine

En revanche, si les bovins semblent être les premiers infectés, les ovins payent le plus lourd tribut en termes d'avortements et d'agneaux malformés. Dans les troupeaux ovins où la présence du SBV a été confirmée, les estimations atteignent en moyenne 15% de gestations anormales (maximum : 50% et minimum : 5%) (Dominguez *et al.*, 2012), ventilées en 72% de gestations à terme avec agneaux malformés et 28% d'avortements. De manière générale, dans son étude de 2013, Dominguez

estime que 8% des agneaux ont présenté des signes cliniques spécifiques, 3% des veaux et 2% des chevreaux.

Cette atteinte particulière des ovins en regard du taux d'exposition similaire entre les espèces ovines et bovines pourrait laisser suspecter une sensibilité particulière des moutons. Cette hypothèse est en partie corroborée par (i) l'observation d'une virémie naturelle trois fois plus longue qu'attendue (Claine *et al.*, 2013) (15 jours au lieu des 5 jours habituellement rapportés dans les infections expérimentales (Martinelle *et al.*, 2015)) et (ii) la démonstration *in vitro* de l'inefficacité de la tétherine (ou BST-2) du mouton à inhiber SBV en comparaison de la protéine codée par le gène orthologue humain (Varela *et al.*, 2017). Cette dernière étude ne compare cependant pas les différentes tétherines de ruminants. En outre, aucune sensibilité particulière des ovins n'a pu être démontrée dans les différentes infections expérimentales.

Enfin, il reste que l'effet le plus important pour expliquer ce surplus de gestations cliniques dans l'espèce ovine semble être la saisonnalité. En effet, la fenêtre de sensibilité du fœtus ovin lors de l'infection maternelle, même si elle n'est pas définie de manière définitive, se situe dans le 2^{ème} mois de gestation (Martinelle *et al.*, 2015; Stockhofe *et al.*, 2013). Or, le pic de transmission des maladies transmises par les culicoïdes se situant à l'automne (Tarlinton *et al.*, 2012), la majorité des brebis peuvent être exposées à ce pic de circulation au moment le plus favorable à l'apparition de malformations au cours de leur gestation. Cet effet de la saisonnalité sur l'incidence de SBV dans les troupeaux de moutons a été notamment démontré aux Pays-Bas (Luttikholt *et al.*, 2014). Il masque, à tout le moins, l'effet d'une éventuelle sensibilité plus grande des ovins. Il en résulte que l'une des mesures les plus efficaces pour diminuer l'incidence clinique de SBV dans un troupeau de moutons est de décaler la saison de reproduction plus tard dans l'année.

La durée de l'immunité colostrale dans cette espèce a été mesurée à 122 jours (74-144 jours) (Claine *et al.*, 2018).

Espèce caprine

Dans la majorité des études globales, les chèvres semblent moins sensibles, la prévalence générale ne dépassant que rarement les 50% (Helmer *et al.*, 2013; Méroc *et al.*, 2013; Veldhuis *et al.*, 2013). De même, le niveau d'atteinte apparent des nouveau-nés est inférieur à celui des autres ruminants domestiques (Dominguez *et al.*, 2012). Cependant, le détail de l'étude de Helmer *et al.*, 2013, fait apparaître que certains troupeaux présentent des pertes comparables aux troupeaux ovins (50% de pertes) quand, pour d'autres, l'atteinte est limitée (5% de pertes). Or, la majorité des chèvres étudiées sont issues de troupeaux laitiers dans lesquels l'élevage *indoor* est une pratique fréquente (soit *indoor* total, soit *indoor* nocturne). Dans l'étude de Helmer, il est statistiquement évident que les troupeaux pratiquant un élevage *indoor* sont protégés de l'infection (même si la protection reste

partielle). Les troupeaux les plus atteints sont ceux dont les chèvres sont plus largement élevées à l'extérieur. D'autres facteurs jouent, la proximité avec des zones humides ou des bois est un élément favorable à l'observation de cas cliniques. Les préférences de *C. obsoletus* citées ci-dessus s'appliquent également. Il semble donc que les techniques d'élevage des troupeaux de chèvres laitières soit l'élément déterminant de la faible incidence de SBV dans l'espèce caprine, d'autant que l'infection transplacentaire expérimentale la plus effective et informative a été réalisée en modèle caprin (Laloy *et al.*, 2017).

Faune Sauvage

Intérêt de l'étude de la Faune Sauvage

Les études menées sur les ruminants domestiques ont fourni des données épidémiologiques assez massives qui peuvent paraître suffisantes pour la connaissance générale des comportements du virus (cf. parties précédentes). En dehors d'une curiosité scientifique légitimant tout sujet d'étude, la production de connaissances spécifiques aux populations d'animaux sauvages est capitale dans le cadre d'un virus comme le SBV. Parmi les apports intéressants, on peut citer :

- le spectre d'hôte : la question est capitale, par exemple du point de vue de l'*overwintering* pour lequel l'une des hypothèses est une espèce hôte « tierce » hébergeant le virus pendant l'hiver (*overwintering* : cf. section dédiée aux culicoïdes) ;
- la complémentarité : le maillage sanitaire d'un territoire vaste et varié est difficile, plusieurs exemples démontrent qu'un suivi des populations sauvages vient compléter la veille sanitaire des espèces domestiques ;
- les maladies vectorielles : plusieurs études précédemment citées démontrent que le logement des animaux modifie leur exposition au virus. L'étude de populations perpétuellement en contact avec les insectes vecteurs est essentielle ;
- la gestion et la protection des espèces menacées : la sensibilité d'une espèce sauvage menacée à un agent pathogène amplifié par des espèces domestiques pourrait compromettre la survie de cette espèce.

Spectre d'hôtes

La grande majorité des études réalisées sur les espèces sauvages autochtones est le fruit d'une récolte de sérum *post-mortem* en aval des journées de chasse. Les études des espèces exotiques se font en collaboration avec les zoos qui, pour leur gestion sanitaire propre, alimentent des banques de sérum des espèces qu'ils hébergent.

Pour les animaux autochtones, le spectre d'hôtes est un décalque assez fidèle des espèces domestiques. Les carnivores sauvages testés sont tous négatifs ainsi que les petits mammifères

(Mouchantat *et al.*, 2015). *A contrario*, l'ensemble des ruminants sauvages autochtones sont sensibles : le chevreuil (*Capreolus capreolus*), le cerf (*Cervus elaphus*), le bouquetin des Alpes (*Capra ibex*), le chamois et l'isard (*Rupicapra rupicapra/pyrenaica*), le mouflon (*Ovis aries musimon*), le daim (*Dama dama*), le bison européen (*Bison bonasus bonasus*). Parmi les non-ruminants, le seul cas d'une espèce autochtone sensible est le sanglier (*Sus scrofa*) (Desmecht *et al.*, 2013; Mouchantat *et al.*, 2015) alors que le porc domestique est, lui, résistant en infection expérimentale (Poskin *et al.*, 2014a).

Les espèces sauvages exotiques présentes dans les zoos ont également été testées. On peut citer ici l'emblématique séroconversion des éléphants d'Asie (*Elephas maximus*) détectée dans les zoos anglais (Molenaar *et al.*, 2015). Le détail des espèces sensibles peut être aisément consulté dans la littérature (Laloy *et al.*, 2016). De nombreux herbivores sont sensibles mais aucun n'a présenté de manifestations cliniques particulières ou de signes d'une sensibilité spéciale laissant penser qu'il pourrait être un réservoir particulier pour SBV.

Etat des lieux

Le constat le plus général que l'on peut tirer de ces bilans est que la séroprévalence des populations sauvages suit l'évolution des populations domestiques. Le phénomène est évident pour le sanglier qui est peu sensible et pour lequel une séroprévalence n'est détectable qu'au pic de la circulation de SBV : environ 30% en hiver 2011, environ 10% en hiver 2012, puis une absence du signal sérologique (Desmecht *et al.*, 2013; Mouchantat *et al.*, 2015), ce qui laisse à penser que le taux d'anticorps chez les sangliers déclinerait plus rapidement que dans les autres espèces.

L'effet prépondérant de la présence d'élevages de ruminants domestiques a été nettement démontré en Pologne (Larska *et al.*, 2014) où la majorité des ruminants sauvages positifs se trouve à l'est (42% d'animaux positifs), dans la région à plus forte densité d'élevage, alors qu'à l'ouest, la prévalence est deux fois plus faible (20% d'animaux positifs). Or, la « vague » de SBV déferlant depuis l'Allemagne, on se serait attendu à la situation inverse (ou, à tout le moins, à une répartition homogène). De même, mais plus localement, dans la partie est des Pyrénées, les chevreuils qui vivent dans une vallée où l'élevage est présent ont une prévalence atteignant 80%, contrairement aux espèces vivant plus éloignées des élevages (Fernández-Aguilar *et al.*, 2014) (l'effet de l'altitude n'est pas totalement discuté dans cette étude alors qu'il pourrait être un facteur d'explication important de ces différences de séroprévalence). Enfin, en Irlande, la population de chevreuils SBV positifs est confinée aux secteurs de séroprévalences bovine et ovine les plus élevées (Graham *et al.*, 2017). Il ressort de ces observations que les espèces ayant le plus d'impact dans l'épidémiologie du virus sont les espèces de ruminants domestiques. Il semble donc que l'atteinte des ruminants sauvages soit la conséquence d'une contagion (*spillover*) des ruminants domestiques vers la faune sauvage. Les populations de faune sauvage n'ont donc qu'un impact limité dans la dispersion du virus.

Les chevreuils et les cerfs sont les deux espèces les plus étudiées. Leur niveau de prévalence oscille habituellement entre 50 et 100% au pic de l'épidémie (Laloy *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2017) avec, le plus souvent, une prévalence légèrement plus élevée chez le chevreuil (Linden *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2017). On peut supposer que cette séroprévalence légèrement supérieure rend compte d'un mode de vie plus proche des zones exploitées pour l'élevage chez le chevreuil que chez le cerf. En Belgique, pour la saison de chasse 2011 (octobre, novembre et décembre), la séroprévalence moyenne atteignait 40,5% pour le cerf et 45,9% pour le chevreuil (Linden *et al.*, 2012). Dans cette étude, la corrélation avec le mois de prélèvement est importante : la séroprévalence par mois démarre à 20% pour le mois d'octobre pour culminer à 80% pour le mois de décembre.

La conséquence de l'infection pour ces deux espèces au niveau reproducteur pourrait être très différente. En effet, suite au phénomène de diapause, l'embryon ne s'implante pas avant la fin décembre au niveau de l'utérus des chevreuils (Díaz *et al.*, 2015). Cette absence d'implantation précoce pourrait avoir un effet protecteur en limitant physiquement l'atteinte de l'embryon par le virus. En revanche, l'accouplement, qui a lieu en septembre chez le cerf, est suivi d'une implantation directe de l'embryon avec l'apparition des premiers placentomes à la fin octobre (Linden *et al.*, 2012). Les effets sur la reproduction pourraient donc être bien plus importants chez le cerf. Cependant, jusqu'à ce jour, il n'est fait mention daucun avorton de cervidés positif pour SBV. Il n'est donc pas possible de mesurer un impact sur la reproduction des cervidés sauvages. La putréfaction rapide des avortons et l'action des charognards rend presque impossible leur détection dans la faune sauvage (Linden *et al.*, 2012). L'absence de fœtus positifs n'est donc pas une preuve de l'absence d'effet de SBV sur les fœtus de cervidés.

Les différentes études sur la faune sauvage ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments non visibles dans les études d'animaux domestiques :

- Lors de la saison 2011, quand l'épidémie s'est répandue en Europe, le virus a circulé de manière intense jusqu'à la mi-novembre suite à des conditions climatiques favorables (Linden *et al.*, 2012). Cette circulation prolongée est probablement l'une des causes de la grande intensité de cette vague.
- SBV circulait dans le sud de l'Espagne au moins cinq mois avant le premier cas déclaré (García-Bocanegra *et al.*, 2017).
- Le virus a circulé à plus de 2 000 m d'altitude (Fernández-Aguilar *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2017). A cet égard, Rossi et collègues démontrent que la séroprévalence est significativement différente entre les territoires situés à moins de 800 m d'altitude et ceux situés à plus de 800 m. Par contre, il n'y a pas de différence significative entre les territoires compris entre 800 m et 1 500 m et ceux situés au-delà de 1 500 m. Ils

démontrent également que l'altitude est un élément qui peut décaler d'un an la progression du virus.

- En France, dans l'un des rares départements pour lequel aucun cas clinique de SBV n'a été rapporté (département des Alpes-Maritimes), la séroprévalence chez les cerfs était de 50% (Rossi *et al.*, 2017). Cette situation met en évidence un manque de sensibilité du réseau de surveillance des espèces domestiques dans ce département.

Dans l'étude de l'impact de SBV sur les populations de faune sauvage européenne, une attention particulière est donnée au suivi des populations de bisons européens présents en Pologne. En effet, le bison européen avait totalement disparu à l'état sauvage après la deuxième guerre mondiale. Sa réintroduction en conditions de liberté ou semi-liberté a été réalisée à partir d'individus de parcs animaliers et de zoos. L'espèce compte actuellement 6 000 individus mais reste menacée (Kęsik-Maliszewska *et al.*, 2018). La proximité génétique entre le bison et les bovidés domestiques (Larska *et al.*, 2013a) se marque par une sensibilité particulière du bison pour SBV en comparaison des autres ruminants sauvages. Au début de l'épidémie en Pologne, la prévalence dans la population de bisons du parc national de Białowieża atteignait 88% quand les cervidés présentaient une séroprévalence de 25% seulement (Larska *et al.*, 2013a). A la fin de l'hiver 2012 (première saison de circulation du virus en Pologne), la prévalence y était de 100% (Kęsik-Maliszewska *et al.*, 2018). Dans la population globale de Pologne, la séroprévalence a atteint un pic en 2014 (87,6%), avant de régresser en 2015 (63,9%) et de remonter légèrement en 2016 (75%), marquant ainsi la réémergence européenne de 2016. Malgré cette sensibilité importante de l'espèce, la circulation de SBV ne semble pas avoir mis en danger les populations polonaises de bisons.

Impact au niveau des troupeaux

Synthèse

La compilation des études estimant l'impact de l'épidémie de SBV au sein des exploitations est un exercice complexe tant la diversité des méthodes est importante. La question de la définition d'un groupe atteint et d'un groupe contrôle, base nécessaire à toute comparaison, fait face à la difficulté du diagnostic de certitude. En effet, le taux de détection de l'ARN viral sur les mort-nés présentant des lésions typiques est de 27% pour les veaux et 35% pour les agneaux (van Maanen *et al.*, 2012). Il est donc parfois difficile d'avoir un diagnostic de certitude pour un troupeau. Certaines études se basent donc sur des résultats PCR positifs (Poskin *et al.*, 2017), quand d'autres font le choix d'inclure une catégorie de troupeaux suspects (Stokes *et al.*, 2018), et d'autres enfin mettent en parallèle les périodes de circulation virale avec des périodes antérieures comparables (Veldhuis *et al.*, 2014).

Le tableau 1 présente donc un panel des estimations effectuées sur les troupeaux atteints de SBV. L'ordre de grandeur d'impact que l'on peut donner pour l'atteinte des nouveau-nés est, pour les

veaux, de l'ordre de quelques pourcents (0,5 à 3%) et, pour les agneaux, de l'ordre de 10 pourcents (avec une grande variabilité inter-troupeau, les plus touchés dépassant les 40% d'agneaux atteints).

Tableau 1: Collection des principales données d'impact de l'infection par le virus de Schmallenberg au niveau des troupeaux bovins et ovins.

Références	Pays	Espèce	Reproduction							Coût	
			Malformations	Mortalité 1ère semaine	Pertes >40%	Avortements	Prolifcité	Dystocie	Taux de sevrage	Traitement	Lait
Dominguez et al., 2014	France	Ovins	8 %								
		Bovins	3 %								
Harris et al., 2014	Royaume-Uni	Ovins		5,1 %	8-16% des fermes						
Martinelle et al., 2014	Belgique	Bovins								65 à 107€/animal	
Raboisson	France-Angleterre	Bovins (allaitants)								15 à 43€/animal/an	
Saegerman et al., 2014	Belgique	Ovins	8,1 %	61,5% des troupeaux		3,5 %	50 %	6,7 %			
Veldhuis et al., 2014	Allemagne-Hollande	Bovins (Laitiers)								-0,26kg/jour moyenne	
										-0,43kg/jour dans troupeaux pos.	
Barret et al., 2015	Royaume-Uni	Ovins							90 %		
Toscon et al., 2015	Italie	Bovins (Laitiers)								Peu d'effet	
Hässler et al., 2015	France-Angleterre	Bovins (Laitiers)								11,37 à 57€ par vache en lactation/an	
Wüthrich et al., 2016	Suisse	Bovins (Laitiers)				2,8 %				1338€/ferme	aucune
Poskin et al., 2017	Belgique	Bovins	3,5 %								
		Ovins	8 %								
Stokes et al., 2018	Royaume-Uni	Ovins								2016 comparable à 2012	

Lésions et pathogénie

Maladie de l'hôte

La maladie clinique de faible sévérité que manifestent les bovins a été principalement détectée suite à son effet sur la lactation. En effet, en dehors des troupeaux laitiers, la fièvre et la diarrhée de quelques jours passent plus souvent inaperçues. Ces signes cliniques très généraux et de faible intensité ont été reproduits expérimentalement (Hoffmann *et al.*, 2012) mais sans lésion associée. La seule voie de transmission possible semble être transcutanée (sous-cutanée ou intradermique (Martinelle *et al.*, 2017)). Les autres voies testées, orale (Wernike *et al.*, 2013a) et nasale (Martinelle *et al.*, 2017), n'ont pas provoqué de virémie. Par ailleurs, dans les infections expérimentales pour lesquelles les animaux contrôles étaient en contact avec les infectés, aucune transmission du virus n'a été détectée (Wernike *et al.*, 2013a).

La virémie est typiquement de quatre à six jours et débute le plus souvent deux à quatre jours après l'infection (observation constante dans toutes les infections expérimentales). Deux exceptions à cette virémie de courte durée ont été observées. La première fait suite à une infection naturelle dans un troupeau de moutons suivi régulièrement par prélèvements sanguins et recherche de l'ARN viral. Plusieurs brebis y ont été testées positives à 15 jours d'intervalle (Claine *et al.*, 2013). La seconde est une infection expérimentale de chèvres dans laquelle l'une des chèvres a montré une virémie intermittente de 15 jours (Laloy *et al.*, 2017). Du reste, il est probable que l'infection naturelle induite par la piqûre des culicoïdes soit différente d'une infection expérimentale comme cela a été démontré pour BTV (Pages *et al.*, 2014).

Le lieu de l'amplification du virus suite à son introduction n'est pas formellement déterminé. SBV a la capacité de se multiplier dans une grande diversité de lignées cellulaires d'origine très variée (Varela *et al.*, 2013). Il est donc possible que de nombreux tissus servent de base à son amplification. Les infections expérimentales montrent que :

- l'ARN viral peut être détecté à long terme dans les organes lymphoïdes tels que la rate (90 dpi (Martinelle *et al.*, 2015) ; 44 dpi (Wernike *et al.*, 2013b)), de même que pour les nœuds lymphatiques draînant la zone d'injection du virus (44 dpi (Wernike *et al.*, 2013b) et 24 dpi (Van Der Poel *et al.*, 2014)). Il est probable que cette persistance de l'ARN soit liée à la phagocytose du virus et non à une persistance de particules infectantes.
- les nœuds lymphatiques mésentériques sont positifs dans la quasi-totalité des études où ils ont été testés. De plus, dans leur étude, Wernike *et al.*, 2013a, démontrent que, pendant la phase aiguë de la maladie, le virus est présent dans les matières fécales. Ces deux éléments

s'ajoutant à la diarrhée fréquemment rapportée dans les signes cliniques typiques laissent penser que la sphère intestinale est l'une des zones importantes de multiplication.

- les poumons ont également été détectés comme fréquemment positifs par RT-PCR (44 dpi (Wernike *et al.*, 2013b), 10 dpi (Poskin *et al.*, 2014b)(Martinelle *et al.*, 2017)). Cependant, le rôle des poumons dans la *clearance* des agents pathogènes circulant est important (Tizard, 2012). Le même raisonnement que pour les organes lymphoïdes peut donc être tenu.
- dans l'étude de Wernike *et al.* 2013b, les reins sont également positifs à 44 dpi. Il se peut donc qu'ils soient un lieu de multiplication importante pour le virus, d'autant que cet aspect primordial du rein dans l'amplification du virus *in utero* a été proposé par Laloy *et al.*, 2017 (cf. partie suivante).
- enfin, chez le mâle et la femelle, le système reproducteur est particulièrement ciblé. Les ovaires contiennent de l'ARN dans cinq études (Laloy *et al.*, 2015, 2017; Martinelle *et al.*, 2015; Poskin *et al.*, 2014b; Wernike *et al.*, 2013b). Chez le mâle, plusieurs études démontrent la présence du virus dans la semence de taureaux (Schulz *et al.*, 2014; Van Der Poel *et al.*, 2014). Le virus présent dans les paillettes de sperme de taureau est potentiellement infectant, mais la voie intra-utérine n'a pas été testée comme voie possible de transmission.
- à noter que dans l'étude de Martinelle *et al.*, 2015, à 90 dpi, les ovaires et la rate contiennent encore du matériel génétique viral détectable mais à 105 dpi, tous les prélèvements sont négatifs, ce qui donne une idée de la durée de persistance du matériel génétique du virus.

Fœtopathies

La conséquence la plus importante de l'infection à SBV est l'apparition de malformations chez les nouveau-nés infectés pendant une fenêtre bien particulière de la gestation.

Passage transplacentaire

Fenêtre de passage transplacentaire

Cette fenêtre n'est, à l'heure actuelle, pas encore clairement définie et la plus grande partie des connaissances sur cette question émane d'une transposition des données collectées pour AKAV (Hashiguchi *et al.*, 1979; Kurogi *et al.*, 1977a, 1977b). En effet, l'effet tératogène, bien plus important pour AKAV que pour SBV, a permis de définir cette fenêtre avec beaucoup plus de précision. Les données concernant AKAV ont été efficacement rassemblées dans la revue publiée par Peter Kirkland (Kirkland, 2015). Les dates clefs de l'infection transplacentaire pour AKAV sont les suivantes :

- ovins : 28 à 56 jours de gestation ;
- bovins : de environ 2 à 6 mois
 - o avant 80 jours : principalement mortalité embryonnaire ;
 - o de 80 à 105 jours : exclusivement encéphalopathies (por- et hydran-encéphalies) ;
 - o de 105 à 170 jours : arthrogrypose ;
 - o entre 105 et 120 : syndrome global hydranencéphalie-arthrogrypose.

Les infections expérimentales menées sur les petits ruminants tendent à confirmer la fenêtre d'infection transplacentaire. Laloy *et al.*, 2017, démontrent un passage transplacentaire avec fœtopathies à 28 et 42 jours de gestation. Martinelle *et al.*, 2015, mettent en évidence une colonisation du placenta aux jours 45 et 60 de la gestation mais sans fœtopathies.

Pour les bovins, le calendrier d'apparition des veaux malformés mis en relation avec l'activité des culicoides semble confirmer ces données. De plus, une expérience récente d'infection transplacentaire expérimentale a été menée pour l'espèce bovine. Dans cet article (König *et al.*, 2019), une première tentative d'infection aux jours 60, 90, 120 et 150 de gestation (avec euthanasie à 35 dpi) est menée. Les résultats semblent assez probants : il est confirmé que le virus peut infecter les fœtus à toutes les dates testées sauf à 150 jours, où il n'y a même pas de séroconversion. En outre, le meilleur taux d'infection fœtale est atteint à 120 jours. Malheureusement, dans une seconde série d'expériences réalisée à 120 jours de gestation (tout en faisant varier le jour d'euthanasie), l'infection fœtale n'est détectée que pour la moitié des fœtus. Cette seconde série atténue la perception du 120^{ème} jour comme période « idéale » de transmission verticale dans l'espèce bovine que pouvait donner la première expérience.

Bien que les similarités entre SBV et AKAV dans l'infection transplacentaire soient grandes, aucune étude n'a mis en évidence de dichotomie entre les fœtus bovins infectés avant et après 105 jours de gestation, ni même que les veaux atteints plus précocément présenteraient une moins grande fréquence d'arthrogrypose.

Origines biologiques de la fenêtre de passage transplacentaire

La littérature consacrée au passage transplacentaire du SBV s'interroge sur les causes biologiques de l'existence de telles fenêtres.

Pour les moutons, le fait que le virus ne puisse pas infecter le fœtus avant 28 jours semble assez évident. C'est au 28^{ème} jour que les cotylédons deviennent fonctionnels (Varela *et al.*, 2013). Avant cette période, il n'y a donc pas de « pont » permettant au virus d'atteindre le fœtus. Varela *et al.* proposent, pour expliquer la fermeture de la fenêtre entre 50 et 60 jours de gestation, la mise en place de la barrière hémato-méningée (BHM). En effet, le fœtus de mouton est un des modèles largement utilisés dans les études physiologiques portant sur la barrière hémato-méningée. Les données sont

donc nombreuses sur la question. La présence de cette barrière est testée par la mesure de la diffusion depuis le sang de nombreuses molécules ou marqueurs. Il apparaît donc que le premier frein à la diffusion de sucre vers l'encéphale se fait au 60^{ème} jour de la gestation, augmente significativement au 70^{ème} jour et progresse jusqu'à un niveau final au 120^{ème} jour (Evans *et al.*, 1974). D'autres auteurs considèrent que les étapes clefs de la formation de la BHM sont 60% de la gestation (première grosse évolution) et 90% de la gestation (Stonestreet *et al.*, 2006). Les 60% de la gestation correspondent pour les ovins (d'après l'auteur) au 86^{ème} jour de gestation et pour les bovins au 170^{ème} jour. Cette hypothèse apparaît donc comme séduisante et correspond assez bien aux observations cliniques. Cependant, Martinelle et collègues, en 2015, voient comme point faible à cette théorie que le virus de SBV est largement plus volumineux (100 nm) que toutes les molécules servant à tester l'existence de la BHM et qu'il est donc probablement hasardeux de tirer des conclusions trop fermes quant à l'effet de la BHM sur le virus.

La seconde réalité biologique qui pourrait expliquer une fermeture de la fenêtre d'action du virus est la mise en place de l'immunité fœtale. En effet, Garigliany *et al.*, 2012, ont détecté qu'environ 28% des veaux nés à l'issue de la première saison de circulation du virus en Belgique naissaient normaux alors qu'ils avaient été infectés *in utero* par SBV comme le prouvait la présence d'anticorps *ante*-colostraux dans leur sang. Il existe donc de nombreux cas dans lesquels le virus infecte le fœtus mais ce dernier déclenche une réponse immunitaire efficace qui jugule l'infection (comme c'est le cas chez les ruminants adultes). Pour AKAV, les fœtus de mouton infectés à partir du 60-65^{ème} jour de gestation développent une réponse humorale (IgM + IgG). Chez les fœtus bovins, Tizard (*Veterinary Immunology*, édition 2012) considère que l'immunité est acquise autour du 150^{ème} jour, même si la production des IgM peut débuter nettement plus tôt. Le développement de l'immunité du fœtus semble donc un facteur très important pour expliquer l'évolution de l'infection *in utero* par SBV.

En ce qui concerne le fœtus bovin, les données d'embryologie sont assez rudimentaires et ne permettent pas de cibler des évènements précis pouvant alimenter la réflexion sur la fenêtre d'infection et de malformation. On peut simplement rappeler que les placentomes sont fonctionnels chez le fœtus bovin à partir du 30^{ème} jour de gestation et qu'il est donc probable que le virus puisse infecter le fœtus, comme dans l'espèce ovine, à partir de ce jour (Charles, 1994). Comment, dès lors, expliquer que la fenêtre de malformations ne débute qu'au 60^{ème} jour de gestation ? Une hypothèse pourrait être que ces infections précoces résulteraient en des mortalités embryonnaires plus fréquentes que chez l'agneau et donc à une absence (apparente) de veaux malformés.

Lésions macroscopiques

L'une des études les plus fournies décrivant les lésions des fœtus liées à l'infection naturelle est basée sur les cas des Pays-Bas pendant la période où la déclaration des cas SBV était obligatoire :

102 agneaux et 204 veaux (Peperkamp *et al.*, 2015). Dans la description qui va suivre, la majorité des données chiffrées proviendront de cette étude et leur origine ne sera donc pas rappelée. Les citations se limiteront aux informations provenant d'autres publications.

S'il fallait retenir une seule lésion à associer à l'infection *in utero* par le virus de SBV, ce serait l'arthrogrypose (*arthrogryposis multiplex congenita*). En effet, l'arthrogrypose (littéralement : articulation recourbée (du latin *grypos* : recourbé, crochu)) est présente chez 97% des ovins et 96% des bovins atteints. Elle donne, en outre, une déformation « hideuse » du fœtus, caractéristique de la maladie. Elle atteint le plus souvent les quatre membres (>95% des cas) mais peut se limiter aux deux antérieurs ou aux deux postérieurs. Elle se double d'une diminution importante de la masse musculaire suite à l'hypoplasie des muscles squelettiques. Dans les cas plus extrêmes, l'ankylose de l'articulation s'accompagne d'une déformation osseuse importante.

Classiquement, l'arthrogrypose est un diagnostic qui décrit une pathologie des membres et les auteurs présentent séparément les atteintes de la colonne vertébrale : scoliose, cyphose, lordose et torticolis. Les lésions sont cependant identiques, atteignant simplement une série d'articulations situées en dehors du squelette appendiculaire et résultent donc en une « arthrogrypose (au sens large) » de la colonne vertébrale.

Les atteintes de la colonne sont donc également très fréquentes mais ne sont évidentes que dans les cas plus extrêmes : 82% des ovins, 86% des bovins. La scoliose (déviation sinuuse de la colonne dans les trois plans, dont la rotation des vertèbres autour de l'axe de la colonne) s'accompagne le plus souvent d'une cyphose importante de la colonne. La rotation des vertèbres, particulièrement visible au niveau des vertèbres thoraciques, s'accompagne d'une sévère déformation de la cage thoracique. Le torticolis (« scoliose » du cou) est fréquemment rapporté (ovins : 24% et bovins : 76%) et contribue à l'apparence typique des fœtus SBV.

La déformation squelettique atteint également le crâne (ovins : 41% et bovins : 5%) : crâne aplati, brachygnyathie inférieure (12%) et fonte des muscles masticateurs.

Le deuxième système particulièrement visé par le virus est le système nerveux central. Macroscopiquement, le plus marquant est l'atteinte du cerveau (ovins : 83% et bovins : 53%). En effet, les lésions de porencéphalie (présence de cavités dans les hémisphères cérébraux) ou d'hydranencéphalie (lésion extrême caractérisée par le remplacement des hémisphères cérébraux par de larges poches remplies de liquide céphalo-rachidien et délimitées par les méninges) dominent le tableau lésionnel. Peperkamp *et al.*, 2015, décrivent en plus de l'hydrocéphalie (dilatation des ventricules cérébraux), de la lissencéphalie (absence des gyri) et de la microcéphalie.

Le cervelet présente fréquemment de la dysplasie (ovins : 94%, bovins : 45%), souvent associée aux lésions du cerveau. Le tronc cérébral est moins déstructuré mais peut être fortement réduit en taille (hypoplasie).

La moelle épinière est réduite en taille (micromyélie) avec un volume total pouvant être inférieur à la moitié du volume attendu (ovins : 75%, bovins : 53%).

En dehors du système nerveux et du système arthro-myo-squelettique, aucune lésion spécifique liée à l'infection par SBV chez le fœtus n'est décrite.

Lésions microscopiques

Les lésions microscopiques principales se situent au niveau du système nerveux central. Leur intensité reflète le niveau de modifications macroscopiques. L'élément principal est l'atteinte neuronale : chromatolyse et hyperéosinophilie (nécrose neuronale), puis disparition et raréfaction neuronale (Herder *et al.*, 2012). La perte neuronale s'accompagne de démyélinisation. Cette démyélinisation est particulièrement évidente au niveau de la moelle épinière.

Au niveau du cerveau, l'hydranencéphalie se caractérise microscopiquement par une quasi absence de tissu nerveux, à l'exception de petits îlots ancrés sur les méninges dans lesquels s'accumulent des *gitter cells* (macrophages dont le cytoplasme est chargé en lipides suite à la phagocytose de la myéline) associées à de la nécrose du neuroparenchyme, de l'oedème, des vacuolisations et des calcifications (Herder *et al.*, 2012). L'hydrocéphalie est classée par Herder et collègues en hydrocéphalie *ex vacuo* suite à son aspect excentrique et à sa proximité avec des foyers de nécrose. La porencéphalie est de taille variable (cavité microscopique à plusieurs centimètres de diamètre), solitaire ou multikystique.

L'atteinte du cervelet est d'intensité variable et de distribution multifocale, caractérisée par une déplétion de la couche granuleuse et une perte importante des cellules de Purkinje. De petites cavités cérébelleuses sont décrites dans de rares cas.

Le tronc cérébral présente la plus grande conservation de son organisation. Le manque de neurones est cependant visible mais c'est dans le tronc cérébral qu'on observe la majorité des atteintes modérées des neurones (chromatolyse et hyperéosinophilie). En revanche, chez les individus les plus atteints, les faisceaux cortico-spinaux sont manquants.

Microscopiquement, les lésions de la moelle épinière sont les plus fréquentes : tous les agneaux à l'exception d'un seul et tous les veaux à l'exception de quatre présentaient des lésions microscopiques. Les animaux sans lésion de la moelle épinière présentaient de petites atteintes du cerveau ou du cervelet mais sans arthrogrypose ou scoliose. Les lésions sont les plus intenses au niveau des cornes ventrales. Dans les cas les plus sévères, la substance grise est complètement désorganisée avec une quasi disparition des neurones moteurs. La substance blanche intensément

démyélinisée et les funiculi ventraux et latéraux sont parfois absents, laissant la place à un tissu fibreux lâche avec prolifération vasculaire. Les cornes dorsales sont également touchées mais avec une moins grande intensité. En revanche, le funiculus dorsal n'est jamais atteint. Les ganglions spinaux sont également non affectés.

L'inflammation accompagnant ces lésions a été décrite de manière fouillée par Herder et collègues en 2013. Les faits saillants sont les suivants :

- l'inflammation est rare au niveau du système nerveux central (18,3% des cas de SBV mais particulièrement rare chez les fœtus bovins (ovins : 28,3%, bovins : 2,9%) ;
- les individus sans inflammation n'ont pas moins de malformations ;
- le mésencéphale qui est le moins affecté macroscopiquement est celui qui est le plus souvent infiltré, il est également très souvent positif en IHC (66,7%) ;
- les cellules positives en IHC sont les neurones, bien que certaines cellules positives présentent les critères morphologiques des astrocytes ;
- le lobe temporal est le plus atteint par la porencéphalie qui est symétrique et accompagnée de *gitter cells* (macrophages spumeux), d'amas de microglie, d'hemosidérose et d'une démyélinisation périphérique. Les plus importantes concentrations de virus (IHC) sont détectées dans les foyers de malformation, comme la porencéphalie ;
- la présence du virus (IHC) est détectée chez les individus sans inflammation (32,8%) mais elle est bien plus fréquemment détectée chez les individus présentant de l'inflammation (93,3%) ;
- les cellules inflammatoires sont principalement CD3+ (lymphocytes T), à l'exception du cas d'un veau présentant une inflammation dominée par des CD79α+ (lymphocytes B).

Les conclusions principales associées à ces observations sont :

- l'un des facteurs clefs qui conditionne le fait d'observer de l'inflammation chez un fœtus infecté par SBV semble donc être le temps écoulé après l'infection. Pour le veau, la gestation plus longue de quatre mois que celle de l'agneau, permet probablement une résolution du phénomène inflammatoire associé à la *clearance* du virus. La persistance de virions ou de protéines virales en grande quantité semble favoriser la persistance du phénomène inflammatoire.
- la porencéphalie induite par SBV est liée à des foyers de multiplication intense du virus. Les observations concordent avec une porencéphalie de type I (liée à de la nécrose et de l'hémorragie).
- le mésencéphale présente une atteinte macroscopique moins marquée qui semble contradictoire avec la présence importante de virus et d'inflammation au niveau microscopique. La grande quantité de virus détectable fait du mésencéphale une cible

importante pour le diagnostic par RT-PCR (De Regge *et al.*, 2013) des nouveau-nés malformés. Par ailleurs, ces observations suggèrent que les neurones du mésencéphale résistent plus longtemps à l'infection par SBV que ceux des autres parties du SNC.

Les lésions microscopiques musculaires sont dominées par une irrégularité de la taille des fibres (nombreuses fibres de petite taille) et un remplacement du tissu par un réseau de fibres de collagène et d'adipocytes.

Pathogénie

La description des lésions résumée ci-dessus, associée aux données issues d'infection expérimentale, permet de dresser les grandes lignes de la pathogénie des lésions *in utero*.

- a) Le virus colonise le système reproducteur des femelles gestantes avec un tropisme particulier pour les zones de placentation (Martinelle *et al.*, 2015). Sa réPLICATION au niveau des cotylédons s'accompagne de dégénérescence et de nécrose sur environ 5 à 10% de la surface (Laloy *et al.*, 2017). *In fine*, les cotylédons infectés sont significativement plus petits que les cotylédons des femelles contrôles. Ces lésions primaires pourraient être à l'origine d'une hypoperfusion des fœtus et être la cause des mortalités précoces des embryons/fœtus et, par là, de la diminution de la prolifératiON des troupeaux infectés (Saegerman *et al.*, 2014). La colonisation des cotylédons est un phénomène aléatoire qui peut conduire, chez les espèces polytoques, à l'infection d'une partie seulement de la portée. Laloy et collègues décrivent bien dans leur expérimentation l'atteinte d'une seule corne et l'infection limitée aux petits de cette corne. En outre, la colonisation des cotylédons et des structures extra-embryonnaires semble être plus efficace au jour 42 de la gestation qu'au jour 28.
- b) L'infection des cotylédons permet la colonisation des fœtus. Chez Laloy *et al.*, 2017, au jour 28 de la gestation, la moitié des fœtus sont infectés, au jour 42 l'ensemble des fœtus sont atteints.
- c) La dynamique d'infection au niveau du fœtus semble passer par une première phase de virémie avec amplification du virus dans de multiples organes avant de se concentrer au niveau du système nerveux central. L'ensemble du fœtus semble participer à l'amplification du virus avec des tissus aussi divers que : les cartilages, les muscles, le myocarde, les structures oculaires et intestinales, ainsi que les parenchymes rénaux, hépatiques et pulmonaires, jusqu'aux tissus nerveux de l'encéphale et la moelle épinière. Les valeurs de Ct les plus basses sont observées dans les muscles squelettiques, les reins et le cœur. L'immunomarquage de la protéine N suggère que le rein serait un organe privilégié d'amplification virale. L'une des hypothèses pour expliquer l'arthrogrypose (issue de la comparaison avec AKA) a été cette forte amplification au niveau musculaire

pendant la vie fœtale. Laloy et collègues, 2017, investiguent la conséquence de la multiplication virale au niveau des muscles en recherchant des lésions microscopiques et en mesurant le taux d'apoptose (IHC : caspase-3) et de multiplication (IHC : KI67) au niveau des myocytes. Aucune lésion microscopique n'est détectée et le marqueur d'apoptose ne diffère pas significativement entre les fœtus infectés et les cas contrôles. Seul le KI67 est plus élevé chez les fœtus infectés. Ces éléments suggèrent que l'infection des myocytes n'a que peu de conséquences cliniques.

- d) Cette virémie permet au virus de gagner le système nerveux central. Le virus se multiplie de manière préférentielle dans les neurones et les cellules précurseurs des neurones. Cette infection neuronale est à l'origine de foyers de malacie (Varela *et al.*, 2013) accompagnés d'hémorragies (Laloy *et al.*, 2017). Ces premières lésions semblent être à l'origine des cavités de porencéphalie détectées à l'issue de la gestation. L'infection des neurones semble homogène sur l'ensemble de l'encéphale. Les structures de l'encéphale qui semblent les moins lésées (diencéphale, mésencéphale) présentent à la naissance une grande quantité de neurones infectés (De Regge *et al.*, 2013; Hahn *et al.*, 2013). Il se pourrait donc que certaines populations de neurones soient plus résistantes que d'autres à l'infection.
- e) La moelle épinière est également atteinte. La population des motoneurones de la corne ventrale est particulièrement sensible (Peperkamp *et al.*, 2015). Leur disparition induit une dénervation et une absence de stimulation des muscles somatiques. Il en découle une atrophie (pour les fibres déjà présentes) de dénervation des muscles suivie d'une fibrose et d'infiltration d'adipocytes. Les muscles fibrosés figent le fœtus en une position définitive qui aura pour conséquence l'ankylose des articulations et la déformation osseuse. Il est étonnant de constater, dans l'expérience de Laloy et collègues, le faible taux d'infection des neurones de la moelle épinière alors que Peperkamp et collègues décrivent l'atteinte de la moelle épinière comme la plus fréquente des lésions. Il se pourrait donc que l'infection massive des neurones de la moelle épinière soit décalée dans le temps et que la fenêtre de sensibilité de cette population de neurones soit plus tardive dans le développement du fœtus. C'est d'ailleurs ce que tendrait à confirmer la pathogénie d'AKAV dans laquelle les fœtus infectés avant 105 jours de gestation ne présentent que peu d'arthrogrypose (et donc peu d'atteinte de la moelle). Pour SBV, étant donné que les lésions de l'encéphale sont le plus souvent couplées avec l'atteinte de la moelle, on pourrait supposer que l'infection des motoneurones se ferait dans une seconde phase plus tardive d'amplification du virus.

Diagnostic étiologique

La confirmation étiologique des mort-nés liés à SBV est parfois difficile (van Maanen *et al.*, 2012), notamment chez le veau dont la longueur de la gestation favorise la *clearance* virale. Les conseils que l'on peut appliquer pour améliorer la détection sont :

- combiner la détection de l'ARN avec la mise en évidence des IgG (van Maanen *et al.*, 2012) ;
- pour l'extraction d'ARN : utilisation d'un protocole basé sur le Trizol® (Hoffmann *et al.*, 2013) qui améliore la sensibilité ;
- préférer la RT-PCR mise au point par le FLI ciblant le segment S plutôt que le L (De Regge *et al.*, 2013) ;
- le choix des organes : liquide amniotique, cordon ombilical, méconium (Bilk *et al.*, 2012) et système nerveux central (mésencéphale et moelle épinière) (De Regge *et al.*, 2013).

Caractéristiques du virus et cycle viral

Virion

Le virus de Schmallenberg est un *Orthobunyavirus*. La nouvelle classification adoptée par l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* range l'espèce *Schmallenberg orthobunyavirus* dans le genre *Orthobunyavirus* appartenant à la famille *Peribunyaviridae* de l'ordre des *Bunyvirales*. Le genre *Orthobunyavirus* compte 88 espèces.

Le virion du SBV reprend les caractéristiques classiques des *Orthobunyavirus*. L'enveloppe externe est hérissée d'hétérodimères formés des protéines transmembranaires Gc et Gn (Fig. 7a). Les estimations de la composition brute des virions des *Peribunyaviridae* sont : RNA 2%, protéines 58%, lipides 33%, glucides 7% (Knipe *et al.*, 2013).

Les trois segments d'ARN à polarité négative sont empaquetés par la protéine N multimérisée. Outre la protection de l'ARN, la protéine N assure l'ancrage de la polymérase virale aux segments d'ARN et assure la stabilité du virion en liant l'extrémité carboxy-terminale des protéines Gn-Gc (Plyusnin and Elliott, 2011).

Gé nome

Description

A l'instar des autres espèces du genre *Orthobunyavirus*, SBV présente un gé nome segmenté, composé de trois molécules d'ARN de polarité négative (Tarlinton *et al.*, 2012). La plus large (segment L) compte 6865 nucléotides (nt) et encode la protéine L (Fig. 7b), la polymérase virale (*RNA-dependent RNA polymerase*). Le segment moyen (M, 4415nt), encode les deux glycoprotéines membranaires Gn et Gc ainsi qu'une protéine non-structurale, la protéine NSm. Enfin, le segment le plus petit (S, 830nt) encode la nucléoprotéine N mais également la seconde protéine non-structurale NSs. Les extrémités 3' et 5' sont conservées parmi les *Peribunyaviridae*. Elles permettent la formation de molécules d'ARN circulaires, fermées par des liens non-covalents. Elles forment, avec la protéine N, trois nucléoprotéines individuelles dont la composition est estimée à 4% de ARN et 96% de protéines (Knipe *et al.*, 2013).

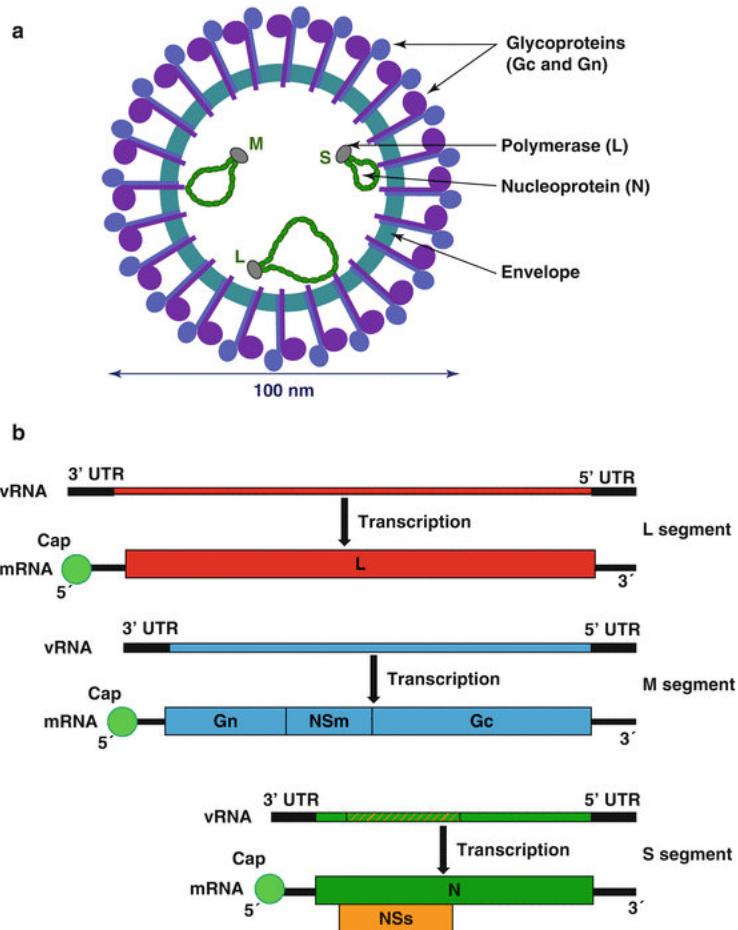


Figure 7: Vue schématique du a) virion et b) génome du virus de Schmallenberg (Doceul et al., 2017).

Réassortiment

La conséquence directe pour un virus de posséder un génome segmenté est la capacité à créer de nouveaux virus par réassortiment (Plyusnin and Elliott, 2011). L'évolution génétique des virus peut se faire par trois mécanismes principaux : les mutations, la recombinaison et le réassortiment. Le réassortiment est d'une grande efficacité et de nombreux exemples de virus ayant modifié leur tropisme hôte/vecteur, évadé l'immunité adaptative ou modifié la pathogénie de la maladie qu'ils induisent (Tarlinton et al., 2012; Wernike et al., 2016) sont décrits. D'ailleurs, dans le cas du SBV, dès les premiers mois qui ont suivi sa découverte, le processus de réassortiment est apparu comme central. Deux études phylogénétiques ont décrit SBV, l'une comme un virus réassorti dont les segments S et L provenaient du virus Shamonda et le segment M du virus Sathuperi (Yanase et al., 2012), et l'autre comme un ancêtre du virus Shamonda mais appartenant à l'espèce *Sathuperi virus* (Goller et al., 2012). La condition de survenue pour un tel réassortiment est la co-infection d'une cellule par différents virus. Pour les *Orthobunyaviruses*, il a été démontré qu'après 16 heures d'infection dans une cellule de mammifère, il n'y a plus de possibilité pour une seconde infection de se produire (Wernike

et al., 2016). Dans une étude récente (Coupeau *et al.*, 2019), testant *in vitro* la capacité des virus Sathuperi et Shamonda à produire des virus réassortis, les auteurs dégagent une tendance différente de l'évolution des virus réassortis suivant le contexte cellulaire : en cellules de mammifères, les virus réassortis sont très nombreux mais une forte pression de sélection s'exerce au fil des passages, alors qu'en cellules d'insectes, le taux de virus réassortis est moindre mais en revanche la persistance des descendants réassortis est plus importante. Enfin, une dernière étude démontre l'importance pour la viabilité d'un virus réassorti d'une combinaison N et L très proche pour permettre une bonne transcription et réplication du virus réassorti (Tilston-Lunel *et al.*, 2017). Cette même étude démontre que le duo de protéines N et L de SBV possède une capacité à transcrire et répliquer une large variété de génomes d'*Orthobunyavirus*. Ainsi, les auteurs démontrent la viabilité d'un virus réassorti dont les segments L et S proviennent de SBV et le segment M provenant du virus Oropouche. Ce dernier étant un agent pathogène humain, ce résultat met en perspective quelles pourraient être les conséquences pour la santé publique du mécanisme de réassortiment chez les *Orthobunyavirus*.

Stabilité génétique

En comparaison du mécanisme de réassortiment qui est largement à l'œuvre chez les *Orthobunyavirus*, le mécanisme de recombinaison est quasiment absent (estimé en conditions expérimentales à moins de 0,66% (Coupeau *et al.*, 2019)) et le mécanisme de mutation est très limité. En effet, bien qu'un taux de mutation très élevé soit l'apanage des virus à ARN, les arbovirus font face à la nécessité de rester adaptés à deux univers cellulaires aussi différents que les cellules de mammifères et d'insectes. Ils subissent donc une pression de sélection intense (effet de goulot d'étranglement - *bottleneck*) qui maintient *de facto* une stabilité génétique importante (Forrester *et al.*, 2014). La nécessaire adaptation du virus pour son vecteur a été démontrée expérimentalement avec le virus de l'Encéphalite équine vénézuélienne et de son vecteur (Kenney *et al.*, 2012). L'effet de goulot d'étranglement au niveau du tube digestif est très important quand le virus est ingéré par une souche du vecteur issue du laboratoire. En revanche, l'étranglement est beaucoup moins important quand le virus est ingéré par la souche locale du vecteur avec qui le virus a longuement co-évolué.

Cette stabilité génétique se retrouve dans le cas de SBV (Hofmann *et al.*, 2015; Wernike and Beer, 2017). Par exemple, en trois ans, parmi les virus issus d'animaux virémiques en Allemagne, le niveau de mutation maximum est de quatre acides aminés (Wernike *et al.*, 2015a). Parmi ces mutations, les substitutions de Lysine (K) -> Acide Glutamique (E) en positions 746 et 1340 par rapport à la souche initiale de 2011 se retrouvent constamment dans les virus circulants et apparaissent donc comme une adaptation aux conditions européennes.

Deux exceptions à cette stabilité génétique qui caractérise SBV nécessitent d'être signalées :

- D'une part, comme les protéines Gn et Gc (cf. infra) sont les plus immunogènes, le segment M présente des îlots d'hypervariabilité (Coupeau *et al.*, 2013a; Fischer *et al.*, 2013) qui sont supposés donner au virus une certaine capacité d'évasion face à la réponse immune de l'hôte. En effet, dans un contexte d'expériences préliminaires de vaccination (Boshra *et al.*, 2017), la partie N-terminale ciblée par la réponse immunitaire vaccinale contient cette séquence hypervariable.
- D'autre part, le seul cas où le virus se soustrait à cette pression de sélection est l'infection *in utero*. En effet, pendant plusieurs mois, le virus se multiplie chez un seul hôte permettant à la diversité génétique naturelle des virus à ARN de s'exprimer. Les virus issus de fœtus malformés présentent donc une dérive génétique beaucoup plus importante (Hulst *et al.*, 2013; Izzo *et al.*, 2016). Pour cette raison, en 2019, les chercheurs du FLI (Wernike and Beer, 2019) ont publié un article visant à mettre en garde contre la phylogénie de SBV basée sur des prélèvements fœtaux. Enfin, une étude récente (Hellert *et al.*, 2019) montre qu'une partie de ces mutations accumulées chez les fœtus se concentrent dans la partie de Gc reconnue par les anticorps neutralisants et pourrait donc être le fruit d'une sélection induite par la pression immunitaire.

Protéines

Dans cette partie, les informations générales relatives sont tirées de *Bunyaviridae : Molecular and Cellular Biology* de Plyusnin and Elliot, 2011. Seules les références aux éléments spécifiques à SBV seront référencées.

ARN polymérase – L

La protéine L est une polymérase qui est encodée par le segment L. Elle est définie comme une *RNA-dependent RNA polymerase*. Sa fonction est donc de catalyser les deux synthèses d'ARN nécessaires au cycle viral, la transcription et la réPLICATION. Les études de localisation démontrent qu'elle se concentre dans le cytoplasme en région périnucléaire. Elle est colocalisée avec la nucléoprotéine et s'ancre dans les membranes intracellulaires.

Glycoprotéines – Gn/Gc

Ces deux protéines sont produites à partir du segment M. Elles possèdent les caractéristiques des protéines membranaires intégrales de type I (ce qui implique qu'elles traversent une fois la membrane dans laquelle elles sont ancrées et que leur extrémité carboxy-terminale pointe vers le cytosol). Elles possèdent trois sites de N-glycosylation qui revêtent une importance majeure pour la réalisation du cycle viral. Gc est nettement plus large que Gn (respectivement 110kDa et 35kDa). Elle

comporte en outre un domaine qui lui permet d'agir comme une protéine de fusion de classe II. Cette fonction est nécessaire au relargage du matériel génétique du virus à l'issue de l'endocytose.

Les deux protéines forment des hétéro-multimères prenant la forme de tripodes (Hellert *et al.*, 2019) ancrés dans l'enveloppe virale. Ces pointes protéiques, hérisées dans la bicouche lipidique enveloppant le virus, assurent l'ancrage du virus sur la membrane des cellules cibles. Le récepteur n'est pas connu mais la variété des cellules que le virus peut infecter laisse présager d'un récepteur très ubiquiste. Le complexe Gn-Gc assure également la fusion des membranes qui survient lors de l'acidification de l'endosome (Bowden *et al.*, 2013) et qui permet le relargage du matériel génétique du virus dans le cytoplasme. Il est démontré que les anticorps neutralisants les *Orthobunyavirus* ciblent ces glycoprotéines.

Varela *et al.*, 2016, ont démontré, dans une élégante étude basée sur le phénotype inattendu d'un virus passé 32 fois en culture cellulaire, que la protéine Gc du virus de Schmallenberg avait un rôle important dans l'inhibition de la synthèse des protéines de l'hôte (cf. cycle viral), rôle qui était jusqu'à présent principalement attribué à la protéine NSs. Une seule mutation chez Gc conférerait à la protéine une puissance inhibitrice du métabolisme protéique cellulaire pouvant compenser une protéine NSm déficiente et, donc, induire une dépression de la réponse interféron (IFN). Cette expérience étant conduite en modèle murin, la capacité d'infection de ce mutant reste cependant à tester chez les ruminants, l'hôte naturel du virus.

Une autre expérience construite sur base d'une collection d'anticorps monoclonaux et de sérums polyclonaux neutralisants et de l'expression de protéines tronquées démontre que la neutralisation cible la partie amino-terminale de la protéine (Wernike *et al.*, 2017). Le signal de ces anticorps est fortement diminué lorsque les ponts disulfures de la partie N-terminale de Gc sont supprimés. Gn, qui contient le signal de localisation vers l'appareil de Golgi, ne semble pas impliquée dans l'entrée du virus. D'ailleurs, la conformation en trois dimensions des pics de glycoprotéines du virus Bunyamwera démontre que Gn est très peu accessible aux interactions (Bowden *et al.*, 2013). Ultérieurement, Roman-Sosa *et al.*, 2017, démontrent que la sécrétion et la conformation tridimensionnelle de Gc sont dépendantes de la glycosylation et de la présence des ponts disulfures. Ils précisent également que les épitopes essentiels à la neutralisation sont au nombre de deux, leur existence étant intimement liée à la présence des ponts disulfures. Les épitopes protecteurs sont en effet non linéaires et n'existent physiquement qu'une fois la protéine en conformation tridimensionnelle définitive.

Protéine non-structurale – NSm

La protéine NSm est le fruit du clivage de la polyprotéine issue du segment M. Elle se trouve en position centrale au sein de la polyprotéine, flanquée de Gn d'un côté et de Gc de l'autre. A l'instar de

Gc et Gn, elle semble posséder les propriétés d'une protéine membranaire intégrale. Elle est composée de cinq domaines (I, III, V : hydrophobes et II, IV : hydrophiles). Ses fonctions sont beaucoup moins bien connues que pour les autres protéines. Il semble qu'en cellules de mammifères, son extrémité N-terminale soit essentielle à la maturation des deux glycoprotéines. Par génétique inverse, l'étude de mutants montre que les versions ne possédant pas les domaines I et II ne peuvent être récupérées (Kraatz *et al.*, 2018). La même étude démontre que le domaine IV est responsable de sa localisation dans le Golgi. Elle possède, en outre, une capacité d'interaction avec l'extrémité de C-terminale de Gn.

Les fonctions de cette protéine sont probablement importantes dans le cycle extrinsèque. Par exemple, des mutations de NSm pour le virus de La Crosse ont été associées à des phénotypes de « super-infection » chez le moustique vecteur avec une dissémination du virus beaucoup plus large dans l'organisme du vecteur (Reese *et al.*, 2010) et notamment un ciblage des ovaires et une capacité à induire une transmission transovarienne (Bergren and Kading, 2018).

Nucléoprotéine – N

La nucléoprotéine est encodée par le segment S. La fonction principale de la nucléoprotéine est de protéger les molécules d'ARN viral de leur dégradation dans l'environnement cellulaire en formant une ribonucléoprotéine (RNP). Leur structure tridimensionnelle montre un sillon d'ancrage de la molécule d'ARN (Dong *et al.*, 2013a). Lorsque la RNP se forme, les nucléoprotéines s'organisent en tétramère dessinant un anneau dans lequel l'ARN, ancré dans la zone centrale, est protégé. Un changement de conformation avec rotation à 180° de la protéine N est suspecté pour permettre l'accès de la RdRp à la molécule d'ARN (Dong *et al.*, 2013b) et ainsi favoriser la transcription et la réPLICATION. En dehors de ce rôle fondamental, la protéine N est impliquée dans de multiples fonctions : (i) interaction avec la RdRp, (ii) interaction avec l'extrémité C-terminale de Gn et Gn pour stabiliser la structure du virion, (iii) interaction avec certaines protéines de la cellule hôte comme poly(A)-binding protein, et (iv) basculement de la transcription vers la réPLICATION.

Les animaux infectés produisent une part importante d'anticorps orientés contre la protéine N (Wernike *et al.*, 2015b). L'immunisation contre cette unique protéine est protectrice en modèle murin (Boshra *et al.*, 2017).

Protéine non-structurale – NSs

La protéine NSs est produite à partir d'un cadre de lecture présent sur le segment S mais décalé et recouvrant (*overlapping*) le cadre de lecture de la protéine N. La protéine est largement hydrophobe. Au cours de l'infection en cellules de mammifères, elle se localise principalement dans le noyau et dans des structures granulaires situées dans le cytoplasme en périphérie du noyau.

La protéine n'est pas nécessaire à la viabilité du virus mais possède un très fort impact sur la virulence en cellules de mammifères. En revanche, en cellules d'insectes, le mutant délété en NSs ne présente pas d'atténuation en comparaison avec le virus sauvage. De plus, aucune des fonctions connues pour NSs en cellules de mammifères n'a pu être transposée en cellules d'insectes.

La fonction de NSs qui a été le plus rapidement mise en évidence est l'inhibition de la réponse interféron. Plusieurs études, basées sur de la génétique inverse, confirment l'absence de réponse IFN dans les cellules infectées par le virus sauvage et, au contraire, une réponse forte chez les mutants délétés (Elliott *et al.*, 2013; Varela *et al.*, 2013). Varela et collègues démontrent, en outre, que le mutant délété NSs provoque une maladie similaire au virus sauvage en souris IFNAR^{-/-}, démontrant sa virulence dans un contexte marqué par l'absence de réponse IFN.

Barry *et al.*, 2014, ont mis en évidence que le mécanisme de blocage de la réponse interféron est en réalité une inhibition générale de la production d'ARNm. NSs parvient à ce résultat en ciblant la sous-unité RPB1 de la ARN polymérase II et provoque sa dégradation précoce par les protéasomes.

Dans cette même étude, les auteurs présentent une augmentation des caspases 3/7 activées liées à la présence de NSs, ce qui tend à démontrer que la protéine est également une promotrice de l'apoptose des cellules infectées. Cette induction de l'apoptose est confirmée par Aksoy et Azkur, 2019.

De plus, l'étude du transcriptome cellulaire suite à l'infection de SBV comparée à un mutant délété en NSs confirme l'effet inhibiteur fort de la protéine sur la transcription (Blomström *et al.*, 2015). Dans cette étude, cependant, huit gènes, tous à effets antiviraux (comme, par exemple, la vipérine et la MX1), restent actifs, bien que de manière atténuée.

Enfin, Gouzil *et al.*, 2017, démontrent que NSs possède un signal de localisation vers le nucléole. Elle s'accumule, au cours des premières heures, dans le nucléole et provoque sa désorganisation.

Cycle viral

Le cycle viral de SBV suit les étapes du cycle classique des *Orthobunyavirus*. Les étapes de ce cycle sont donc décrites ci-dessous (Fig. 8).

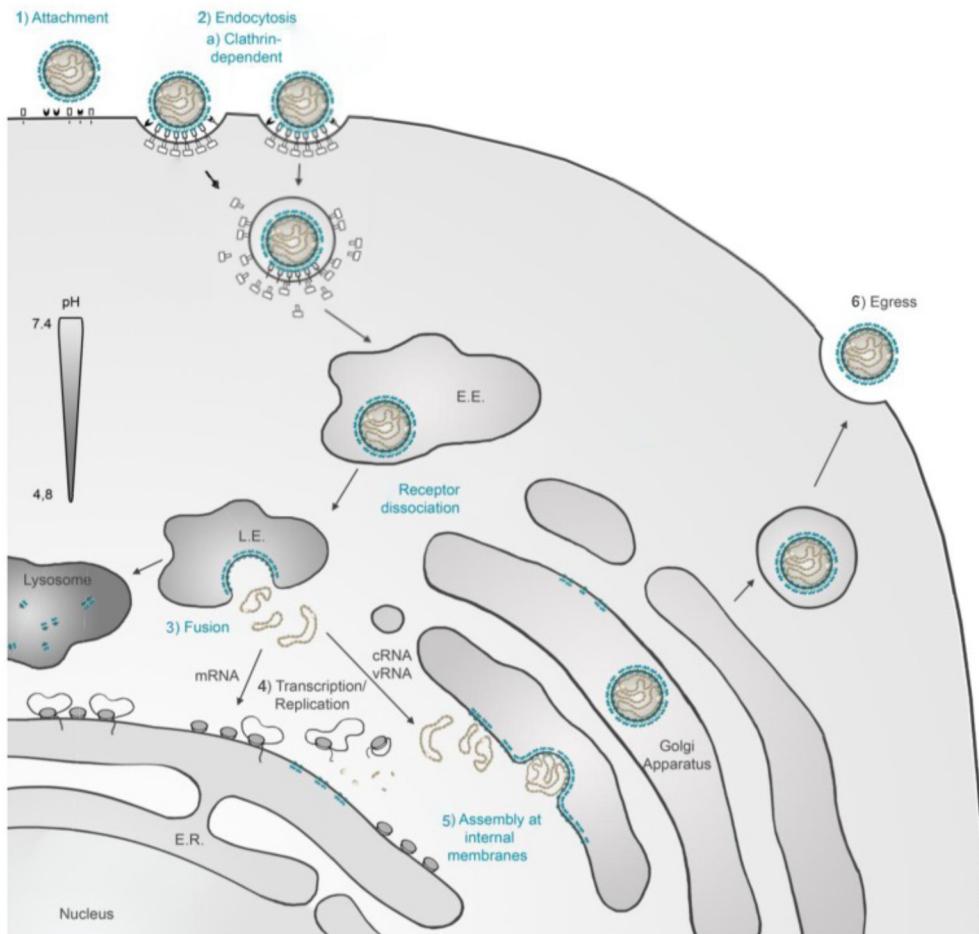


Figure 8: Etapes classiques du cycle des *Orthobunyavirus* (Cifuentes-Muñoz et al., 2014). E.E. : early endosome ; L.E. : late endosome.

1-Attachement

La première étape est l'attachement à la membrane de la cellule hôte. Comme précisé ci-dessus, l'attachement est médié par les glycoprotéines et principalement par Gc. Le récepteur cellulaire est inconnu, mais vu l'étendue des populations cellulaires sensibles au virus, le récepteur est probablement une molécule ubiquiste. La présence de Gn semble nécessaire pour que Gc adopte une conformation qui expose les sites d'attachement. Au niveau du cycle chez l'arthropode vecteur, il semble que Gn participe plus directement à l'attachement du virus sur les cellules du tube digestif du vecteur (Knipe et al., 2013).

2-Endocytose

L'endocytose est basée sur les molécules de clathrine. Elle peut donc être bloquée par le sucre et la chlorpromazine.

3-Fusion

La fusion est la conséquence de l'acidification de l'endosome. Cette baisse de pH induit un changement de conformation qui expose le domaine de fusion de Gc. La fusion a pour conséquence le largage des molécules de nucléoprotéines dans le cytosol.

4-Transcription et réPLICATION

La synthèse est associée aux membranes périnucléaires. L'ARN qui serait libre ne peut servir de patron à la transcription. Il doit obligatoirement être associé à la protéine N. Les promoteurs de la réPLICATION sont les extrémités 3' et 5' des molécules de vARN. Pour cette fonction, leur complémentarité semble aussi importante que leur séquence elle-même.

La transcription primaire est basée sur un système de « vol de coiffe » (*cap snatching*) qui recycle, dans le cytoplasme, les mARN maturés de la cellule. Ce *cap snatching* est assuré par la fonction d'endonucléase de la polymérase L. Il a été étudié en détails pour SBV (Coupeau *et al.*, 2013b). Les séquences des coiffes sont variables. Il semble que la longueur de la coiffe induise un comportement différent de la polymérase : pour les coiffes les plus longues, la polymérase transcrit directement le vARN, pour les coiffes plus courtes, la polymérase opte pour une technique « d'amorçage et réalignement » (*prime and realign*) qui ajoute quelques nucléotides supplémentaires à la séquence.

La terminaison ne s'accompagne pas d'un motif polyA. Coupeau *et al.* confirment l'absence de queue polyA. Ils proposent, pour le segment S, un motif en « épingle à cheveux » (*hairpin*), conservé chez de nombreux *Orthobunyavirus*, qui pourrait avoir un rôle dans la substitution à la queue polyA.

Il semble que les *Orthobunyavirus* couplent la traduction à la transcription. En l'absence de ribosomes actifs sur le mARN, la polymérase interrompt précocement la transcription.

La réPLICATION vise à produire une molécule d'antigénome, un ARN à polarité positive sans coiffe et complet dont l'extrémité 3' s'étend jusqu'à l'extrémité 5' du vARN. Le signal qui induit le passage de la transcription à la réPLICATION n'est pas connu. L'une des hypothèses est que la concentration élevée en protéine N (protéine la plus produite) pourrait être le facteur déclenchant de ce changement d'activité de la polymérase.

5-Assemblage du virion

L’assemblage du virion se produit au niveau de l’appareil de Golgi. Lorsque la polyprotéine M est processée, c’est Gn qui contient le signal de localisation vers l’appareil de Golgi et qui entraîne l’hétéro-multimère Gn-Gc vers cette organelle (Roman-Sosa *et al.*, 2016). La nucléoprotéine s’accumule dans le cytoplasme avant d’être transportée vers l’appareil de Golgi, probablement le long des filaments d’actine.

L’encapsidation est un point critique pour tout virus dont le génome est segmenté, la difficulté étant d’empaqueter tous les segments d’ARN. Les facteurs d’encapsidation sont contenus dans les extrémités 3’ et 5’. Il semble que les signaux d’encapsidation n’aient pas tous la même efficacité et que, si le taux d’encapsidation n’est pas le même pour tous les segments, un mécanisme de régulation est probablement à l’œuvre qui permet de garantir la présence des trois segments (Knipe *et al.*, 2013).

6-Sortie

Les virions s’accumulent dans l’appareil de Golgi avant d’être transportés dans des vésicules d’exocytose et sont relargués dans le compartiment extracellulaire lors de la fusion de cette vésicule.

Effet de la réPLICATION sur la cellule hôte

La sensibilité des cellules au cycle viral dépend de l’organisme dont elles proviennent. En effet, les *Bunyavirales* ont, le plus souvent, un cycle lytique en cellules de mammifères et non-lytique en cellules d’arthropodes.

Cette différence de destin cellulaire signe un « choix » tactique du virus qui n’a besoin que d’un passage transitoire chez son hôte mammifère alors que, en revanche, il lui est nécessaire de mener une infection au long cours chez son insecte vecteur. Le cycle non-lytique en cellule d’insectes est donc, pour le virus, la possibilité de persister dans les tissus du vecteur. Il est d’ailleurs intéressant de noter que chez les hantavirus, qui sont les seuls *Bunyavirales* à persister chez un mammifère, le cycle viral en cellules de mammifères n’est pas lytique (Knipe *et al.*, 2013).

Vecteur

La découverte, en 2011, d'un virus proche de AKAV et des autres *Orthobunyavirus* transmis par des insectes vecteurs a d'emblée permis de suspecter une maladie à transmission vectorielle. Le vecteur le plus rapidement suspecté, et confirmé, a été le culicoïde (*Diptera : Ceratopogonidae*).

Définition

L'OMS décrit, en 1961, les critères de reconnaissance d'une espèce en tant que vecteur :

- isoler le virus en l'absence de tout sang visible dans l'organisme d'insectes sauvages capturés ;
- détecter une virémie chez les membres de l'espèce suspectée suite à un repas sanguin sur un vertébré infecté ou en conditions expérimentales de laboratoire ;
- démontrer la capacité à transmettre le virus après piqûre ;
- accumuler les preuves de terrain confirmant une association significative entre l'arthropode infecté et la population de vertébrés présentant les signes de l'infection.

Dans le contexte du SBV, l'élevage en laboratoire avec prise de repas sanguin n'est pas, à l'heure actuelle, maîtrisé pour le principal culicoïde suspecté, *C. obsoletus*. La preuve de la capacité vectorielle se base donc sur la détection du matériel génétique du virus en quantités suffisantes pour être compatibles avec une transmission.

Plusieurs méthodes sont décrites :

- Rasmussen *et al.*, 2012, testent la présence du virus dans les pools de culicoïdes par qRT-PCR. L'hypothèse que les résultats positifs ne proviennent pas de sang résiduel lié à un repas sanguin est confirmée par le résultat négatif de PCR ciblant les β-actines des bovins et des ovins.
- Elbers *et al.*, 2013, séparent les têtes des corps. Pour les échantillons positifs, ils comparent les Ct obtenus par qRT-PCR dans les têtes et dans les corps. Les Ct plus bas dans les têtes confirment l'amplification du virus et donc le rôle de vecteur.
- De Regge *et al.*, 2014, testent la présence de SBV dans les têtes des culicoïdes en ne sélectionnant que des femelles non engorgées ayant pondu.

Par ces méthodes, plusieurs espèces ont été détectées comme vecteurs potentiels au premier rang desquels on trouve le complexe *Obsoletus* (comprenant : *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus*). D'autres espèces, avec une fréquence de détection moins grande, sont suspectées de propager le virus : *C. dewulfi*, *C. pulicaris* et, dans le sud de l'Europe, *C. imicola*.

Comme rappelé dans la partie traitant de l'épidémiologie de SBV, le rôle du vecteur dans la propagation du virus est capital. Son importance mériterait d'y consacrer une large partie, probablement équivalente à ce qui vient d'être développé pour le cycle intrisèque. Cependant, les expériences de cette thèse étant assez éloignées de la problématique des culicoïdes, ne seront rassemblés ici que les éléments essentiels de la biologie du vecteur principal, *C. obsoletus*.

Biologie du vecteur

Généralités

Les culicoïdes vivent en moyenne 10 à 20 jours. Cette durée de vie peut être exceptionnellement allongée pendant les périodes plus froides, jusqu'à 60 ou 90 jours (Balenghien *et al.*, 2010). Les mâles sont floricoles. Ils se nourrissent de nectar, de pollen et de jus de matières organiques en décomposition. Ils sont observés principalement dans la végétation et au sommet des arbres. Les femelles sont observées plus près du sol, à proximité immédiate du bétail (Zimmer *et al.*, 2014a). Elles peuvent, dans certains cas, être plus nombreuses à l'intérieur des bâtiments qu'à l'extérieur lorsque les animaux sont rentrés pour la saison hivernale. Les femelles ont en effet besoin d'un repas sanguin pour la maturation de leurs œufs. Les entomologistes estiment qu'une femelle prend un repas sanguin tous les trois à quatre jours, la ponte survenant deux à quatre jours après le repas (Zimmer *et al.*, 2014a). On estime d'ailleurs qu'une femelle culicoïde passe 90% de son temps à digérer ses repas sanguins et à maturer ses œufs (Lassen *et al.*, 2012). Le comportement des femelles en attente de repas peut être assez agressif : il est estimé que les atterrissages de *C. impunctatus* sur le bras exposé d'un humain peuvent atteindre la fréquence de 635/min (Bessell *et al.*, 2013).

Les culicoïdes repèrent leur hôte en vue de repas sanguins au moyen d'organes sensoriels olfactifs (antennes et récepteurs maxillaires) capables de détecter des composés volatils (e.g. dioxyde de carbone, 1-octen-3-ol, acide lactique, phénols, acétone, ...) (Zimmer *et al.*, 2015). La taille de l'hôte semble donc jouer une rôle important suite, notamment, à une production importante de dioxyde de carbone (Koch et Axtell, 1979). Ce facteur pourrait expliquer la fréquence des repas sanguins en provenance des bovins.

Le cycle des culicoïdes comprend quatre stades larvaires. Les œufs éclosent deux à huit jours après la ponte. Le stade larvaire peut durer deux semaines en été (et plusieurs mois en saison froide) à l'issue duquel le développement atteint le stade de nymphe d'où émerge l'imago après deux à dix jours (Balenghien *et al.*, 2010). Le cycle larvaire de *C. obsoletus* est abondamment observé dans les résidus d'ensilage, dans les boues des ornières, dans la paille contaminée par des matières fécales et dans le fumier. *C. chiropterus* et *dewulfi* ont besoin de milieux à haute teneur en matières organiques et fréquentent ainsi les bouses des bovins (Zimmer *et al.*, 2014a). En Belgique, les restes de bouses

séchées sur les murs des étables se sont révélés compatibles avec le développement larvaire de *C. obsoletus* (Zimmer *et al.*, 2014b).

Au vu du lien intime qui existe entre le cycle de *C. obsoletus* et l'élevage bovin, on ne s'étonne pas de constater que les repas sanguins des femelles de ce complexe soient principalement composés de sang bovin. Les bovins sont d'ailleurs la principale source de repas sanguin des culicoïdes européens avec 77% des repas d'origine bovine (Lassen *et al.*, 2012). *C. obsoletus* est, en outre, l'un des culicoïdes les moins stricts dans ses habitudes alimentaires : ruminants domestiques et sauvages, équidés, souris, humains, ...

La saison d'activité des culicoïdes démarre au printemps pour se terminer à la fin du mois d'octobre. Les aléas météorologiques peuvent faire varier assez nettement la longueur des saisons (Linden *et al.*, 2012). A l'échelle européenne, la saison de *C. obsoletus* est la plus précoce sur toute la côte ouest de la France où elle démarre au mois de mars. Le démarrage s'étend progressivement vers l'est au fur à mesure des semaines qui passent et les régions le plus à l'est ont une saison démarrant au mois de mai (Cuéllar *et al.*, 2018).

Facteurs de dispersion

L'un des facteurs prépondérants expliquant la dispersion du virus est la dispersion du vecteur lui-même par les courants aériens. Les culicoïdes peuvent être transportés sur plus de 1 000 km par le vent (Tarlinton *et al.*, 2012). L'utilisation des modèles de dispersion des particules aériennes a été largement utilisé pour expliquer la dispersion de SBV par-delà les mers en Angleterre et en Irlande (cf. partie consacrée aux îles Britanniques).

En revanche, si les courants aériens peuvent expliquer la dispersion du virus sur de grandes distances, à un niveau plus local, ils ne suffisent pas à expliquer la dispersion. Par exemple, dans l'épidémie de BTV-8 en 2006 dans le nord de l'Europe, la circulation sous le vent des culicoïdes ne suffit pas à expliquer le nombre de fermes infectées. De plus, en utilisant une méthode de piégeage-marquage-recapture basée sur une aspersion d'ovalbumine (détectée ensuite par ELISA), Sanders *et al.*, 2017, détectent 84,4% des culicoïdes sous le vent et 15,6% des culicoïdes contre le vent. La capacité à rejoindre un lieu précis situé à plus de 1 km est démontré pour les culicoïdes du groupe *Pulicaris* (Kirkeby *et al.*, 2013a).

Kirkeby *et al.*, 2013b, ont suivi pendant deux mois la distribution des populations de culicoïdes dans une prairie dans laquelle pâtraient des moutons. Cette étude démontre que les culicoïdes ont une forte tendance à former des clusters de densité qui varient de jour en jour. Aucun des facteurs étudiés, pas même la présence des moutons, ne peut expliquer le phénomène. L'essaimage des femelles culicoïdes pourrait se faire autour de zones « mimant » la présence d'animaux, comme par exemple de larges objets sombres.

Enfin, une corrélation existe entre la zone de circulation du SBV en 2011 et la zone de sécheresse relative recensée par l'Observatoire Européen de la Sécheresse (Calzolari and Albieri, 2013).

Les études ciblant la biologie et les déplacements des culicoïdes mettent en évidence le manque de sensibilité des outils actuels en regard de la complexité de ces questions : par exemple, les techniques de piégeage-marquage-recapture permettent de suivre entre 0,5 et 2% des culicoïdes marqués (Kirkeby *et al.*, 2013a).

Overwintering

L'une des principales questions que pose la transmission vectorielle par les culicoïdes, sachant que la virémie chez l'hôte ne dure que quelques jours, est le passage de l'hiver. En effet, les populations de culicoïdes sont estimées par piégeage. Or, pendant les mois d'hiver, l'activité de piégeage tombe à zéro, poussant les auteurs à parler de saison libre de vecteurs (*vector free period*) (Cuéllar *et al.*, 2018). Il faut donc un mécanisme qui permette de passer ce « trou » d'activité vectorielle.

De Regge propose une revue des différentes pistes envisagées pour expliquer l'*overwintering*.

Voici le résumé commenté des pistes qu'il propose (De Regge, 2017) :

- la période libre de vecteurs est théorique et le cycle d'infection vecteur/hôte se poursuit à bas bruits :
 - plusieurs cas de SBV transmis en hiver sont avérés (King *et al.*, 2015; Wernike *et al.*, 2013c) ;
 - la présence d'adultes actifs est beaucoup moins importante mais elle est tout de même détectable (Lossen *et al.*, 2007; Mehlhorn *et al.*, 2009) ;
- la transmission transovarienne permettrait au virus de passer l'hiver dans les stades larvaires infectés :
 - la transmission transovarienne est avérée pour de nombreux arbovirus, le plus souvent chez le moustique, (Bergren et Kading, 2018) ;
 - des femelles nullipares ont été testées positives en Pologne (Larska *et al.*, 2013b) ;
 - le manque de modèles expérimentaux du cycle extrinsèque en laboratoire rendra difficile la validation de cette hypothèse ;
- une espèce de faune sauvage pourrait être le réservoir :
 - beaucoup de ruminants sauvages sont sensibles (cf. partie faune sauvage) ;
 - cependant, aucune espèce ne semble aussi sensible que les ruminants domestiques (cf. partie faune sauvage) ;

- les arrière-faix chargés en virus pourraient servir de point de réinfection pour les culicoïdes :
 - o à l'heure actuelle, aucune donnée ne permet de considérer que les culicoïdes s'alimentent sur une telle source ;
 - o il est cependant évident que la probabilité que des larves évoluant dans un tas de fumier se retrouvent en contact avec un arrière-faix hautement contaminé n'est pas nulle ;
 - o les connaissances sur la biologie du vecteur sont trop parcellaires pour savoir ce qu'il adviendrait d'un tel évènement ;
- les arrière-faix chargés en virus pourraient contaminer un bovin naïf qui les ingèrerait :
 - o la transmission orale semble inopérante (Martinelle *et al.*, 2017; Wernike *et al.*, 2013a) ;
 - o De Regge note cependant que la dose de virus d'un arrière-faix est sans commune mesure avec les doses infectantes expérimentales. Il se base également sur la description d'une telle transmission pour BTV (Menzies *et al.*, 2008) pour exclure d'emblée cette hypothèse ;
- de rares cas de veaux détectés positifs en PCR à l'autopsie, mais sans anticorps anti-SBV détectés, pourraient présenter des virémies récurrentes et servir de point de départ à une nouvelle circulation.

L'auteur de cet article pointe la première hypothèse comme étant la plus vraisemblable. Cette réflexion a pourtant le mérite de mettre en lumière, indirectement, le champ des connaissances qu'il faut acquérir avant de pouvoir définitivement statuer sur ces hypothèses.

Immunité

La réaction immunitaire mise en place lors d'une infection par le SBV n'a pas été étudiée de manière très approfondie. Cependant, les éléments connus de cette réponse immunitaire tendent à montrer qu'elle suit le schéma classique d'une réponse antivirale.

Réponse innée

La composante la plus étudiée de la réaction innée est la réponse interféron. En effet, dans son adaptation à son hôte mammifère, le SBV a acquis une capacité à inhiber la réponse interféron au moyen de sa protéine NSn (cf. partie consacrée aux protéines non-structurelles). Cette inhibition permet au virus d'installer une courte virémie de quelques jours suffisante pour une transmission aux populations de vecteurs hématophages en contact avec l'hôte. Aucun mécanisme de persistance à plus long terme chez l'hôte mammifère n'est connu à ce jour.

Dans cette thèse, l'interaction entre l'un des principaux effecteurs de la réponse interféron et le SBV est étudiée. Pour cette raison, dans les paragraphes qui suivent, la nature et le mécanisme d'action de cet effecteur, la protéine Mx1, sont largement décrits.

Réponse acquise

Réponse cellulaire

La réponse acquise cellulaire n'a pas fait l'objet de nombreuses études. Une seule a étudié clairement cette question au moyen d'un suivi dans le temps des populations de lymphocytes CD8+ et CD4+ dans le sang de bovins infectés expérimentalement (Wernike *et al.*, 2013a). Il en ressort que la *clearance* virale lors de primo-infections ne dépend pas principalement des lymphocytes cytotoxiques CD8+. En revanche, cette population de lymphocytes pourrait être importante dans la protection contre les réinfections. Ce rôle de l'immunité cellulaire adaptative dans la défense face aux réinfections par le SBV est indirectement mis en évidence par les études testant différents prototypes de vaccins. Dans une première étude (Wernike *et al.*, 2013b), les différents prototypes induisent une réponse en anticorps comparable mais, pour autant, n'offrent pas tous la même protection lors du challenge viral. A l'inverse, une autre étude, qui démontre qu'une seule injection de vaccin est suffisante pour protéger les agneaux contre une infection expérimentale avec le SBV (Hechinger *et al.*, 2014), révèle que le taux d'anticorps chez ces agneaux vaccinés est très bas, voire en-dessous du seuil de positivité de l'ELISA utilisé. Ce faible taux d'anticorps suggère que la protection de ces agneaux est probablement liée à une immunité cellulaire acquise.

Réponse humorale

La production d'anticorps circulant à la suite d'une infection par le virus SBV est mesurée dans de nombreux protocoles d'infection expérimentale. Cependant, dans la plupart des cas, la réaction humorale n'est pas l'objet central de ces recherches. La plupart de celles-ci détectent des anticorps spécifiques du SBV à l'issue de la première semaine post-infection (Laloy *et al.*, 2015; Martinelle *et al.*, 2017; Van Der Poel *et al.*, 2014).

Une étude s'est attachée à suivre le niveau des différents isotypes d'anticorps (IgM et IgG) pendant plus d'une année dans l'espèce ovine (Poskin *et al.*, 2015) : la détection d'IgM débute au 6^{ème} jour post-infection et persiste deux semaines ; la détection des IgG est plus variable, débutant entre le 10^{ème} et 21^{ème} jour, elle atteint un plateau au 28^{ème} jour et persiste pendant toute la durée de l'étude. Dans cette étude, la *clearance* virale en primo-infection est corrélée à l'apparition des IgM dans le sang, suggérant un rôle important de ces derniers dans le contrôle de la primo-infection. La persistance des IgG anti-SBV a été suivie en conditions d'infections naturelles. Ces IgG étaient présentes pendant l'entièreté de ces études. Ils persistent donc au moins quatre ans chez le mouton (Claine *et al.*, 2018) et six ans chez les bovins (Wernike *et al.*, 2018). Ces anticorps neutralisants ciblent notamment deux domaines de la protéine Gc qui sont composés de portions accolées suite au repli tridimensionnel de la protéine en lien avec la présence de ponts disulfures (Roman-Sosa *et al.*, 2016).

Protéine Mx

La protéine Mx1 bovine est issue du gène orthologue au gène de la MxA humaine. La MxA humaine étant particulièrement bien documentée, la description générale du fonctionnement des Mx se fera sur base des connaissances de la MxA. Ensuite, quelques particularités de la Mx1 bovine seront évoquées. Enfin les éléments principaux de l'interaction des Mx avec les *Orthobunyavirus* seront décrits.

MxA humaine

Généralités

Les informations qui suivent sont tirées de trois revues récentes (Haller *et al.*, 2015; Pilla-Moffett *et al.*, 2016; Zav'yalov *et al.*, 2018).

Les protéines Mx, dont le nom est une évocation de l'efficacité de la protéine pour inhiber le cycle des virus influenza (anciennement Myxovirus), ont été découvertes suite à l'observation fortuite d'une souche de souris résistant anormalement à l'inoculation intra-crânienne d'une souche neurotrophe de virus influenza (Haller *et al.*, 2018).

Ensuite, des souris exprimant la MxA humaine se sont avérées résistantes à une infection par un virus influenza hautement pathogène, ce qui démontrait la puissance de cet effecteur de l'immunité innée.

Il existe deux types de protéines Mx : la A et la B pour l'espèce humaine et, chez la majorité des mammifères (à l'exception notable du rat), les Mx 1 et 2 issues des gènes orthologues. La MxB possède également une activité antivirale mais relevant d'un tout autre mécanisme et dont la cible principale sont les lentivirus.

L'expression des gènes *Mx* est sous le contrôle exclusif des interférons de type I et III. Aucune autre cytokine ne peut induire leur expression. L'expression de ces gènes est donc un excellent marqueur de l'action des l'IFNs de type I et III.

Structure

La structure des Mx est fortement liée à leur fonction de GTPase (les Mx appartiennent de fait à la famille des *dynamin-like GTPase*).

La structure dépliée (Fig. 9) à elle seule ne permet pas de comprendre leur fonctionnement. A l'extrémité C-terminale, on trouve le domaine GTPase qui comporte le motif de lien avec la molécule de GTP. Ce motif est tripartite et sa grande conservation parmi les différentes espèces montre l'importance de la fonction GTPase pour la fonction des Mx. Le domaine GTPase est suivi par le domaine central (*middle domain, MD*) dont la présence est nécessaire à l'oligomérisation et l'interaction avec les protéines virales. Enfin, le domaine effecteur de la GTPase (*GTPase effector domain, GED*) qui, bien que positionné à l'opposé du domaine GTPase, est le centre enzymatique actif de la lyse des GTP. L'une des conséquences du repliement de la protéine est effectivement de rapprocher le GED du domaine GTPase pour permettre la lyse effective du GTP. Seule la Mx1 murine possède un peptide signal de localisation dans le noyau (*nuclear localization signal, NLS*) situé à l'extrémité N-terminale.

La structure tridimensionnelle ne coïncide pas complètement avec la structure dépliée. Comme expliqué ci-dessus, le premier objectif de la structure tridimensionnelle est de créer un domaine G (*G-domain*) assurant la fixation et la lyse enzymatique du GTP. Ce domaine G est lié à la queue (*stalk*) de la protéine par un *bundle signaling element* (BSE). Cet élément central s'articule avec les deux parties latérales par deux charnières (*hinge*). Il se compose de trois hélices provenant des deux extrémités (N et C-terminales) et du segment central. Sa création est donc nécessaire au repliement de la protéine et à son bon fonctionnement. Son rôle est de transférer les modifications de structure entraînées par l'hydrolyse du GTP à la queue de la protéine. La queue (*stalk*) présente une boucle (*loop, L4*) qui est l'une des zones essentielles de l'interaction avec les protéines virales. Le remplacement d'un seul acide aminé dans cette boucle est à l'origine d'importantes différences dans

l'effet anti-influenza des Mx dans les populations de primates (Mitchell *et al.*, 2012). La queue participe également à l'oligomérisation des Mx dans le cytoplasme des cellules.

Le lien entre l'activité GTPasique et l'activité antivirale n'est pas clair. Il se pourrait que l'hydrolyse des molécules de GTP induise des modifications de conformation de la molécule permettant la séquestration ou le clivage des protéines virales. Les études mutationnelles de la MxA démontrent cependant que l'action antivirale exige la présence concomitante d'un domaine G actif, un BSE intact et une oligomérisation via la queue de la protéine.

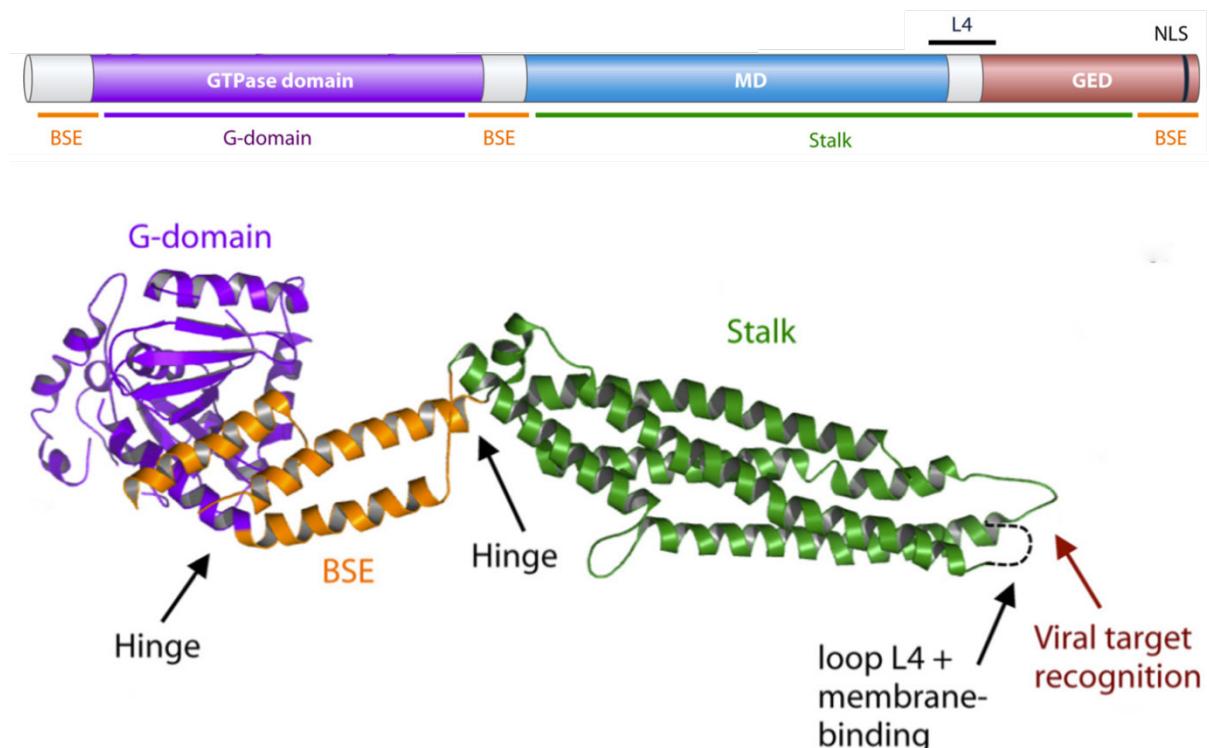


Figure 9: Les différents domaines de la protéine Mx en structure linéaire et conformation tridimensionnelle (Verhelst *et al.*, 2013). La structure dépliée ne correspond pas aux domaines de la protéine dans sa conformation finale. La formation du BSE (bundle signaling element) permet le rapprochement du domaine GTPase (GTPase domain) et GED (GTPase effector domain) qui forment le domaine G (G-domain) qui assure la fixation et la lyse enzymatique des molécules de GTP. La queue (stalk) est nécessaire à l'oligomérisation et à l'interaction avec les protéines virales via, notamment, la boucle L4 (loop L4). Le BSE central s'articule avec le domaine G et la queue via deux charnières (hinge).

La protéine MxA est cytoplasmique. Une fois produites, les MxA s'oligomérisent en structures annulaires entourant des compartiments du réticulum endoplasmique. Les raisons de cette localisation et de cet agencement ne sont pas connues. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de protection des Mx contre une dégradation trop rapide. Une autre hypothèse serait que cet agencement dépende d'une stratégie antivirale orientée vers les virus dépendant des membranes intracellulaires pour leur amplification, comme c'est le cas des *Bunyavirales*.

Stratégie antivirale de la MxA

La protéine MxA inhibe une grande variété de virus à ARN et à ADN (à l'exception notable du HIV, dont l'inhibition incomberait plus particulièrement à la MxB). Il est étonnant de constater qu'une seule protéine possède la capacité d'inhiber un si large panel de virus (12 familles sensibles (Verhelst *et al.*, 2013)). Le mécanisme d'inhibition est spécifique à chaque virus, ce qui pousse certains auteurs à comparer la MxA à un « couteau suisse » équipé d'un outil spécifique à chaque situation.

Virus influenza

L'action emblématique de la MxA est l'inhibition des virus influenza. Il est d'ailleurs démontré que les souches humaines sont plus résistantes à la MxA que les souches aviaires.

Les mécanismes d'action de la MxA ne sont pas complètement élucidés mais il semble que la protéine, à localisation cytoplasmique, se lie aux RNP présentes dans le cytoplasme. La conséquence est une diminution du transport du matériel génétique du virus vers le noyau.

Orthobunyavirus

La stratégie d'inhibition utilisée par la MxA humaine a été étudiée principalement vis-à-vis du virus de La Crosse (LACV).

Une première étude (Frese *et al.*, 1996) a démontré que des cellules Vero exprimant de manière permanente la MxA présentait de la résistance vis-à-vis d'un large spectre de *Bunyavirales* (LACV, virus de la fièvre de la vallée du Rift, virus Hantaan). Pour LACV, l'expérience démontre une inhibition de la production de la glycoprotéine Gc accompagnée d'une forte diminution de la production de la protéine N. Au niveau ARN, la production des ARNs issus des segments M et L est très fortement inhibée alors que les ARNs issus du segment S (cARN, mARN, vARN) sont tous présents bien qu'en quantités cinq à dix fois moindres.

Ce résultat est confirmé dans une seconde expérience (Miura *et al.*, 2001) basée sur une transfection de cellules de moustique (*Aedes albopictus*). Ce système présente l'avantage d'étudier le virus dans un environnement cellulaire très favorable (LACV est transmis par *Aedes triseriatus*) mais naturellement déficient en IFN. La production de MxA et la présence du virus sont détectées par immunofluorescence (MxA : anticorps monoclonal ; LACV : sérum polyclonal de lapin). Le virus n'est quasiment pas détectable dans les cellules exprimant MxA. Dans cette expérience, l'activité de la MxA est présentée en parallèle pour LACV et un *Alphavirus* également transmis par un moustique. L'effet vis-à-vis de l'*Alphavirus* est quasi nul.

Le mécanisme d'action de la MxA vis-à-vis de LACV a été investigué en cellules Vero exprimant de manière permanente la MxA (Kochs *et al.*, 2002). Cette expérience démontre que lors de l'infection par LACV en présence de MxA, la localisation et la distribution de la nucléoprotéine et de la MxA sont complètement modifiées. La protéine N qui est habituellement distribuée à proximité de

l'appareil de Golgi (cf. cycle du virus), se retrouve groupée en très larges amas périnucléaires. Ces larges amas co-localisent parfaitement avec la MxA. Cette dernière est habituellement dispersée en fins granules liés au réticulum endoplasmique. En microscopie électronique, ces amas apparaissent sous la forme de longs filaments de 15-20 nm de diamètre, accolés parallèlement les uns aux autres avec un haut degré d'organisation. Les auteurs testent également un mutant à localisation intranucléaire de la MxA (remplacement d'un acide glutamique en arginine en position 645 qui mime le signal de localisation intranucléaire de la Mx murine) qui s'est révélé inefficace à inhiber le virus de la stomatite vésiculeuse tout en conservant son effet anti-influenza (Zürcher *et al.*, 1992). Ce mutant perd son action antivirale face à LACV et il n'est associé à aucune relocalisation de N. Enfin, les auteurs reproduisent l'expérience avec deux autres virus : le virus de la fièvre de la vallée du Rift (*Phlebovirus*) ainsi qu'avec le virus Bunyamwera (*Orthobunyavirus*). La co-relocalisation N+MxA est reproduite pour ces deux virus suggérant que ce mécanisme d'action est largement appliqué aux *Bunyavirales*. Cet article démontre donc que l'effet principal de la MxA face aux *Orthobunyavirus* est un effet de capture et de relocalisation de la nucléoprotéine. La protéine N étant centrale dans le cycle viral des *Orthobunyavirus*, cette « séquestration » est probablement très efficace : diminution de la protection des filaments de ARN viraux, diminution de l'activité de la polymérase, diminution de la formation des virions.

Enfin, une dernière expérience (Reichelt *et al.*, 2004) démontre que l'action de la MxA n'affecte pas le transport des glycoprotéines vers l'appareil de Golgi mais bien la formation du virion. En outre, elle démontre que la séquestration de la protéine N de LACV s'opère en lien avec les membranes des structures intermédiaires au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi.

Protéine Mx1 bovine

La protéine Mx1 bovine est issue du gène orthologue chez le bovin de la MxA humaine. Le mARN issu du gène *MX1* bovin subit un épissage alternatif qui produit deux sous-types, la Mx1-a et Mx1B. La Mx1B montre une localisation nucléaire (Shirozu *et al.*, 2016).

La Mx1-a, à l'instar de la MxA humaine, a démontré un effet antiviral important face à un large panel de virus : le virus de la stomatite vésiculeuse (Baise *et al.*, 2004), le virus de la rage (Leroy *et al.*, 2006), le virus de la fièvre aphteuse (Wang *et al.*, 2016), les virus influenza (Dam Van *et al.*, 2019) et les pneumovirus (Dermine and Desmecht, 2012).

La protéine Mx1 est également sécrétée dans un contexte différent complètement de la lutte antivirale. Elle est en effet exprimée de manière forte au niveau de l'utérus pendant la phase pré-implantatoire (Shirozu *et al.*, 2016). Les cellules trophoblastiques sécrètent, en effet, de l'IFN β (interféron tau) qui induit la production de Mx. La production de l'IFN β diminue fortement après l'implantation. La production de Mx est donc réduite après l'implantation mais se poursuit à un taux

basal variable jusqu'à la moitié de la gestation (Shirozu *et al.*, 2016). La production de Mx semble atteindre un pic (10 fois inférieure à la production pré-implantatoire) aux alentours du jour 80 de la gestation. Toujours selon Shirozu *et al.*, la production utérine de Mx est plus importante dans les régions intercotylédonnaires qu'au niveau des cotylédons.

Objectifs

Le but de cette thèse est d'apporter une contribution aux connaissances accumulées sur le virus de Schmallenberg depuis sa découverte.

Il est ici question de poser un regard large sur ce virus au moyen de trois études investiguant des aspects divers. L'intérêt de regrouper ces études au sein d'une même thèse est d'envisager la problématique du SBV à trois niveaux complémentaires : population, organisme et cellule. Ce « zoom » progressif dans l'échelle d'étude est de nature à former une image assez globale offrant une meilleure compréhension du fonctionnement de cet agent pathogène.

Au niveau population, le but est de décrire la dynamique de circulation du SBV dans les années qui suivent son émergence. Ce travail s'appuie sur des échantillons de sérum collectés entre 2012 et 2017 dans les populations de cervidés sauvages de Wallonie. Cette étude de séroprévalence permet, notamment, d'investiguer l'hypothèse de pics de circulation cycliques observés chez d'autres virus issus du même genre.

Au niveau organisme, l'objectif est de décrire les conséquences, dans l'espèce bovine, de l'infection *in utero* qui accompagne la circulation du virus. Cette étude lésionnelle, basée sur des cas d'infection naturelle, permet de proposer des hypothèses quant à la pathogénie de ces lésions.

Au niveau cellulaire, l'étude investigue l'effet, sur l'amplification cytoplasmique du virus, de l'un des effecteurs de la réponse interféron, la protéine Mx1. Elle appartient à l'arsenal de défense cellulaire antivirale participant, de ce fait, à la réponse immunitaire innée. En comparant l'effet de protéines Mx1 issues d'espèces de mammifères domestiques ayant une sensibilité variable au virus, cette étude cherche à poser les bases d'une compréhension du rôle de la protéine Mx1 dans l'infection par le SBV.

Dans les pages qui vont suivre, les trois études sont présentées dans l'ordre chronologique de leur réalisation.

Section expérimentale

Section expérimentale

Étude 1

Pathological manifestations and distribution of viral RNA in malformed newborn calves after natural intrauterine infection by emerging Schmallenberg virus

Emerging Infect. Dis. 20, 1327–1330

Bayrou C., Garigliany M.-M., Sarlet M., Sartelet A., Cassart D. and Desmecht D.

Préambule

Durant les premiers mois de l'année 2012, la Belgique a été confrontée aux premiers cas de fœtus malformés suite à l'infection *in utero* par le virus de Schmallenberg. Cette étude recense les 15 premiers cas de veaux nouveau-nés positifs pour le SBV. Elle se concentre sur l'aspect lésionnel et la distribution de l'ARN viral au sein des organismes de ces veaux.

Tous les veaux susceptibles d'avoir été infectés par le SBV étaient testés par RT-PCR et par ELISA sur un échantillon de sang cardiaque. Seuls étaient enrôlés dans l'étude les veaux chez qui l'ARN viral et des anticorps anti-SBV étaient détectés. Pour ces veaux, une autopsie complète suivie d'un examen histopathologique sur les principaux organes a été réalisée. Tous les organes prélevés étaient testés par RT-PCR pour rechercher l'ARN viral.

La première étape d'analyse a été de classer les veaux pour rendre compte de la variabilité dans l'intensité des malformations. Dans ce but, un score de déformation corporelle (*Whole Body Deformation score*) a été créé. L'ensemble des observations ont été présentées en fonction de ce score.

Les principales observations macroscopiques ont été, d'une part, la concentration des malformations au niveau des systèmes neurologique et myo-arthro-squelettique et, d'autre part, une tendance nette à l'intensification des lésions musculaires et à une réduction croissante du diamètre de la moelle épinière (micromyélie) avec l'augmentation du score de déformation. Ces observations se sont confirmées au niveau histologique. L'augmentation du score de déformation s'accompagne d'une intensification et d'une généralisation des lésions musculaires de type *end-stage muscles*. En outre, le dénombrement des neurones dans les cornes de la moelle épinière a démontré une quasi disparition de ceux-ci avec l'augmentation du score de déformation. En revanche, les résultats de détection de l'ARN viral ont révélé une image contrastée de ces deux systèmes. Les muscles ont été majoritairement négatifs à la RT-PCR quand le système nerveux central, et particulièrement la moelle épinière, est ressorti très majoritairement positif.

De ces observations, il ressort, qu'à l'inverse d'autres virus (comme le BVD par exemple), les malformations induites par le SBV sont assez « standardisées », permettant une forte suspicion étiologique en présence d'un veau mort-né avec arthrogrypose et micromyélie. La moelle épinière apparaît comme un organe clef pour la mise en évidence de l'ARN viral. Elle apparaît, en outre, comme un organe central dans la pathogénie des lésions *in utero*.

Abstract

Schmallenberg virus is the first Orthobunyavirus detected in Europe. It emerged northwest of the continent in the summer 2011 and has since spread rapidly to the point of being detected in the majority of European countries a year later. Ruminants are infected by biting midges (*Culicoides* spp.) which results in a non specific flu-like illness occurring during the summer and autumn, with fever, anorexia, drop in milk production and sometimes diarrhea. Moreover, in a subset of fetuses infected *in utero*, a congenital malformation/neurological syndrome ensues. So far, no systematic study of these congenital cases have been reported. In this paper, we report the results of an exhaustive survey of the macroscopic and microscopic morphological alterations detected in a cohort of calves naturally infected *in utero* and born deformed and we deduce the possible scenario of lesions/disease production. In addition, the distribution of SBV-specific RNA in the different tissues of these congenital cases is reported for the first time, which is essential for diagnostic purposes and for further studies dedicated to the physiopathology of Schmallenberg virus-associated disease.

Introduction

In the summer-fall of 2011, a nonspecific febrile syndrome characterized by hyperthermia and drop in milk production was reported in adult dairy cows from a series of farms located in the Netherlands and Germany (Hoffmann *et al.*, 2012; Muskens *et al.*, 2012). Further, in November 2011, an enzootic outbreak of abortion, stillbirth and birth at term of lambs, kids and calves with neurologic signs and/or head, spine or limb malformations emerged throughout North-Western Europe (van den Brom *et al.*, 2012; Gariglinany *et al.*, 2012). Both syndromes were associated with the presence in the blood (adults) or in the central nervous system (newborns) of the genome of a new *Orthobunyavirus* named Schmallenberg virus (SBV) after the place where the first positive samples were collected (van den Brom *et al.*, 2012; Gariglinany *et al.*, 2012). After its first detection in Germany (Hoffmann *et al.*, 2012), the SBV was subsequently identified in the Netherlands (van den Brom *et al.*, 2012), Belgium (Gariglinany *et al.*, 2012), the South-Eastern United Kingdom (International Society for Infection Diseases, 2012), France (Direction Générale de l'Alimentation, 2012), Italy, Luxemburg, and Spain (WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION SYSTEM, 2012a, 2012b, 2012c), which emphasizes its extremely rapid spread during the first transmission season (summer/fall 2011). The disease has re-emerged during the 2012 vector-active season in France, Germany, Switzerland, Poland, the United Kingdom, Austria, Finland, and Sweden (Conraths *et al.*, 2013a).

Like other *Orthobunyaviruses*, the newcomer is apparently transmitted by arthropod vectors, primarily by biting midges (*Culicoides* spp.) (De Regge *et al.*, 2012; EFSA, 2012; Rasmussen *et al.*, 2012). The virus belongs to the Simbu serogroup (Goller *et al.*, 2012) and, like its phylogenetic relatives Akabane and Aino viruses, is able to cross the placenta which can lead to congenital malformations (Garigliany *et al.*, 2012). As this new viral disease of ruminants emerged a few months ago, very limited information is available on its physiopathology. In this paper, an exhaustive survey of macroscopic and microscopic lesions was performed in a cohort of calves infected *in utero* and born deformed. In addition, the article reports the distribution of SBV-specific RNA in the different tissues of these field cases which is essential for diagnostic purposes.

Materials and Methods

Context

Field veterinarians refer approximately 2 200 dead animals per year for autopsy to the University of Liège Faculty of Veterinary Medicine. For cattle, a dedicated shuttle runs daily throughout Wallonia to remove and transport the bodies from the farms to the Faculty, which allows autopsy within a reasonable time, between 12 and 48 hours after death in 90% of cases. During a ~6-month period beginning in January 2012, an unusual musculo-skeletal syndrome event was recognized among referred newborn calves. The affected animals were born at term, none of them had suckled or received colostrum. They displayed mild to severe deformities of axial and appendicular systems and corresponding anamnestic data consistently mentioned severe ante-mortem psychic, behavioral and motor dysfunctions. The frequency of such cases was approximately 20 times that expected from the 1980-2010 period.

Gross pathology

The animals were examined by the staff according to the standard protocol. The animals were first weighed and the average weight of the different cohorts defined hereafter were compared using the Mann-Whitney test. In order to better reflect the diversity of clinical presentations, said calves were divided into four categories according to the severity of their musculo-skeletal deformities (Fig. 10). Animals with neurological signs and apparently normal body shape were given a whole-body deformity (WBD) score of 0. Deformities can involve 3 main body parts: the spine, the forelimbs or the hindlimbs. The WBD was given according to the number of parts involved. In addition, the diameters of the *foramen magnum* and of the spinal cord therethrough were systematically measured. The occipital ratio mentioned below is the result of dividing the second by the first diameter. After a thorough examination, the following organs were sampled: brain, spinal cord, lung, myocardium, thymus, liver, spleen, kidney, duodenum, jejunum, ileum, colon and skeletal muscles. From the brain, specimens from 6 distinct regions were sampled: olfactory bulb (paleopallium), cortex (neopallium), diencephalon, midbrain (mesencephalon), cerebellum and pons (metencephalon). The spinal cord samples consisted of the segment corresponding to the 4th cervical vertebra. Nine skeletal muscles were sampled, 2 spinal muscles (*Semispinalis capitis* and *Longissimus thoracis*), 3 forelimb muscles (*Supraspinatus*, *Extensor carpi radialis* and *Flexor carpi ulnaris*) and 3 hindlimb muscles (*Semimembranosus*, *Quadriceps femoris* and *Peroneus tertius*). For the *Semispinalis capitis*, a piece of muscle was taken directly below the 4th cervical vertebra from either side of the pathological curvature of the spine, thus a first from the concave side and a second from the convex side. Each tissue sample was then divided into two fragments, one was frozen at -80 °C (for subsequent RNA

extraction) and the other was immersed in 10% buffered formalin (histopathology). Postmortem serum was extracted from the cardiac ventricles and kept frozen at -20°C until use.



Figure 10: Definition of whole-body deformity (WBD) scores in SBV cases. Animals with neurological signs and apparently normal body shape were given a WBD score of 0. Deformities can involve 3 main body parts: the spine, the forelimbs or the hindlimbs. The WBD was given according to the number of parts involved.

Histology

All tissues were routinely processed in paraffin wax, cut at 4- μ m thickness, mounted on glass slides, deparaffinized in xylene, dehydrated in ethanol and stained with hematoxylin and eosin. We performed luxol fast blue staining for visualizing white matter in spinal cord and efferent myelinated axons in ventral horns. Perls' acid ferrocyanide reaction was used to reveal iron compounds in the ferric state, with nuclear fast red for counterstaining. The control cohort included five day-old calves that were simultaneously negative for viral RNA and anti-SBV IgGs. The extent of histological changes in muscles was reported semi-quantitatively by using a score of 0, 1, 2 or 3 depending on whether the histologically normal tissue extended over 100, 75-100, 25-75, or less than 25% of the area examined.

Detection of SBV-specific antibodies

IgG antibodies against the nucleoprotein of the Schmallenberg virus were detected in postmortem sera by using the ELISA kit (ID Screen® Schmallenberg virus Indirect v.1) recently made available by ID.vet Innovative Diagnostics (Bréard *et al.*, 2013). In this assay, results are expressed as

percentages of the reference signal yielded by a positive control serum, with serologic status defined as negative (<60%), doubtful (>60% and <70%) or positive (>70%) by the manufacturer. Positive and negative reference bovine sera were drawn within a previously archived bank (15).

Detection of viral RNA

We sought the new virus in the tissues of all animals belonging to one or more of the following categories : (1) calves with reported neurological symptoms *ante mortem*, (2) calves displaying musculo-skeletal deformities and (3) calves that died spontaneously soon after birth and in which no unequivocal cause of death was identified at autopsy. Tissue samples collected in the autopsy room were homogenized (Qiagen's TissueLyser, 30 Hz for 2 min) in TRIzol reagent (Invitrogen) and total RNA was extracted from the resulting homogenate according to the manufacturer's instructions. Precipitated RNA was resuspended in 10% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) and stored at -80°C until use. A Mastercycler® pro thermocycler (Eppendorf) and a StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems) were used for reverse transcription and quantitative PCR (qPCR), respectively. The detection of the SBV genome was performed according to Bilk *et al.*, 2012, and that of the BVDV genome according to La Rocca and Sandvik, 2009, except that the heterologous internal control (β -actin) and each virus were detected separately. Briefly, the 3 RT-qPCR assays were carried out with the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR kit (Applied Biosystems) using a total volume of 25 μ L. Primer and probes used in this study are listed in Table 1. A master mix consisting of 4.5 μ L RNase-free water, 12.5 μ L 2 x RT-PCR buffer, 1.0 μ L 25 x RT-PCR enzyme mix, 2.0 μ L SBV-specific (BVDV- or β -actin-specific) primer-probe mix (10 μ M target-specific primers + 1.875 μ M target-specific probe) for one reaction and 5 μ L RNA template was added. For amplification of SBV RNA, the following temperature profile was used: 10 min at 45°C (reverse transcription), 10 min at 95°C (inactivation of reverse transcriptase and activation of *Taq* polymerase), followed by 42 cycles of 15 s at 95°C (denaturation), 20 s at 56°C (annealing) and 30 s at 72°C (elongation). For amplification of BVDV RNA, the temperature profile was the following: 10 min at 50°C, 2 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C (denaturation) and 30 s at 60°C (combined annealing and elongation). The detection of the BTV genome was performed according to Toussaint *et al.*, 2007, with slight modifications. Briefly, a pan-BTV two-step RT-qPCR targeting genome segment-5 of bluetongue viruses was carried out, again with β -actin mRNA as internal control. The Gene Expression Master Mix from Applied Biosystems was used for a first qPCR with the following conditions: 10 min at 95°C, then 45 cycles of 15 s at 95°C (denaturation) and 1 min at 58°C (combined annealing and elongation). The cut-off was set at a value of 43 as determined by dilutions of the synthetic RNA controls according to Toussaint *et al.*, 2007. Positive and doubtful samples are then theoretically submitted to a segment-1 or a segment-7-specific PCR as described by Garigliany *et al.*, 2011. As the step-1 qPCR did not detect any positive or doubtful samples from the tissues examined here, the step 2 was not necessary. For the detection of

the genetic material of the three viruses targeted, all reactions were carried out twice. In 90% of cases, the results were identical. Whenever the results were conflicting, a third RT-qPCR was performed and the majority result was taken as definitive. A negative extraction control, and both a negative and a positive reverse transcription and amplification controls were always included.

Table 1: Primers and probes

Target	Primer/probe name	Sequence (5'→3')†	Genome position
SBV	382-F	TCA GAT TGT CAT GCC CCT TGC	382–402‡
	469-R	TTC GGC CCC AGG TGC AAA TC	450–469‡
	P_408	FAM-TTA AGG GAT GCA CCT GGG CCG ATG GT-BHQ1	408–433‡
BVDV	106-F	CCA TGC CCT TAG TAG GAC TAG C	106–127§
	190-R	GCG TCG AAC CAC TGA CGA CT	190–209§
	P_162	FAM-TGG ATG GCT TAA GCC CTG AGT ACA G-EDQ	162–186§
BTv	F_1-19	GGC AAC YAC CAA ACA TGG A	1–19¶
	R_76-57	AAA GTY CTC GTG GCA TTW GC	57–76¶
	P_49-27	FAM-CYC CAC TGA TRT TGT ATT TTC TCA A-TAMRA	49–27¶
β-actin	F_1005-1029	CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C	1005–1029
	R_1135-1114	CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT TT	1114–1135
	P_1081-1105	FAM-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-TAMRA	1081–1105

*SBV, Schmallenberg virus; BVDV, bovine viral diarrhea virus; BTv, bluetongue viruses; FAM = 6-carboxyfluorescein; EDQ, Eclipse Dark Quencher; BHQ1, Black Hole Quencher-1.

†Reverse primers complementary to positive-sense target strand.

‡In the SBV genome segment-S (GenBank accession no. HE649914).

§In the BVDV NADL genome (GenBank accession no. M31182)

¶In the BTv genome segment-5.

Refuting idiopathic arthrogryposis

The cause of the congenital arthrogryposis syndrome affecting the local Belgian Blue Cattle population was recently assigned to a focal transversion in the splice acceptor region of the *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class H (PIGH)* intron 1. All relevant animals were genotyped to exclude the possibility that this mutation contributed to the observed lesions using the 5' exonuclease diagnostic assay recently made available (Sartelet *et al.*, 2015).

Results

Detection and definition of SBV cases

Between 15 January and 31 March 2012, 97 less than 1-wk old calves were referred to the Faculty department of Pathology by field veterinarians. At that time, pathologists were immersed in the context of a new viral infection of ruminants that emerged four months before in a place geographically close (Schmallenberg village is located 250 km northeast) and that was suspected to play a causal role in the emergence of several hydranencephaly/arthrogryposis series in newborn lambs. As the consequences of the new infection on bovine fetuses were not known yet, it was necessary to establish or refute the presence of the new virus in deformed calves and in those which died spontaneously without obvious cause at autopsy. Among the 67 suspect animals, the SBV genetic material was detected in 15 by RT-qPCR and specific anti-SBV nucleoprotein IgGs were systematically highlighted in their sera by ELISA. Conversely, all attempts to retrieve the genetic material of BTV8 and BVDV viruses from the tissues of these SBV-positive cases failed. In addition, none of these animals was carrying the mutation characteristic of the cleft palate/arthrogryposis syndrome which is responsible for virtually all noninfectious cases of arthrogryposis in the local livestock. These 15 calves were referred to as *SBV cases* and are identified by a letter below (A-O). Of the 52 SBV-negative calves, 2 were seropositive, displayed suggestive lesions and remained negative for other causes. Both had severe arthrogryposis (WBD-3), micromyelia and hydrocephaly. They were not positive for BTV8 or for BVDV, nor for the mutation characteristic of genetic arthrogryposis. Although there was little doubt as to whether these animals were indeed infected with SBV *in utero*, they were not included in the cohort of SBV cases whose characteristics are listed below.

Gross lesions at autopsy

All SBV cases showed altered whole-body conformation and central nervous system (CNS) damages. No racial, nor sex predisposition was noted compared to the cohort of RT-qPCR/ELISA-negative calves. Gross lesions are aggregated in Table 2.

The body as a whole

SBV-positive animals were significantly lighter than SBV-negative calves (32 ± 15 vs. 49 ± 4 kg, $P < 0.05$) (Kolkman *et al.*, 2010). The large deviation between SBV cases denotes a heterogeneous deficit of body weight. Notably, there was an obvious correlation between the body mass deficit and the severity of deformations in whole-body conformation (Table 2). Also, most deformed animals died spontaneously within 24 hours after birth (scores WBD-2 and -3). Among the least affected, the majority was euthanized.

Table 2 : Macroscopic characteristics of 15 SBV cases at autopsy

		Whole-body deformity score				Total calves
		WBD-0	WBD-1	WBD-2	WBD-3	
Various						
SBV calves (#)		2	4	4	5	15
Death	Euthanasia	2	3	0	0	5
	Spontaneous	0	1	4	5	10
Body weight ^{1,2} (kg)		49±4	39±3	34±3	21±2	
Axial musculo-skeletal system						
Defect location	Cervical	0	2	4	5	11
	Thoracic	0	0	2	5	7
	Lumbar	0	0	0	5	5
Type of deviation	Lateral	0	2	4	5	11
	Dorso-ventral	0	0	1	4	5
	Helicoidal	0	0	1	4	5
Appendicular musculo-skeletal system						
Arthrogryposis (1 or more limb involved)		0	3	4	5	12
Symetric limb involvement		NA	3	3	5	11
Fore-/hindlimb involvement	Both	NA	0	1	5	6
	Forelimbs only	NA	2	3	0	5
	Hindlimbs only	NA	1	0	0	1
Head						
Coaptation defect	Prognathism	0	0	0	1	1
	Brachygnathism	0	1	1	2	4
Altered profile	Horse-like	0	1	1	0	2
	Pig-like	0	0	0	2	2
Broken sagittal axis		0	1	2	2	5
Central nervous system						
Porencephaly		2	3	3	1	9
Hydranencephaly		1	1	0	1	3
Hydrocephaly		0	0	1	4	5
Cerebellar hypoplasia		0	0	0	1	1
Micromyelia		2	4	4	5	15

Fifteen newborn calves infected *in utero* by the Schmallenberg virus were categorized according to the extent of their deformities. The table lists the gross morphological changes observed at autopsy. NA, not applicable. ¹Mean±SD. ²Bodyweight of age-matched Belgian Blue healthy calves is 49,2 ± 7,1 kg (Kolkman et al., 2010).

The axial musculo-skeletal system

Overall, we observed permanent deviations of the axial skeleton in all three planes (Fig. 11). The most common observation (11/15) was a lateral deviation of the cervical spine (torticollis). In two cases (WBD-2), we observed lateral deviations of the thoracic segment of the spine. In addition, in the most distorted animals (WBD-3), the torticollis was accompanied by a dorso-ventral deviation of the thoracolumbar spine (either kyphosis or lordosis) and by a gradual rotation of the column itself, giving it a helical conformation. In the most severe cases (WBD-3), vertebrae examined individually also displayed deformities, with distortions in the shape of the spinal canal, but without stenosis. Besides, deficits in muscle mass in the spinal muscles were observed in all cases. Regarding their magnitude and distribution, no global pattern was identified. These changes seemed consistent with prenatal occurrence of processes leading to atrophy and/or hypoplasia. In addition, after section, muscles revealed whitish and multifocally distributed areas.

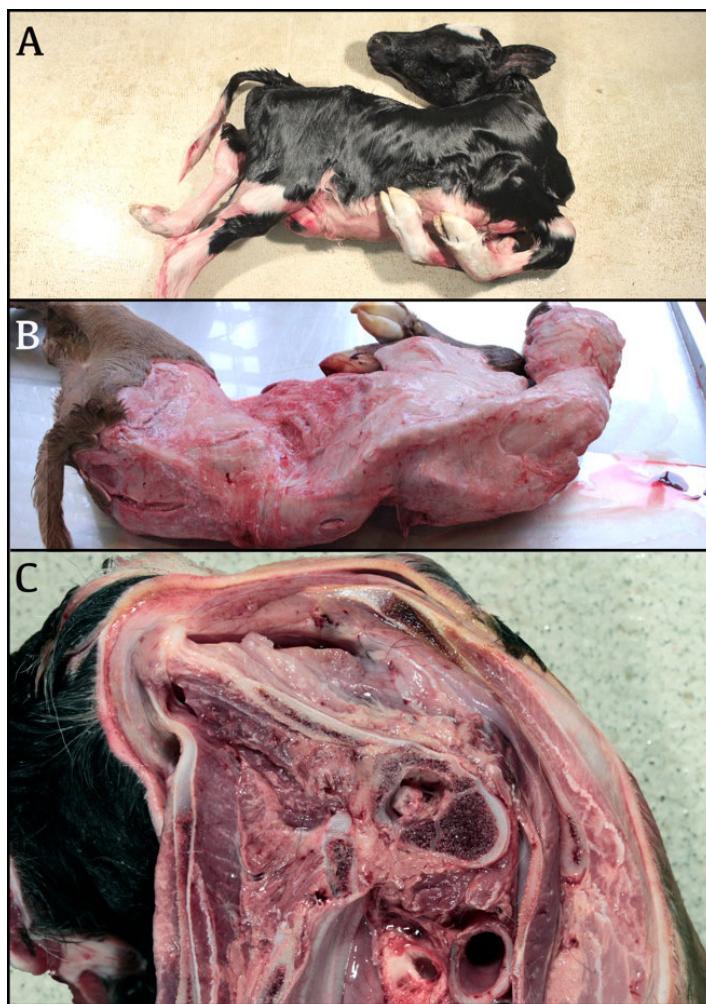


Figure 11: Deformities of the axial skeleton in SBV cases. A, torticollis; B, lateral deviations and asymmetric loss of *M. longissimus dorsi* volume; C, loss of volume and discoloration of right cervical muscles and left tilt of the vertebral spinous process

The appendicular musculo-skeletal system

Most cases (13/15) displayed joint fixation of one or all joints of one or more limbs, which is referred to as arthrogryposis. Joints involvement was always symmetric (right/left ratio = 1), whereas the double fore-/hindlegs involvement was observed in the most severe cases only (WBD-3). When a single pair of limbs was involved, it was almost always the forelimbs (1 case with only hindlegs involvement). The joints were fixed either in hyperflexion (66% of affected joints) or in hyperextension. Section of the tendons always increased the mobility of the corresponding joint and the articular cavities were filled with a normal yellow, viscous synovial fluid. Tendons spanning fixed joints were shorter than expected and corresponding muscles displayed altered mass (decreased) and color (multifocal whitish patches). On visual inspection, bone lengths remained proportionate to the size of the calves, but some articular surfaces deviated from the plane expected.

The head

The general shape of the head was often altered but the magnitude of the changes was not correlated with axial and appendicular musculo-skeletal changes (Table 2). Two calves displayed a horse-like (long nose and reduced height of cranial cavity) and 2 others a pig-like head (increased height and reduced length), 4 calves were brachygnathic (upper teeth protruding beyond lower teeth) and 1 prognathic (lower jaw is too far forward). Notably, the head of a third of the calves displayed diverging sagittal axes, with an angle between the sagittal plane of the upper and lower halves of the head (Fig. 12).

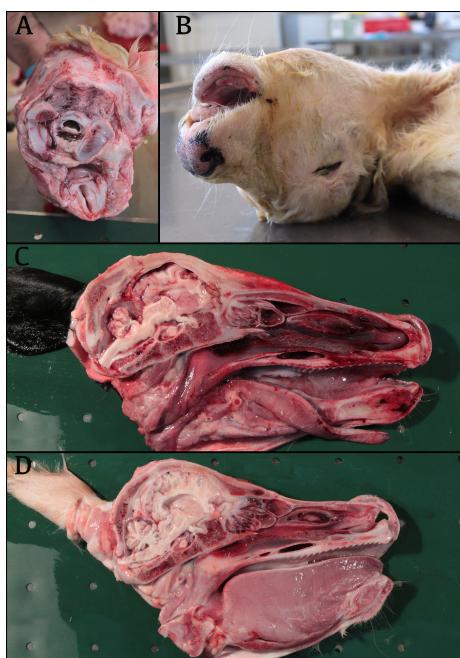


Figure 12: Deformities of the head in SBV cases. A, diverging sagittal axes; B, brachygnathism; C, horse-like and D, pig-like profiles, respectively

The central nervous system

Major alterations were systematically observed after opening the skull and spinal canal (Figs. 13-15). These changes involved the spinal cord and the telencephalon, while the brainstem (medulla oblongata, pons, mesencephalon and diencephalon) and cerebellum were kept intact (except 1 hypoplastic cerebellum). In WBD-2 and -3 cases, a decrease in the cross-sectional area of the spinal cord was observed over its entire length (Fig. 13).

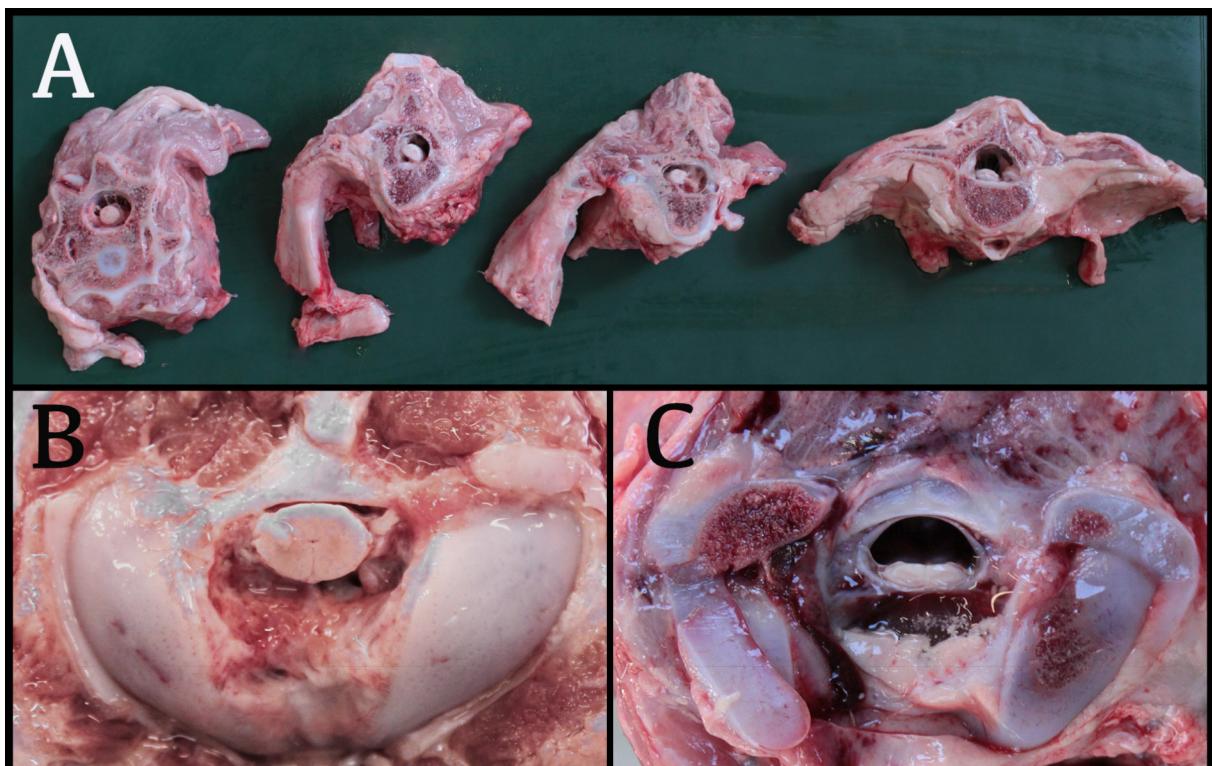


Figure 13: Micromyelia in SBV cases. A, successive sections showing micromyelia extending over the entire length of the spinal cord ; B, cross-section of spinal cord when it emerges from the foramen magnum in a control calf ; C, the same in a SBV-positive calf

Because the size of the spinal canal did not display a similar trend, a large space filled with CSF was always interposed between the spinal cord and most of the canal circumference. Besides, the general structure of the spinal cord was preserved, with an intact ventral median fissure and a normally proportioned central canal. These changes are referred to as micromyelia without myelodysplasia and seem consistent with prenatal occurrence of processes leading to atrophy and/or hypoplasia. Remarkably, the magnitude of the decrease in spinal cord cross-sectional area, as measured via the occipital ratio, was positively correlated with the severity of axial and appendicular musculo-skeletal deformities (Fig. 14).

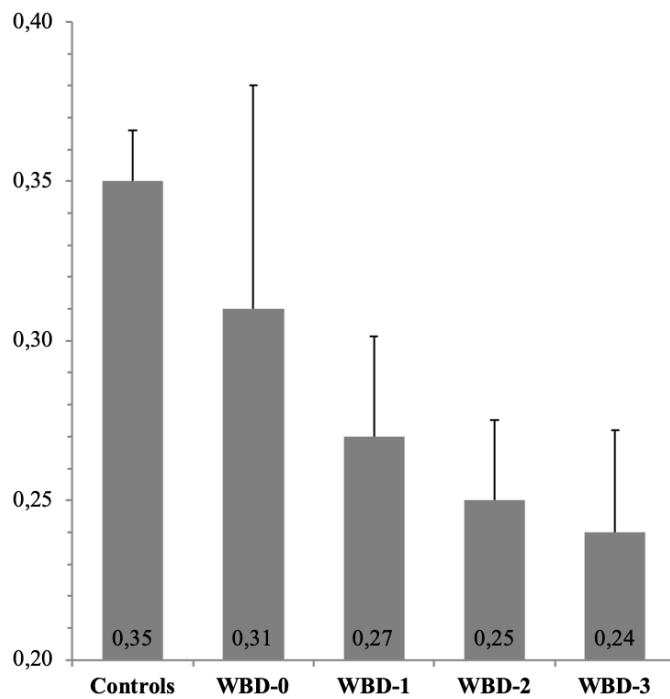


Figure 14: Occipital ratios (Mean ± SD) in control and SBV-positive calves. Note negative correlation with whole-body deformity scores (WBD). The diameters of the foramen magnum and of the spinal cord therethrough were measured. The occipital ratio of a specific calf is the result of dividing the second by the first diameter.

Moreover, the neopallial part of the telencephalon was nearly completely absent in most SBV cases, whereas the paleopallium-olfactory components, the archipallium-hippocampus, fornix and basal nuclei were comparatively spared (Fig. 15). The amount of CSF was consistently increased due to the filling of the space normally occupied by the neopallium. These macroscopic alterations produced three distinct morphotypes. In some calves, multiple, bilateral, and randomly located cystic cavities were detected in the neopallium, most of which communicated with the ipsilateral ventricle. These alterations were referred to as porencephaly. In other cases, all that remained from the neopallium was a thin, nearly transparent membrane with sometimes a few floating smooth-surfaced islets resembling cortex. The membrane was kept distended by the CSF that filled the space normally occupied by cerebral tissue. These changes were referred to as hydranencephaly. Finally, in a third subset of cases, the brain appeared normal after opening the skull, but revealed a severe, bilateral and symmetrical dilatation of lateral ventricles after section.

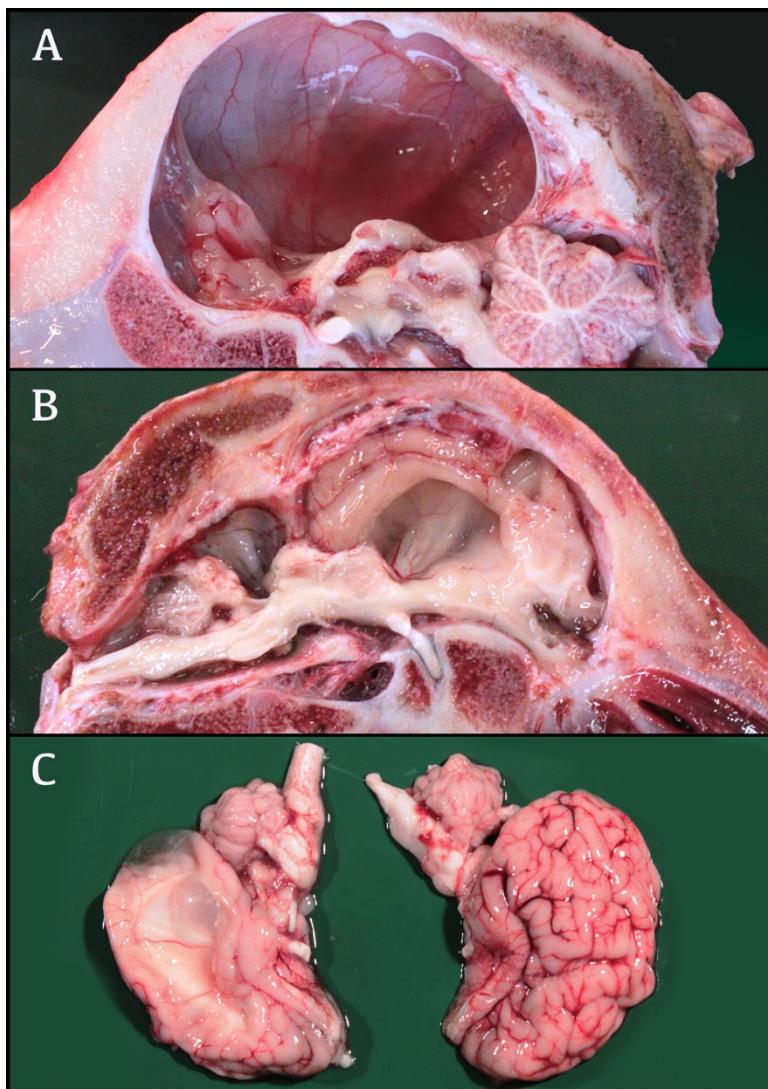


Figure 15: Deformities of the telencephalon in SBV cases. A, hydranencephaly; B, hydrocephaly and cerebellar hypoplasia ; C, porencephaly.

Histopathology

Encephalon

The brain stem and cerebellum displayed no systematic alterations (Table 3). In particular, areas of large neurons were still detectable, there was no perivascular cuffing of lymphocytes, no hemorrhages, no hemosiderin-laden macrophages, no mineralization, no gliosis, nor stigmata of periependymal inflammation. In the telencephalon, only minor changes were seen. In porencephalic cases, the cavities were lined by astrocytes and surrounded by occasional foci of gliosis. The membrane typical of hydranencephaly consisted mostly of astroglia, pia mater, blood vessels and, sometimes, a few inflammatory cells. The thinned neopallium accompanying hydrocephaly was not remarkable either, again showing evenly distributed gliosis.

Table 3: Distribution of microscopic inflammatory lesions and virus-specific RNA in the CNS of 15 SBV cases

CNS portion ↓		Whole-body deformity score														
		WBD-0		WBD-1				WBD-2				WBD-3				
Calves IDs →		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
	RT-qPCR	NT	+	NT	-	+	+	-	-	NT	-	+	+	-	-	-
<i>Paleopallium</i>	Histology	NT	G	0	0	G	G	0	0	NT	0	0	0	0	0	0
	RT-qPCR	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Neopallium</i>	Histology	0	G	0	G	G	0	0	0	NT	G	0	0	0	0	0
<i>Diencephalon</i>	RT-qPCR	NT	+	NT	-	+	+	+	-	NT	-	+	+	-	+	-
	Histology	NT	0	0	G	G	0	0	0	NT	0	G	0	0	0	0
<i>Mesencephalon</i>	RT-qPCR	NT	+	NT	-	+	+	+	+	NT	+	+	+	+	+	-
	Histology	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	G	0	0	0	0
<i>Cerebellum</i>	RT-qPCR	NT	+	NT	-	+	+	-	+	NT	-	-	+	-	-	-
	Histology	0	0	0	E	0	0	0	0	NT	0	0	0	0	0	0
<i>Pons</i>	RT-qPCR	NT	+	NT	-	+	+	+	+	NT	-	+	+	-	+	-
	Histology	0	0	0	E	0	0	E	0	NT	0	E	0	0	0	0
<i>Spinal cord*</i>	RT-qPCR	NT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Histology	NT	0	0	E	0	0	0	E	NT	E	E	E	E	0	E

CNS, central nervous system ; WBD, whole-body deformity score ; 0, no lesion ; G, gliosis ; E, edema ; NT, not tested.

*Sections were made at the level of the fourth cervical vertebra.

Spinal cord

Examining the spinal cord by light microscopy instantly revealed a very significant decrease in the density of neurons along its entire length (Table 4). Conversely, like the encephalon, the presence of changes characteristic of recent or past necrosis or inflammation was not obvious. There was no perivascular cuffing of lymphocytes, no mineralization, no hemorrhages, no hemosiderin-laden macrophages. Some foci of gliosis and images consistent of neuronophagia were observed, but they remained very rare. In the most deformed animals (WBD-3), there were no motor neuron left in the gray matter and no efferent axons in the ventral horns (Fig. 16).

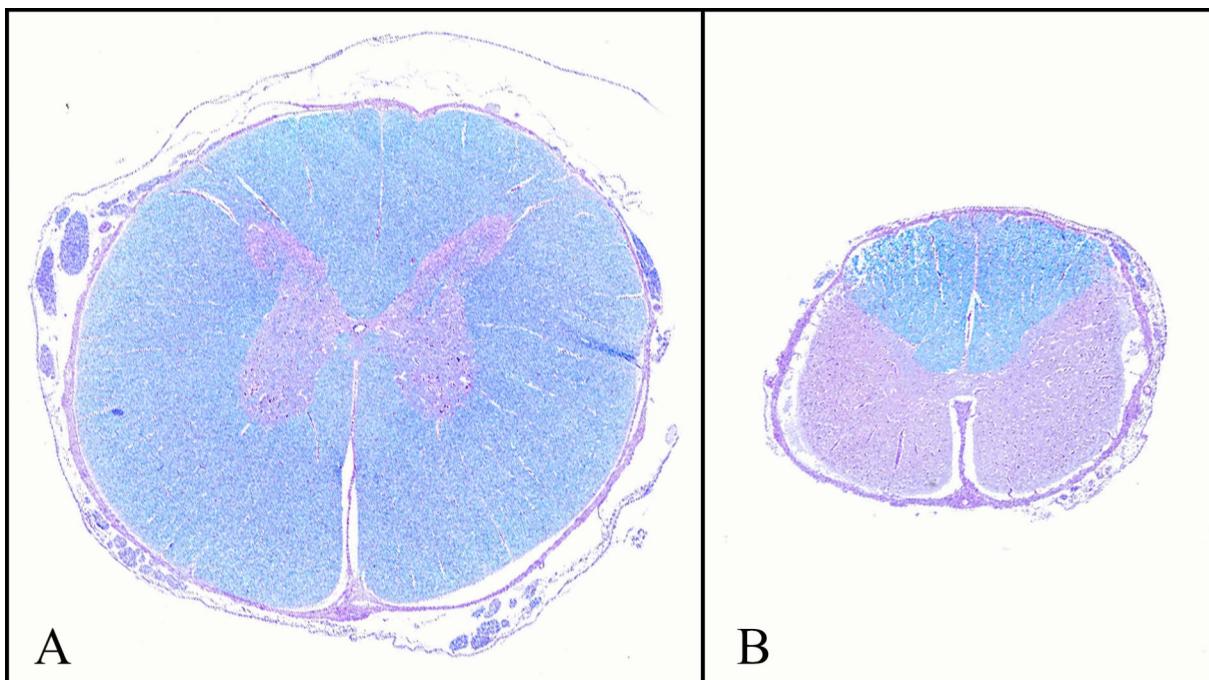


Figure 16: *Micromyelia*. Age- and site-matched spinal cord transversal histological section at the level of C4. A, control calf; B, SBV case. Note atrophy/hypoplasia and disappearance of most myelinated cords in ventral and lateral tracts of SBV case. Luxol fast blue staining.

Generally, the deficit in motor neurons was more pronounced than the deficit in sensory neurons (Table 4). Finally, there was an inverse correlation between the density of spinal neurons and the magnitude of whole-body deformation (Table 4).

Table 4: Correlation between spinal neurons counts and axial muscles histological changes in 15 SBV cases

Structure examined ↓	Control calves	SBV cases - whole-body deformity score															
		WBD-0			WBD-1			WBD-2			WBD-3						
		Calves IDs →		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Axial muscles																	
<i>M. semi. capititis (cas)</i>	Histology	0	NT	0	0	0	3	0	3	3	NT	3	3	3	3	3	3
<i>M. semi. capititis (ces)</i>	Histology	0	NT	1	0	0	2	0	3	3	NT	3	3	3	3	3	3
Spinal cord dorsal horn neurones																	
Left dorsal horn	Neuron count	12±5	NT	11	21	4	5	10	5	1	NT	4	0	0	0	7	3
Right dorsal horn	Neuron count	11±4	NT	23	17	6	5	10	7	3	NT	5	1	0	0	5	0
Spinal cord ventral horn neurones																	
Left ventral horn	Neuron count	50±10	NT	56	57	15	1	45	9	1	NT	0	0	0	0	7	0
Right ventral horn	Neuron count	50±4	NT	47	55	14	3	31	7	0	NT	0	0	0	0	4	0

Extent of histological changes was reported semi-quantitatively by using a score of 0, 1, 2 or 3 depending on whether the histologically normal tissue extended over 100, 75-100, 25-75, or less than 25% of the area examined and intensity of shading reflects this. Neurons were enumerated in transverse sections of the spinal cord corresponding to C4. Intensity of shading reflects the magnitude of neuron deficits. NT, not tested ; *cas*, concave side ; *ces*, convex side.

Muscles

Apart in muscle parts injured by prolonged decubitus, changes characteristic of ongoing necrotizing or inflammatory processes were absent. In particular, hypercontraction bands, myofibers containing eosinophilic coagulum, leukocytic invasion and mineralization were absent. Conversely, muscle sections consistently displayed a diffuse pattern of increased fiber size variation with connective tissue and fat infiltrations (Table 5, Fig. 17). Large-diameter fibers were admixed with severely atrophied fibers and islets of muscle-like tissue were dissected from each other by variable size areas where myofibers were replaced by fibrous connective tissue and by fat. In addition, myotubes were consistently observed in most-altered muscles examined, suggesting widespread attempts of regeneration and repair. Although the nature of the morphological changes was the same throughout the muscles examined, their magnitude, as judged from the muscle/connective tissue ratio, varied from place to place which explains the scattered whitish plaques observed macroscopically.

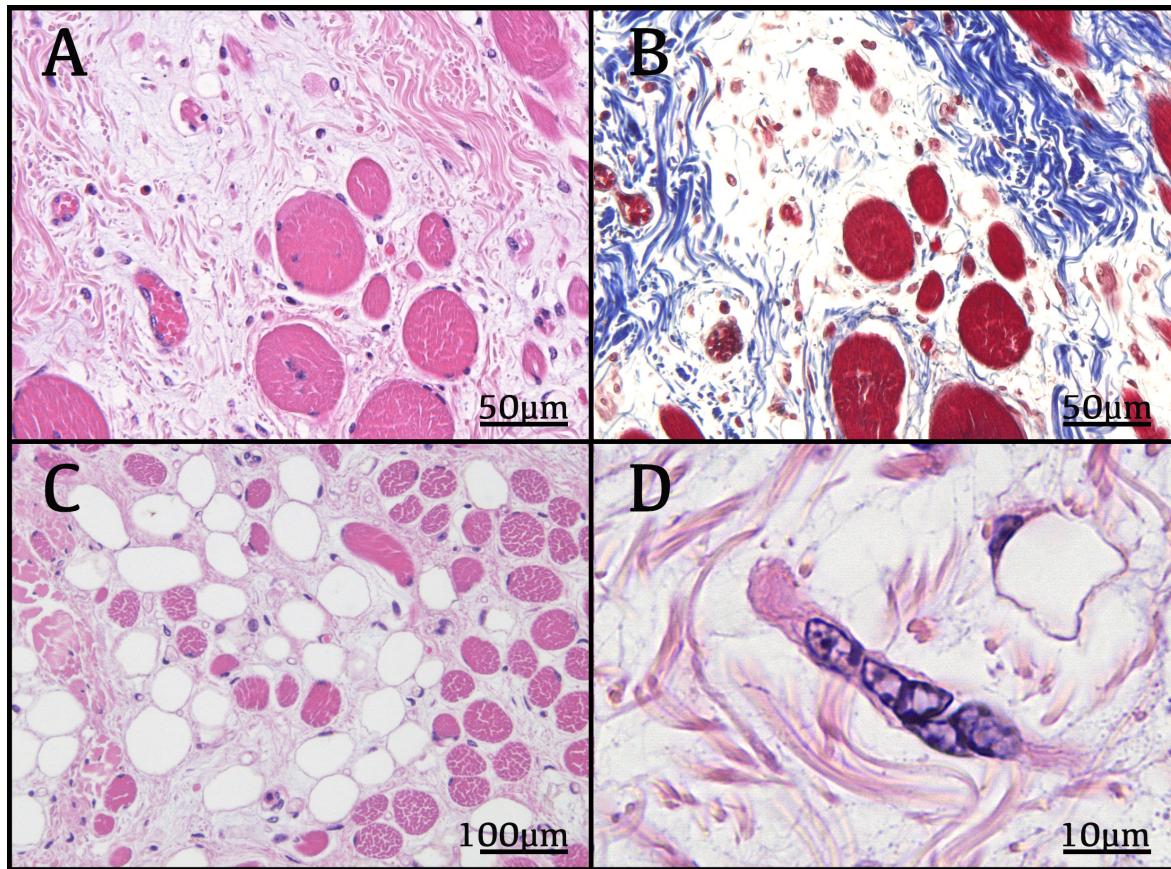


Figure 17: End-stage muscles in a typical SBV case. Age- and site-matched histological sections of Semispinalis capitis muscle. A, large-diameter fibers were admixed with severely atrophied fibers and islets of muscle-like tissue were dissected from each other by variable size areas where myofibers were replaced by fibrous connective tissue (B) and by fat (C). D, a myotube suggesting an attempted regeneration. Haematoxylin and eosin (A, C, D) and Masson's trichrome (B) stains ; magnification, x100 (C), x200 (A, B) and x1000 (D).

Table 5: Distribution of microscopic lesions and virus-specific RNA in the skeletal muscles of 15 SBV cases

Skeletal muscle ↓	Whole-body deformity score																
			WBD-0			WBD-1			WBD-2			WBD-3					
	Calves IDs →		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Spinal muscles																	
<i>M. semi. capitis (cas)</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	0	0	0	3	0	3	3	NT	3	3	3	3	3	3	
<i>M. semi. capitis (ces)</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	1	0	0	2	0	3	3	NT	3	3	3	3	3	3	
<i>M. longissimus</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	2	3	3	1	2	
Forelimb muscles																	
<i>M. supraspinatus</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	+■	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	2	3	3	1	2
<i>M. extensor carpi</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	+■	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	1	0	0	0	0	0	0	0	NT	1	3	3	3	0	3
<i>M. flexor carpi ulnaris</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	+■	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	1	0	0	1	0	0	0	0	NT	3	3	3	2	3	
Hindlimb muscles																	
<i>M. semimembranosus</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	+■	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	0	1	0	0	0	0	3	NT	3	3	3	3	3		
<i>M. quadriceps femoris</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	+■	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	0	0	0	1	0	3	3	NT	3	3	3	3	3		
<i>M. peroneus tertius</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	+■	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	
	Histology	NT	1	1	0	1	1	2	2	NT	0	3	3	3	3		

Extent of histological changes was reported semi-quantitatively by using a score of 0, 1, 2 or 3 depending on whether the histologically normal tissue extended over 100, 75-100, 25-75, or less than 25% of the area examined and intensity of shading reflects this. NT, not tested ; *semi.*, *semispinalis* ; *cas*, concave side ; *ces*, convex side.

Other organs

The thoracic and abdominal organs showed no lesion sufficiently reproducible to be characteristic of the cohort or of one of its subsets. The majority of animals showed lymphocytic infiltration of the small intestine submucosa, five of them a lymphocytic interstitial pneumonia and six others hepatocytes swelling, increased granularity and eosinophilia (Table 6).

Distribution of SBV-specific RNA

A general pattern emerges from the compilation of the RT-qPCR results: the viral genetic material is always present in the CNS, sometimes in the lungs and colon and almost never in the muscles. Considering the entire cohort, the virus was detected in all parts of the CNS. If we examine the animals individually however, the detection rate varies depending on the segment (Table 3). The virus is almost always detected in the spinal cord (93%) and the neopallium (87%), often in the midbrain (83%) and pons (67%) and about half the time in the diencephalon (58%), cerebellum (42%) and paleopallium (42%). Keeping animal E apart, the only organs in which the virus was detected in more than a single calf were the lungs (29%) and colon (14%). No unequivocal correlation was identified between lesions and the presence of viral genetic material in the CNS and colon (Table 6). Conversely, whereas lymphocytic interstitial pneumonia was found in only 1 of the 10 virus-negative lungs, it was detected in 75% of virus-positive lungs. Quantitatively speaking (based on threshold cycle values), no systematic differences were found between organs.

It is worthwhile to note that the viral genetic material was much more widely distributed in the tissues of animal E. In particular, while the viral genome was not detected in any of the nine muscles tested in 14 of the 15 animals, 6 muscles were viro-positive in this outlier (Table 5). Similarly, in the same calf, the viral genome was detected in five organs (liver, spleen, kidney, lung, myocardium) when it was retrieved in only 1 or 2 organs in 4 calves and never in the other 10.

Table 6: Distribution of microscopic lesions and virus-specific RNA in thoraco-abdominal organs of 15 SBV cases

Organ ↓	Whole-body deformity score															
			WBD-0			WBD-1			WBD-2				WBD-3			
	Calves IDs →		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Thorax																
<i>Lung</i>	RT-qPCR	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	Histology		IP		IP		IP				NT		NT		IP	
<i>Thymus</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology	NT								NT		NT				
<i>Myocardium</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology	NT								NT		NT				
Abdomen																
<i>Duodenum</i>	RT-qPCR	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology	NT								NT		NT		HL		
<i>Jejunum</i>	RT-qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology	I		HL						NT	I	NT	HL	HL	HL	
<i>Ileum</i>	RT-qPCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology	HL		HL	HL	HL	HL		HL	HL	NT	HL	NT	HL	HL	HL
<i>Colon</i>	RT-qPCR	NT	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology	NT								NT		NT				
<i>Kidney</i>	RT-qPCR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology									NT		NT				
<i>Liver</i>	RT-qPCR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Histology	D		D		D			D	NT		NT	D	C	D	
<i>Spleen</i>	RT-qPCR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-
	Histology									NT		NT	C			

Histological alterations are noted as follows : C, congestion ; D, degeneration ; I, leukocytic infiltration ; IP, interstitial pneumonia. HL, lymphoid hyperplasia. Blank spaces denotes absence of alteration. NT, not tested.

Discussion

This study focused on SBV-associated macroscopic and microscopic lesions and on the distribution of SBV RNA in tissues from newborn calves naturally infected *in utero*. As 100% of the 17 seropositive newborn calves displayed severe morphological alterations of the telencephalon and spinal cord and because SBV RNA was detected there in >87% of cases, we conclude that the fetal CNS is systematically targeted during SBV infection *in utero*.

Central nervous system

Porencephaly and hydranencephaly are two morphologically distinct types of compensatory hydrocephaly in which the spaces normally occupied by the neopallium are filled with cerebro-spinal fluid (Summers, 1995). As similar lesions were previously associated with infection of the bovine fetus with phylogenetically close (Akabane, Aino, and Cache Valley) or even distant (Bluetongue, Wesselbron, Rift valley fever, and Chuzan) viruses, it is very likely that there is a causal relationship between the infection by SBV *in utero* and these forebrain deformities. On a mechanistic point of view, por- and hydranencephaly could result from destruction of the paraventricular germinal zone of the telencephalon as well as of the neocortex that is already formed. The mechanisms involved can broadly be separated into 2 types which are not mutually exclusive: (i) direct cytopathogenicity of SBV on neuronal and glial cells and (ii) ischemic necrosis. In the present SBV-positive cases, there was very little evidence for ischemic destruction due to a vasculopathy. In particular, neither thrombosis or perivascular edema, nor sequelae of hemorrhages (erythrophagocytosis or hemosiderin-laden macrophages) were seen, which sharply contrasts with histological reports describing the similarly cavitated brains of bluetongue virus-infected bovine fetuses (MacLachlan and Osburn, 1983). Conversely, our histological findings resemble those characterizing the cavitated telencephalon of lambs infected by Cache Valley virus *in utero* (Rodrigues Hoffmann *et al.*, 2012). Selective nerve cell necrosis and subsequent cavitation were therefore supposed to result from the direct cytolytic action of the virus itself. Necrosis of paraventricular immature, rapidly dividing neurons would prevent the outward migration of neuroblasts and subsequent maturation of the cerebral cortex and cause hypoplasia whereas necrosis of established neocortical neurons would result in atrophy. In both cases, cavitation of necrotic areas then follows, the distinction between hydranencephaly and porencephaly being a matter of degree. A third subset of calves showed symmetrical dilatation of the lateral ventricles with corresponding thinning of the cortex (hydrocephaly). Logically, one of the causes of such damage is a stenosis of the mesencephalic aqueduct (Baumgärtner *et al.*, 1982; Csiza *et al.*, 1971). When this happens, the lateral ventricles expand primarily at the expense of the neopallium (necrosis by compression) because the resistance of the diencephalon to mechanical constraints seems higher. The stenosis may result either from a developmental disorder associated to a genetic defect (Leipold *et al.*, 1993) or from a pre- or postnatal periependymal inflammation. It is tempting to invoke

the latter mechanism here because a post-inflammatory stenosis of the aqueduct with secondary hydrocephaly has already been demonstrated in kittens and puppies infected *in utero* by the feline parvovirus (Csiza *et al.*, 1971) or canine parainfluenza virus, respectively (Baumgärtner *et al.*, 1982). Unfortunately, we have not been able to confirm the existence of significant tissue remodeling around the aqueduct, which leaves the question of the origin of hydrocephaly unresolved. The systematic lack of signs of inflammation in the telencephalons yet highly deformed and in which the genetic material of the virus is still present is a remarkable feature of the cohort examined here. This absence suggests that infection occurred early during gestation, at a time when the host response to infection is still limited (mild gliosis and mononuclear infiltration) and subsides to inapparent microscopic changes at term (Barlow, 1980; Maxie and Youssef, 2007). Regarding the cerebellum, the observations gathered here (one single hypoplasia) contrast with those reported recently by which ~40% of calves infected *in utero* displayed a cerebellar hypoplasia at autopsy (Herder *et al.*, 2012). This difference remains unexplained.

Grossly, the spinal cord was much too thin (micromyelia) and there was an obvious inverse relationship between its circumference and the degree of whole body deformity. Microscopically, the picture was that of a partially developed cord with partial myelination and far too few neurones in the gray matter, especially in the ventral horn. Again, signs of inflammation were inapparent. In addition, we observed a negative correlation between the number of neurons and the magnitude of the deformities in the axial and appendicular musculo-skeletons, suggesting a causal relationship. As muscles require normal innervation for normal *in utero* development, the possibility that necrosis of ventral horn motor neurons significantly contributes to axial and limb muscles atrophy is very likely. Indeed, losses of motor neurons occurred anywhere from the cervical to lumbar segments and were accompanied by a severe and diffuse loss of myelinated fibers in lateral and ventral funiculi and in ventral motor spinal nerves. These lesions are obviously compatible with neurogenic atrophy in the muscles normally supplied. Again, it is very likely that the cytopathic action of SBV is responsible for the necrosis of gray matter neurons. Interestingly, Akabane and Cache Valley viruses, both phylogenetically related to SBV and infecting ruminant species, target spinal cord gray matter neurons as well, again with slightly more severe lesions involving the ventral motor neurons (Charles, 1994; Edwards *et al.*, 1989; Konno and Nakagawa, 1982, 1982; Konno *et al.*, 1982; Parsonson *et al.*, 1981). Moreover, examples of viral transplacental infections in other species are known to generate a similar lesion of the spinal cord, eg varicella-zoster herpesvirus in humans (Cooper *et al.*, 2000) or Menangle virus, a recently recognized paramyxovirus, in pigs (Philbey *et al.*, 2007).

Skeletal muscles

Taken together, the macroscopic and microscopic changes in skeletal muscles are compatible with several distinct lesions: (i) atrophy, (ii) compensatory hypertrophy, (iii) chronic polymyositis, (iv) lipomatosis and (v) attempts to regenerate. The coexistence of these lesions is characteristic of so-called end-stage muscles, i.e. muscles in which one or more processes are long at work. This picture is consistent with denervation atrophy as aforesdiscussed, but a virus-induced necrotizing polymyositis could have contributed as well. In this respect, the detection of SBV genetic material in all skeletal muscles of the animal E suggests that either the calf was viremic or the virus is able to infect the muscle cells of the bovine fetus. It is therefore possible that SBV can cause muscle necrosis by a direct cytolytic effect on myofibers as Akabane and Cache Valley viruses do (Konno and Nakagawa, 1982; Rodrigues Hoffmann *et al.*, 2012). Besides, the question of why the virus was detected in many skeletal muscles of a single SBV case and never in the muscles of the other 14 remains unresolved.

Arthrogryposis

One cause of congenital limb and axial skeletal arthrogryposis is decreased fetal movement (Hall, 2009, 2009). Abnormalities affecting the central and peripheral nervous systems are actually considered to be the most common cause of fetal akinesia in affected fetuses with subsequent development of arthrogryposis (Hall, 1997). In our SBV cases, we also found that the tendon of most atrophied locomotor muscles was shortened which prevented the mobilization of corresponding joints. Altogether, there is no doubt that the lesions of the spinal cord, axial and appendicular skeletal muscles have necessarily caused focal or multifocal fetal akinesia, which has resulted in different degrees of arthrogryposis at term.

SBV biology

We know that a calf can be infected *in utero*, seroconvert *in utero* and remain asymptomatic at birth and after (Garigliany *et al.*, 2012). Here we have gathered enough facts to conclude that *in utero* infection can also result in serious damages to the CNS and muscles. By analogy with Akabane virus (Charles, 1994), it is very likely that the clinical picture shown by *in utero* SBV-infected newborns depends on the age of the fetus at the time of infection. The infection must be quickly contained if the fetus is infected when immunocompetent (120/150 days post-conception onward) and we deduce that, consequently, the damages inflicted by the virus have no or little effect on its further development. Conversely, the infection likely spreads easier and lasts much longer if the virus contaminates an immunologically immature fetus, probably causing lesions severe enough to significantly impede further development. Knowing that transplacental infection is only possible when the first placentome is present (30 days post-conception in cattle), the time window during which the infection of a bovine fetus may lead to a por-/hydranencephaly-micromyelia-arthrogryposis syndrome ranges from 30 to

120/150 days after conception. In addition, as different degrees of overall deformation were observed (4 WBD scores) and because they are correlated with a progressively larger number of necrotic neurons, we suggest that the importance of spinal cord injuries, so the number of necrotic neurons and therefore the overall severity of the deformity, also depends on the age of the fetus within the risk window.

The virus was detected in 15 of the 17 calves infected *in utero*. When the virus infects the bovine fetus during the risk window mentioned above and causes neuromuscular defects, its genetic material therefore remains detectable at term in the majority of cases (~90%), thus 4 months later, at a minimum. The physical form of this persisting virus and the way it persists in the face of a strong seroconversion is currently unknown. The hypothesis of the existence of sanctuaries must be addressed, for example in the CNS (~90% of cases were viro-positive) or lung (~30%). In practice, a priority is to establish whether the virus persists in calves infected *in utero* but born asymptomatic. Should this be the case, the possibility that the virus may leave his sanctuary later and spread hematogeneously to infect a new generation of Culicoides and perpetuate its biological cycle must be taken into account in future epidemiological studies.

Despite the fact that SBV infects the immunologically immature fetus, no simultaneously viro-positive and seronegative animal was detected, which suggests that immunotolerant calves, if any, are less than 6%. This was not a surprise as, to our knowledge, no cases of immune tolerance have been reported so far for the phylogenetically close Akabane, Aino, Shamonda, or Sathuperi viruses. Taken together, these observations suggest that there might be no induction of immune tolerance with Simbu group viruses which, in face of the relatively frequent occurrence of immunotolerance to the BVD virus in calves infected *in utero* during the same risk window, raises a fascinating mechanistic question.

Laboratory diagnosis

To our knowledge, there is currently one well-documented source with which to compare the rate of detection of SBV RNA in suspected SBV cases (De Regge *et al.*, 2013). At first sight, these detection rates appear very different. This is however not a surprise since the definition of a suspected SBV case is very different between the two studies. For De Regge *et al.*, a suspected case was an aborted calf that showed the typical malformations described for SBV infection, being arthrogryposis, hydranencephaly or hypoplasia of cerebrum and/or cerebellum (De Regge *et al.*, 2013). Using this definition, 38% of the suspected cases proved SBV RNA positive. In the present study, we considered that, in the spring 2012, the whole spectrum of SBV-related conditions in the bovine species was, by definition for a disease that had emerged 2 months before, unknown. This is the reason why we opted for a broader definition of suspected SBV cases: (i) calves with neurological symptoms *ante mortem*, or (ii) calves with musculo-skeletal deformities, or (iii) calves in which no unequivocal cause of death

was identified at autopsy. Using this broader definition, 22% of suspected cases proved SBV RNA positive. Further, if we restrict the cohort of suspected SBV cases to those compatible with the aforescribed narrow definition, we then had 15 suspected cases in total, of which 13 proved SBV RNA positive, thus a detection rate of 87%. In this case, the starting cohort is similar, except that aborted calves were tested on the one hand (De Regge *et al.*, 2013), and calves born at term on the other (this study). Considering the methodological aspects, it seems that the higher rates we observed could be due to one of, or to the combination of three differences, each allowing an increased sensitivity. First, we stored the tissue samples at -80°C often within 24 hours after death and, in all cases, within 48 hours, which is favorable to the conservation of viral RNA. Second, the extraction procedure implemented in this study (TRIzol) is deemed more efficient than using commercially available kits. Third, whereas SBV and β-actin RNAs were amplified together in a duplex assay in the first study (De Regge *et al.*, 2013), we amplified SBV RNA and β-actin RNA separately, which, between our hands, results in an increased sensitivity compared to duplex assays.

To our knowledge, this study is the most comprehensive so far in terms of distribution of SBV RNA in the calf naturally infected *in utero* (26 sites were tested, cf. Tables 4-6). It clearly appears that testing the spinal cord at C4 maximizes the probability of detecting the virus (93%). The viral RNA is also often present in the neopallium (87%) and the mesencephalon (83%). Taking a fragment at each of these 3 sites and pooling them for RT-qPCR can detect all, which confirms recently published reports (Bilk *et al.*, 2012; De Regge *et al.*, 2013). For cons, the paleopallium, diencephalon and cerebellum seem definitely not suitable for diagnosis. Furthermore, we show that the lymphoid and related organs (spleen, thymus, liver) contain only very rarely the virus (in 1 out of 15 calves), which suggests that SBV is not lymphotropic. Finally, the screening of the organs revealed that the virus is quite frequently detectable in the lungs (one third of cases). This result is surprising since, unlike the CNS, lungs are exposed to circulating antibodies. This observation may reflect an important aspect of the biology of the new virus in its ruminant host.

Diagnosis on the field

The data suggest that, on the field and when resources are limited, relying on precolostral positive serology to assign the cause of a congenital triad por-/hydranencephaly-micromyelia-arthrogryposis to SBV is rarely wrong. This conclusion is obviously valid only in areas where phylogenetically related viruses, those likely to cause cross reactions, are absent. In the present context, the cause of all cases of arthrogryposis autopsied between January 1 and June 30, 2012 was established: either the SBV genetic material or anti-SBV IgGs were detected, or the animal was homozygous for the *PIGH* mutation. The presence of this genetic defect in a population does not, however, hamper the differential diagnosis in field situations: the genetic

arthrogryposis syndrome does not include por-/hydranencephaly or micromyelia. Further, the calves concerned always display a cleft palate, which was never observed among SBV cases.

Acknowledgements

The authors thank Drs Martin Beer and Bernd Hoffmann (Friedrich-Loeffler Institut, Riems, Germany) for kindly having provided help for the set up and validation of our RT-qPCR procedure and for having confirmed a set of results. Mrs Deborah Kleijnen and Pauline Meirlaen are highly acknowledged for their skilled technical support through the study. The study was supported by a grant from the Research Council in Life Sciences of University of Liège.

Section expérimentale

Étude 2

Schmallenberg virus, cyclical reemergence in the core region: a seroepidemiologic study in wild ruminants, Belgium, 2012-2017

Emerging Infect. Dis. Submitted

Bayrou C., Volpe R., Lesenfants C., Paternostre J., Coupeau D., Muylkers B., Moula N., Desmecht D.
and Linden A.

Préambule

Cette étude a été le résultat du suivi, pendant cinq ans, de la séroprévalence de SBV parmi les populations de cervidés sauvages de Wallonie. L'étude s'est appuyée sur la récolte de sérum réalisée annuellement par le Réseau de Surveillance Sanitaire de la Faune Sauvage (ULiège).

Les échantillons appartenaient aux deux espèces majoritaires, le chevreuil (*Capreolus capreolus*) et le cerf (*Cervus elaphus*). Les échantillons ont été classés suivant l'âge en deux catégories, les juvéniles (jeunes de l'année) et les adultes. Les sérum ont été analysés au moyen d'un ELISA commercial de compétition (IDvet®). Pour les trois premières années, de 2012 à 2014, une séroneutralisation a été effectuée sur un *pool* aléatoire d'échantillons.

L'ELISA a montré une sensibilité relative de 70% et une spécificité relative de 93%. Néanmoins, les échantillons de cerfs pour l'année 2012 font exception. Pour cette cohorte, la spécificité relative tombe à 30%. Elle n'a donc pas été introduite dans les analyses statistiques.

Les résultats démontrent deux pics de circulation en 2012 et 2016. En dehors de ces deux années, la circulation est minimale. Ainsi, la séroprévalence chez les juvéniles n'atteint que quelques pourcents sans être significativement différente de zéro. La séroprévalence chez les adultes décroît progressivement après 2012. Cette décroissance est beaucoup plus marquée chez les chevreuils, suggérant que la persistance des anticorps est moins grande chez cette espèce. L'année 2017 est marquée par une diminution de la séroprévalence comparable à la transition 2012-2013.

Le schéma général de l'évolution de la séroprévalence est compatible avec des pics de circulation cycliques du SBV à l'instar de ce qui s'observe pour les autres *Orthobunyavirus* dans les zones endémiques. Ces données suggèrent également que les cervidés sauvages n'ont pas de rôle central dans la dynamique de circulation du virus.

Abstract

The Schmallenberg virus emerged in 2011 in Europe. The epicenter of primordial spreading was the region straddling Germany, the Netherlands and Belgium. After the remarkably fast spreading of the virus across Europe, one of the key questions was whether the newcomer would establish a lasting presence on the continent. Using the IDvet commercial multispecies ELISA, we followed the corresponding seroprevalence dynamic in southern Belgium (Wallonia) wild deer populations for 5 years (2012 to 2017). The study revealed two years of intense circulation, 2012 and 2016, characterized by a peak seroprevalence in the two studied populations (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*). The difference between low and high circulation years was particularly clear among juveniles. Between the peak years and after 2016, seroprevalences declined rapidly among adults and became nil among juveniles. The general pattern of seroprevalence evolution observed is consistent with a cyclic circulation of Schmallenberg virus, similar to what is observed for other Orthobunyaviruses in endemic areas. These data also suggest that wild cervids play no central role in the circulation dynamics of the virus.

Introduction

Schmallenberg virus (SBV) is a tri-segmented negative-sense RNA virus that was discovered in 2011 in Germany and the Netherlands (Hoffmann *et al.*, 2012; Muskens *et al.*, 2012) after an increasing number of veterinarian practitioners recorded a syndrome of fever, watery diarrhea and drop in milk production in cattle herds that was not solved by an extensive etiologic investigation. The *Schmallenberg orthobunyavirus* species is one of the 88 members of the *Orthobunyavirus* genus that belongs to the *Peribunyaviridae* family and infects ruminants. It is transmitted by midges from the *Culicoides* genus (Diptera: *Ceratopogonidae*). The most efficient vectors belong to the *Obsoletus* complex (*C. obsoletus*, *C. chiopterus*, *C. scoticus*) (De Regge *et al.*, 2014; Elbers *et al.*, 2013; Rasmussen *et al.*, 2012). The main economic impact (Saegerman *et al.*, 2014) of the infection is the consequence of the *in utero* infection: fetal death or malformation consisting in arthrogryposis linked to severe neuronal losses in the central nervous system (Bayrou *et al.*, 2014; Peperkamp *et al.*, 2015).

One of the most spectacular aspect of the virus biology was its remarkable spreading across Europe (Rossi *et al.*, 2017). Indeed, retrospective studies in culicoides population in France showed that, by the time of the virus discovery by the Friedrich-Loeffler-Institute (Germany), SBV was already circulating in the Burgundy region (Ségard *et al.*, 2018). And, after the first season of circulation, the virus invasion covered Belgium (Méroc *et al.*, 2013), the Netherlands (Elbers *et al.*, 2013), northern half of France (Dominguez *et al.*, 2012), the majority of Germany (Conraths *et al.*, 2013a) and the south of England (McGowan *et al.*, 2018). In comparison to the Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) that emerged in the same area in 2006, the SBV spreading was evaluated to be 20

times more efficient in terms of cumulative cases and 2 times longer in terms of distances (Gubbins *et al.*, 2014b).

Belgium is one of the core country of the primary epidemic (Conraths *et al.*, 2013a). In spring 2012, the seroprevalence in cows from Wallonia (southern half of Belgium) reached 90,8% (Garigliany *et al.*, 2012) and the between-herd prevalence in the whole country was 99,8% in cattle (Méroc *et al.*, 2013) and 98,0% in sheep (Méroc *et al.*, 2014).

All across Europe, wild ruminants that have been in contact with the virus developed a detectable humoral response (García-Bocanegra *et al.*, 2017; Larska *et al.*, 2014; Mouchantat *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2017). Beside the detection of SBV-specific antibodies, no evidence of other signs of the disease is reported, especially no abortion. However, the very low probability to find dead fetuses in forest leaves open the question of the vertical transmission of SBV in wild deer (Linden *et al.*, 2012). At the end of 2011, the seroprevalence in wild ruminants populations in Wallonia was: 45.9% for roe deer (*Capreolus capreolus*) and 40.5% for red deer (*Cervus elaphus*).

We herein followed over 5 years the dynamics of SBV seroprevalence in deer population in Wallonia. According to our best knowledge, this is the only study so far that offers a 5-year global view of the virus fate after the primary outbreak in one of the regions of the epidemic epicenter.

Materials and methods

Ethical statement

All the samples used in this study were collected post-mortem. As a consequence, no animal being specifically hunted for this study, no ethical approval was required.

Serum samples

The study is based on the annual sampling protocol of the Surveillance Network of Wildlife Diseases (SNWD) of the University of Liège (Belgium). The SNWD takes advantage of the hunting activities in southern Belgium (Wallonia) to collect, every year from October 1st to December 31th, as many samples as possible to cover the largest number of communities. Blood is collected post-mortem from the saphenous veins (or other veins if unsuccessful) or directly from heart's ventricles. Briefly, two dry tubes are filled with venous blood. After centrifugation (1000 g, 10 min, room temperature) the sera are aliquoted and stored at -20°C. Serum color was used to evaluate magnitude of postmortem hemolysis, yielding 3 qualitative categories: "absence", "mild" and "severe". No analysis was carried out on severely hemolysed sera. A set of descriptive data was systematically aggregated with each serum: species, gender, age, body weight, date and location of sampling.

Antibodies detection

All samples were analyzed using the commercially available *ID Screen® Schmallenberg virus Competition Multi-species* enzyme-linked immunosorbent assay (IDvet, Grabel, France). Following the manufacturer instructions, the analysis can lead to 3 different outcomes: positive, doubtful or negative. All samples were tested in duplicates, those returning either two positive or one positive one doubtful were considered as positive.

To assess the relative sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the said ELISA, sero-neutralisation tests (SNT) were carried out in parallel on a random subset of samples taken in years 2012, 2013 and 2014. After thawing, sera were incubated at 56°C during 30min for heat inactivation of the complement. They were diluted 6 times in a serial 2-fold dilution process with Minimal Eagle Medium (MEM). Into each well, 100-200 TCID₅₀ of virus stock were added (SBV isolate BH80/11-4 kindly provided by University of Namur). Infection of BHK cells monolayer showing 70% of confluence was performed after 2 hours of incubation at 37°C. Infected cells were incubated during 4 days before lecture. Fixation was achieved by a 20 min incubation with crystal violet/ethanol solution. Titers ≥ 8 were considered positive.

Statistical analysis

Descriptive statistics were used to calculate the frequency of seropositive animals by species and year. A logistic regression was firstly applied to the whole dataset and, separately, to each species (*Capreolus capreolus* – *Cervus elaphus*), then to the year 2016 according to a similar approach. The following factors were used to explain the positive ELISA results: “year”, “month”, “community”, “species”, “gender” and “age category”. The statistical differences between years were evaluated using a PostHoc test. All statistical analysis were performed with SAS (SAS, 2001).

Results

Samples

The species, age, time and location distributions of animals from which serum samples were drawn are detailed in Table 7 and Fig. 18. In this study, 2258 sera were analyzed : 1140 from roe deer and 1138 from red deer. The number of samples per year is quite homogeneous, 2017 excepted (~300 samples). Most wild cervids living in southern Belgium are found in the Ardennes, which explains the apparently heterogeneous geographical distribution seen in Fig. 18.

Table 7: Number of harvested sera by years in deer populations, Wallonia (Belgium)

	2012	2013	2014	2015	2016	2017	TOTAL
Roe deer							
(<i>Capreolus capreolus</i>)	239	259	170	190	173	109	1140
adults	169	186	121	147	125	76	824
juveniles	70	73	49	43	48	33	316
Red Deer							
(<i>Cervus elaphus</i>)	189	245	214	171	183	116	1118
adults	106	140	118	99	103	65	631
juveniles	83	105	96	72	80	51	487
TOTAL	428	504	384	361	356	225	2258

Geographical repartition of deer sera sampled from 2012 to 2017, Wallonia (Belgium)

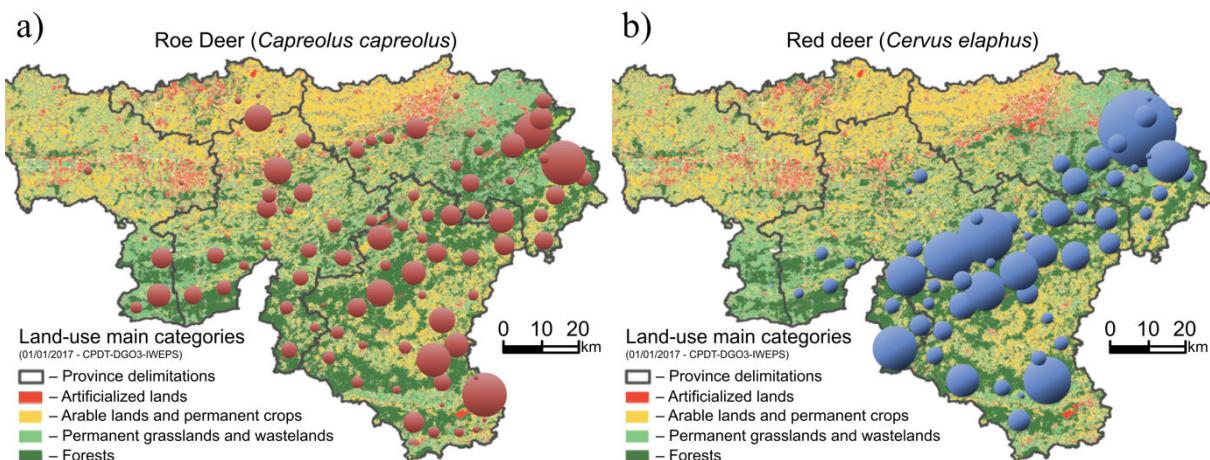


Figure 18: Circles represent samples collected by the Surveillance Network of Wildlife Diseases of the University of Liège (Belgium) for (a) roe deer (*Capreolus capreolus*) population and (b) red deer (*Cervus elaphus*) population. Each circle is centered on the community where the samples were harvested. The circle area is proportional to the number of samples collected in that particular community. The map was edited in 2017 by the Walloon Institute for Evaluation, Prospective and Statistics (IWEPS) and show the use of lands in the provinces of Wallonia (Belgium).

Relative Se and Sp of the competitive ELISA

To assess the relative sensitivity and specificity of the commercial ELISA used in this study, 622 sera were randomly drawn from the 2012, 2013 and 2014 cohorts for simultaneous testing by SN, the latter being taken as the gold standard. The overall relative Se was 70% (95% CI: 66% - 77%) and Sp was 93% (95% CI: 90% - 96%). For unknown reasons, the relative Se dropped dramatically to 30% when examining the subcohort of red deer sampled in 2012 only. These sera were retested with different kits/operators without improving the detection rate of positive samples. Based on this abnormal low level of detection compared to all other subcohorts, we decided (1) to report overall Se

and Sp calculated from the 5 other subcohorts, (2) to use SN-calculated seroprevalence in the said subcohort and (3) to exclude red deer sampled in 2012 from the statistical analysis.

Seroprevalence and statistical analysis

The seroprevalence results suggest that only two years were compatible with an intense virus circulation : 2012 and 2016 (Figure 19 and Table 8). Indeed, for both years, a far higher seroprevalence than for other years of sampling was observed, whatever the species or the age category ($p < 0,05$). Among juveniles, the apparent seroprevalences in 2013, 2014, 2015 on the one hand and 2017 on the other were not significantly different from zero ($p > 0,05$). Simultaneously in the adult populations, a continuous decrease in apparent seroprevalences was noticed from 2012 to 2015 compared to 2012, then in 2017 compared to 2016 (with a nadir close to 10%). The rate of decrease tended to be faster among roe deer compared to red deer. Further, the logistic regression detected two factors that significantly influenced the probability to be positive : “year” and “age” ($p < 0,0001$).

Table 8: Statistical comparison of Schmallenberg virus seroprevalence between years in deer populations, Wallonia (Belgium)

	2012		2013		2014		2015		2016		2017	
	Juv.	Adul.	Juv.	Adul.	Juv.	Adul.	Juv.	Adul.	Juv.	Adul.	Juv.	Adul.
2012	<i>Capr.</i>	p	p	p	p	p	p			p	p	
	<i>Cerv.</i>	n. s.										
2013	<i>Capr.</i>							p	p			
	<i>Cerv.</i>				p		p	p				
2014	<i>Capr.</i>						p	p				
	<i>Cerv.</i>						p	p				
2015	<i>Capr.</i>						p	p				
	<i>Cerv.</i>						p	p				
2016	<i>Capr.</i>								p	p		
	<i>Cerv.</i>								p	p		

* *Capr.*, Roe deer (*Capreolus capreolus*); *Cerv.*, Red deer (*Cervus elaphus*); Juv., juveniles; Adul., adults; p, significant statistical result $p < 0,05$; n.s., no statistical test.

Seroprevalence in deer population from 2012 to 2017, Wallonia (Belgium)

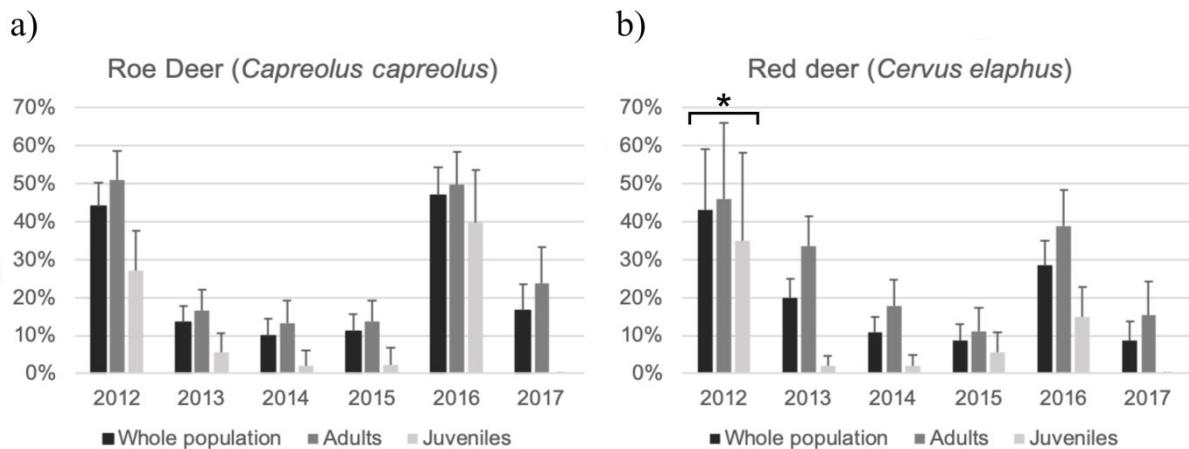


Figure 19: Follow-up of the seroprevalence of Schmallenberg virus among (a) roe deer (*Capreolus capreolus*) population and (b) red deer (*Cervus elaphus*) population for the five years that followed the initial spreading in 2011. * The ELISA sensitivity was dramatically reduced ($Se = 30\%$) for sera sampled in 2012 in the red deer population; thus, the results presented for this cohort are not the direct results from ELISA but a calculated estimation based on SNT results combined with the sensitivity and the specificity of the ELISA observed in other cohorts

Discussion

Studying wild ruminants

Wild ruminants were chosen as a basis for this study after their sensitivity had been proven (Linden *et al.*, 2012). This choice comes with some advantages: (i) those ruminant populations are full time outdoor which we expect maximize seroconversion as even partial indoor management influences seroprevalence (Helmer *et al.*, 2013; Veldhuis *et al.*, 2013) and (ii) as the hunting season in Belgium is limited to three months (October, November and December), the sampling period is constant over years and takes place at the end of culicoides season (Cuéllar *et al.*, 2018). One major limitation is the impossibility to conduct a preestablished statistically optimal sero-survey. Firstly, because of no available precise population data and, secondly, the choice of sampled animals depends on the hunting bag.

Main outcome: cyclical major circulations

The main result of this study is the observation of an endemic installation of SBV in Wallonia with cyclical major reemergence. Such an endemic profile has been already described for phylogenetically close virus: Akabane, Aino and Peaton viruses (Kato *et al.*, 2016). In our study, cycle duration is estimated to be 4 to 5 years long. Indeed, the emergence took place in 2011 and 2012 circulation is probably specific to the geographic area covered by this study (see below).

This cyclical profile fits with the “Susceptible-Infected-Recovered-Susceptible” (SIRS) epidemiological model. In general, the transition from “Recovered” to “Susceptible” involves 3 main mechanisms: population renewal, vanishing immunity or viral mutations. The latter is frequently observed with RNA viruses. However, SBV has shown a remarkable genetic stability over time (Hofmann *et al.*, 2015; Wernike and Beer, 2017), likely due to the bottleneck effect created by the permanent shift between mammalian and arthropods hosts. Thus, viral mutation is probably not the main factor that triggers the reemergence in the SBV context.

In domestic ruminants, the acquired immunity has been demonstrated to last at least 4 years in sheep (Claine *et al.*, 2018) and 6 years in cattle (Wernike *et al.*, 2018a) and could be lifelong. Even if the immunity duration could vary individually, those estimations do not fit with a SIRS model in domestic species where vanishing immunity is the main factor. Therefore, the duration of acquired immunity highlights the importance of populations renewal to explain the major SBV reemergences.

Acquired immunity duration

In this study, however, the decrease rate of the immunity is fast, especially in roe deer (for the whole population: from 44% in 2012 to 14% in 2013 and from 47% in 2016 to 17% in 2017. If the population renewal rate was the only parameter used explaining this decrease in seroprevalence, the

calculated renewal rate should exceed 60%, which is not compatible with the expected multiplication ratio of about 1.4 for this species (Gaillard *et al.*, 1997). As a consequence, our study raises the question of the duration of humoral immunity in roe deer and supports the hypothesis of a quicker vanishing immunity.

Seroprevalence in juveniles

In this study, the seroprevalence in juveniles is highlighted. Indeed, because they are young animals born the year of sampling, their seroprevalence is a more direct reflect of the actual SBV circulation in the studied year. Nevertheless, the detection of the antibodies in young animals can also be attributed to the passive transfer of the maternal immunity. The maternal immunity in domestic ruminants becomes undetectable after approximatively 4 months (69 to 144 days) (Claine *et al.*, 2018) in lambs and 6 months (Elbers *et al.*, 2014) in calves. Since births in deer are concentrated between mid-May and mid-June, the juveniles, when sampled, were aged between 3.5 to 7.5 months. The transposition of maternal immunity duration from domestic species to wild deer implies a significant proportion of juveniles with circulating colostral antibodies. However, the absence of positive juveniles in 2017 and the small proportion (no statistically different from 0) in 2013-14-15 indicate that this phenomenon is marginal. Thus, juvenile deer are valuable indicators of SBV circulation in the year of sampling, and, as it is the case for the acquired immunity in adult roe deer, our study suggests a shorter duration period of the maternal immunity in young cervids than in domestic ruminants.

2012 Reemergence

Our results show that 2012 was a major circulation period in deer. Some occasional infections were recorded among domestic ruminants during culicoids season of 2012 in Wallonia (Bayrou *et al.*, 2013). But, because the majority of domestic ruminants had already massively seroconverted (>85%) before the culicoids season of 2012 (Garigliany *et al.*, 2012; Mérac *et al.*, 2013, 2014), not enough naive animals remained to trigger a large outbreak. Even the wild deer were already significantly infected (Linden *et al.*, 2012). Thus, a major reemergence in 2012 was not expected.

To explain this circulation, important is the geographical area of the study. Indeed, the majority of the samples of the study comes from the Ardennes. This region is of higher altitude compared to other regions of Wallonia and is mainly composed of large forests and a mix of grasslands and wastelands. This specific biotope slowed down the progression of the virus in 2011 and Mérac and colleagues (2015) noticed that, in 2012, the Ardennes was the only region in Belgium where SBV was significantly circulating: in young cattle aged between 6 to 12 months, the seroprevalence jumped from 56.8% in 2011 to 78.95% in 2012 while in all other regions this percentage decreased in young stock. Our 2012 results are thus reflecting this epidemic “lag” which is specific to the Ardennes

ecosystem. Interestingly, Rossi and colleagues (2017) reported the same one-year delay in the ecosystem of the mountains of France.

2016 Reemergence

A major SBV circulation was recorded in 2016 in both deer populations. This reemergence was detected across Europe: Belgium (De Regge, 2017), Germany (Wernike and Beer, 2017), France (Gache *et al.*, 2018), United Kingdom (Stokes *et al.*, 2018) and Poland (Larska, 2018) in domestic ruminants. The decreased seroprevalence recorded in 2017 in this study suggests that another SIRS cycle is ongoing in Wallonia.

During the 2011 circulation, Linden and colleagues, studying the same species in the same area, noticed an increasing prevalence during the hunting season showing that the virus circulated until mid-November. In 2016, no statistical difference exists between the months of sampling indicating that the virus was circulating earlier in the culicoids season.

The intensity of the SBV circulation in 2016 was similar to 2012 (no statistical difference between the two years) but seroprevalences remained far lower than the 80% or more recorded in some area during the primary invasion (Fernández-Aguilar *et al.*, 2014; Rossi *et al.*, 2017). We conclude that for this second wave of circulation, some elements modulated the velocity of the outbreak. We suggest that the remaining positive animals in the host population slow down the epidemic.

Low circulation years

Between the two reemergences, the seroprevalence was very low especially in juveniles (close to 0%). The interpretation of the few percents of seroprevalence is not straightforward, mainly because of the unknown duration of the maternal immunity in deer, but also because the prevalence is not significantly different from 0. However, if the decrease rate of immunity in roe deer between 2012 and 2013 would have been constantly applied to the following years, the prevalence in 2015 in the whole population would have been close to 2%. Therefore, the constant prevalence around 10% together with the low prevalence in juveniles suggests that, between the two reemergences, the virus is circulating at a low level and this local circulation compensates the expected decrease of seroprevalence.

In 2017, no positive samples were detected in juveniles, showing a very mild circulation of the virus. However, interpretation of these negative results should be cautious because of the low samples number collected this year.

Wild ruminants as SBV reservoirs

At the beginning of the SBV outbreak, the question of the possible implication of the deer as a reservoir raised. In this study, we recorded high levels of seroprevalence that could suggest that wild

ruminants participate to the amplification of the virus. Nevertheless, our study was not designed to look after viremia levels that could be informative on that particular question.

Yet, it is noteworthy that the low levels of prevalence (around 10%) that precedes the 2016 reemergence were already achieved in 2014. Hence, if deer were the main reservoir of the virus, the reemergence would have taken place one year earlier. It suggests a minor role of deer in the epidemiology of SBV and, probably, the infection in wild deer follows the pace of the domestic outbreaks.

Roe deer sensitivity

Interestingly, in this study as in others (Linden *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2017) the seroprevalence tends to be higher in roe deer than in red deer (even if not statistically significant in our study). An opposite situation was found in the context of the BTV-8 epidemic that started in the same area in 2006 (Linden *et al.*, 2010). Indeed, roe deer were considerably less targeted by BTV-8: seroprevalence in roe deer was 2.8% vs 52.3% in red deer. One hypothesis explains this difference with a lesser exposition of roe deer to culicoids bites. This hypothesis was based on the fact that female culicoids stalk mammalians for blood meals by detecting volatile compounds like carbon dioxide (Zimmer *et al.*, 2015). As a consequence, the size of the mammalian host could play a role with a higher attraction rate for bigger organisms (Koch and Axtell, 1979). Because BTV-8 and SBV are transmitted by the same vector (Pages *et al.*, 2014), the high SBV seroprevalence in roe deer refutes the aforementioned hypothesis.

ELISA Sensitivity

The relative sensitivity and specificity of the competitive ELISA were 71% and 93% respectively. Those results appear quite low in comparison to what is usually found in domestic ruminants with more than 98% of concordance (Bréard *et al.*, 2013; van der Heijden *et al.*, 2013; Loeffen *et al.*, 2012). However, the IDvet multispecies ELISA is widely used in wildlife studies (Laloy *et al.*, 2014; Molenaar *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2017) and Laloy and colleagues (2014) found a similar sensitivity of 70%.

In our study, sera from red deer collected in 2012 were associated with an almost complete failure of the ELISA while SNT was still working properly leading to the detection of significant number of positive samples. Thus, the ELISA appears to present an overall reduced sensitivity in wild deer compared to domestic ruminants and this phenomenon was specifically intensified for one year in one species.

The main difference between samples from domestic animals and wildlife species is the *post-mortem* blood harvest. One consequence is the high level of contamination by *post-mortem* grown

bacteria. Hence, an assumption to explain the lack of sensitivity could be that, in some way, the bacterial contaminants of blood induce a direct or indirect consumption of Np specific antibodies without altering the Gn-Gc specific antibodies that protect against cell infection in neutralization tests. We suppose that something happened with the conservation of red deer sera from 2012 that could have exacerbated the phenomenon.

Acknowledgments

We thank all the members of the Surveillance Network of wildlife diseases of the University of Liège for their strong implication and the time they spent to collect the samples for this study. Without their joyful collaboration this study would not have seen birth.

Section expérimentale

Étude 3

Anti-Schmallenberg virus activities of type I/III interferons-induced Mx1 GTPases from different mammalian species

Journal of Interferon & Cytokine Research ; Submitted

Bayrou^{1*} C., Van Laere^{1*} AS., Dam Van^{2,3} P., Garigliany¹ M., Desmecht¹ D.

Préambule

Cette troisième étude propose de comparer l'effet de la GTPase Mx1 de quatre espèces de mammifères (espèce bovine, canine, équine et porcine) sur le cycle du SBV. En effet, de nombreuses études ont déjà décrit l'action antivirale des protéines Mx humaines et bovines.

A cette fin, le protocole arrêté a consisté en une transfection transitoire de cellules HEK-293 suivie d'une infection monocycle (incubation de 5 heures). L'outil de mesure a été la cytométrie en flux. Pour le virus, la détection a été réalisée au moyen d'un anticorps monoclonal commercial ciblant la nucléoprotéine (associé à un anticorps secondaire couplé au FITC). Pour les protéines Mx1, la difficulté était de comparer le taux d'expression de différentes protéines. La solution adoptée a été d'adojoindre à chacune des quatre Mx1 un tag-V5 qui permettait la détection des différentes protéines par un seul anticorps anti-V5 (couplé à la phycoérythrine). Les résultats présentés dans cette étude sont le fruit de quatre expériences indépendantes, chacune en triplicat.

Pour chacune des V5-Mx, la présence de la protéine s'est accompagnée d'une diminution significative ($p = 0,05$) de la détection de la nucléoprotéine virale. Cet effet semblait cependant moins marqué pour la Mx1 canine. En outre, l'analyse plus détaillée des résultats de cytométrie a permis de mettre en évidence un effet dose dépendant de l'action de la Mx.

Ces résultats sont discutés à la lumière des connaissances accumulées sur l'interaction entre certains *Bunyavirales* et les Mx1 de l'homme et des rongeurs. En effet, aucune étude avant celle-ci ne s'était penchée sur l'action de ces quatre Mx vis-à-vis du virus de Schmallenberg.

Abstract

Type I/ III interferons provide powerful and universal innate intracellular defense mechanisms against viruses. Among the antiviral effectors induced, Mx proteins of some species appear as key components of antiviral defense. The family *Peribunyaviridae* includes many viruses of veterinary importance, either because infection results in clinical disease or because animals serve as reservoirs for arthropod vectors. For example, RVFV affects ruminants in whom it causes acute necrotizing hepatitis and/or abortion, Nairobi Sheep Disease Virus infects small ruminants in whom it causes hemorrhagic enteritis, Akabane, Schmallenberg and Cache Valley viruses infect ruminants in whom they cause developmental abnormalities of the central nervous system and the appendicular apparatus. It is deduced that evolutionary pressures should have led to the selection of the most appropriate Mx1 antiviral isoforms to resist these infections. Although human, mouse, rat and cotton rat Mx isoforms have been shown to inhibit different members of the *Peribunyaviridae*, the possible antiviral function of the Mx isoforms domestic animals produce has, to our knowledge, never been studied so far. Here, the anti-Schmallenberg virus activity of four distinct mammalian Mx1 proteins was measured by comparing the number of viral nucleoprotein-positive cells 5 hours after infection in a sample of 100,000 cells expected to contain both Mx1-positive and Mx1-negative cell subpopulations. The systematic depletion of Schmallenberg virus nucleoprotein-positive cells among canine, equine, porcine and bovine Mx1-expressing cell populations compared to Mx-negative cells suggests a strong anti-Schmallenberg activity.

Introduction

Type I (IFN- α/β) and III (IFN- λ) interferons provide powerful and universal innate intracellular defense mechanisms against viruses. Among the antiviral effectors induced, Mx proteins of some species appear as key components of defense. The Mx structure resembles that of other members of the dynamin-like large GTPase superfamily, consisting of a N-terminal GTPase domain (G domain) and a C-terminal stalk (Gao *et al.*, 2011). These two structural domains are linked by a bundle-signaling element that is necessary to transfer structural changes during GTP binding and hydrolysis to the stalk structure. The body of work published to date suggests that the minimum requirements of a putatively antiviral Mx protein are to possess a GTP-binding site, the structural bases allowing multimerisation, and a specific C-terminal GTPase effector domain.

In 1962, Lindenmann showed that the inbred mouse strain A2G is resistant to doses of mouse-adapted influenza virus that are lethal to other inbred strains (Lindenmann, 1962). The presence of a natural resistance gene to influenza was intriguing because mice are not natural hosts for orthomyxoviruses. Soon it became clear that said gene (*mx1*) was the first member of a small gene family present in all vertebrate species from fish to men, and that the spectrum of antiviral activity was

much larger than initially appreciated. Today, we know that Mx family members have distinct antiviral profiles against a diverse range of viruses, among them pathogens of great importance in human and veterinary medicine as summarized in a recent comprehensive review (Verhelst *et al.*, 2013).

The typical profile of a virus that is likely to be susceptible to the inhibitory effect of one or more Mx protein isoforms is to have a genome made of single-stranded RNA strands of negative polarity. The two viral families by far the most studied in this regard are *Orthomyxoviridae* and *Peribunyaviridae*. Formerly, the family *Bunyaviridae* (now the order *Bunyavirales*) was the largest virus family, with more than 350 viral species encompassed by five genera: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, and *Tospovirus* (Calisher, 1996; Fauquet *et al.*, 2005). Many bunyaviruses are significant pathogens in humans and animals with the exception of the tospoviruses, which are plant pathogens.

Human illnesses resulting from bunyavirus infection range from mild, asymptomatic infection to more severe disease including pulmonary diseases, hemorrhagic fevers, and fatal encephalitides (Dionisio *et al.*, 2003; Soldan and González-Scarano, 2005). For example, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV, *Nairovirus*) is the second most widespread of all medically important arboviruses after Dengue viruses and is endemic in much of Africa, Asia, and Europe. Notably, mortality rates of up to 30% in humans have been reported for CCHFV. In addition, La Crosse virus (LACV, *Orthobunyavirus*) and Rift Valley fever virus (RVFV, *Phlebovirus*) are important causes of arboviral encephalitides. Currently, there are no effective therapeutics or vaccines for these human bunyaviral diseases which have fueled a major research effort about innate anti-bunyavirus effectors, including human and murine Mx1 proteins. It emerged that human MxA, mouse, rat and cotton rat Mx2 proteins (but not their respective Mx1 isoforms) inhibit different members of the *Peribunyaviridae* (Verhelst *et al.*, 2013). Specifically, human MxA inhibit growth in cell culture of LACV, RVFV, CCHFV, Hantaan (HTNV), Puumala (PUUV), Tula (TULV) and Dugbe viruses (Andersson *et al.*, 2004; Bridgen *et al.*, 2004; Frese *et al.*, 1996; Kanerva *et al.*, 1996; Kochs *et al.*, 2002) and LACV in transgenic mice (Hefti *et al.*, 1999). Mouse Mx2 slows HTNV replication (Jin *et al.*, 2001), rat Mx2 inhibits LACV and RVFV (Sandrock *et al.*, 2001) and cotton rat Mx2 decelerates RVFV replication (Stertz *et al.*, 2007).

The family *Peribunyaviridae* also includes many viruses of veterinary importance, either because infection results in clinical disease or because animals serve as reservoirs for arthropod vectors. For example, RVFV affects ruminants in whom it causes acute necrotizing hepatitis and/or abortion, Nairobi Sheep Disease Virus infects small ruminants in whom it causes hemorrhagic enteritis, Akabane, Schmallenberg and Cache Valley viruses infect ruminants in whom they cause developmental abnormalities of the central nervous system and the appendicular apparatus. It is

deduced that evolutionary pressures also existed in domestic animals, which should have led to the selection of the most appropriate Mx1 antiviral isoforms to resist these infections.

Although many animal species have always been concerned by bunyaviral infections, the possible antiviral function of the Mx1 isoforms they produce has, to our knowledge, never been studied so far. In the following study, the anti-bunyaviral function of canine, bovine, porcine and equine Mx1 proteins was compared by measuring the amount of viral nucleoprotein synthesized in vitro after infection of a cell monolayer by Schmallenberg virus, the newcomer of the family, assigned to the genus *Bunyavirus*.

Materials and Methods

Experimental design

The anti-SBV activity of four distinct mammalian Mx1 proteins was measured by comparing the number of viral nucleoprotein-positive cells 5 hours after infection in a sample of 100,000 cells expected to contain both Mx1-positive and Mx1-negative cell subpopulations. The operating procedure ensured that all cells had previously been exposed to the same scenario and reagents since they had been cultured, transfected, washed, infected, fixed and stained together in the same well/tube. Finally, a V5 epitope flanked all the recombinant Mx1 proteins studied, which allowed an absolute standardization of the labeling of the different Mx1-positive cells to be identified by flow cytometry.

For transfection, five identical expression plasmids were used. They all encoded a single polyprotein, consisting of an RFP protein in the N-terminal position, then a 2A peptide, then a V5-Mx1 protein in the C-terminal position. Spontaneous splitting of the polyprotein into its 2 constitutive proteins was expected, with nuclear localization for the RFP protein and cytoplasmic localization for the V5-Mx1 proteins. The recombinant V5-Mx1 proteins targeted were the canine (suffix "cf", standing for *Canis familiaris*), equine ("ec", *Equus caballus*), porcine ("ss", *Sus scrofa*) and bovine ("bt", *Bos taurus*) isoforms. In the fifth plasmid, the ORF of the canine protein contained 5 successive stop codons arranged in the N-terminal position. This plasmid was intended to exclude the possible activity of the plasmid DNA itself and/or of the RFP protein alone, the RFP-dependent fluorescence allowing identification of the cells that were duly transfected from those that had not been.

The anti-SBV activity of the above-mentioned V5-Mx1 proteins was measured 5 h after cell monolayers had been infected with a m.o.i. of 0,5. Four independent triplicate repeats were performed. Finally, the results reported here all come from experiments whose V5-Mx1 expression rates were comparable (between 40 and 60%).

Biochemical and biologic reagents**Cells**

Human embryonic kidney cells (HEK-293T) were maintained at 37°C under a humidified atmosphere of 5% CO₂-95% air in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 0.4 mM sodium pyruvate, 1x non-essential amino acids, 100 units/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin.

Plasmids

A plasmid vector (pDA657RA) was synthesized for expressing a reference canine Mx1 (NP_001003134.1) in mammalian cells. The recombinant canine Mx1 (cfMx1) intended was fused to a N-term functional group consisting of a V5 epitope. The resulting V5-cfMx1 protein was further fused to a N-term bipartite group consisting of the fluorescent marker protein RFP followed by the spontaneously cleavable peptide 2A. In all cases, the CDS expected to encode the recombinant V5-cfMx1 protein aimed was codon-optimized, artificially synthesized by solid-phase DNA synthesis, and cloned in the said vector. Once the capacity of pDA657RA/V5-cfMx1 to drive appropriate expression of V5-cfMx1 in HEK-293T cells was duly checked, similar plasmids expressing V5 epitope-flanked equine (NP_001075961), porcine (NP_999226) and bovine (NP_776365.1) Mx1 were synthesized. Finally, 5 stop codons were introduced in the pDA657RA/V5-cfMx1 plasmid after peptide 2A, generating the control plasmid expected to express RFP alone. The 5 expression plasmids were approximately the same size (betw. 7901 and 7946 bp) and the sequences of all the inserts of interest were duly verified by sequencing before use. All plasmid maps are available on request.

Antibodies

The monoclonal anti-V5 conjugated to phycoerythrin and used in flow cytometry assays was from Abcam (catalog #ab72480) and the monoclonal anti-V5 conjugated to FITC and used in immunofluorescence studies too (#ab1274). The primary mouse monoclonal targeting viral NP was from Cambridge Bio (#01-05-0145) and the corresponding secondary polyclonal goat anti-mouse IgGs conjugated to FITC and used in flow cytometry assays was from Abcam (#ab6785).

HRP-conjugated anti-V5 tag and anti-actin monoclonals used in immunoblotting were from ThermoFisher (MA5-15253) and from Abcam (ab49900), respectively.

Virus

The SBV stock was obtained by the amplification of the SBV-BH80/11-4 isolate in BHK-21 cells (ATCC[®]#CCL-10TM).

Cell expansion and transfection

Thawed HEK-293T cells (ATCC[®]CRL-1573TM) were first passaged once in DMEM (with 10% FCS, 1% pen-strep and 0,5% fungizone) and then seeded either in T75 cell culture flasks (immunoblotting and cytology) or onto 24-well plates (1.10^5 cells per well, for flow cytometry). Eighteen hours after, cell monolayers were transfected with pDA657RA/V5-Mx1 by use of the Lipofectamine[®]3000 Transfection reagent kit (ref.#L3000-008, ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions.

Recombinant V5-Mx1 characterization by Western blotting

For immunoblotting, a 80-90% confluent monolayer in a T75 cell culture flask was transfected. Briefly, an amount of 24 µg of the plasmid DNA was diluted in P300 reagent (dilution 1:2 w/v), the mix being then added in the Lipofectamine 3000 reagent diluted in Opti-MEM medium (dilution 1:16 v/v). The final mixture was added dropwise into the T75 flask and the latter was reincubated at 37°C for 48h in a 5% CO₂ and 80% RH atmosphere. RFP-positive and –negative HEK-293T cells were sorted out by flow cytometry and resulting suspensions were washed with PBS at 4°C and pelleted by a low-speed centrifugation. Cells pellets were lysed by boiling in Laemmli's SDS-sample buffer and reduced by mixing with NuPAGE LDS Sample Buffer (ref.#NP007, ThermoFisher Scientific) and reducing agent (ref.#NP004). Subsequently, samples were heated at 70°C for 10 min and 10 µL of each were loaded on a NuPAGE[™] 4-12% Bis-Tris Protein Gels (ref. #NP0322BOX, ThermoFisher Scientific) and run at 200 V for 60 min using the XCell SureLock[™] mini-cell electrophoresis system (Invitrogen). Migrated proteins were then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (LC2005, ThermoFisher Scientific), nonspecific binding sites were blocked with skim milk (5% in PBST) for 1 h at RT and membranes were probed overnight at 4°C with an anti-V5 epitope mAb diluted in skim milk (2,5% in PBST). The blots were then washed in PBST and incubated for 1 h at RT with a horseradish peroxidase-conjugated goat pAb raised against mouse IgGs (ref.#31430, diluted 1/1000 v/v, from ThermoFisher). Finally, the membranes were washed with PBST on a plate shaker for 5 min, then in deionized water for 2 min. Detection of horseradish peroxidase on membranes was finally made by use of the chemiluminescent substrate Novex[®]OECL. Results were visualized using the imaging system ImageQuant[™] LAS 4000 and ImageJ software.

Recombinant V5-Mx1 characterization by immunocytology

For immunocytostaining, transfected HEK-293T cell suspensions were obtained as aforementioned, cytospanned and then fixed in paraformaldehyde 4% (v/v) at RT for 30 min. The fixed cells were washed with PBST, permeabilized with 0.2% (v/v) Triton X-100 for 5 min, incubated with Dako[®]Protein Block Serum-free (Code no. X0909) at RT for 2 h, and then overnight at 4°C with 10 µg/ml of an anti-V5 epitope mAb. After washing thrice with PBST, 200 µl of fluorescein

isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse immunoglobulin antibody diluted 1/200 (v/v) (Abcam, code no. ab9703970) was added onto each cytospin at RT for 60 min in the dark. Excessive reagents were then removed by washing with PBST and cellular nuclei were stained with DAPI (Aldrich, code no. D9564-10MG). The slides were then thoroughly washed with PBST, mounted with Prolong Gold antifade medium (ThermoFisher Scientific, code no. P36941) and FITC/DAPI signals were examined on a Leica TCS SP5 confocal fluorescence microscope using 488nm and 405nm laser filters.

In vitro assay of Mx1 anti-SBV activity

To evaluate the antiviral activity associated with the expression of each of the targeted V5-Mx1 proteins, the percentage of Schmallenberg virus nucleoprotein-positive cells was measured by flow cytometry in infected populations of lipofectamine-transfected HEK-293T cells. Briefly, 24h after transfection, cells were infected with dilutions of the SBV virus stock. After 1 h of infection, the cells were rinsed with PBS, placed in fresh medium, cultured for another 4 h, then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0,2% saponin and 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate-buffered saline (PBS), blocked with 1% BSA in PBS, and probed with the corresponding antibodies, first to detect viral NP using a pre-mixed cocktail of primary/secondary antibodies, then for detecting the V5 epitope. The samples were finally analyzed (>100 000 cells) in an LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences). Instrument settings were adjusted with fresh 293T samples in 4 tubes (an unlabelled sample, 2 singly labeled samples, and 1 sample labeled with the mixed antibodies) and FACS Diva calculation software (BD Biosciences). The detection and compensation stabilities were tested before each experimental campaign with SetUp beads and dot plots were analyzed with FACS DivaTM software (v.8.0.1, BD Biosciences).

Data analysis

All values are presented as means \pm SD. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) with *post hoc* testing by Fisher's protected least significant difference multiple range test.

Results

Expression of recombinant V5-Mx1 proteins in HEK-293T cells

The nature and sequence of the V5-Mx1 proteins being tested were confirmed by resequencing the product of transgene-specific PCRs from transfected HEK-293T cell extracts. Expression of recombinant V5-Mx1 proteins after transfection was assessed both qualitatively, by immunofluorescence detection of the V5 epitope in HEK-293T cells (example in Fig. 20A), and semi-quantitatively, by immunoblotting (Fig. 20B). As expected, immunocytoLOGY showed that RFP-associated fluorescence was seen in the nucleus whereas V5-Mx1 accumulated in the cytoplasm. Besides, immunoblots confirmed both the presence and the calculated molecular weight of each V5-Mx1 to be tested.

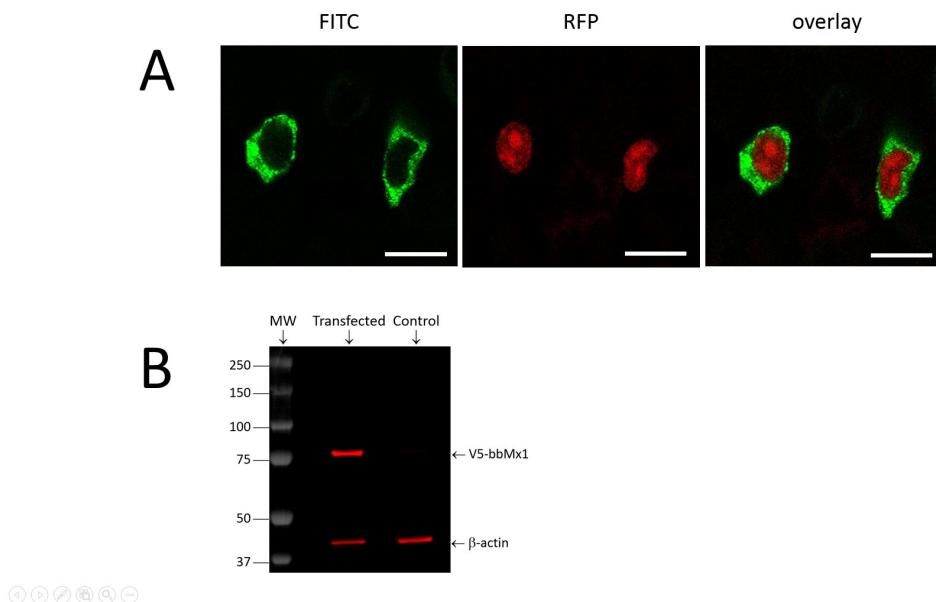


Figure 20: Expression of a Bovinae V5-Mx1 in HEK-293T cells. (A) Two cells examined under a confocal microscope after transient transfection of plasmid pDA657RA/V5-Mx1. Cells had been fixed 24 h after transfection, permeabilized, and immunostained by incubation with monoclonal anti-V5 antibody conjugated to FITC. As expected, RFP-associated fluorescence is seen in the nucleus whereas V5-Mx1 accumulated in the cytoplasm (Dam Van and others, 2019). (B) Immunoblotting, β -actin is used as a positive control and V5-positive band show the expected molecular weight.

Effect of V5-Mx1 proteins on Schmallenberg virus NP synthesis

Given the reproducibility of the apparent m.o.i. (% NP-positive cells) measured among V5-negative cells within each experimental campaign (grey boxes), it is assumed that the transfection procedure and reagents equally affected all the cell populations transfected/infected (Figs. 21-22). Moreover, as the infection rate of RFP-positive/V5-negative cells after transfection of expression plasmid pDA657RA/V5-cfMx1-ko tended to be similar to that of RFP-negative/V5-negative cells after transfection with the control empty plasmid ($p>0,05$, data not shown), it was deduced that expression of RFP *per se* did not alter the viral biological cycle in the studied cell preparation. Among

Mx1-negative cells, exposure to lipofectamine alone decreased SBV infectivity ($p<0,05$) and exposure to any of the 4 lipofectamine/plasmid cocktails tested resulted in a further decrease (Fig. 22). Interestingly, the viral NP detection rate among V5-negative cells was systematically lower when the cells had been exposed to the cocktail associating lipofectamine and the plasmid encoding the V5-btMx1 protein (Fig. 22, $p<0.05$). Further, a systematic depletion ($p<0,001$) of SBV NP-positive cells was detected in all V5-Mx1 expressing cell subpopulations, compared to the corresponding Mx1-negative subpopulations (Fig. 22). This is attributable to V5-Mx1 proteins themselves, thus suggesting a strong anti-SBV effect at the timepoint studied.

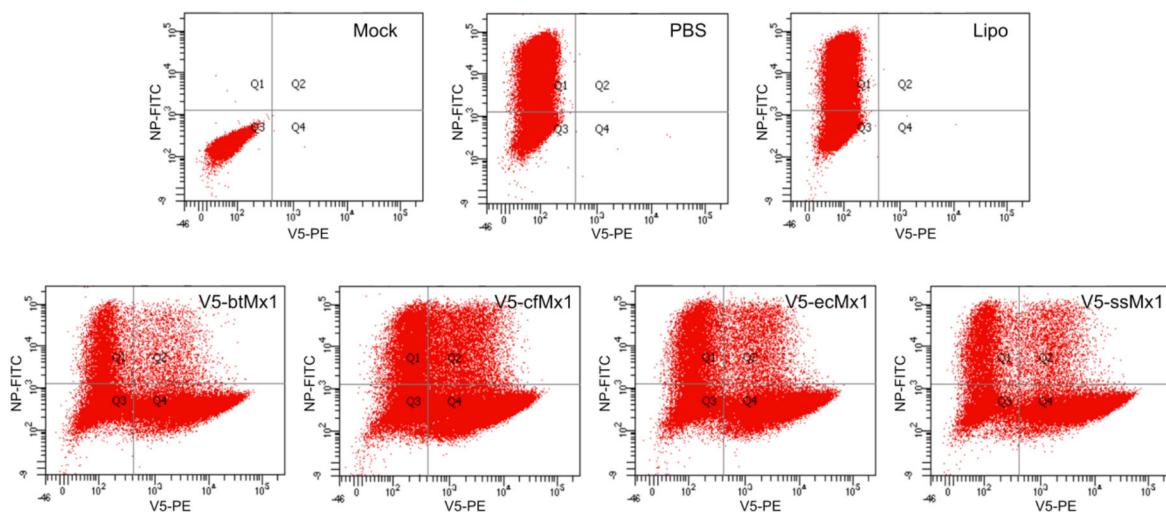


Figure 21: Schmallenberg virus nucleoprotein synthesis is inhibited or delayed in the presence of specific Mx1 proteins. Typical raw data obtained after flow cytometric analysis of double-stained HEK-293T cells that had been transfected/infected or not. Expression of exogenous V5-Mx1 proteins was driven by the corresponding plasmid transiently transfected 24 h before infection, each transfection process thus resulting in a mixed population of expressing (V5 epitope-positive) and nonexpressing (-negative) cells. Whenever appropriate, cell populations had been infected by Schmallenberg virus 5 hours before analysis. Cells were double immunostained as described in the text, with FITC detecting viral nucleoprotein and phycoerythrin (PE) detecting Mx1 V5-epitope. Cell suspensions were analyzed using a LSRII Fortessa flow cytometer, gating on forward/side scatter to exclude debris. A minimum of 10⁵ cells were acquired and analyzed with BD-FACSDiva software v.8.0.1.

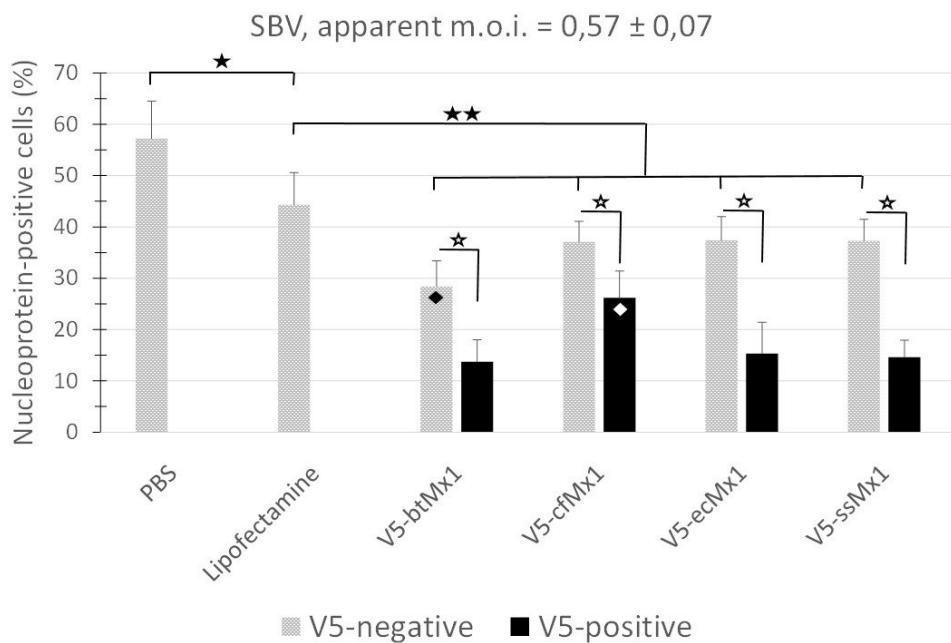


Figure 22: Percent Schmallenberg virus nucleoprotein-producing cells 5 h after Schmallenberg virus infection in HEK-293T cell populations. Each box pair represents means \pm SD measured in V5-Mx1 nonexpressing (grey) and expressing (black) cells from four independent experiments, each including 3 different wells. Expression of bovine (bt), canine (cf), equine (ec) and porcine (ss) V5-Mx1 caused significant inhibition of viral nucleoprotein expression (open stars, $p < 0.001$). Note that exposure to lipofectamine or to lipofectamine/plasmid complex significantly decreases NP detection in Mx-negative cells (closed stars, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively). The lozenges identify statistical differences ($p < 0.01$) between expression plasmids: (i) the rate of NP expression among Mx1-negative cells is lower when the plasmid encodes V5-btMx1 rather than any other Mx1 (black lozenge) and (ii) the rate of NP expression in Mx1-positive cells remains higher when the plasmid encodes V5-cfMx1 rather than any other Mx1 (white).

Comparative anti-SBV activity among different V5-Mx1 proteins

Overall, the expression of the viral NP was significantly less hampered by canine V5-Mx1 than by any of the other three V5-Mx1 proteins (Fig. 22, $p < 0.05$). When examining the distribution of fluorescences in the raw scatterplots, it is intuitively perceived that the number of NP-positive cells decreases as the intensity of the V5-associated fluorescence increases (Fig. 21). In order to quantify this trend, we arbitrarily created 5 consecutive V5-associated fluorescence ranges (Fig. 23) and measured the viral NP expression rates characteristic of each (Fig. 24). By doing so, we show that detection of SBV NP five hours after infection in V5-Mx1-expressing cells is all the more diminished/delayed as the level of expression of the recombinant V5-Mx1 protein targeted is high, suggesting a Mx1 concentration-dependent gradient in viral NP detection. Again, the canine Mx1-associated anti-Schmallenberg effect, though significant, appears weaker than that exercised by other Mx1 proteins.

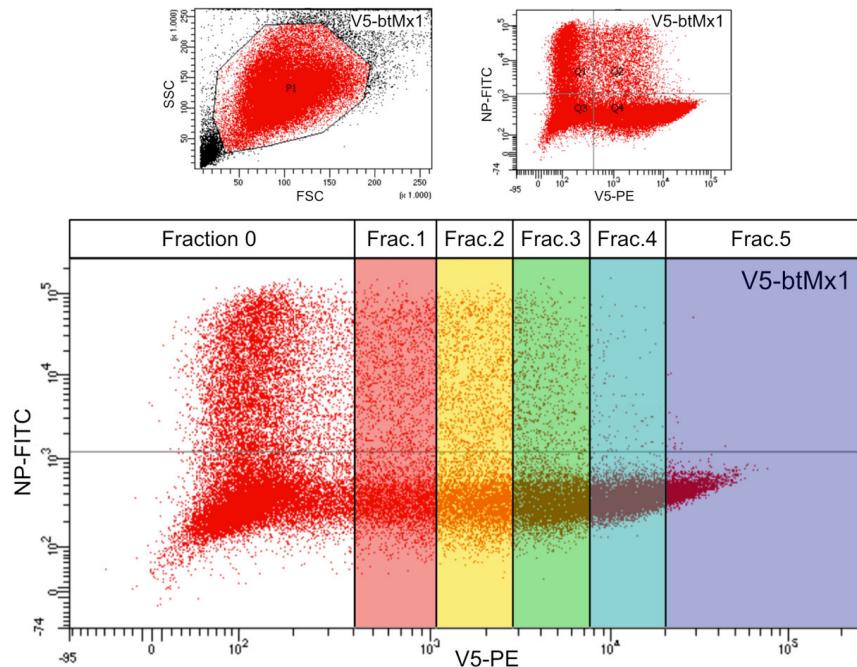


Figure 23: Schematic description of the categorization of Mx1-positive cells as a function of the intensity of the fluorescence associated with the V5 epitope and, therefore, as a function of the target recombinant Mx1 level of expression. The denomination of the five consecutive fluorescence ranges corresponds to that used in Fig. 24. See Fig. 21 for keys.

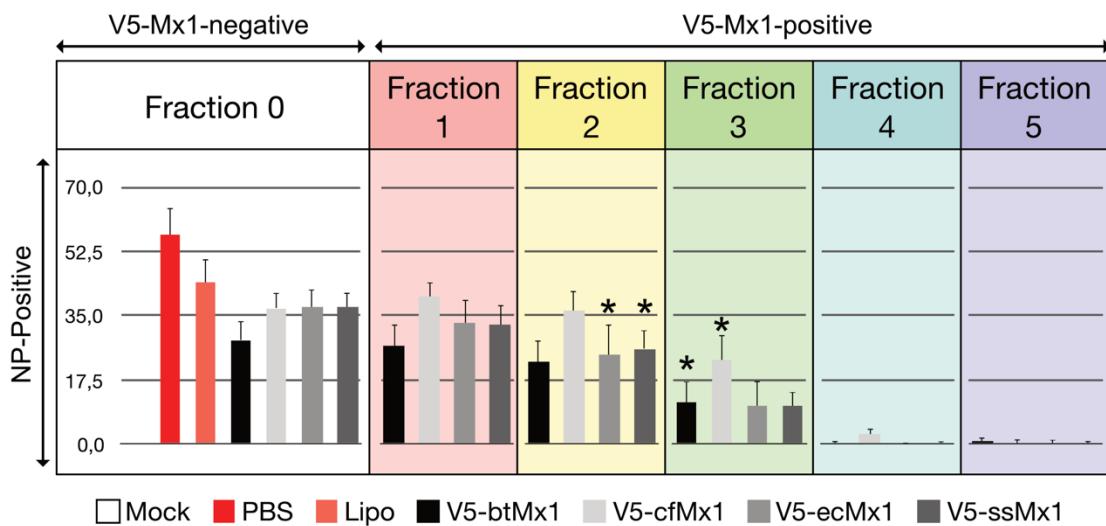


Figure 24: The synthesis of Schmallenberg virus nucleoprotein 5 h after infection in Mx-expressing cells is all the more inhibited or delayed as the level of expression of the recombinant Mx1 protein targeted is high. Note that the canine Mx1-associated anti-Schmallenberg effect, though significant, is clearly weaker than that exercised by other Mx1 proteins. Each box represents mean \pm SD of the fractions of viral nucleoprotein-positive cells characterizing mock- (black), lipofectamine- (grey) or lipofectamine/plasmid pretreated (colors) HEK-293T cells appearing in the respective V5-associated fluorescence categories defined in Fig. 23. For each pretreatment (PBS, lipofectamine or lipofectamine/plasmid), the said means \pm SD were calculated from twelve independent wells obtained from 4 experimental campaigns organized at least one week apart (3 wells per campaign). See Fig. 23 for key. *, for said Mx1, first fraction in which rate of NP expression is significantly lower than that among Mx1-negative cells ($p < 0.05$).

Discussion

The anti-SBV function of several orthologous Mx1 proteins, all of which are localized in the cytoplasm (Fig. 20A), was examined using a highly standardized experimental design. The recombinant Mx1 proteins studied all had the expected molecular weight (Fig. 20B). The common epitope (V5) grafted in the N-terminal position made it possible to use the same mAb to detect them. The fluorescence emitted by this antibody was used as a quantitative measure of intracellular Mx1 concentration and only experimental campaigns with similar V5-specific mean fluorescence for the 4 V5-Mx1 being tested ($CV < 10\%$) were retained for analysis. Therefore, results can be interpreted in terms of intrinsic antiviral activities of the recombinant Mx1 studied. Last but not least, the results suggest the existence of anti-Schmallenberg virus activity exerted by all Mx1 tested.

Antiviral effect of a set of Mx1 proteins

The antiviral spectrum of the bovine Mx1 is probably the most studied after that of human MxA. An anti-rhabdovirus activity has been detected repeatedly in several experiments conducted *in vitro*, either against VSV (Babiker *et al.*, 2007; Baise *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2009) or against the rabies virus (Leroy *et al.*, 2006). On the other hand, all the paramyxoviruses tested *in vitro* so far (Sendai virus, bovine or human isolates of parainfluenza-3 virus, bovine or human strains of respiratory syncytial virus) have been shown to be bovine Mx1-resistant (Leroy *et al.*, 2005). By contrast, *in vivo*, transgenic mice expressing bovine Mx1 are much more resistant to the mouse pneumovirus than their wild-type counterparts (Dermine and Desmecht, 2012). In an experimental design almost comparable to that used here, it had been established that the expression of an ectopic bovine Mx1 in HEK-293 cells caused a drastic decrease in the number of influenza A virus NP-positive cells (Dam Van *et al.*, 2019). Here, we show for the first time that, like human MxA and Mx2 proteins of mouse, rat and cotton rat, the bovine Mx1 protein exerts an inhibitory function on the life cycle of a Orthobunyavirus, the Schmallenberg virus. As natural infections of adult cattle with this virus remain almost asymptomatic, we suggest that the Mx1 protein participates in the innate control of the infection. In the bovine fetus, on the other hand, it is likely that immaturity of the IFN type 1 response and the resulting impairment of Mx1 expression may explain the unbridled proliferation of the virus and the associated developmental consequences (Bayrou *et al.*, 2014).

Very little information was available about the equine Mx1 protein before it was tested here. At most, we know that the corresponding gene is located on chromosome 26 (Lear *et al.*, 1998), that two spots are detected by antisera raised against human MxA on an electrophoresis gel of total proteins extracted from equine cells exposed to IFN- α (Heinz *et al.*, 1994) and that equine Mx1 exerts an anti-influenza activity (Dam Van *et al.*, 2019). According to the results gathered here, equine Mx1 also

displays a significant anti-Schmallenberg virus activity, the strength of which matched that of bovine Mx1 (Figs. 22, 24).

The porcine Mx1 gene and promoter were shown to share the major structural and functional characteristics displayed by their homologs described in mouse and man (Thomas *et al.*, 2006). In addition, allelic polymorphisms generating two very different isoforms have been identified (Nakajima *et al.*, 2007; Palm *et al.*, 2007). The anti-influenza activity conferred by both V5-ssMx1 isoforms was evaluated *in vitro* using either transfection of 3T3 cells followed by plaque assays (Nakajima *et al.*, 2007) or transfection of Vero cells followed by flow cytometric determination of the fraction of influenza virus-infected cells among Mx1-producing and -nonproducing cell populations (Palm *et al.*, 2007). Both studies revealed that isoform α of ssMx1 is endowed with a significant anti-influenza activity. Further, this result was then consolidated by highlighting a blockade of the centripetal traffic of the incoming viral particles in the presence of ssMx1 (Palm *et al.*, 2010). According to the results gathered here, porcine Mx1 displays a significant anti-Schmallenberg virus activity, the strength of which matched that of bovine and equine Mx1 (Figs. 22, 24).

When canine Mx1 was transiently expressed in 3T3 cells, no anti-VSV activity was detected, which contrasts with canine Mx2 (Nakamura *et al.*, 2005). Similarly, using the minireplicon system for modelling influenza A and B viruses biological cycle, expression of canine Mx1 did not brake the polymerase activity at all (Frensing *et al.*, 2011; Seitz *et al.*, 2010). In a recent study, the influenza A virus NP-positive cell fraction did not vary significantly in the presence of canine Mx1, suggesting, as in previous studies, that it is not endowed with anti-influenza activity (Dam Van *et al.*, 2019). Here, we show that dog Mx1 decreases or delays the synthesis of the SBV NP protein, a weaker effect than that demonstrated by the porcine, bovine and equine Mx1 proteins, but nevertheless significant ($p<0.05$). To our knowledge, this is the first time that it is shown that the life cycle of a virus is inhibited by this canine Mx1. In summary, all Mx1 proteins tested here exert an apparent anti-Schmallenberg virus activity. Since the experimental design is highly standardized and the expression levels of ectopic Mx1 were similar, both with respect to the transfected cell fraction and with respect to the average fluorescence intensity emitted by the anti-V5 mAb, the amplitude of the measured anti-SBV effects can be compared. In doing so, it appears (i) that the anti-SBV effect is approximately similar for bovine, equine and porcine Mx1 and (ii) that canine Mx1 exerts an antiviral activity slightly weaker than that shown by its three orthologs (Fig. 22).

A dose-response relationship is disclosed

The study shows that the fraction of NP-positive cells decreases steadily as the intensity of V5-associated fluorescence increases for all Mx1 proteins tested (Fig. 24). In other words, at most one cell expresses a given ectopic Mx1 protein, at most rarely the viral NP is detectable 5h pi. To our knowledge, the highly standardized design of the study allows us to interpret this result in terms of a

dose-response relationship between the cytoplasmic concentration of ectopic Mx1 protein on the one hand and the rate of viral neo-NP synthesis in the same cytoplasm on the other hand. We also show that beyond a certain concentration threshold, Mx1 completely abolishes the synthesis of viral NP (Fig. 24). This result suggests that, in nature, it is not only the amino acid sequence of a given Mx1 protein that can make the difference in terms of innate immunity, but also (especially?) the magnitude of its expression, thus the intrinsic nature of the relevant gene promoter. It should be noted, however, that the readout used measures the rate of only a partial run of the viral biological cycle since the steps downstream of the NP synthesis do not affect the results. Therefore, it is quite possible that certain Mx1 proteins may also differently brake other viral proteins synthesis, viral genome replication, assembly and/or budding processes.

About the underlying anti-SBV mechanism

The human MxA protein is known to inhibit various *Bunyaviruses* : LACV (genus *Orthobunyavirus*), CCHFV and Dugbe virus (*Nairovirus*), RVFV (*Phlebovirus*), HTNV, PUUV and TULV (*Hantavirus*) (Andersson *et al.*, 2004; Bridgen *et al.*, 2004; Frese *et al.*, 1996; Kanerva *et al.*, 1996; Kochs *et al.*, 2002). This does not mean that it has antiviral activity against all members of the *Peribunyaviridae* family. For example viruses of the genus *Tospovirus* and *Bunyamweraviruse*, the archetype of the genus *Orthobunyavirus*, escape MxA blockade (Bridgen *et al.*, 2004; Frese *et al.*, 2000). Here, we show that the life cycle of another member of the genus *Orthobunyavirus*, SBV, is susceptible to the four mammalian isoforms of Mx1 tested.

In terms of the underlying mechanism, it is the interaction between MxA and LACV that is by far the most studied so far (Frese *et al.*, 1996; Hefti *et al.*, 1999; Kochs *et al.*, 2002; Reichelt *et al.*, 2004).

Similar to other members of the *Peribunyaviridae* family, the genome of LACV consists of three single-stranded RNA segments of negative polarity. After entry into the host cell, LACV transcribes and replicates the genome in the cytoplasm. The genomic RNA segments encode three structural proteins: the RNA polymerase, a glycoprotein precursor (which is processed into the envelope glycoproteins G1 and G2), the nucleocapsid protein (N), and two nonstructural proteins (NSm and NSs). The genomic RNAs of the incoming virus are first transcribed into mRNA by the viral RNA polymerase. Following mRNA translation, replication of the genome occurs via synthesis of full-length plus-strand copies of the genomic RNA. For this shift from mRNA transcription to genome replication, newly synthesized N protein is required (Hacker *et al.*, 1989). Presumably, unassembled N protein associates with the viral polymerase to form the replication complex and tightly associates with the vRNAs to form the viral ribonucleoprotein complexes (vRNPs). These complexes are transported to the Golgi apparatus, where they associate with the viral envelope

glycoproteins and bud into the Golgi cisternae, thus releasing new virions (Schmaljohn and Nichol, 2001).

With respect to the molecular mechanism underlying inhibition of LACV by MxA, the literature data are not unambiguous. MxA was shown to inhibit LACV replication by sequestering the newly produced viral NP at large, membrane-associated perinuclear complexes, this missorting preventing NP from performing its function in viral replication (Kochs *et al.*, 2002; Reichelt *et al.*, 2004). In contrast, Frese and colleagues (1996) suggested that the active viral RNA polymerase complex is the target for MxA. They demonstrated that human MxA protein inhibits the accumulation of viral transcripts, and particularly the longer ones, suggesting an effect on elongation (Frese *et al.*, 1996). Altogether, it comes out that this effect on elongation could also be secondary to NP sequestration. This sequestration would probably also affect mostly the large segments, as they need more nucleocapsid protein for their replication. Some results suggest a similar mode of action against other viruses of this family, including CCHFV, RVFV, HTNV, PUUV and TULV (Andersson *et al.*, 2004, 2006; Frese *et al.*, 1996; Habjan *et al.*, 2009; Kanerva *et al.*, 1996). However, an argument against a general antibunyaviral mechanism is the observation that the NP of Dugbe virus appears to avoid MxA activity and is not sequestered to the perinuclear region by human MxA (Bridgen *et al.*, 2004).

Here, the average intensity of NP-associated fluorescences does not decrease when the average intensity of V5Mx1-associated fluorescences increases (Fig. 21). This observation excludes the intervention of a competition between Mx1 and mAb # 01-05-0145 (Cambridge Bio) for the same binding element or epitope on NP. Thus the Mx1 proteins tested here cause a drastic dose-dependent decrease in the number of cells expressing a detectable amount of NP 5h pi. As we are, 5h pi, at a time when secondary infections are excluded, the experiment does not inform about a possible effect of Mx1 on the replication, assembly and/or budding of new viral particles. On the other hand, it tests the event chain which goes from the binding to the synthesis of NP, while passing by the primary transcription of the genomic segment "S" during the first viral cycle. The study thus demonstrates that, under the conditions of the experiment, the four Mx1 tested hinder one or more early stages of the viral cycle. This result is compatible with a braking of the primary transcription as observed previously for LACV by Frese and colleagues (1996), but does not exclude that, downstream from the synthesis of NP, the Mx1 tested have the same anti-replicative function as the one shown when testing MxA/LACV, MxA/HTNV or MxA/RVFV pairs.

Acknowledgements

We thank the "Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur - Commission de la Coopération au Développement (ARES – CCD)" from Belgium for supporting this research. The authors thank Dr. Emna Benzarti for her careful proofreading of the manuscript.

Discussion - Perspectives

Pathogénie

La première étude met en évidence un lien entre l'atteinte musculaire des veaux infectés *in utero* et la micromyélie, cette dernière étant liée à une diminution du nombre de neurones moteurs. Ce lien peut être envisagé dans deux directions suivant que l'on place la lésion primaire au niveau des muscles ou au niveau de la moelle épinière.

Les éléments qui pourraient plaider pour une atteinte primaire des muscles sont essentiellement : (i) le SBV se multiplie dans les muscles des fœtus (Laloy *et al.*, 2017) et (ii) la myosite observée suite au passage transplacentaire du AKAV a été proposée comme l'un des facteurs d'explication de l'arthrogrypose chez les fœtus atteints (Konno et Nakagawa, 1982).

Cependant, l'étude de ces cas naturels de l'infection *in utero* a convaincu les auteurs de cet article que l'élément déterminant était l'atteinte neuronale. Voici les éléments de discussion qui permettent d'étayer cette hypothèse :

- Les muscles sont un lieu de multiplication massive du virus. Cet élément ne permet cependant pas d'en déduire que cette multiplication virale soit à l'origine de lésions massives. En effet, d'autres organes, tels que le foie et les reins, supportent l'amplification du virus sans présenter de lésions (Laloy *et al.*, 2017). D'ailleurs, Laloy *et al.*, qui investiguent la question de l'atteinte musculaire dans leur infection expérimentale transplacentaire ne mettent en évidence qu'une augmentation du Ki67, ce qui suggère que, si la multiplication du virus n'est pas sans effet sur les cellules musculaires, ses conséquences restent limitées.
- La nature des lésions musculaires, atrophie musculaire avec disparition d'une partie des fibres remplacées par du tissu fibreux et adipeux, est typiquement ce qui s'observe dans les cas d'atrophie de dénervation chronique (Cooper et Valentine, 2016). Cependant, il convient de noter que, à l'instar des autres lésions type « *end-stage* », il est très difficile, face à une telle atteinte terminale des muscles, de déterminer, sur base des lésions, la cause primaire.
- Les causes pouvant conduire à de l'arthrogrypose peuvent être très nombreuses. Tout ce qui limite le mouvement du fœtus peut induire cette malformation. Six grandes conditions d'apparition peuvent être identifiées : atteinte nerveuse (du cerveau aux nerfs périphériques), atteinte musculaire, atteinte des tissus conjonctifs, manque d'espace dans la matrice, atteinte vasculaire intra-utérine et maladie de la mère (Hall, 1997). On peut noter, que dans les cas très nombreux d'akinésie fœtale rapportés en médecine humaine, l'arthrogrypose est sévère mais aucune atteinte du système nerveux central n'est rapportée

(Hall, 2009). Il est donc vraisemblable qu'une atteinte primaire des muscles n'aurait pas entraîné une corrélation aussi évidente entre la sévérité de l'atteinte musculaire et la sévérité de l'atteinte de la moelle épinière.

Il est d'ailleurs intéressant de noter que, dans certains cas, le virus Zika peut engendrer chez le fœtus humain des lésions similaires d'arthrogrypose consécutives à une destruction des motoneurones (Ramalho *et al.*, 2017).

L'atteinte de la moelle épinière est donc un élément central de la pathogénie de l'infection *in utero*. Elle est d'ailleurs l'atteinte la plus fréquente dans l'étude de Peperkamp *et al.*, en 2015, portant sur plus de 300 fœtus de ruminants. Comme souligné dans l'introduction, il est donc étonnant que l'infection expérimentale réalisée en modèle caprin par Laloy *et al.* ne mette en évidence aucune lésion de la moelle épinière. Pourtant, cette étude est basée sur l'un des protocoles d'infections expérimentales ayant le plus fidèlement reproduit la maladie naturelle chez le fœtus infecté. Il consistait en une infection de chèvres gestantes à 28 et 42 jours de gestation et une euthanasie au 55^{ème} jour. L'une des hypothèses serait donc que l'atteinte de la moelle épinière, ou sa sensibilité à l'infection, serait plus tardive que l'atteinte de l'encéphale. Ce phénomène est décrit de manière assez nette pour le virus Akabane dans l'espèce bovine. La lésion d'arthrogrypose, liée à l'atteinte de la moelle épinière, n'apparaît que pour les infections prenant place après le 105^{ème} jour de gestation. Les lésions induites par des infections qui ont lieu avant cette date se limitent à l'encéphale (Kirkland, 2015).

La formulation d'hypothèses pouvant expliquer ce décalage est limitée par la connaissance assez partielle de plusieurs points clefs. Notamment, le fait que la fenêtre d'infection *in utero* chez les ruminants coïncide avec la fin de la période embryonnaire (~30 jours chez le mouton, ~60 jours chez les bovins (McGeady, 2017)) est une limite. En effet, si la période embryonnaire est assez bien décrite chez les ruminants, la littérature concernant la période fœtale est beaucoup plus limitée.

Une infection différée de la moelle épinière pourrait s'expliquer par un passage différent du virus à travers la barrière hémato-méningée au niveau de l'encéphale et de la moelle épinière. Or, la barrière hémato-spinale (*blood-spinal cord barrier*), bien que très proche de la barrière hémato-encéphalique, présente des différences de composition, notamment dans la nature des jonctions serrées (Bartanusz *et al.*, 2011). Ces modifications s'accompagneraient d'un passage plus aisé de plusieurs traceurs utilisés pour étudier l'effet restrictif de la barrière. Le passage de petites molécules n'est cependant que difficilement comparable au passage de virions. Il est donc difficile de déduire de ces rares informations l'effet de cette barrière sur le passage du SBV dans la moelle épinière.

La colonisation de la moelle épinière à partir de l'encéphale par le virus de la Dengue a été étudié en modèle murin (An *et al.*, 2003). Il en ressort que deux voies permettent cette colonisation : une diffusion rapide par le canal épendymaire associée, dans un deuxième temps, à une diffusion de

neurone à neurone par les synapses. Or, les cellules de l'épendyme présentent des caractéristiques de cellules du système phagocytaire et offrent une ligne de défense face aux infections virales (Bleier *et al.*, 1975). La capacité du SBV à franchir cette barrière reste donc à déterminer. De même, l'hypothèse d'un passage de neurones à neurones à travers les synapses reste à démontrer dans le cas du SBV. Cependant, cette hypothèse pourrait expliquer un ralentissement de la diffusion du virus dans la moelle. En effet, la synaptogénèse ne débute qu'à la fin du 3^{ème} trimestre chez le fœtus humain pour atteindre un pic après la naissance (Huttenlocher and Dabholkar, 1997). En transposant ces données chez le veau (avec la limite que le développement du cerveau humain est probablement moins rapide que celui des ruminants qui naissent avec des capacités motrices bien plus importantes (Garwicz *et al.*, 2009)), l'un des éléments qui pourrait expliquer l'atteinte retardée de la moelle pourrait être une densité en synapses trop faible pour permettre une diffusion significative du virus.

Installation du virus : état endémique ?

Cette seconde étude investigue le devenir du SBV en Wallonie. Elle dresse le portrait d'un virus circulant à bas bruit durant les trois ou quatre années qui séparent des saisons de circulation intense comme en 2016. Ces années de circulation intense sont probablement le fruit d'une diminution de l'immunité de troupeau de la région. Néanmoins, cette étude n'investigue pas la question des souches circulantes dans les différentes années. Une telle étude phylogénétique aurait pu garantir que les souches du virus circulant en 2016 sont bien identiques aux souches des années précédentes excluant, de la sorte, l'hypothèse d'une nouvelle introduction. Cependant, aucune étude n'a démontré qu'une nouvelle souche de SBV circulait en Europe. De plus, cette alternance de pic de circulation intense avec des années à basse prévalence a déjà été décrite pour des virus proches : les virus Akabane, Aino et Peaton au Japon (Kato *et al.*, 2016) et en Australie (Geoghegan *et al.*, 2014). On peut donc en déduire que le SBV s'est installé, de manière prolongée, en Wallonie.

On peut se demander si une telle installation cyclique peut être qualifiée d'endémique. En effet, le sens de l'adjectif endémique peut varier (Kalra *et al.*, 2015), mais dans son acceptation la plus fréquente, il caractérise l'un des deux états d'une maladie dans lequel, pour une zone géographique donnée, la fréquence de cette maladie est stable (Porta *et al.*, 2014). Par opposition, l'adjectif épidémique, caractérise une maladie dont la fréquence, dans une zone géographique donnée, dépasse nettement la fréquence attendue (Porta *et al.*, 2014). La situation de la prévalence du SBV dans les années qui suivent sa découverte serait donc une composante des deux états principaux d'une maladie. Le terme de réémergence est fréquemment utilisé dans la littérature pour décrire ces épisodes de circulation intense du SBV (Conraths *et al.*, 2013a; International Society for Infection Diseases, 2016). Cependant, le terme de réémergence suggère un aspect inattendu du retour de l'agent pathogène. Dès lors que l'on suspecte que ce phénomène est cyclique, lié à l'immunité de troupeau générale dans la

région concernée, ce terme semble moins approprié. L'installation du SBV dans notre région devrait donc être décrite suivant les termes définis dans *Veterinary Epidemiology* (Thrusfield, 2018) : une situation globale caractérisée par une prévalence faible, définie comme hypoendémique, entrecoupée de fluctuations cycliques prédictibles dénommées pulsations endémiques.

Plan de lutte

L'une des questions que pose l'installation dans une région d'un virus ciblant les animaux de production est l'opportunité de la mise en place d'une stratégie de contrôle.

De manière générale, le choix d'une stratégie de lutte pour une maladie donnée dépend de plusieurs facteurs (Saegerman *et al.*, 2011) :

- la prévalence réelle de la maladie,
- le contexte socio-économique,
- le système de surveillance de la santé animale,
- le programme mis en place par les autorités sanitaires.

Dans le cadre du SBV, il n'y a pas de programme officiel de surveillance et de mesures régulières de l'impact du virus. Par ailleurs, l'impact socio-économique est faible dans nos pays. Comme décrit dans l'introduction, l'espèce ovine, principalement à cause de sa reproduction saisonnière, paye le plus lourd tribut à la maladie. Si la spéculation ovine avait été la principale activité d'élevage en Belgique, l'impact ressenti de la circulation du SBV aurait probablement été différent ; il en résulte que l'investissement dans une stratégie de lutte spécifique contre le SBV ne semble pas nécessaire ou rentable.

Au vu de l'aspect cyclique des réémergences, si un plan de lutte devait être décidé, la mise en place d'une vaccination annuelle systématique généralisée semblerait disproportionnée en regard de la faible circulation du virus lorsque l'immunité de troupeau est élevée. Il semblerait donc plus opportun de décider d'un suivi du taux de ruminants domestiques séropositifs de manière à évaluer le niveau d'immunité de troupeau. Une campagne de vaccination pourrait être décidée à partir d'un seuil de séroprévalence jugé à risque parce que trop faible. Dans leur étude de suivi de la séroprévalence dans les troupeaux ovins en Belgique, Sohier *et al.*, 2017b, remarquent que la séroprévalence générale passe de 84% en 2011 à 26% en 2015. Or, comme le montre notre étude, 2016 est une année de recirculation intense. Au vu de ces résultats, l'ordre de grandeur d'un tel seuil pourrait se situer vers 30-35% suivant le niveau de sécurité attendu. Cependant, la dynamique de transmission des arbovirus dépendant en grande partie de la dynamique des populations d'arthropodes, une telle stratégie devrait s'accompagner d'une recherche approfondie des facteurs influençant le comportement, la répartition et la croissance des populations d'insectes vecteurs. Notre étude tend à montrer que la diminution de la

séroprévalence chez les cervidés sauvages n'est pas le facteur déclenchant des pulsations. Limiter un tel plan de lutte aux ruminants domestiques semble donc une mesure suffisante pour la gestion des phases de résurgence de SBV.

Bien qu'aucun plan de lutte officiel n'ait été décidé, la question de la vaccination a été investiguée, d'une part, de manière très concrète, par plusieurs firmes, qui ont commercialisé en 2012 des vaccins sur base d'autorisations de mise sur le marché (AMM) provisoires (SBVvax, Merial ; Bovilis SBV, MSD Santé Animale). Ces vaccins utilisaient des virus inactivés. D'autre part, plusieurs études ont investigué des pistes de mise au point de vaccins plus complexes. A titre d'exemple, on peut citer une étude démontrant l'efficacité de *Virus-Like Particles* (VLP) d'origine végétale pour présenter des épitopes des protéines Gn et Gc du SBV (Hassani-Mehraban *et al.*, 2015). D'autres auteurs ont utilisé des virus atténusés par délétion de la protéine non-structurale NSs démontrant leur capacité à induire une protection tout en offrant une possibilité de marquage pour différencier la réponse vaccinale et l'exposition à un virus sauvage. Il est intéressant de noter que, bien que l'absence de la protéine NSs atténue fortement la virulence du SBV, quelques mutations dans la protéine Gc suffisent à compenser cette délétion en conférant au virus déleté une virulence équivalente aux souches sauvages en modèle murin (Varela *et al.*, 2016). La délétion de la protéine NSs ne pourrait donc pas être un mécanisme d'atténuation suffisamment sûr pour une souche vaccinale.

Enfin, plusieurs vaccins sous-unitaires ont été testés sur base de vaccins à ADN (Boshra *et al.*, 2017) ou de virus recombinant (poxvirus : *Modified Vaccinia virus Ankara* ou herpèsvirus : herpèsvirus équin de type 1) (Wernike *et al.*, 2018b). Ces deux équipes ont choisi d'exprimer la partie N-terminale de Gc et ont démontré l'installation d'une immunité protectrice. En effet, la partie N-terminale de Gc contient des peptides déterminants pour la neutralisation de l'infection par une série d'anticorps monoclonaux (Roman-Sosa *et al.*, 2016). Cependant, il faut noter que la partie N-terminale de Gc a été également décrite comme une région hypervariable (Coupeau *et al.*, 2013a; Fischer *et al.*, 2013). Il semble donc risqué de choisir ce domaine de Gc pour construire un plan de lutte vaccinal, les variants capables d'évader l'immunité vaccinale pouvant apparaître assez rapidement. Ce phénomène dans lequel le domaine le plus protecteur et immunogène des glycoprotéines de surface est aussi le plus variable est bien décrit chez le virus influenza. Pour ce dernier, l'immunité cible avant tout la tête globulaire de l'hémagglutinine (Jang et Seong, 2014). Les anticorps qui accompagnent cette réponse sont protecteurs mais cette protection est aisément contournée par les nouvelles souches présentant des mutations au niveau de la tête de la protéine. La recherche de vaccins pan-influenza travaille donc à forcer la production d'anticorps ciblant la tige de la protéine. Ces anticorps ont un effet protecteur étendu à un nombre de souches plus important que celui des anticorps dont la cible est la tête globulaire (Jang et Seong, 2014).

Il faut noter que l'équipe de Boshra *et al.*, 2017, a également utilisé la vaccination par ADN pour induire une réaction immunitaire protectrice ciblant la protéine N. On peut se demander par quel mécanisme une exposition à la protéine N formant la nucléoprotéine qui est enfouie dans le virion peut engendrer une protection. Le mécanisme le plus évident est la stimulation d'une réponse cellulaire cytotoxique (Tizard, 2012). Cependant, les anticorps anti-N peuvent également jouer un rôle. Pour le virus influenza, il a été démontré qu'une lignée de souris déficientes en anticorps n'est pas protégée par une vaccination sous-unitaire avec la nucléoprotéine. En revanche, un certain niveau de protection peut être observé en transférant le sérum des souris immunisées contre la nucléoprotéine à des souris naïves (Carraher *et al.*, 2008). Les anticorps anti-NP sont produits suite à l'exposition de l'antigène NP à la surface des cellules infectées ou lors de la lyse des cellules infectées qui permet un relargage de NP dans le milieu interstitiel. Les auteurs de cet article suggèrent que les anticorps anti-NP, bien que ne bloquant pas l'entrée du virus dans la cellule, peuvent promouvoir une cytolysé par le complément, amplifier la réponse des cellules T et réduire, de manière indirecte, la réPLICATION virale.

SBV vs BTV-8 chez les ruminants sauvages

Au début de l'épidémie du SBV, mettre en évidence une prévalence importante chez le chevreuil n'était pas forcément attendu. En effet, lors de l'épidémie de BTV-8 en 2006, de nombreuses études ont montré que les chevreuils avaient été, en apparence, beaucoup moins exposés au virus que les ruminants domestiques ou même que le cerf élaphe (Boadella *et al.*, 2010; Casaubon *et al.*, 2013; García-Bocanegra *et al.*, 2011; Linden *et al.*, 2010). Etant donné que le SBV et le BTV-8 partagent le même vecteur, on pouvait s'attendre à une séroprévalence significativement plus basse chez le chevreuil pour SBV également. Ce n'est, à l'évidence, pas le cas. Notre étude, à la suite de celles ayant investigué la prévalence du SBV chez les ruminants sauvages, permet d'exclure l'hypothèse que les chevreuils seraient moins exposés aux piqûres de culicoides que les cerfs et les ruminants domestiques. Cette hypothèse avait été envisagée pour expliquer la différence de prévalence entre les cerfs et les chevreuils face au BTV-8 (Linden *et al.*, 2010). La mesure d'une exposition massive des chevreuils au SBV permet donc de suspecter une réelle sensibilité moindre du chevreuil vis-à-vis de BTV-8. A ce jour, aucune infection expérimentale n'a été menée pour investiguer cette hypothèse.

A l'inverse, le cerf élaphe semble jouer un rôle important de réservoir dans les épidémies de BTV (Lorca-Oró *et al.*, 2014). Notre étude n'investigue pas directement la question de la relation entre la dynamique de circulation du SBV chez les ruminants sauvages avec les foyers d'épidémie des ruminants domestiques. Cependant, le fait que, dans les populations de cervidés sauvages, la séroprévalence tombe à un niveau plancher deux saisons avant la pulsation de 2016 suggère que leur rôle n'est pas prépondérant dans la dynamique générale de circulation du virus.

La question du « sens »

Lorsque j'ai l'occasion de discuter de mon sujet de thèse avec des interlocuteurs éloignés de ma discipline, l'une des questions la plus spontanée et récurrente est celle du « sens ». Pourquoi ce virus qui nécessite, pour se disséminer, de créer une virémie chez un hôte mammifère afin d'infecter un arthropode hématophage vecteur, provoque-t-il des lésions chez les fœtus, allant jusqu'à léser de manière considérable leur système nerveux central en les rendant non viables ? Cela n'a pas de « sens ».

Il est très compliqué d'apporter des réponses à cette question du « sens », de la raison d'être, d'un processus biologique que l'on étudie. La littérature scientifique n'y apporte pas de réponse directe et on serait tenté de ne pas l'aborder pour éviter de s'y enliser. Mais peut-on prétendre au titre de *Philosophiae Doctor* (PhD) et laisser de côté la question du « sens » ?

Intérêt de la question

Les paragraphes qui vont suivre présentent donc des pistes de réponse à cette question. Et s'il n'est pas possible d'y apporter une réponse définitive, les éléments de réponse permettent néanmoins d'éclairer une partie de la biologie du virus qui n'a pas été abordée dans cette thèse et justifie donc qu'on s'y arrête, d'autant que cette question du « sens », énoncée spontanément à la vue des éléments de base qui constituent le cycle du virus, se renforce encore quand on observe avec plus d'acuité le SBV. Pourquoi cet arbovirus a-t-il conservé la capacité de provoquer ces lésions nerveuses *in utero* alors que cela semble inutile à son cycle ? Il possède, en effet, un génome réduit au minimum (11kb qui encodent six protéines ; en comparaison, un virus influenza A possède un génome de 14kb encodant 12 protéines (Biquand et Demeret, 2018) et le BTV un génome de 19kb pour 11 protéines (Liao *et al.*, 2018)) ; ce génome subit à chaque passage d'hôte un effet de sélection très important (Forrester *et al.*, 2014) qui limite fortement sa dérive génétique. De plus, le faible nombre de ses protéines (cf. *infra*) empêche le déploiement d'un jeu de protéines dédié à chacun de ses hôtes. Il apparaît donc très peu probable que ce virus, à la fois sobrement construit et coincé dans le carcan de son cycle à deux hôtes, ait conservé des comportements biologiques aussi marqués que l'atteinte *in utero* en dehors de tout avantage sélectif, d'autant que cette atteinte du fœtus est une caractéristique partagée par un grand nombre de virus proches : les virus Akabane, Aino, Peaton, ... Il est donc intéressant, pour qui cherche à comprendre finement la biologie ce virus, de s'interroger sur l'avantage sélectif qui préside à l'apparition de cette maladie.

Hypothèses

L'avantage sélectif le plus direct auquel on pense suite à une transmission verticale est la capacité du nouveau-né à servir de réservoir pour le virus. Cette hypothèse a été envisagée par Nick

De Regge, 2017, dans sa réflexion sur le passage de l'hiver des *Orthobunyavirus*. D'une part, les veaux vivants infectés *in utero* pourraient présenter des virémies transitoires ou permanentes qui permettraient l'infection de nouvelles générations de culicoïdes. D'autre part, les veaux mort-nés pourraient servir de réservoir pour l'infection des larves de culicoïdes qui se développent dans les tas de fumiers sur lesquels les avortons et veaux mort-nés pourraient échouer. Si cette stratégie était le but principal du passage transplacentaire, on peut se demander l'intérêt d'une concentration du virus au niveau du SNC dont l'accessibilité est considérablement réduite en comparaison des autres organes. De plus, dans le cadre de cette thèse, l'un des objectifs poursuivis était de caractériser la diversité génétique des virus présents dans l'encéphale des veaux atteints. Cette étude a été menée en collaboration avec ma collègue Anne-Sophie Van Laere. Le projet n'a pas encore atteint son terme, raison pour laquelle il ne fait pas partie des études présentées dans cette thèse. Il s'est en effet heurté aux difficultés techniques liées à l'état de conservation des échantillons et à la faible quantité de virus présente chez les veaux en comparaison des agneaux. Des séquences partielles du segment M ont cependant été retrouvées pour sept veaux. Ces séquences révélaient une grande diversité génétique au-delà de la région hypervariable déjà décrite (Coupeau *et al.*, 2013a; Fischer *et al.*, 2013). Ce résultat contraste avec la stabilité du génome du SBV dans le temps (Hofmann *et al.*, 2015; Wernike and Beer, 2017). Il semble donc que, dans le SNC des fœtus de ruminants, le virus libéré de sa contrainte de passage chez l'arthropode vecteur présente une dérive génétique importante. Cette observation a été confirmée par d'autres études (Hulst *et al.*, 2013; Izzo *et al.*, 2016; Wernike et Beer, 2019). Ces mutations n'étant pas observées dans les souches de virus circulantes, il semble donc peu probable que les mutations accumulées pendant les mois de gestation qui suivent l'infection du fœtus soient favorables à la dissémination du virus chez les culicoïdes. Ainsi, les veaux et agneaux nés après une infection *in utero* seraient porteurs d'un virus mal adapté au passage chez l'arthropode. Ce constat oblige donc à envisager d'autres hypothèses que celle du veau nouveau-né « réservoir » pour répondre à cette question du « sens ».

Quand Gubbins et collègues comparent, en 2014, la dynamique de dispersion du BTV-8 et du SBV, il ressort de manière évidente que la stratégie du SBV consiste en une adaptation très poussée pour son vecteur au détriment (relatif) de son hôte mammifère. Ainsi, mon hypothèse est que le comportement du virus chez les ruminants est la résultante de protéines sélectionnées pour offrir un avantage sélectif important chez le culicoïde, tout en conservant une adaptation aux deux organismes.

On observe chez le mammifère que SBV cible particulièrement le système reproducteur avec une persistance rapportée au niveau des ovaires et du tractus reproducteur de la femelle (Laloy *et al.*, 2015, 2017; Martinelle *et al.*, 2015; Poskin *et al.*, 2014b; Wernike *et al.*, 2013b), et chez le mâle, au niveau des testicules et du sperme (Schulz *et al.*, 2014; Van Der Poel *et al.*, 2014). Le système digestif est également ciblé avec, pendant la phase aiguë de la maladie, de la diarrhée et une excrétion de particules virales dans les matières fécales (Wernike *et al.*, 2013a) et, dans la majorité des études, une

persistance de l'ARN viral dans les ganglions mésentériques. Chez la femelle, ce ciblage du système reproducteur s'accompagne d'un passage transplacentaire avec invasion du SNC du fœtus. Il faut noter que le virus Akabane possède la capacité d'envahir le SNC des adultes (Oem *et al.*, 2014), ce qui tend à montrer que cet organe n'est pas atteint simplement par opportunisme chez les fœtus mais est une cible spécifique de ces virus. Mon hypothèse est donc que l'atteinte du système reproducteur (avec passage transplacentaire), du SNC et de la sphère intestinale s'opère également chez les culicoïdes où elle offre un avantage sélectif et qu'il faut chercher chez le vecteur l'origine des lésions et symptômes observés chez l'hôte.

Bien qu'il n'existe pas dans la littérature la preuve complète pouvant soutenir cette hypothèse, les paragraphes suivants apporteront les éléments permettant de justifier que le virus utilise le même jeu de protéines chez le vertébré et l'invertébré et que l'infection de ces différents systèmes lui apporte des avantages biologiques considérables.

Les protéines

Les protéines des *Péribunyaviridae* peuvent se classer en trois catégories : les protéines totalement adaptées aux deux organismes, les protéines modérément spécialisées et les protéines totalement spécialisées.

La nucléoprotéine et la polymérase semblent toutes deux exercer les mêmes fonctions chez les arthropodes et les mammifères et semblent donc totalement adaptées aux deux organismes.

Les protéines Gn et Gc qui forment des hétérodimères à la surface du virus sont fortement impliquées dans l'attachement du virus et son entrée dans la cellule cible. Elles exercent ces rôles dans les deux organismes. La protéine Gc, par sa topographie à la surface du virion, offre le plus d'opportunité d'interaction (Li *et al.*, 2017) avec les composants de la membrane cellulaire et c'est donc son rôle principal. Cependant, cette protéine pourrait également participer à l'inhibition de la synthèse des protéines de la cellule hôte (Varela *et al.*, 2016). La protéine Gn, quant à elle, pourrait participer plus directement à l'attachement des cellules du tube digestif de l'insecte vecteur (Knipe *et al.*, 2013). Ces protéines ont donc des fonctions principales similaires pour les deux contextes mais pourraient être partiellement spécialisées, Gc plutôt active chez les vertébrés et Gn prenant un rôle plus prépondérant chez l'arthropode.

Enfin, les protéines non-structurales semblent totalement spécialisées. La protéine NSs a pour fonction principale l'inhibition de l'appareil de production des protéines cellulaires chez les mammifères (Varela *et al.*, 2013). Cette inhibition est le mécanisme principal de résistance à l'interféron mis en place par le virus. En revanche, cette protéine ne semble pas jouer de rôle important au sein des cellules d'insecte (Plyusnin and Elliott, 2011). La situation est probablement inverse pour la protéine NSm. Cette dernière ne semble que très peu interagir avec l'environnement cellulaire chez

l'hôte mammifère, son seul rôle connu se limitant à une interaction avec les protéines Gn et Gc (Kraatz *et al.*, 2018). A l'inverse, des mutations de NSm pour le virus de La Crosse ont été associées à des phénotypes de « super-infection » chez le moustique vecteur avec une dissémination du virus beaucoup plus large dans l'organisme du vecteur (Reese *et al.*, 2010).

Cette organisation dresse le portrait de virus ayant sélectionné un système de protéines structurales polyvalent, renforcé par deux protéines non-structurales spécialisées pour chaque organisme et permettant, par leur interaction avec les cellules de l'hôte, une plus grande virulence au sein de l'organisme.

Système digestif

Le système digestif des arthropodes est un tissu capital dans le cycle des arbovirus. La capacité, pour un virus, d'utiliser un insecte comme vecteur dépend, en grande partie, de son aptitude à passer la barrière formée par l'épithélium et la membrane basale du tube digestif (Franz *et al.*, 2015). Pour passer cette barrière, le virus doit se multiplier avec une certaine efficacité dans l'épithélium. Le nombre de cellules épithéliales infectées est très limité (Kenney *et al.*, 2012). C'est ce nombre limité de cellules qui réduit fortement la diversité des particules virales amplifiées et fait de cette barrière digestive le goulot d'étranglement le plus important pour la diversité génétique des populations d'arbovirus (Forrester *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que, comme cela a été démontré pour le virus de l'Encéphalite Equine du Venezuela, plus la souche de virus utilisée pour infecter le moustique est adaptée à ce vecteur (dans cette expérience, une comparaison d'une souche de laboratoire et d'une souche prélevée dans la zone géographique des moustiques utilisés dans l'expérience), plus le nombre de cellules épithéliales infectées est grand (Kenney *et al.*, 2012). En s'adaptant à son vecteur, le virus se ménage donc une capacité à maintenir une diversité génétique plus grande. Enfin, il semble que la vitalité des *Peribunyaviridae* dans la sphère digestive dépende en grande partie de leurs protéines non-structurales et en particulier de NSm (Horne and Vanlandingham, 2014).

Appareil reproducteur et transmission verticale

Le système reproducteur des arthropodes est une cible importante des arbovirus. Il permet au virus de diversifier son mode de transmission en s'écartant du cycle vertébré/invertébré par la transmission verticale et horizontale vénérienne au sein des populations d'arthropodes (Huang *et al.*, 2019). La transmission verticale (plus précisément transmission trans-ovarienne (TTO)) permet d'infecter un pourcentage élevé de la descendance d'un insecte femelle. Ces descendants ont une capacité vectorielle directe (dès les premières heures du stade adulte et donc dès le premier repas sanguin) et peuvent eux-mêmes transmettre le virus à leur descendance (Bergren and Kading, 2018). La conséquence directe de la TTO est que les mâles qui en sont issus sont également infectés par le virus. Le caractère non-hématophage des mâles empêche ce cas de figure dans le cycle

vertébré/invertébré classique. Chez le moustique, la transmission du virus par des mâles infectés à des femelles naïves à l'issue de la période d'accouplement a été démontrée (Mavale *et al.*, 2010). La TTO offre donc un avantage sélectif très important. Pour les *Bunyavirales*, les connaissances actuelles sur cette question ont été collectées dans la très complète revue de Bergren et Kading publiée en 2018. Il ressort de cette revue que la TTO a été démontrée pour de nombreux bunyavirus, le plus souvent ceux dont le vecteur est un moustique du genre *Culex*. La TTO a d'abord été étudiée pour expliquer la capacité de ces virus à passer l'hiver. Cependant, il ressort des études menées pour le virus de La Crosse que la TTO offre l'énorme avantage de pouvoir maintenir le virus dans une population de vecteurs en l'absence de passage par l'hôte vertébré pendant environ quatre ans (Miller *et al.*, 1977). On notera que ces quatre ans couvrent la période de pulsation cyclique que nous avons observée pour le SBV dans notre deuxième étude.

Cependant, pour les virus transmis par des culicoïdes, comme le SBV, les preuves d'une TTO sont manquantes. Néanmoins, dans le cas du SBV, une étude a rapporté un taux de 10,8% de femelles nullipares porteuses de l'ARN viral (Larska *et al.*, 2013b). Bien que la présence d'ARN viral ne soit pas la preuve que ces culicoïdes aient une capacité infectante, cette étude suggère que le SBV s'appuie sur la TTO pour se maintenir. D'autres études testant par PCR la présence du SBV au sein des populations de culicoïdes n'ont pas trouvé de femelles nullipares positives (Elbers *et al.*, 2015; Rasmussen *et al.*, 2014). L'aspect contradictoire de ces résultats peut cependant trouver une explication dans : (i) la faible sensibilité et les biais associés au piégeage des culicoïdes (De Regge *et al.*, 2015), (ii) le fait que les conditions nécessaires au déploiement efficace de la TTO au sein d'une population de vecteurs ne sont parfois réunies que très localement. Ce deuxième point est illustré par Reese et collègues en 2010, dans leur suivi de populations de moustiques en région endémique du virus de La Crosse durant deux années consécutives. Ils notent que les œufs de moustiques récoltés donnent habituellement naissance à des individus négatifs ou très faiblement infectés. Quatre sites parmi les 119 sur lesquels l'étude se base font exception : les œufs y donnent naissance à des moustiques « super-infectés » et ce, pour les deux saisons consécutives, suggérant fortement qu'une TTO très efficace opère chez les femelles de ces sites. Parmi les causes pouvant expliquer ce succès de la TTO, ils notent des mutations de l'ARN viral communes aux quatre sites dans la séquence de la protéine NSm. Le rôle de cette protéine semble donc essentiel pour la mise en place d'une TTO efficace. Cette étude met également en évidence la nécessité d'une parfaite adaptation du virus à son vecteur pour mener à bien cette transmission verticale.

Système nerveux

Le système nerveux des insectes est composé de ganglions nerveux distribués ventralement par rapport au tube digestif à l'exception des ganglions cérébroïdes, positionnés dorsalement, qui forment une structure jouant le rôle de cerveau. Après le passage de la barrière digestive de l'arthropode, les

ganglions nerveux sont infectés par les arbovirus (Horne and Vanlandingham, 2014; Neira Oviedo *et al.*, 2011). L'infection des ganglions nerveux des femelles moustiques par le virus de La Crosse a été démontrée comme modifiant le comportement de ces insectes : les femelles infectées fragmentent significativement plus leurs repas sanguins (Grimstad *et al.*, 1980), ce qui augmente le nombre potentiel d'animaux piqués et infectés. Pour les culicoïdes, une étude récente du transcriptome révèle que, à la suite d'une infection par l'orbivirus de la fièvre hémorragique des cervidés, l'expression des gènes exprimant les protéines liant les odeurs (*odorant-binding proteins*) est augmentée (Nayduch *et al.*, 2019), suggérant que le comportement de recherche des hôtes est modifié par l'infection. Une étude antérieure avait déjà démontré que les culicoïdes infectés par le BTV présentaient un comportement modifié de réticence à la lumière (McDermott *et al.*, 2015). Ce dernier point pose d'ailleurs la question de l'utilisation de pièges lumineux dans les études de prévalence de ce type de virus chez les culicoïdes. Ces exemples illustrent la capacité du virus à modifier, dans son intérêt, le comportement de son vecteur suite, notamment, à l'infection de son système nerveux.

La littérature démontre donc, de manière assez abondante, que l'infection des trois systèmes digestif, nerveux et reproducteur du vecteur offre aux arbovirus des avantages sélectifs importants. Le virus ayant choisi d'utiliser le même jeu de protéines pour les deux hôtes, il se pourrait que leur nécessaire adaptation aux trois systèmes de l'arthropode se reflète par des lésions symétriques mais non nécessaires chez les vertébrés. Est-ce bien là l'origine des manifestations cliniques de la maladie des hôtes mammifères ? C'est une hypothèse que je propose mais qui resterait à démontrer (pour peu que cela soit possible).

Protéine Mx1

L'interaction entre les *Péribunyaviridae* et la protéine Mx1 a été étudiée, mais principalement dans le cadre de l'interaction avec la protéine MxA humaine (Frese *et al.*, 1996; Kochs et Haller, 1999; Miura *et al.*, 2001). La troisième étude présentée dans cette thèse apporte des données ciblant l'interaction entre le SBV et quatre protéines Mx issues de quatre espèces de mammifères. Elle met en évidence une diminution de la détection de la nucléoprotéine suite à la présence de la protéine Mx dans le cytoplasme. La forte standardisation permet une comparaison des niveaux d'expression des quatre Mx. Toutes les quatre conduisent à une diminution de la détection de la nucléoprotéine, la moins efficace étant la protéine issue du chien. La diminution de la détection de la nucléoprotéine peut faire suite à deux phénomènes. Le premier pourrait être le masquage du site cible de l'anticorps monoclonal anti-NP suite à une interaction forte de la Mx1 avec la NP. Il a en effet été démontré que la Mx-A humaine interagissait avec la NP du virus de La Crosse (Kochs *et al.*, 2002). Le deuxième pourrait être une diminution de la production de la NP dans le cytoplasme cellulaire. Ce phénomène a été également décrit pour le virus de La Crosse mis en présence de Mx-A humaine dans une étude

légèrement antérieure (Frese *et al.*, 1996). La recherche et la description du mécanisme à l'œuvre dans ce contexte sont, d'ailleurs, parmi les perspectives les plus directes de ce travail.

Quel que soit le mécanisme principal, l'effet de la présence de protéine Mx1 sur la détection de la protéine N suggère une perturbation de l'amplification virale au sein de la cellule. Dans les faits, le virus contourne cet effet antiviral, au moins dans le premier temps de l'infection, par inhibition de la réponse interféron (Varela *et al.*, 2013). Or, il a été démontré que, suite à la production d'interféron tau, la production de Mx1 est effective au sein de l'utérus gestant et des cellules du placenta (Shirozu *et al.*, 2016). C'est donc l'une des rares occasions où le virus ne peut inhiber la réponse interféron puisqu'elle est déjà en place. Cette production de Mx-1 est importante avant l'implantation embryonnaire (qui a lieu vers 30 jours). Après l'implantation, la quantité de Mx1 produite diminue avant d'être à nouveau stimulée (avec moins d'intensité) entre 80 et 100 jours. La présence de la Mx1 bovine déjà formée dans l'utérus pourrait être l'un des facteurs expliquant la fenêtre de passage transplacentaire. Chez les bovins, le passage transplacentaire démarre aux alentours du 60^{ème} jour de la gestation pour se terminer vers le 150^{ème} jour (König *et al.*, 2019). Or, on considère que la protéine Mx possède une demi-vie estimée entre 24 et 36 heures ; une telle demi-vie conduit à une diminution significative de la concentration en protéine Mx après 5 à 10 jours (Zav'yalov *et al.*, 2018). Ainsi, une diminution de la transcription post-implantation pourrait permettre un passage du virus après le 40^{ème} jour. Le pic de synthèse de la protéine entre le 80 et le 100^{ème} jour pourrait aussi jouer un rôle dans les lésions incomplètes (absence d'arthrogrypose) qu'induit le AKAV avant le jour 105.

L'aspect dose-dépendant de l'effet de la Mx dans les quatre espèces était inattendu. C'est en effet la première fois que ce phénomène est décrit pour le mécanisme d'action des Mx1. Or, le gène *MX1* est l'un des rares à ne pas être complètement inhibé lors de la mise à l'arrêt de la machinerie de production des protéines cellulaires par la protéine NSs du virus (Blomström *et al.*, 2015). Notre étude suggère cependant qu'une quantité suffisante de Mx1 doit être produite pour atteindre une action antivirale marquée.

Enfin, l'hypothèse initiale qui était présente au lancement de cette étude était qu'une efficacité variable des Mx de différentes espèces pouvait être à l'origine de la spécificité d'hôte du SBV. Or, cette différence d'efficacité dans l'action des Mx semble exister puisque, dans notre étude, la Mx d'origine canine semble moins active que la Mx d'origine bovine. Mais ce résultat est en opposition avec le comportement du virus dans la nature. L'activité de la Mx ne permet donc pas d'expliquer la spécificité d'hôte de ce virus. Le rôle de la Mx chez les bovins pourrait être de limiter la maladie chez le bovin adulte chez qui, de fait, l'infection par le SBV est presque asymptomatique.

Bibliographie

- Afonso, A., Abrahantes, J.C., Conraths, F., Veldhuis, A., Elbers, A., Roberts, H., Van der Stede, Y., Méroc, E., Gache, K., and Richardson, J. (2014). The Schmallenberg virus epidemic in Europe—2011–2013. *Preventive Veterinary Medicine* *116*, 391–403.
- Aksoy, E., and Azkur, A.K. (2019). Schmallenberg virus induces apoptosis in Vero cell line via extrinsic and intrinsic pathways in a time and dose dependent manner. *J. Vet. Med. Sci.* *81*, 204–212.
- An, J., Zhou, D.-S., Kawasaki, K., and Yasui, K. (2003). The pathogenesis of spinal cord involvement in dengue virus infection. *Virchows Arch* *442*, 472–481.
- Andersson, I., Bladh, L., Mousavi-Jazi, M., Magnusson, K.-E., Lundkvist, A., Haller, O., and Mirazimi, A. (2004). Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Virol.* *78*, 4323–4329.
- Andersson, I., Lundkvist, A., Haller, O., and Mirazimi, A. (2006). Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *J. Med. Virol.* *78*, 216–222.
- Babiker, H. a. E., Nakatsu, Y., Yamada, K., Yoneda, A., Takada, A., Ueda, J., Hata, H., and Watanabe, T. (2007). Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. *Immunogenetics* *59*, 59–67.
- Baise, E., Pire, G., Leroy, M., Gérardin, J., Goris, N., De Clercq, K., Kerkhofs, P., and Desmecht, D. (2004). Conditional expression of type I interferon-induced bovine Mx1 GTPase in a stable transgenic vero cell line interferes with replication of vesicular stomatitis virus. *J. Interferon Cytokine Res.* *24*, 513–521.
- Balenghien, T., Garros, C., Mathieu, B., Setier-Rio, M.-L., Allène, X., Gardes, L., Rakotoarivoany, I., Venail, R., Akaddar, A., Drouet, M., et al. (2010). La surveillance des Culicoides en France. *2*.
- Barlow, R.M. (1980). Morphogenesis of hydranencephaly and other intracranial malformations in progeny of pregnant ewes infected with pestiviruses. *J. Comp. Pathol.* *90*, 87–98.
- Barrett, D., More, S.J., O'Neill, R., Bradshaw, B., Casey, M., Keane, M., McGrath, G., and Sammin, D. (2015). Prevalence and distribution of exposure to Schmallenberg virus in Irish cattle during October 2012 to November 2013. *BMC Vet. Res.* *11*, 267.
- Barry, G., Varela, M., Ratinier, M., Blomström, A.-L., Caporale, M., Seehusen, F., Hahn, K., Schnettler, E., Baumgärtner, W., Kohl, A., et al. (2014). NSs protein of Schmallenberg virus counteracts the antiviral response of the cell by inhibiting its transcriptional machinery. *J. Gen. Virol.* *95*, 1640–1646.
- Bartanusz, V., Jezova, D., Alajajian, B., and Digicaylioglu, M. (2011). The blood-spinal cord barrier: Morphology and Clinical Implications. *Annals of Neurology* *70*, 194–206.

- Baumgärtner, W.K., Krakowka, S., Koestner, A., and Evermann, J. (1982). Acute encephalitis and hydrocephalus in dogs caused by canine parainfluenza virus. *Vet. Pathol.* *19*, 79–92.
- Bayrou, C., Garigliany, M.-M., Cassart, D., Jolly, S., and Desmecht, D. (2013). Schmallenberg virus circulation in Belgium in 2012. *Vet. Rec.* *172*, 296.
- Bayrou, C., Garigliany, M.-M., Sarlet, M., Sartelet, A., Cassart, D., and Desmecht, D. (2014). Natural intrauterine infection with Schmallenberg virus in malformed newborn calves. *Emerging Infect. Dis.* *20*, 1327–1330.
- Bergren, N.A., and Kading, R.C. (2018). The Ecological Significance and Implications of Transovarial Transmission among the Vector-Borne Bunyaviruses: A Review. *Insects* *9*, 173.
- Bessell, P.R., Searle, K.R., Auty, H.K., Handel, I.G., Purse, B.V., and Bronsvoort, B.M. deC (2013). Epidemic potential of an emerging vector borne disease in a marginal environment: Schmallenberg in Scotland. *Sci Rep* *3*, 1178.
- Bilk, S., Schulze, C., Fischer, M., Beer, M., Hlinak, A., and Hoffmann, B. (2012). Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Veterinary Microbiology* *159*, 236–238.
- Biquand, É., and Demeret, C. (2018). Interactions avec le système ubiquitine : un prérequis de l'adaptation des virus influenza à l'homme ? *Med Sci (Paris)* *34*, 509–511.
- Bleier, R., Albrecht, R., and Cruce, J.A. (1975). Supraependymal cells of hypothalamic third ventricle: identification as resident phagocytes of the brain. *Science* *189*, 299–301.
- Blomström, A.-L., Stenberg, H., Scharin, I., Figueiredo, J., Nhambirre, O., Abilio, A.P., Fafetine, J., and Berg, M. (2014). Serological screening suggests presence of Schmallenberg virus in cattle, sheep and goat in the Zambezia Province, Mozambique. *Transbound Emerg Dis* *61*, 289–292.
- Blomström, A.-L., Gu, Q., Barry, G., Wilkie, G., Skelton, J.K., Baird, M., McFarlane, M., Schnettler, E., Elliott, R.M., Palmarini, M., *et al.* (2015). Transcriptome analysis reveals the host response to Schmallenberg virus in bovine cells and antagonistic effects of the NSs protein. *BMC Genomics* *16*, 324.
- Boadella, M., Carta, T., Oleaga, Á., Pajares, G., Muñoz, M., and Gortázar, C. (2010). Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC Vet Res* *6*, 51.
- Boshra, H.Y., Charro, D., Lorenzo, G., Sánchez, I., Lazaro, B., Brun, A., and Abrescia, N.G.A. (2017). DNA vaccination regimes against Schmallenberg virus infection in IFNAR^{-/-} mice suggest two targets for immunization. *Antiviral Res.* *141*, 107–115.
- Bowden, T.A., Bitto, D., McLees, A., Yeromonahos, C., Elliott, R.M., and Huiskonen, J.T. (2013). Orthobunyavirus Ultrastructure and the Curious Tripodal Glycoprotein Spike. *PLoS Pathog* *9*.

Bréard, E., Lara, E., Comtet, L., Viarouge, C., Doceul, V., Desprat, A., Vitour, D., Pozzi, N., Cay, A.B., De Regge, N., *et al.* (2013). Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapsid recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS ONE* *8*, e53446.

Bridgen, A., Dalrymple, D.A., Weber, F., and Elliott, R.M. (2004). Inhibition of Dugbe nairovirus replication by human MxA protein. *Virus Res.* *99*, 47–50.

van den Brom, R., Luttkholt, S.J.M., Lievaart-Peterson, K., Peperkamp, N.H.M.T., Mars, M.H., van der Poel, W.H.M., and Vellema, P. (2012). Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneesk* *137*, 106–111.

Brugger, K., Köfer, J., and Rubel, F. (2016). Outdoor and indoor monitoring of livestock-associated Culicoides spp. to assess vector-free periods and disease risks. *BMC Vet. Res.* *12*, 88.

Calisher, C.H. (1996). History, Classification, and Taxonomy of Viruses in the Family Bunyaviridae. In *The Bunyaviridae*, R.M. Elliott, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 1–17.

Calzolari, M., and Albieri, A. (2013). Could drought conditions trigger Schmallenberg virus and other arboviruses circulation? *Int J Health Geogr* *12*, 7.

Carraher, D.M., Kaminski, D.A., Moquin, A., Hartson, L., and Randall, T.D. (2008). A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J Immunol* *181*, 4168–4176.

Casaubon, J., Chaignat, V., Vogt, H.-R., Michel, A.O., Thür, B., and Ryser-Degiorgis, M.-P. (2013). Survey of bluetongue virus infection in free-ranging wild ruminants in Switzerland. *BMC Vet Res* *9*, 166.

Cay, A.B., Regge, N., Riocreux, F., Meroc, E., Stede, Y., Loo, H., Bertels, G., Saulmont, M., Delooz, L., Deblauwe, I., *et al.* (2011). Schmallenberg virus in Belgium: first diagnosis and initial assessments. *Le Nouveau Praticien Veterinaire Elevages et Sante* *29*–34.

Charles, J.A. (1994). Akabane virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* *10*, 525–546.

Chowell, G., Ammon, C.E., Hengartner, N.W., and Hyman, J.M. (2006). Estimation of the reproductive number of the Spanish flu epidemic in Geneva, Switzerland. *Vaccine* *24*, 6747–6750.

Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N., and Tischler, N.D. (2014). Hantavirus Gn and Gc Envelope Glycoproteins: Key Structural Units for Virus Cell Entry and Virus Assembly. *Viruses* *6*, 1801–1822.

Claine, F., Coupeau, D., Wiggers, L., Muylkens, B., and Kirschvink, N. (2013). Schmallenberg virus among female lambs, Belgium, 2012. *Emerging Infect. Dis.* *19*, 1115–1117.

Claine, F., Coupeau, D., Wiggers, L., Muylkens, B., and Kirschvink, N. (2018). Modelling the

evolution of Schmallenberg virus seroprevalence in a sheep flock after natural infection. *Prev. Vet. Med.* *154*, 132–138.

Collins, Á.B., Barrett, D., Doherty, M.L., Larska, M., and Mee, J.F. (2016). Post-epidemic Schmallenberg virus circulation: parallel bovine serological and Culicoides virological surveillance studies in Ireland. *BMC Vet. Res.* *12*, 234.

Collins, Á.B., Barrett, D.J., Doherty, M.L., McDonnell, M., and Mee, J.F. (2017). Significant re-emergence and recirculation of Schmallenberg virus in previously exposed dairy herds in Ireland in 2016. *Transbound Emerg Dis* *64*, 1359–1363.

Conraths, F.J., Kämer, D., Teske, K., Hoffmann, B., Mettenleiter, T.C., and Beer, M. (2013a). Reemerging Schmallenberg virus infections, Germany, 2012. *Emerging Infect. Dis.* *19*, 513–514.

Conraths, F.J., Peters, M., and Beer, M. (2013b). Schmallenberg virus, a novel orthobunyavirus infection in ruminants in Europe: potential global impact and preventive measures. *N Z Vet J* *61*, 63–67.

Cooper, B.J., and Valentine, B.A. (2016). Chapter 3 - Muscle and Tendon. In Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1 (Sixth Edition), M.G. Maxie, ed. (W.B. Saunders), pp. 164-249.e1.

Cooper, C., Wojtulewicz, J., Ratnamohan, V.M., and Arbuckle, S. (2000). Congenital varicella syndrome diagnosed by polymerase chain reaction--scarring of the spinal cord, not the skin. *J Paediatr Child Health* *36*, 186–188.

Coupeau, D., Claine, F., Wiggers, L., Kirschvink, N., and Muylkens, B. (2013a). In vivo and in vitro identification of a hypervariable region in Schmallenberg virus. *J. Gen. Virol.* *94*, 1168–1174.

Coupeau, D., Claine, F., Wiggers, L., Martin, B., Kirschvink, N., and Muylkens, B. (2013b). Characterization of messenger RNA termini in Schmallenberg virus and related Simbuviruses. *J. Gen. Virol.* *94*, 2399–2405.

Coupeau, D., Bayrou, C., Baillieux, P., Marichal, A., Lenaerts, A.-C., Caty, C., Wiggers, L., Kirschvink, N., Desmecht, D., and Muylkens, B. (2019). Host-dependence of in vitro reassortment dynamics among Simbuviruses related to Schmallenberg virus. *Emerging Microbes & Infections*.

Csiza, C.K., Scott, F.W., Gillespie, J.H., and De Lahunta, A. (1971). Feline viruses. XIV. Transplacental infections in spontaneous panleukopenia of cats. *Cornell Vet* *61*, 423–439.

Cuéllar, A.C., Kjær, L.J., Kirkeby, C., Skovgard, H., Nielsen, S.A., Stockmarr, A., Andersson, G., Lindstrom, A., Chirico, J., Lühken, R., *et al.* (2018). Spatial and temporal variation in the abundance of Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in nine European countries. *Parasit Vectors* *11*, 112.

Dam Van, P., Desmecht, D., Garigliany, M.-M., Bui Tran Anh, D., and Van Laere, A.-S. (2019). Anti-Influenza A Virus Activities of Type I/III Interferons-Induced Mx1 GTPases from Different Mammalian Species. *J. Interferon Cytokine Res.*

De Regge, N. (2017). Akabane, Aino and Schmallenberg virus-where do we stand and what do we know about the role of domestic ruminant hosts and Culicoides vectors in virus transmission and overwintering? *Curr Opin Virol* 27, 15–30.

De Regge, N., Deblauwe, I., De Deken, R., Vantieghem, P., Madder, M., Geysen, D., Smeets, F., Losson, B., van den Berg, T., and Cay, A.B. (2012). Detection of Schmallenberg virus in different Culicoides spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis* 59, 471–475.

De Regge, N., van den Berg, T., Georges, L., and Cay, B. (2013). Diagnosis of Schmallenberg virus infection in malformed lambs and calves and first indications for virus clearance in the fetus. *Vet. Microbiol.* 162, 595–600.

De Regge, N., Madder, M., Deblauwe, I., Losson, B., Fassotte, C., Demeulemeester, J., Smeets, F., Tomme, M., and Cay, A.B. (2014). Schmallenberg virus circulation in culicoides in Belgium in 2012: field validation of a real time RT-PCR approach to assess virus replication and dissemination in midges. *PLoS ONE* 9, e87005.

De Regge, N., De Deken, R., Fassotte, C., Losson, B., Deblauwe, I., Madder, M., Vantieghem, P., Tomme, M., Smeets, F., and Cay, A.B. (2015). Culicoides monitoring in Belgium in 2011: analysis of spatiotemporal abundance, species diversity and Schmallenberg virus detection. *Med. Vet. Entomol.* 29, 263–275.

Delooz, L., Saegerman, C., Quinet, C., Petitjean, T., De Regge, N., and Cay, B. (2017). Resurgence of Schmallenberg Virus in Belgium after 3 Years of Epidemiological Silence. *Transbound Emerg Dis* 64, 1641–1642.

Dermine, M., and Desmecht, D. (2012). In Vivo modulation of the innate response to pneumovirus by type-I and -III interferon-induced Bos taurus Mx1. *J. Interferon Cytokine Res.* 32, 332–337.

Desmecht, D., Garigliany, M.-M., Beer, M., Schirrmeyer, H., Paternostre, J., Volpe, R., and Linden, A. (2013). Detection of antibodies against Schmallenberg virus in wild boars, Belgium, 2010–2012.

Díaz, J.M., Prieto, A., López, C., Díaz, P., Pérez, A., Panadero, R., Pajares, G., Díez-Baños, P., Morrondo, P., and Fernández, G. (2015). High spread of Schmallenberg virus among roe deer (*Capreolus capreolus*) in Spain. *Res. Vet. Sci.* 102, 231–233.

Dionisio, D., Esperti, F., Vivarelli, A., and Valassina, M. (2003). Epidemiological, clinical and

laboratory aspects of sandfly fever. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *16*, 383–388.

Direction Générale de l’Alimentation (2012). Schmallenberg Virus : deux cas confirmés en France.

Doceul, V., Wernike, K., Vitour, D., and Laloy, E. (2017). Schmallenberg Virus. In *Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases of Livestock*, J. Bayry, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 99–119.

Dominguez, M., Hendrikx, P., Zientara, S., Calavas, D., Jaÿ, M., Touratier, A., Languille, J., and Fediaevsky, A. (2012). Preliminary estimate of Schmallenberg virus infection impact in sheep flocks – France. *Veterinary Record* *171*, 426.2-426.

Dominguez, M., Gache, K., Touratier, A., Perrin, J.-B., Fediaevsky, A., Collin, E., Bréard, E., Sailleau, C., Viarouge, C., Zanella, G., et al. (2014). Spread and impact of the Schmallenberg virus epidemic in France in 2012-2013. *BMC Vet. Res.* *10*, 248.

Dong, H., Li, P., Elliott, R.M., and Dong, C. (2013a). Structure of Schmallenberg orthobunyavirus nucleoprotein suggests a novel mechanism of genome encapsidation. *J. Virol.* *87*, 5593–5601.

Dong, H., Li, P., Böttcher, B., Elliott, R.M., and Dong, C. (2013b). Crystal structure of Schmallenberg orthobunyavirus nucleoprotein-RNA complex reveals a novel RNA sequestration mechanism. *RNA* *19*, 1129–1136.

Edwards, J.F., Livingston, C.W., Chung, S.I., and Collisson, E.C. (1989). Ovine arthrogryposis and central nervous system malformations associated with in utero Cache Valley virus infection: spontaneous disease. *Vet. Pathol.* *26*, 33–39.

EFSA (2012). “Schmallenberg” virus: analysis of the epidemiological data. EFSA Supporting Publications *9*, 261E.

Elbers, A.R.W., Loeffen, W.L.A., Quak, S., de Boer-Luijze, E., van der Spek, A.N., Bouwstra, R., Maas, R., Spierenburg, M.A.H., de Kluijver, E.P., van Schaik, G., et al. (2012). Seroprevalence of Schmallenberg Virus Antibodies among Dairy Cattle, the Netherlands, Winter 2011–2012. *Emerg Infect Dis* *18*, 1065–1071.

Elbers, A.R.W., Meiswinkel, R., van Weezep, E., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., and Kooi, E.A. (2013). Schmallenberg virus in Culicoides spp. biting midges, the Netherlands, 2011. *Emerging Infect. Dis.* *19*, 106–109.

Elbers, A.R.W., Stockhofe-Zurwieden, N., and van der Poel, W.H.M. (2014). Schmallenberg virus antibody persistence in adult cattle after natural infection and decay of maternal antibodies in calves. *BMC Vet. Res.* *10*, 103.

- Elbers, A.R.W., Meiswinkel, R., van Weezep, E., Kooi, E.A., and van der Poel, W.H.M. (2015). Schmallenberg Virus in Culicoides Biting Midges in the Netherlands in 2012. *Transbound Emerg Dis* 62, 339–342.
- Elliott, R.M., Blakqori, G., van Knippenberg, I.C., Koudriakova, E., Li, P., McLees, A., Shi, X., and Szemiel, A.M. (2013). Establishment of a reverse genetics system for Schmallenberg virus, a newly emerged orthobunyavirus in Europe. *J. Gen. Virol.* 94, 851–859.
- European Food Safety Authority (2014). EFSA assesses current knowledge of Schmallenberg virus. *Vet. Rec.* 174, 566.
- Evans, C.A.N., Reynolds, J.M., Reynolds, M.L., Saunders, N.R., and Segal, M.B. (1974). The development of a blood-brain barrier mechanism in foetal sheep. *J Physiol* 238, 371–386.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005). Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Academic Press).
- Fernández-Aguilar, X., Pujols, J., Velarde, R., Rosell, R., López-Olvera, J.R., Marco, I., Pumarola, M., Segalés, J., Lavín, S., and Cabezón, O. (2014). Schmallenberg virus circulation in high mountain ecosystem, Spain. *Emerging Infect. Dis.* 20, 1062–1064.
- Fischer, M., Hoffmann, B., Goller, K.V., Höper, D., Wernike, K., and Beer, M. (2013). A mutation “hot spot” in the Schmallenberg virus M segment. *J. Gen. Virol.* 94, 1161–1167.
- Forrester, N., Coffey, L., and Weaver, S. (2014). Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission. *Viruses* 6, 3991–4004.
- Franz, A.W.E., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., and Clem, R.J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7, 3741–3767.
- Frensing, T., Seitz, C., Heynisch, B., Patzina, C., Kochs, G., and Reichl, U. (2011). Efficient influenza B virus propagation due to deficient interferon-induced antiviral activity in MDCK cells. *Vaccine* 29, 7125–7129.
- Frese, M., Kochs, G., Feldmann, H., Hertkorn, C., and Haller, O. (1996). Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol* 70, 915–923.
- Frese, M., Prins, M., Ponten, A., Goldbach, R.W., Haller, O., and Zeltz, P. (2000). Constitutive expression of interferon-induced human MxA protein in transgenic tobacco plants does not confer resistance to a variety of RNA viruses. *Transgenic Res.* 9, 429–438.
- Gache, K., Dominguez, M., Pelletier, C., Petit, E., Calavas, D., Hendrikx, P., and Touratier, A. (2013). Schmallenberg virus: a seroprevalence survey in cattle and sheep, France, winter 2011-2012. *Vet. Rec.* 173, 141.
- Gache, K., Zientara, S., Collin, E., Authié, E., Dion, F., Garin, E., Zanella, G., and Calavas, D.

- (2018). Spatial and temporal patterns of Schmallenberg virus in France in 2016. *Vet. Rec.* *182*, 575.
- Gaillard, J.-M., Boutin, J.-M., Delorme, D., Van Laere, G., Duncan, P., and Lebreton, J.-D. (1997). Early survival in roe deer: causes and consequences of cohort variation in two contrasted populations. *Oecologia* *112*, 502–513.
- Gao, S., von der Malsburg, A., Dick, A., Faelber, K., Schröder, G.F., Haller, O., Kochs, G., and Daumke, O. (2011). Structure of myxovirus resistance protein a reveals intra- and intermolecular domain interactions required for the antiviral function. *Immunity* *35*, 514–525.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Lorca-Oró, C., Pujols, J., González, M.Á., Napp, S., Gómez-Guillamón, F., Zorrilla, I., Miguel, E.S., and Arenas, A. (2011). Role of wild ruminants in the epidemiology of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spain. *Vet Res* *42*, 88.
- García-Bocanegra, I., Cano-Terriza, D., Vidal, G., Rosell, R., Paniagua, J., Jiménez-Ruiz, S., Expósito, C., Rivero-Juarez, A., Arenas, A., and Pujols, J. (2017). Monitoring of Schmallenberg virus in Spanish wild artiodactyls, 2006-2015. *PLoS ONE* *12*, e0182212.
- Garigliany, M., De Leeuw, I., Kleijnen, D., Vandenbussche, F., Callens, J., Van Loo, H., Lebrun, M., Saulmont, M., Desmecht, D., and De Clercq, K. (2011). The presence of bluetongue virus serotype 8 RNA in Belgian cattle since 2008. *Transbound Emerg Dis* *58*, 503–509.
- Garigliany, M.-M., Bayrou, C., Kleijnen, D., Cassart, D., and Desmecht, D. (2012). Schmallenberg virus in domestic cattle, Belgium, 2012. *Emerging Infect. Dis.* *18*, 1512–1514.
- Garigliany, M.-M., Desmecht, D., Bayrou, C., and Peeters, D. (2013). No serologic evidence for emerging Schmallenberg virus infection in dogs (*Canis domesticus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* *13*, 830–833.
- Garigliany, M.-M., Hoffmann, B., Dive, M., Sartelet, A., Bayrou, C., Cassart, D., Beer, M., and Desmecht, D. (2012). Schmallenberg Virus in Calf Born at Term with Porencephaly, Belgium. *Emerging Infectious Diseases* *18*.
- Garwicz, M., Christensson, M., and Psouni, E. (2009). A unifying model for timing of walking onset in humans and other mammals. *PNAS* *106*, 21889–21893.
- Geoghegan, J.L., Walker, P.J., Duchemin, J.-B., Jeanne, I., and Holmes, E.C. (2014). Seasonal Drivers of the Epidemiology of Arthropod-Borne Viruses in Australia. *PLOS Neglected Tropical Diseases* *8*, e3325.
- Gerhauser, I., Weigand, M., Hahn, K., Herder, V., Wohlsein, P., Habierski, A., Varela, M., Palmarini, M., and Baumgärtner, W. (2014). Lack of schmallenberg virus in ruminant brain tissues archived from 1961 to 2010 in Germany. *J. Comp. Pathol.* *150*, 151–154.
- Gloster, J., Burgin, L., Witham, C., Athanassiadou, M., and Mellor, P.S. (2008). Bluetongue in

the United Kingdom and northern Europe in 2007 and key issues for 2008. *Vet. Rec.* *162*, 298–302.

Goffredo, M., Monaco, F., Capelli, G., Quaglia, M., Federici, V., Catalani, M., Montarsi, F., Polci, A., Pinoni, C., Calistri, P., *et al.* (2013). Schmallenberg virus in Italy: a retrospective survey in Culicoides stored during the bluetongue Italian surveillance program. *Prev. Vet. Med.* *111*, 230–236.

Goller, K.V., Höper, D., Schirrmeier, H., Mettenleiter, T.C., and Beer, M. (2012). Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerging Infect. Dis.* *18*, 1644–1646.

González, M., López, S., Mullens, B.A., Baldet, T., and Goldarazena, A. (2013). A survey of Culicoides developmental sites on a farm in northern Spain, with a brief review of immature habitats of European species. *Vet. Parasitol.* *191*, 81–93.

Gouzil, J., Fablet, A., Lara, E., Caignard, G., Cochet, M., Kundlacz, C., Palmarini, M., Varela, M., Breard, E., Sailleau, C., *et al.* (2017). Nonstructural Protein NSs of Schmallenberg Virus Is Targeted to the Nucleolus and Induces Nucleolar Disorganization. *J. Virol.* *91*.

Graham, D.A., Gallagher, C., Carden, R.F., Lozano, J.-M., Moriarty, J., and O'Neill, R. (2017). A survey of free-ranging deer in Ireland for serological evidence of exposure to bovine viral diarrhoea virus, bovine herpes virus-1, bluetongue virus and Schmallenberg virus. *Ir Vet J* *70*, 13.

Grimstad, P.R., Ross, Q.E., and Craig, G.B. (1980). *Aedes Triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse Virus: II. Modification of mosquito feeding behavior by virus infection. *J Med Entomol* *17*, 1–7.

Gubbins, S., Turner, J., Baylis, M., van der Stede, Y., van Schaik, G., Abrahantes, J.C., and Wilson, A.J. (2014a). Inferences about the transmission of Schmallenberg virus within and between farms. *Preventive Veterinary Medicine* *116*, 380–390.

Gubbins, S., Richardson, J., Baylis, M., Wilson, A.J., and Abrahantes, J.C. (2014b). Modelling the continental-scale spread of Schmallenberg virus in Europe: Approaches and challenges. *Preventive Veterinary Medicine* *116*, 404–411.

Gubbins Simon, Carpenter Simon, Baylis Matthew, Wood James L.N, and Mellor Philip S (2008). Assessing the risk of bluetongue to UK livestock: uncertainty and sensitivity analyses of a temperature-dependent model for the basic reproduction number. *Journal of The Royal Society Interface* *5*, 363–371.

Habjan, M., Penski, N., Wagner, V., Spiegel, M., Overby, A.K., Kochs, G., Huiskonen, J.T., and Weber, F. (2009). Efficient production of Rift Valley fever virus-like particles: The antiviral protein MxA can inhibit primary transcription of bunyaviruses. *Virology* *385*, 400–408.

Hacker, D., Raju, R., and Kolakofsky, D. (1989). La Crosse virus nucleocapsid protein controls its own synthesis in mosquito cells by encapsidating its mRNA. *J. Virol.* *63*, 5166–5174.

Hahn, K., Habierski, A., Herder, V., Wohlsein, P., Peters, M., Hansmann, F., and Baumgärtner, W. (2013). Schmallenberg virus in central nervous system of ruminants. *Emerging Infect. Dis.* *19*, 154–155.

Hall, J.G. (1997). Arthrogryposis multiplex congenita: etiology, genetics, classification, diagnostic approach, and general aspects. *J Pediatr Orthop B* *6*, 159–166.

Hall, J.G. (2009). Pena-Shokeir phenotype (fetal akinesia deformation sequence) revisited. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* *85*, 677–694.

Haller, O., Staeheli, P., Schwemmle, M., and Kochs, G. (2015). Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends in Microbiology* *23*, 154–163.

Haller, O., Arnheiter, H., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (2018). The Discovery of the Antiviral Resistance Gene Mx: A Story of Great Ideas, Great Failures, and Some Success. *Annu. Rev. Virol.* *5*, 33–51.

Hashiguchi, Y., Nanba, K., and Kumagai, T. (1979). Congenital abnormalities in newborn lambs following Akabane virus infection in pregnant ewes. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* *19*, 1–11.

Hassani-Mehraban, A., Creutzburg, S., van Heereveld, L., and Kormelink, R. (2015). Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations. *BMC Biotechnol.* *15*, 80.

Hefti, H.P., Frese, M., Landis, H., Di Paolo, C., Aguzzi, A., Haller, O., and Pavlovic, J. (1999). Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. *J. Virol.* *73*, 6984–6991.

van der Heijden, H.M.J.F., Bouwstra, R.J., Mars, M.H., van der Poel, W.H.M., Wellenberg, G.J., and van Maanen, C. (2013). Development and validation of an indirect Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Schmallenberg virus in blood samples from ruminants. *Res. Vet. Sci.* *95*, 731–735.

Heinz, H., Marquardt, J., Schubert, H.J., Adolf, G.R., and Leibold, W. (1994). Proteins induced by recombinant equine interferon-beta 1 within equine peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear neutrophilic granulocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *42*, 221–235.

Hellert, J., Aebischer, A., Wernike, K., Haouz, A., Brocchi, E., Reiche, S., Guardado-Calvo, P., Beer, M., and Rey, F.A. (2019). Orthobunyavirus spike architecture and recognition by neutralizing antibodies. *Nat Commun* *10*, 879.

Helmer, C., Eibach, R., Tegtmeyer, P.C., Humann-Ziehank, E., and Ganter, M. (2013). Survey of Schmallenberg virus (SBV) infection in German goat flocks. *Epidemiol. Infect.* *141*, 2335–2345.

Herd Book BBB Herd Book Blanc Bleu Belge.

Herder, V., Wohlsein, P., Peters, M., Hansmann, F., and Baumgärtner, W. (2012). Salient Lesions in Domestic Ruminants Infected With the Emerging So-called Schmallenberg Virus in Germany. *Veterinary Pathology* *49*, 588–591.

Hoffmann, B., Scheuch, M., Höper, D., Jungblut, R., Holsteg, M., Schirrmeier, H., Eschbaumer, M., Goller, K.V., Wernike, K., Fischer, M., *et al.* (2012). Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerging Infect. Dis.* *18*, 469–472.

Hoffmann, B., Schulz, C., and Beer, M. (2013). First detection of Schmallenberg virus RNA in bovine semen, Germany, 2012. *Vet. Microbiol.* *167*, 289–295.

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

Horne, K.M., and Vanlandingham, D.L. (2014). Bunyavirus-Vector Interactions. *Viruses* *6*, 4373–4397.

Huang, Y.-J.S., Higgs, S., and Vanlandingham, D.L. (2019). Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. *Front Microbiol* *10*.

Hulst, M., Kortekaas, J., Hakze-van der Honing, R., Vastenhoud, S., Cornellissen, J., van Maanen, K., Bossers, A., Harders, F., Stockhofe, N., and van der Poel, W. (2013). Genetic characterization of an atypical Schmallenberg virus isolated from the brain of a malformed lamb. *Virus Genes* *47*, 505–514.

Humphries, D., and Burr, P. (2012). Schmallenberg virus milk antibody ELISA. *Vet. Rec.* *171*, 511–512.

Huttenlocher, P.R., and Dabholkar, A.S. (1997). Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* *387*, 167–178.

International Society for Infection Diseases (2012). PRO/AH/EDR> Schmallenberg virus - Europe (09): update.

International Society for Infection Diseases (2016). PromED m. Schmallenberg virus - Europe: netherlands, Belgium, reemergence. 2016.

Izzo, F., Cosseddu, G.M., Polci, A., Iapaolo, F., Pinoni, C., Capobianco Dondona, A., Valleriani, F., and Monaco, F. (2016). Genetic characterization of Italian field strains of Schmallenberg virus based on N and NSs genes. *Virus Genes* *52*, 582–585.

Jacquet, D. (2019). Le revenu dans les élevages allaitants spécialisés: moins variable qu'en

élevage laitier, mais peu élevé!

Jang, Y.H., and Seong, B.L. (2014). Options and Obstacles for Designing a Universal Influenza Vaccine. *Viruses* *6*, 3159–3180.

Jin, H.K., Yoshimatsu, K., Takada, A., Ogino, M., Asano, A., Arikawa, J., and Watanabe, T. (2001). Mouse Mx2 protein inhibits hantavirus but not influenza virus replication. *Arch. Virol.* *146*, 41–49.

Kalra, S., Kumar, A., Jarhyan, P., and Unnikrishnan, A.G. (2015). Endemic or epidemic? Measuring the endemicity index of diabetes. *Indian J Endocrinol Metab* *19*, 5–7.

Kanerva, M., Melén, K., Vaheri, A., and Julkunen, I. (1996). Inhibition of puumala and tula hantaviruses in Vero cells by MxA protein. *Virology* *224*, 55–62.

Kato, T., Shirafuji, H., Tanaka, S., Sato, M., Yamakawa, M., Tsuda, T., and Yanase, T. (2016). Bovine Arboviruses in Culicoides Biting Midges and Sentinel Cattle in Southern Japan from 2003 to 2013. *Transbound Emerg Dis* *63*, e160–e172.

Kenney, J.L., Adams, A.P., Gorchakov, R., Leal, G., and Weaver, S.C. (2012). Genetic and Anatomic Determinants of Enzootic Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection of Culex (Melanoconion) taeniopus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* *6*, e1606.

Kęsik-Maliszewska, J., Krzysiak, M.K., Grochowska, M., Lechowski, L., Chase, C., and Larska, M. (2018). EPIDEMIOLOGY OF SCHMALLENBERG VIRUS IN EUROPEAN BISON (BISON BONASUS) IN POLAND. *J. Wildl. Dis.* *54*, 272–282.

King, B., O’Shea Brown, T., Tarlinton, R., and Daly, J.M. (2015). Seroprevalence of Schmallenberg virus in the United Kingdom and the Republic of Ireland: 2011–2013. *Vet. Microbiol.* *180*, 36–40.

Kirkeby, C., Bødker, R., Stockmarr, A., Lind, P., and Heegaard, P.M.H. (2013a). Quantifying dispersal of european culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) vectors between farms using a novel mark-release-recapture technique. *PLoS ONE* *8*, e61269.

Kirkeby, C., Bødker, R., Stockmarr, A., and Lind, P. (2013b). Spatial abundance and clustering of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) on a local scale. *Parasit Vectors* *6*, 43.

Kirkland, P.D. (2015). Akabane virus infection. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* *34*, 403–410.

Knipe, D.M., Howley, P.M., and Cohen, J.I. (2013). *Fields virology*. (Philadelphia: Wolters Kluwer/ Lippincott Williams & Wilkins).

Koch, H.G., and Axtell, R.C. (1979). Attraction of Culicoides Furens and C. Hollensis (Diptera: Ceratopogonidae) to Animal Hosts in a Salt Marsh Habitat. *J Med Entomol* *15*, 494–499.

- Kochs, G., and Haller, O. (1999). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *96*, 2082–2086.
- Kochs, G., Janzen, C., Hohenberg, H., and Haller, O. (2002). Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 3153–3158.
- Kolkman, I., Opsomer, G., Aerts, S., Hoflack, G., Laevens, H., and Lips, D. (2010). Analysis of body measurements of newborn purebred Belgian Blue calves. *Animal* *4*, 661–671.
- König, P., Wernike, K., Hechinger, S., Tauscher, K., Breithaupt, A., and Beer, M. (2019). Fetal infection with Schmallenberg virus - An experimental pathogenesis study in pregnant cows. *Transbound Emerg Dis* *66*, 454–462.
- Konno, S., and Nakagawa, M. (1982). Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. *Experimental disease. Vet. Pathol.* *19*, 267–279.
- Konno, S., Moriwaki, M., and Nakagawa, M. (1982). Akabane disease in cattle: congenital abnormalities caused by viral infection. *Spontaneous disease. Vet. Pathol.* *19*, 246–266.
- Kraatz, F., Wernike, K., Reiche, S., Aebischer, A., Reimann, I., and Beer, M. (2018). Schmallenberg virus non-structural protein NSm: Intracellular distribution and role of non-hydrophobic domains. *Virology* *516*, 46–54.
- Krzysiak, M.K., Iwaniak, W., Kęsik-Maliszewska, J., Olech, W., and Larska, M. (2017). Serological Study of Exposure to Selected Arthropod-Borne Pathogens in European Bison (*Bison bonasus*) in Poland. *Transbound Emerg Dis* *64*, 1411–1423.
- Kupferschmidt, K. (2012). Scientists Rush to Find Clues on New Animal Virus. *Science* *335*, 1028–1029.
- Kurogi, H., Inaba, Y., Takahashi, E., Sato, K., and Satoda, K. (1977a). Congenital abnormalities in newborn calves after inoculation of pregnant cows with Akabane virus. *Infect Immun* *17*, 338–343.
- Kurogi, H., Inaba, Y., Takahashi, E., Sato, K., and Goto, Y. (1977b). Experimental infection of pregnant goats with Akabane virus. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* *17*, 1–9.
- La Rocca, S.A., and Sandvik, T. (2009). A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle. *J. Virol. Methods* *161*, 122–127.
- Laloy, E., Bréard, E., Sailleau, C., Viarouge, C., Desprat, A., Zientara, S., Klein, F., Hars, J., and Rossi, S. (2014). Schmallenberg virus infection among red deer, France, 2010-2012. *Emerging Infect. Dis.* *20*, 131–134.
- Laloy, E., Riou, M., Barc, C., Belbis, G., Bréard, E., Breton, S., Cordonnier, N., Crochet, D.,

Delaunay, R., Moreau, J., *et al.* (2015). Schmallenberg virus: experimental infection in goats and bucks. *BMC Vet. Res.* *11*, 221.

Laloy, E., Braud, C., Bréard, E., Kaandorp, J., Bourgeois, A., Kohl, M., Meyer, G., Sailleau, C., Viarouge, C., Zientara, S., *et al.* (2016). Schmallenberg Virus in Zoo Ruminants, France and the Netherlands. *Emerging Infect. Dis.* *22*, 2201–2203.

Laloy, E., Bréard, E., Trapp, S., Pozzi, N., Riou, M., Barc, C., Breton, S., Delaunay, R., Cordonnier, N., Chateau-Joubert, S., *et al.* (2017). Fetopathic effects of experimental Schmallenberg virus infection in pregnant goats. *Vet. Microbiol.* *211*, 141–149.

Larska, M. (2018). Schmallenberg virus: a cyclical problem. *Vet. Rec.* *183*, 688–689.

Larska, M., Polak, M.P., Grochowska, M., Lechowski, L., Zwiżek, J.S., and Źmudziński, J.F. (2013a). First report of Schmallenberg virus infection in cattle and midges in Poland. *Transbound Emerg Dis* *60*, 97–101.

Larska, M., Lechowski, L., Grochowska, M., and Źmudziński, J.F. (2013b). Detection of the Schmallenberg virus in nulliparous Culicoides obsoletus/scoticus complex and C. punctatus—the possibility of transovarial virus transmission in the midge population and of a new vector. *Vet. Microbiol.* *166*, 467–473.

Larska, M., Krzysiak, M.K., Kęsik-Maliszewska, J., and Rola, J. (2014). Cross-sectional study of Schmallenberg virus seroprevalence in wild ruminants in Poland at the end of the vector season of 2013. *BMC Vet. Res.* *10*, 967.

Lassen, S.B., Nielsen, S.A., and Kristensen, M. (2012). Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark. *Parasit Vectors* *5*, 143.

Lear, T.L., Breen, M., Ponce de Leon, F.A., Coogee, L., Ferguson, E.M., Chambers, T.M., and Bailey, E. (1998). Cloning and chromosomal localization of MX1 and ETS2 to chromosome 26 of the horse (*Equus caballus*). *Chromosome Res.* *6*, 333–335.

Leipold, H.W., Hiraga, T., and Dennis, S.M. (1993). Congenital defects of the bovine central nervous system. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* *9*, 77–91.

Leroy, M., Baise, E., Pire, G., Gérardin, J., and Desmecht, D. (2005). Resistance of paramyxoviridae to type I interferon-induced *Bos taurus* Mx1 dynamin. *J. Interferon Cytokine Res.* *25*, 192–201.

Leroy, M., Pire, G., Baise, E., and Desmecht, D. (2006). Expression of the interferon-alpha/beta-inducible bovine Mx1 dynamin interferes with replication of rabies virus. *Neurobiol. Dis.* *21*, 515–521.

Li, C., Guo, X., Deng, Y., Xing, D., Sun, A., Liu, Q., Wu, Q., Dong, Y., Zhang, Y., Zhang, H., *et al.* (2017). Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerg Microbes Infect* *6*, e23.

Liao, D., Yang, H., Xiao, L., Zhu, J., Wang, J., Li, Z., Zhang, N., and Li, H. (2018). Complete Genome Sequence of a Bluetongue Virus Serotype 15 Strain Isolated from China in 1996. *Genome Announc* *6*.

Lievaart-Peterson, K., Luttkholt, S., Peperkamp, K., Van den Brom, R., and Vellema, P. (2015). Schmallenberg disease in sheep or goats: Past, present and future. *Vet. Microbiol.* *181*, 147–153.

Linden, A., Grégoire, F., Nahayo, A., Hanrez, D., Mousset, B., Massart, A.L., De Leeuw, I., Vandemeulebroucke, E., Vandenbussche, F., and De Clercq, K. (2010). Bluetongue Virus in Wild Deer, Belgium, 2005–2008. *Emerg Infect Dis* *16*, 833–836.

Linden, A., Desmecht, D., Volpe, R., Wirtgen, M., Gregoire, F., Pirson, J., Paternostre, J., Kleijnen, D., Schirrmeier, H., Beer, M., *et al.* (2012). Epizootic spread of Schmallenberg virus among wild cervids, Belgium, Fall 2011. *Emerging Infect. Dis.* *18*, 2006–2008.

Lindenmann, J. (1962). Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology* *16*, 203–204.

Loeffen, W., Quak, S., de Boer-Luijze, E., Hulst, M., van der Poel, W., Bouwstra, R., and Maas, R. (2012). Development of a virus neutralisation test to detect antibodies against Schmallenberg virus and serological results in suspect and infected herds. *Acta Vet. Scand.* *54*, 44.

Lorca-Oró, C., López-Olvera, J.R., Ruiz-Fons, F., Acevedo, P., García-Bocanegra, I., Oleaga, Á., Gortázar, C., and Pujols, J. (2014). Long-Term Dynamics of Bluetongue Virus in Wild Ruminants: Relationship with Outbreaks in Livestock in Spain, 2006–2011. *PLoS One* *9*.

Losson, B., Mignon, B., Paternostre, J., Madder, M., Deken, R.D., Deken, G.D., Deblauwe, I., Fassotte, C., Cors, R., Defrance, T., *et al.* (2007). Biting midges overwintering in Belgium. *Veterinary Record* *160*, 451–452.

Luttkholt, S., Veldhuis, A., van den Brom, R., Moll, L., Lievaart-Peterson, K., Peperkamp, K., van Schaik, G., and Vellema, P. (2014). Risk factors for malformations and impact on reproductive performance and mortality rates of Schmallenberg virus in sheep flocks in the Netherlands. *PLoS ONE* *9*, e100135.

van Maanen, C., van der Heijden, H., Wellenberg, G.J., Witteveen, G., Luttkholt, S., Bouwstra, R., Kooi, B., Vellema, P., Peperkamp, K., and Mars, J. (2012). Schmallenberg virus antibodies in bovine and ovine fetuses. *Veterinary Record* *171*, 299.2–299.

- MacLachlan, N.J., and Osburn, B.I. (1983). Bluetongue virus-induced hydranencephaly in cattle. *Vet. Pathol.* *20*, 563–573.
- Martinelle, L., Poskin, A., Dal Pozzo, F., De Regge, N., Cay, B., and Saegerman, C. (2015). Experimental Infection of Sheep at 45 and 60 Days of Gestation with Schmallenberg Virus Readily Led to Placental Colonization without Causing Congenital Malformations. *PLoS ONE* *10*, e0139375.
- Martinelle, L., Poskin, A., Dal Pozzo, F., Mostin, L., Van Campe, W., Cay, A.B., De Regge, N., and Saegerman, C. (2017). Three Different Routes of Inoculation for Experimental Infection with Schmallenberg Virus in Sheep. *Transbound Emerg Dis* *64*, 305–308.
- Mathew, C., Klevar, S., Elbers, A.R.W., van der Poel, W.H.M., Kirkland, P.D., Godfroid, J., Mdegela, R.H., Mwamengele, G., and Stokstad, M. (2015). Detection of serum neutralizing antibodies to Simbu sero-group viruses in cattle in Tanzania. *BMC Vet. Res.* *11*, 208.
- Mavale, M., Parashar, D., Sudeep, A., Gokhale, M., Ghodke, Y., Geevarghese, G., Arankalle, V., and Mishra, A.C. (2010). Venereal Transmission of Chikungunya Virus by *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* *83*, 1242–1244.
- Maxie, M.G., and Youssef, S. (2007). Nervous system. In *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals* (Fifth Edition), (Edinburgh: Elsevier), pp. 281–457.
- McDermott, E.G., Mayo, C.E., Gerry, A.C., Laudier, D., MacLachlan, N.J., and Mullens, B.A. (2015). Bluetongue virus infection creates light averse Culicoides vectors and serious errors in transmission risk estimates. *Parasites & Vectors* *8*, 460.
- McGeady, T.A. (Thomas A.) (2017). *Veterinary embryology*. (Chichester: Wiley-Blackwell).
- McGowan, S.L., La Rocca, S.A., Grierson, S.S., Dastjerdi, A., Choudhury, B., and Steinbach, F. (2018). Incursion of Schmallenberg virus into Great Britain in 2011 and emergence of variant sequences in 2016. *The Veterinary Journal* *234*, 77–84.
- McGrath, G., More, S.J., and O'Neill, R. (2018). Hypothetical route of the introduction of Schmallenberg virus into Ireland using two complementary analyses. *Vet. Rec.* *182*, 226.
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Schmahl, G., Al-Quraishi, S., Walldorf, U., Mehlhorn, B., and Bätza, H.-J. (2009). Entomological survey on vectors of Bluetongue virus in Northrhine-Westfalia (Germany) during 2007 and 2008. *Parasitol. Res.* *105*, 321–329.
- Menzies, F.D., McCullough, S.J., McKeown, I.M., Forster, J.L., Jess, S., Batten, C., Murchie, A.K., Gloster, J., Fallows, J.G., Pelgrim, W., *et al.* (2008). Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Veterinary Record* *163*, 203–209.
- Méroc, E., Poskin, A., Van Loo, H., Quinet, C., Van Driessche, E., Delooz, L., Behaeghel, I., Riocreux, F., Hooyberghs, J., De Regge, N., *et al.* (2013). Large-scale cross-sectional serological

survey of Schmallenberg virus in Belgian cattle at the end of the first vector season. *Transbound Emerg Dis* 60, 4–8.

Méroc, E., De Regge, N., Riocreux, F., Caij, A.B., van den Berg, T., and van der Stede, Y. (2014). Distribution of Schmallenberg virus and seroprevalence in Belgian sheep and goats. *Transbound Emerg Dis* 61, 425–431.

Miller, B.R., DeFoliart, G.R., and Yuill, T.M. (1977). Vertical transmission of La Crosse virus (California encephalitis group): transovarial and filial infection rates in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 14, 437–440.

Mitchell, P.S., Patzina, C., Emerman, M., Haller, O., Malik, H.S., and Kochs, G. (2012). Evolution-guided identification of antiviral specificity determinants in the broadly acting interferon-induced innate immunity factor MxA. *Cell Host Microbe* 12, 598–604.

Miura, T.A., Carlson, J.O., Beaty, B.J., Bowen, R.A., and Olson, K.E. (2001). Expression of Human MxA Protein in Mosquito Cells Interferes with LaCrosse Virus Replication. *Journal of Virology* 75, 3001–3003.

Molenaar, F.M., La Rocca, S.A., Khatri, M., Lopez, J., Steinbach, F., and Dastjerdi, A. (2015). Exposure of Asian Elephants and Other Exotic Ungulates to Schmallenberg Virus. *PLoS ONE* 10, e0135532.

Mouchantat, S., Wernike, K., Lutz, W., Hoffmann, B., Ulrich, R.G., Börner, K., Wittstatt, U., and Beer, M. (2015). A broad spectrum screening of Schmallenberg virus antibodies in wildlife animals in Germany. *Vet. Res.* 46, 99.

Muskens, J., Smolenaars, A.J.G., van der Poel, W.H.M., Mars, M.H., van Wuijckhuise, L., Holzhauer, M., van Weering, H., and Kock, P. (2012). [Diarrhea and loss of production on Dutch dairy farms caused by the Schmallenberg virus]. *Tijdschr Diergeneeskdt* 137, 112–115.

Nakajima, E., Morozumi, T., Tsukamoto, K., Watanabe, T., Plastow, G., and Mitsuhashi, T. (2007). A naturally occurring variant of porcine Mx1 associated with increased susceptibility to influenza virus in vitro. *Biochem. Genet.* 45, 11–24.

Nakamura, T., Asano, A., Okano, S., Ko, J.-H., Kon, Y., Watanabe, T., and Agui, T. (2005). Intracellular localization and antiviral property of canine Mx proteins. *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 169–173.

Näslund, K., Blomqvist, G., Vernersson, C., Zientara, S., Bréard, E., and Valarcher, J.F. (2014). Development and evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological detection of Schmallenberg virus antibodies in ruminants using whole virus antigen. *Acta Vet. Scand.* 56, 71.

Nayduch, D., Shankar, V., Mills, M.K., Robl, T., Drolet, B.S., Ruder, M.G., Scully, E.D., and Saski, C.A. (2019). Transcriptome Response of Female Culicoides sonorensis Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) to Early Infection with Epizootic Hemorrhagic Disease Virus (EHDV-2). *Viruses* *11*.

Neira Oviedo, M.V., Romoser, W.S., James, C.B.L., Mahmood, F., and Reisen, W.K. (2011). Infection dynamics of western equine encephalomyelitis virus (Togaviridae: Alphavirus) in four strains of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae): an immunocytochemical study. *Res Rep Trop Med* *2*, 65–77.

Nelson, R.L. (1965). Carbon Dioxide as an Attractant For Culicoides. *J Med Entomol* *2*, 56–57.

Oem, J.-K., Kim, Y.-H., Kim, S.-H., Lee, M.-H., and Lee, K.-K. (2014). Serological characteristics of affected cattle during an outbreak of bovine enzootic encephalomyelitis caused by Akabane virus. *Trop Anim Health Prod* *46*, 261–263.

Pages, N., Bréard, E., Urien, C., Talavera, S., Viarouge, C., Lorca-Oro, C., Jouneau, L., Charley, B., Zientara, S., Bensaïd, A., et al. (2014). Culicoides Midge Bites Modulate the Host Response and Impact on Bluetongue Virus Infection in Sheep. *PLoS One* *9*.

Palm, M., Leroy, M., Thomas, A., Linden, A., and Desmecht, D. (2007). Differential anti-influenza activity among allelic variants at the *Sus scrofa* Mx1 locus. *J. Interferon Cytokine Res.* *27*, 147–155.

Palm, M., Garigliany, M.-M., Cornet, F., and Desmecht, D. (2010). Interferon-induced *Sus scrofa* Mx1 blocks endocytic traffic of incoming influenza A virus particles. *Vet. Res.* *41*, 29.

Parsonson, I.M., Della-Porta, A.J., and Snowdon, W.A. (1981). Akabane virus infection in the pregnant ewe. 2. Pathology of the foetus. *Veterinary Microbiology* *6*, 209–224.

Pejaković, S., Wiggers, L., Coupeau, D., Kirschvink, N., Mason, J., and Muylkens, B. (2018). Test selection for antibody detection according to the seroprevalence level of Schmallenberg virus in sheep. *PLoS ONE* *13*, e0196532.

Peperkamp, N.H., Luttkholt, S.J., Dijkman, R., Vos, J.H., Junker, K., Greijdanus, S., Roumen, M.P., van Garderen, E., Meertens, N., van Maanen, C., et al. (2015). Ovine and Bovine Congenital Abnormalities Associated With Intrauterine Infection With Schmallenberg Virus. *Vet. Pathol.* *52*, 1057–1066.

Philbey, A.W., Ross, A.D., Kirkland, P.D., and Love, R.J. (2007). Skeletal and neurological malformations in pigs congenitally infected with Menangle virus. *Aust. Vet. J.* *85*, 134–140.

Pilla-Moffett, D., Barber, M.F., Taylor, G.A., and Coers, J. (2016). Interferon-inducible GTPases in host resistance, inflammation and disease. *J Mol Biol* *428*, 3495–3513.

- Plyusnin, A., and Elliott, R.M. (2011). Bunyaviridae: molecular and cellular biology. (Norfolk, UK: Caister Academic Press).
- Porta, M.S., Greenland, S., Hernan, M., Silva, I. dos S., and Last, J.M. (2014). A dictionary of epidemiology. (Oxford: Oxford University Press).
- Poskin, A., Van Campe, W., Mostin, L., Cay, B., and De Regge, N. (2014a). Experimental Schmallenberg virus infection of pigs. *Vet. Microbiol.* *170*, 398–402.
- Poskin, A., Martinelle, L., Mostin, L., Van Campe, W., Dal Pozzo, F., Saegerman, C., Cay, A.B., and De Regge, N. (2014b). Dose-dependent effect of experimental Schmallenberg virus infection in sheep. *Vet. J.* *201*, 419–422.
- Poskin, A., Méroc, E., Behaeghel, I., Riocreux, F., Couche, M., Van Loo, H., Bertels, G., Delooz, L., Quinet, C., Dispas, M., *et al.* (2017). Schmallenberg Virus in Belgium: Estimation of Impact in Cattle and Sheep Herds. *Transbound Emerg Dis* *64*, 264–274.
- Ramalho, F.S., Yamamoto, A.Y., da Silva, L.L., Figueiredo, L.T.M., Rocha, L.B., Neder, L., Teixeira, S.R., Apolinário, L.A., Ramalho, L.N.Z., Silva, D.M., *et al.* (2017). Congenital Zika Virus Infection Induces Severe Spinal Cord Injury. *Clin. Infect. Dis.* *65*, 687–690.
- Rasmussen, L.D., Kristensen, B., Kirkeby, C., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., Bødker, R., and Bøtner, A. (2012). Culicoids as Vectors of Schmallenberg Virus. *Emerg Infect Dis* *18*, 1204–1206.
- Rasmussen, L.D., Kirkeby, C., Bødker, R., Kristensen, B., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., and Bøtner, A. (2014). Rapid spread of Schmallenberg virus-infected biting midges (*Culicoides* spp.) across Denmark in 2012. *Transbound Emerg Dis* *61*, 12–16.
- Reese, S.M., Mossel, E.C., Beaty, M.K., Beck, E.T., Geske, D., Blair, C.D., Beaty, B.J., and Black, W.C. (2010). Identification of super-infected *Aedes triseriatus* mosquitoes collected as eggs from the field and partial characterization of the infecting La Crosse viruses. *Virol. J.* *7*, 76.
- Reichelt, M., Stertz, S., Krijnse-Locker, J., Haller, O., and Kochs, G. (2004). Missorting of LaCrosse Virus Nucleocapsid Protein by the Interferon-Induced MxA GTPase Involves Smooth ER Membranes: Membrane Association of Antivirally Active MxA GTPase. *Traffic* *5*, 772–784.
- Robin, M., Archer, D., Garros, C., Gardès, L., and Baylis, M. (2014). The threat of midge-borne equine disease: investigation of Culicoides species on UK equine premises. *Vet. Rec.* *174*, 301.
- Rodrigues Hoffmann, A., Welsh, C.J., Varner, P.W., de la Concha-Bermejillo, A., Ball, J.M., Ambrus, A., and Edwards, J.F. (2012). Identification of the Target Cells and Sequence of Infection during Experimental Infection of Ovine Fetuses with Cache Valley Virus. *Journal of Virology* *86*, 4793–4800.
- Roman-Sosa, G., Brocchi, E., Schirrmeier, H., Wernike, K., Schelp, C., and Beer, M. (2016).

Analysis of the humoral immune response against the envelope glycoprotein Gc of Schmallenberg virus reveals a domain located at the amino terminus targeted by mAbs with neutralizing activity. *J. Gen. Virol.* **97**, 571–580.

Roman-Sosa, G., Karger, A., Kraatz, F., Aebsicher, A., Wernike, K., Maksimov, P., Lillig, C.H., Reimann, I., Brocchi, E., Keller, M., *et al.* (2017). The amino terminal subdomain of glycoprotein Gc of Schmallenberg virus: disulfide bonding and structural determinants of neutralization. *J. Gen. Virol.* **98**, 1259–1273.

Rossi, S., Viarouge, C., Faure, E., Gilot-Fromont, E., Gache, K., Gibert, P., Verheyden, H., Hars, J., Klein, F., Maillard, D., *et al.* (2017). Exposure of Wildlife to the Schmallenberg Virus in France (2011-2014): Higher, Faster, Stronger (than Bluetongue)! *Transbound Emerg Dis* **64**, 354–363.

Saegerman, C., Porter, S.R., and Humblet, M.-F. (2011). The use of modelling to evaluate and adapt strategies for animal disease control: -EN- -FR- L'utilisation des modèles pour évaluer et modifier les stratégies de lutte contre les maladies animales -ES- Utilización de modelos para evaluar y adaptar estrategias de control zoosanitario. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* **30**, 555–569.

Saegerman, C., Martinelle, L., Dal Pozzo, F., and Kirschvink, N. (2014). Preliminary survey on the impact of Schmallenberg virus on sheep flocks in South of Belgium. *Transbound Emerg Dis* **61**, 469–472.

Sailleau, C., Boogaerts, C., Meyrueix, A., Laloy, E., Bréard, E., Viarouge, C., Desprat, A., Vitour, D., Doceul, V., Boucher, C., *et al.* (2013). Schmallenberg virus infection in dogs, France, 2012. *Emerging Infect. Dis.* **19**, 1896–1898.

Sanders, C.J., Harrup, L.E., Tugwell, L.A., Brugman, V.A., England, M., and Carpenter, S. (2017). Quantification of within- and between-farm dispersal of Culicoides biting midges using an immunomarking technique. *J Appl Ecol* **54**, 1429–1439.

Sandrock, M., Frese, M., Haller, O., and Kochs, G. (2001). Interferon-induced rat Mx proteins confer resistance to Rift Valley fever virus and other arthropod-borne viruses. *J. Interferon Cytokine Res.* **21**, 663–668.

Sartelet, A., Li, W., Pailhoux, E., Richard, C., Tamma, N., Karim, L., Fasquelle, C., Druet, T., Coppieters, W., Georges, M., *et al.* (2015). Genome-wide next-generation DNA and RNA sequencing reveals a mutation that perturbs splicing of the phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class H gene (PIGH) and causes arthrogryposis in Belgian Blue cattle. *BMC Genomics* **16**, 316.

Schmaljohn, C., and Nichol, S.T. (2001). *Hantaviruses* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).

Schulz, C., Wernike, K., Beer, M., and Hoffmann, B. (2014). Infectious Schmallenberg virus from bovine semen, Germany. *Emerging Infect. Dis.* **20**, 338–340.

Ségard, A., Gardès, L., Jacquier, E., Grillet, C., Mathieu, B., Rakotoarivony, I., Setier-Rio, M.-L., Chavernac, D., Cêtre-Sossah, C., Balenghien, T., *et al.* (2018). Schmallenberg virus in Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) populations in France during 2011-2012 outbreak. *Transbound Emerg Dis* *65*, e94–e103.

Seitz, C., Frensing, T., Höper, D., Kochs, G., and Reichl, U. (2010). High yields of influenza A virus in Madin-Darby canine kidney cells are promoted by an insufficient interferon-induced antiviral state. *J. Gen. Virol.* *91*, 1754–1763.

Shirozu, T., Sasaki, K., Kawahara, M., Yanagawa, Y., Nagano, M., Yamauchi, N., and Takahashi, M. (2016). Expression dynamics of bovine MX genes in the endometrium and placenta during early to mid pregnancy. *J. Reprod. Dev.* *62*, 29–35.

Sibhat, B., Ayelet, G., Gebremedhin, E.Z., Skjerve, E., and Asmare, K. (2018). Seroprevalence of Schmallenberg virus in dairy cattle in Ethiopia. *Acta Trop.* *178*, 61–67.

Sohier, C., Deblauwe, I., Van Loo, T., Hanon, J.-B., Cay, A.B., and De Regge, N. (2017a). Evidence of extensive renewed Schmallenberg virus circulation in Belgium during summer of 2016 - increase in arthrogryposis-hydranencephaly cases expected. *Transbound Emerg Dis* *64*, 1015–1019.

Sohier, C., Michiels, R., Kapps, E., Van Mael, E., Quinet, C., Cay, A.B., and De Regge, N. (2017b). Unchanged Schmallenberg virus seroprevalence in the Belgian sheep population after the vector season of 2014 and 2015 despite evidence of virus circulation. *Res. Vet. Sci.* *114*, 177–180.

Soldan, S.S., and González-Scarano, F. (2005). Emerging infectious diseases: the Bunyaviridae. *J. Neurovirol.* *11*, 412–423.

Stertz, S., Dittmann, J., Blanco, J.C.G., Pletneva, L.M., Haller, O., and Kochs, G. (2007). The antiviral potential of interferon-induced cotton rat Mx proteins against orthomyxovirus (influenza), rhabdovirus, and bunyavirus. *J. Interferon Cytokine Res.* *27*, 847–855.

Stockhofe, N., Hulst, M., Hakze, R., Vellema, P., and Van Der Poel, W.H.M. (2013). Transplacental Infection of Schmallenberg Virus in the First Trimester of Gestation Is Highly Efficient in Sheep. (Epizone 7th Annual Meeting, Bruxelles, Belgium).

Stokes, J.E., Tarlinton, R.E., Lovatt, F., Baylis, M., Carson, A., and Duncan, J.S. (2018). Survey to determine the farm-level impact of Schmallenberg virus during the 2016-2017 United Kingdom lambing season. *Vet. Rec.* *183*, 690.

Stonestreet, B.S., Sadowska, G.B., Leeman, J., Hanumara, R.C., Petersson, K.H., and Patlak, C.S. (2006). Effects of acute hyperosmolality on blood-brain barrier function in ovine fetuses and lambs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *291*, R1031–R1039.

- Summers, B.A. (1995). Degenerative diseases of the central nervous system. In Veterinary Neuropathology, (St. Louis (MO): Mosby), pp. 273–277.
- Tarlinton, R., Daly, J., Dunham, S., and Kydd, J. (2012). The challenge of Schmallenberg virus emergence in Europe. *Vet. J.* *194*, 10–18.
- Thomas, A.V., Palm, M., Broers, A.D., Zezafoun, H., and Desmecht, D.J.-M. (2006). Genomic structure, promoter analysis, and expression of the porcine (*Sus scrofa*) Mx1 gene. *Immunogenetics* *58*, 383–389.
- Thrusfield, M.V. (2018). Veterinary epidemiology. (Hoboken, NJ: Wiley).
- Tilston-Lunel, N.L., Shi, X., Elliott, R.M., and Acrani, G.O. (2017). The Potential for Reassortment between Oropouche and Schmallenberg Orthobunyaviruses. *Viruses* *9*.
- Tizard, I.R. (2012). Veterinary Immunology (Elsevier Health Sciences).
- Toussaint, J.F., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., and De Clercq, K. (2007). Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods* *140*, 115–123.
- Valas, S., Baudry, C., Ehrhardt, N., LeVen, A., Thirion, M., Aubert, C., and Vialard, J. (2015). Serosurvey of Schmallenberg Virus Infection in the Highest Goat-Specialized Region of France. *Transbound Emerg Dis* *62*, e85-88.
- Van Der Poel, W.H.M., Parlevliet, J.M., Verstraten, E.R. a. M., Kooi, E.A., Hakze-Van Der Honing, R., and Stockhofe, N. (2014). Schmallenberg virus detection in bovine semen after experimental infection of bulls. *Epidemiol. Infect.* *142*, 1495–1500.
- Varela, M., Schnettler, E., Caporale, M., Murgia, C., Barry, G., McFarlane, M., McGregor, E., Piras, I.M., Shaw, A., Lamm, C., *et al.* (2013). Schmallenberg virus pathogenesis, tropism and interaction with the innate immune system of the host. *PLoS Pathog.* *9*, e1003133.
- Varela, M., Pinto, R.M., Caporale, M., Piras, I.M., Taggart, A., Seehusen, F., Hahn, K., Janowicz, A., de Souza, W.M., Baumgärtner, W., *et al.* (2016). Mutations in the Schmallenberg Virus Gc Glycoprotein Facilitate Cellular Protein Synthesis Shutoff and Restore Pathogenicity of NSs Deletion Mutants in Mice. *J. Virol.* *90*, 5440–5450.
- Varela, M., Piras, I.M., Mullan, C., Shi, X., Tilston-Lunel, N.L., Pinto, R.M., Taggart, A., Welch, S.R., Neil, S.J.D., Kreher, F., *et al.* (2017). Sensitivity to BST-2 restriction correlates with Orthobunyavirus host range. *Virology* *509*, 121–130.
- Veldhuis, A.M.B., van Schaik, G., Vellema, P., Elbers, A.R.W., Bouwstra, R., van der Heijden, H.M.J.F., and Mars, M.H. (2013). Schmallenberg virus epidemic in the Netherlands: spatiotemporal introduction in 2011 and seroprevalence in ruminants. *Prev. Vet. Med.* *112*, 35–47.

- Veldhuis, A.M.B., Santman-Berends, I.M.G.A., Gethmann, J.M., Mars, M.H., van Wuyckhuise, L., Vellema, P., Holsteg, M., Höreth-Böntgen, D., Conraths, F.J., and van Schaik, G. (2014). Schmallenberg virus epidemic: Impact on milk production, reproductive performance and mortality in dairy cattle in the Netherlands and Kleve district, Germany. *Preventive Veterinary Medicine* *116*, 412–422.
- Veldhuis, A.M.B., Mars, M.H., Roos, C. a. J., van Wuyckhuise, L., and van Schaik, G. (2017). Two Years After the Schmallenberg Virus Epidemic in the Netherlands: Does the Virus still Circulate? *Transbound Emerg Dis* *64*, 116–120.
- Verhelst, J., Hulpiau, P., and Saelens, X. (2013). Mx Proteins: Antiviral Gatekeepers That Restrain the Uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *77*, 551–566.
- Wang, H.-M., Xia, X.-Z., Hu, G.-X., Yu, L., and He, H.-B. (2016). Bovine Mx1 enables resistance against foot-and-mouth disease virus in naturally susceptible cells by inhibiting the replication of viral RNA. *Acta Virol.* *60*, 85–93.
- Wensman, J.J., Blomqvist, G., Hjort, M., and Holst, B.S. (2013). Presence of antibodies to Schmallenberg virus in a dog in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* *51*, 2802–2803.
- Wernike, K., and Beer, M. (2017). Schmallenberg Virus: A Novel Virus of Veterinary Importance. *Adv. Virus Res.* *99*, 39–60.
- Wernike, K., and Beer, M. (2019). Misinterpretation of Schmallenberg virus sequence variations: the sample material makes the difference. *Virus Genes*.
- Wernike, K., Eschbaumer, M., Schirrmeyer, H., Blohm, U., Breithaupt, A., Hoffmann, B., and Beer, M. (2013a). Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg virus in cattle. *Vet. Microbiol.* *165*, 155–159.
- Wernike, K., Hoffmann, B., Bréard, E., Bøtner, A., Ponsart, C., Zientara, S., Lohse, L., Pozzi, N., Viarouge, C., Sarradin, P., et al. (2013b). Schmallenberg virus experimental infection of sheep. *Vet. Microbiol.* *166*, 461–466.
- Wernike, K., Kohn, M., Conraths, F.J., Werner, D., Kameke, D., Hechinger, S., Kampen, H., and Beer, M. (2013c). Transmission of Schmallenberg virus during Winter, Germany. *Emerging Infect. Dis.* *19*, 1701–1703.
- Wernike, K., Silaghi, C., Nieder, M., Pfeffer, M., and Beer, M. (2014). Dynamics of Schmallenberg virus infection within a cattle herd in Germany, 2011. *Epidemiol. Infect.* *142*, 1501–1504.
- Wernike, K., Hoffmann, B., Conraths, F.J., and Beer, M. (2015a). Schmallenberg Virus Recurrence, Germany, 2014. *Emerging Infect. Dis.* *21*, 1202–1204.

Wernike, K., Brocchi, E., Cordioli, P., Sénéchal, Y., Schelp, C., Wegelt, A., Aebrischer, A., Roman-Sosa, G., Reimann, I., and Beer, M. (2015b). A novel panel of monoclonal antibodies against Schmallenberg virus nucleoprotein and glycoprotein Gc allows specific orthobunyavirus detection and reveals antigenic differences. *Vet. Res.* *46*, 27.

Wernike, K., Brocchi, E., and Beer, M. (2016). Effective interference between Simbu serogroup orthobunyaviruses in mammalian cells. *Vet. Microbiol.* *196*, 23–26.

Wernike, K., Aebrischer, A., Roman-Sosa, G., and Beer, M. (2017). The N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc is highly immunogenic and can provide protection from infection. *Sci Rep* *7*, 42500.

Wernike, K., Holsteg, M., Szillat, K.P., and Beer, M. (2018a). Development of within-herd immunity and long-term persistence of antibodies against Schmallenberg virus in naturally infected cattle. *BMC Vet. Res.* *14*, 368.

Wernike, K., Mundt, A., Link, E.K., Aebrischer, A., Schlotthauer, F., Sutter, G., Fux, R., and Beer, M. (2018b). N-terminal domain of Schmallenberg virus envelope protein Gc delivered by recombinant equine herpesvirus type 1 and modified vaccinia virus Ankara: Immunogenicity and protective efficacy in cattle. *Vaccine* *36*, 5116–5123.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION SYSTEM (2012a). Schmallenberg virus, Italy: Immediate notification report.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION SYSTEM (2012b). Schmallenbergvirus, Luxemburg – Immediate notification report.

WORLD ANIMAL HEALTH INFORMATION SYSTEM (2012c). Schmallenbergvirus, Spain – Immediate notification report.

Yamada, K., Nakatsu, Y., Onogi, A., Ueda, J., and Watanabe, T. (2009). Specific intracellular localization and antiviral property of genetic and splicing variants in bovine Mx1. *Viral Immunol.* *22*, 389–395.

Yanase, T., Kato, T., Aizawa, M., Shuto, Y., Shirafuji, H., Yamakawa, M., and Tsuda, T. (2012). Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Archives of Virology* *157*, 1611–1616.

Zanella, G., Raballand, C., Durand, B., Sailleau, C., Pelzer, S., Benoit, F., Doceul, V., Zientara, S., and Bréard, E. (2013). Likely Introduction Date of Schmallenberg Virus into France According to Monthly Serological Surveys in Cattle. *Transbound Emerg Dis* *62*, e76-79.

Zav'yalov, V.P., Hämäläinen-Laanaya, H., Korpela, T.K., and Wahlroos, T. (2018). Interferon-

Inducible Myxovirus Resistance Proteins: Potential Biomarkers for Differentiating Viral from Bacterial Infections. *Clin. Chem.*

Zeller, H., and Bouloy, M. (2000). Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* *19*, 79–91.

Zimmer, J.-Y., Haubrûge, É., and Francis, F. (2014a). Synthèse bibliographique : l’écologie larvaire des culicoïdes (Diptera : Ceratopogonidae). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* *12*.

Zimmer, J.-Y., Brostaux, Y., Haubrûge, E., and Francis, F. (2014b). Larval development sites of the main Culicoides species (Diptera: Ceratopogonidae) in northern Europe and distribution of coprophilic species larvae in Belgian pastures. *Vet. Parasitol.* *205*, 676–686.

Zimmer, J.-Y., Verheggen, F.J., Haubrûge, E., and Francis, F. (2015). Orientation behaviour of Culicoides obsoletus (Diptera: Ceratopogonidae), a relevant virus vector in northern Europe, toward host-associated odorant cues. *Vet. Parasitol.* *211*, 274–282.

Zürcher, T., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (1992). Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *EMBO J* *11*, 1657–1661.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2019/0480/11

ISBN 978-2-87543-143-1

