

La fièvre catarrhale ovine (*bluetongue*) : quand une maladie du sud s'invite au nord

E. Albina¹
S. Zientara²
C. Sailleau²
A. Perrin¹
C. Cêtre-Sossah¹
E. Bréard²
C. Grillet¹

¹ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Cirad), Département Elevage et médecine vétérinaire tropicale (EMVT), Unité de recherche 1,5 Contrôle des Maladies, TA30/G, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5 <emmanuel.albina@cirad.fr>

² Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), Unité mixte de recherche en virologie 1161 Afssa-Enva-Inra, 23, avenue du Général-de-Gaulle, 94704 Maisons-Alfort

Résumé. La fièvre catarrhale ovine, ou *bluetongue*, est une maladie virale non contagieuse du mouton, transmise par piqûres de *Culicoides*, diptères hématophages. Elle est due à un orbivirus appartenant à la famille des *Reoviridae* dont le génome viral est constitué de 10 segments d'ARN bicaténaires, protégé par une capsid virale protéique à symétrie icosaédrique non enveloppée. Il existe à l'heure actuelle 24 sérotypes distincts de ce virus, chacun induisant une faible immunité protectrice contre les autres sérotypes. Si, classiquement, seul le mouton exprime la maladie après infection (hyperthermie, congestion des muqueuses et cyanose de la langue), les bovins, caprins et autres ruminants sauvages peuvent être infectés, mais ils expriment rarement la maladie. Autrefois cantonnée entre les 30-40° parallèles sud et les 40-50° parallèles nord, l'infection s'est récemment étendue vers le sud puis le nord de l'Europe. La raison de cette extension est double, la remontée du vecteur tropical *Culicoides imicola* vers le nord et l'adaptation du virus à de nouveaux vecteurs non encore identifiés mais pérennes en Europe septentrionale. La lutte contre la maladie repose sur l'utilisation de vaccins à virus atténué ou inactivé (un vaccin contre chaque sérotype) et la détection et l'élimination rapide des foyers introduits dans une zone indemne.

Mots clés : fièvre catarrhale ovine, bluetongue, orbivirus, reoviridae, *Culicoides*

Abstract. Bluetongue is a non contagious viral disease of sheep transmitted by bites of haematophagous midges. The disease is caused by an orbivirus belonging to the *Reoviridae* family. The genome is segmented in 10 double-strand RNA encapsidated in a non-enveloped spherical particle with a icosahedral symmetry. Twenty distinct serotypes have been identified so far, each of them inducing limited cross-protection against the others. Sheep are usually the only ones showing clinical signs like pyrexia, congestion of mucosa and cyanosis of the tongue. However, cattle, goat and wild ruminants can be asymptotically infected. Formerly restricted to the area between the 30/40th south and 40/50th north parallels, the infection has progressively extended to the south of Europe and was more recently introduced in the north. The reason for this extension might be twice : the northward spreading of the tropical vector *Culicoides imicola* and the adaptation of the virus to a yet unknown endemic biting midge. Control of the disease is based on the use of live-attenuated or inactivated vaccines specific of the serotype. In free area, emergency measures can also consist in the rapid detection and elimination of the outbreaks.

Key words: bluetongue, orbivirus, reoviridae, *Culicoides*

Tirés à part : E. Albina

La fièvre catarrhale ovine (FCO, *bluetongue* ou BT) est une arbovirose non contagieuse qui, sous nos latitudes, provoque des signes cliniques chez les moutons, rarement chez les chèvres et les bovins. Elle se traduit dans la première espèce par une maladie généralisée associant hyperthermie, abattement, anorexie et développement de lésions œdémateuses congestives, hyperhémiques, voire hémorragiques, en particulier au niveau de la face et des muqueuses de l'oropharynx. Elle provoque la mort dans 2 à 20 % des cas. Autrefois limitée entre les latitudes 35° S et 40° N, elle s'est récemment répandue dans les pays d'Europe du sud, jusqu'alors indemnes, et a depuis tendance à persister dans la plupart de ces régions.

Les raisons de ces changements dans l'épidémiologie de la FCO sont complexes mais sont liées à de récentes extensions de la distribution de son vecteur majeur, un diptère hématophage du genre *Culicoides* de l'espèce *imicola*, et à la présence d'un réservoir permettant au virus de persister pendant l'hiver en l'absence de vecteurs adultes. Le lien entre le réchauffement climatique et l'augmentation de l'aire de distribution du vecteur *C. imicola* est fortement suspecté. Ainsi, la modélisation géographique des biotopes favorables à l'installation de ce vecteur identifie toute l'Europe du sud, en particulier une bonne partie du sud de la France, comme zone à risque [1]. Cependant, l'émergence en août 2006 de nombreux foyers de FCO aux Pays-Bas (459 foyers au 19 janvier 2007), en Allemagne (914 foyers), en Belgique (695 foyers), au Luxembourg (8 foyers) et dans le nord de la France (7 foyers) a bouleversé le schéma épidémiologique classique de la maladie.

L'origine du virus de sérotype 8 jusqu'alors non répertorié en Europe, reste indéterminée. L'infection se traduit par des signes cliniques marqués chez les bovins, rappelant certaines des manifestations cliniques provoquées par la fièvre aphteuse. En outre, le vecteur *Culicoides imicola* n'a pas été détecté dans la zone infectée, signifiant qu'un autre vecteur a pris le relais avec tout autant d'efficacité.

L'incidence clinique de l'infection chez les ovins, voire chez les bovins, et la mise en place, en cas d'épizootie, de mesures de prophylaxie sanitaire et médicale entraînant de fortes pertes économiques pour une filière justifient l'inscription de cette maladie dans la liste des maladies à incidence majeure de l'Organisation mondiale de la santé animale (ex. Office international des épizooties, OIE).

Un arbovirus à multiples facettes

Classification et caractéristiques générales

Le virus responsable de la fièvre catarrhale ovine (BTV) est un virus non enveloppé à ARN double brin segmenté appartenant à la famille des *Reoviridae*, genre *Orbivirus*. C'est un virus quasi exclusivement transmis par des arthropodes vecteurs (Arbovirus pour *Arthropod borne virus*).

En 1959, Sabin [2] proposa de regrouper, au sein d'un groupe spécifique, des virus jusqu'alors classés dans le groupe des échovirus et isolés du tractus gastro-intestinal et de l'arbre respiratoire mais qui n'étaient pas directement associés à des entités cliniques définies. Il proposa le nom de réovirus pour virus respiratoires, entéritiques, orphelins. Cette famille s'est progressivement enrichie de virus apparentés et est aujourd'hui composée de douze genres : *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Seadornavirus* et *Idnoreovirus* [3].

Les virus de la famille des *Reoviridae* sont dépourvus d'enveloppe virale et possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique dont la taille varie entre 60 à 80 nm (*figure 1A*). Cette dernière est constituée d'une capsidie externe et d'une capsidie interne (ou *core*). La masse molaire de la particule virale est d'environ $120 \cdot 10^6$ Da [4]. Le génome est constitué de 10 à 12 segments d'ARN bicaténaire (la masse molaire du génome varie de 12 à $20 \cdot 10^6$ Da). La densité des réovirus en gradient de chlorure de césium est de 1,33 à 1,39. Ces virus sont stables à -70 °C et +4 °C ; en revanche, ils perdent leur pouvoir infectieux à -20 °C.

Les réovirus sont caractérisés par un large spectre d'hôte et infectent vertébrés, oiseaux, mammifères, poissons ainsi qu'invertébrés et plantes. Les *Orbivirus* sont isolés de nombreuses espèces animales, y compris l'homme, et sont

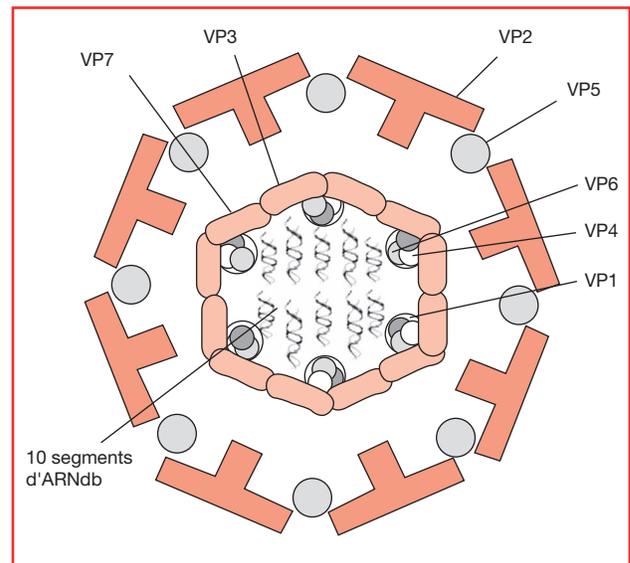


Figure 1. Représentation schématique de la structure des virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) et de la peste équine. Le cœur viral est constitué des protéines VP1, 3, 4 et 6 et des segments ARN. Autour de ce cœur, s'organise la couche externe de la capsidie interne constituée de la VP7. Autour de la capsidie interne, s'assemble la capsidie externe comprenant les protéines VP2 et VP5.

répandus dans le monde entier. Ils sont responsables de maladies majeures en médecine vétérinaire alors que, en médecine humaine, leur gravité est moindre. Ils sont transmis par l'intermédiaire de nombreux vecteurs biologiques : tiques, phlébotomes, moustiques, moucheron (*Culicoides...*). Parmi les *Orbivirus*, les virus de la bluetongue (BTV), de la maladie hémorragique épizootique du cerf (*epizootic hemorrhagic disease of deer virus*, EHDV) et de la peste équine (*African horsesickness virus*, AHSV) constituent des risques sanitaires majeurs. Les *Orbivirus* possèdent des caractères morphologiques, structuraux et biologiques communs. Ils sont divisés en sérogroupes, les virus d'un même séro groupe possédant un antigène commun localisé au niveau de la capsid interne qui leur confère une réactivité croisée en fixation du complément. Actuellement, 14 sérogroupes distincts sont identifiés ainsi qu'un ensemble de virus non groupés (*tableau 1*). Chaque séro groupe est divisé en sérotypes [5]. Des antigènes spécifiques de type sont associés à la capsid externe et induisent la production d'anticorps neutralisants.

Structure

Les virus BTV et AHSV possèdent sept protéines structurales différentes (VP1 à VP7) réparties en deux capsides (*figure 1B*). La capsid externe est composée de VP2 et VP5. La protéine VP2, constituant majeur de la capsid externe, exposée à la surface de la particule virale, est l'antigène spécifique de type [6]. Cet antigène a permis d'identifier 24 sérotypes différents du virus de la FCO. Les anticorps neutralisant le virus de la FCO sont induits par

des épitopes localisés sur la protéine VP2. Le site de fixation des orbivirus à leur récepteur cellulaire serait situé sur VP2 [7]. La capsid interne, ou *core*, est composée des deux protéines majeures VP3 et VP7 et de trois protéines mineures VP1, VP4 et VP6, ces dernières constituant les complexes de transcription. Les complexes de transcription sont disposés sur la face interne de la capsid formée par la protéine VP3, au niveau des pores situés aux 12 sommets de la particule à symétrie icosaédrique. Ils forment une structure en forme de fleur dans le cœur de la particule virale, autour desquels s'enroulent les segments d'ARN [8]. Ces derniers apparaissent en quatre couches concentriques dans le cœur de la particule virale lorsque l'observation est faite selon l'axe de symétrie passant par deux sommets de la particule [9]. La protéine VP3 est une protéine de la capsid interne qui possède des déterminants antigéniques spécifiques de groupe [10, 11]. La protéine VP7 est le composant majeur de la capsid interne du virus et possède également des déterminants antigéniques de groupe. Le génome, localisé dans la capsid interne est constitué de dix segments d'ARN double brin (db) de tailles différentes [12]. La taille totale du génome segmenté est d'environ 19 200 bases. Le *tableau 2* présente les caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO ainsi que de leurs produits d'expression. La composition moyenne de la totalité du génome séquencé est la suivante : 57 % (A + U) et 43 % (G + C). Les extrémités 5' et 3' de tous les segments génomiques sont conservées. À l'extrémité 5', on retrouve la séquence GUUAAA et, à l'extrémité 3', la séquence ACUUAAC. La taille moyenne des séquences non codantes

Tableau 1. Les sérogroupes du genre *Orbivirus*

Sérogroupes	Nombre de sérotypes	Hôtes vertébrés	Invertébrés vecteurs
Bluetongue virus (BTV)	24	Ruminants domestiques et sauvages	Culicoïdes
Epizootic hemorrhagic disease of deer (EHDV)	8	Chameaux, bovins lamas, cerfs	Culicoïdes
Eubenangee	4	Inconnu	Culicoïdes, moustiques
African horsesickness (AHSV)	9	Equidés, zèbres, chiens, éléphants, chameaux, moutons, chèvres	Culicoïdes, moustiques
Encéphalose équine (EEV)	7	Chevaux	Culicoïdes,
Warrego	2	Marsupiaux	Culicoïdes,
Wallal	2	Marsupiaux	Culicoïdes,
Palyam	11	Bovins, moutons	Culicoïdes, moustiques
Changuinola	12	Humains, rongeurs	Culicoïdes, phlébotomes
Corriparta	4	Humains, rongeurs	Moustiques
Kemerovo	40	Humains, rongeurs, oiseaux, bovins, moutons	Tiques
Umatilla	3	Oiseaux	Moustiques
Orungo	4	Humains, chameaux, bovins, chèvres, singes, moutons	Moustiques
Lebombo	1	Humains, rongeurs	Moustiques

Tableau 2. Caractéristiques des segments génomiques et des protéines du virus de la BT sérotype 10 [12, 22]

Segments	Taille (en pb)	Région non codante en 5'	Région non codante en 3'	Protéines	Masse molaire (kDa)	Localisation	Nombre de molécules par virion	Fonctions ou propriétés
1	3954	11	37	VP1	149	Protéine mineure de la capsid interne	10	- antigène de groupe - ARN polymérase
2	2926	19	39	VP2	111	Capsid externe	180 (60 trimères)	- spécificité de type - antigène protecteur - ligand récepteur cellulaire - hémagglutinine
3	2770	17	50	VP3	103	Protéine majeure de la capsid interne	120 (60 dimères)	- antigène de groupe
4	1981	7	41	VP4	76	Protéine mineure de la capsid interne	20 (dimères ?)	- antigène de groupe - guanylyltransférase
5	1769	34	79	NS1	64	Protéine non structurale	0	antigène de groupe
6	1638	29	31	VP5	59	Capsid externe	360 (120 trimères)	spécificité de type
7	1156	17	92	VP7	38	Protéine majeure de la capsid interne	780 (260 trimères)	antigène de groupe
8	1124	19	34	NS2	41	Protéine non structurale	0	- associée aux corps d'inclusion - fixe les ARN messagers
9	1046	15	44	VP6/VP6A	36	Protéine mineure de la capsid interne	72	- antigène de groupe - fixe les ARN sb et db (hélicase)
10	822	19/58	116	NS3/NS3A	25 572/ 24 020	Protéine non structurale	0	- glycoprotéine, - libération des virions

des extrémités 5' varie de 7 (segment 4) à 34 pb (segment 6) alors que les séquences non codantes des extrémités 3' sont plus longues, de 79 (segment 6) à 116 pb (segment 10, *tableau 2*).

Variabilité du génome

La comparaison des séquences nucléotidiques du segment 2 des BTV, AHSV et EHDV indique que le degré de similitude n'est que de 39 %. La séquence de ce gène est variable au sein même d'un sérotype puisque la comparaison des séquences des gènes 2 de la souche sauvage corse et du vaccin de même sérotype utilisé en Corse montre une identité de nucléotides de 96,5 % (identité acides aminés 98,4 %) sur l'ensemble de la séquence [13]. La comparaison des séquences en acides aminés des protéines VP2 de AHSV4 et BTV10 [11] permet d'émettre l'hypothèse que ces protéines auraient eu un ancêtre commun puis qu'elles auraient évolué, notamment sous l'influence de la pression de sélection du système immunitaire des hôtes respectifs de ces virus [12]. Seules leurs extrémités carboxyterminales sont conservées. Ces régions, non exposées à la surface du virion, pourraient être impliquées dans des interactions avec les protéines de capsid (notamment VP5 et VP7) [12]. Les segments 3 des BTV, AHSV et EHDV sont plus conser-

vés entre eux que ne le sont leurs segments 2 : 59 % des nucléotides des gènes 3 sont communs. Les gènes des segments 4, 6, 7, 8 et 9 sont également plus conservés avec respectivement 55,4, 49, 55,2, 53, 50,6 et 49,8 % d'identité entre le BTV et l'AHSV [14-17].

Cycle de réplication

La réplication du virus s'effectue dans le cytoplasme de la cellule. La transcription s'effectue à partir des brins négatifs d'ARN bicaténaires et nécessite une ARN polymérase ARN-dépendante d'origine virale. Les ARN messagers, coiffés et méthylés par des protéines virales non structurales, quittent la particule virale par des pores situés aux sommets de la capsid icosaédrique [4]. Des corps d'inclusion virale, ou viroplasmes, dont le composant majeur est la protéine NS2, sont détectés dans le cytoplasme de la cellule infectée [18]. Ces structures semblent être le lieu de la morphogénèse des particules virales. Le cycle de réplication des orbivirus est rapide puisque, 8 à 10 heures après inoculation d'une culture de cellules MS ou Vero à haute multiplicité d'infection à 37 °C, le virus est décelé dans le surnageant de culture [19].

À cette phase d'éclipse succède une phase de croissance exponentielle jusqu'à la 24^e heure. L'attachement du virion

à la membrane cellulaire s'effectue par l'intermédiaire de la protéine VP2 et l'interaction de cette protéine avec son ligand cellulaire déclenche l'internalisation du virus [20]. Le virus se fixe à son récepteur localisé dans la membrane cellulaire dans un site caractérisé par la présence de molécules de clathrine. La membrane cellulaire s'invagine alors, produisant une vésicule (appelée *coated-pit*) dont la surface externe est recouverte de clathrine. Le récepteur cellulaire n'est pas identifié de façon définitive mais une sialoglycoprotéine membranaire seule ou en association avec un corécepteur interviendrait [20]. En outre, l'étude des interactions entre le BTV et les érythrocytes indique que le virus se fixerait par l'intermédiaire de la protéine VP2 à la sialoglycophorine A présente à la surface des hématies d'origine humaine et animale, offrant ainsi au virus la possibilité de circuler associé aux globules rouges et facilitant probablement sa transmission au vecteur hématophage [21]. La VP5 virale intervient lorsque le pH diminue dans les vésicules endosomales : cette protéine permet alors la perméabilisation des membranes compatibles avec ses propriétés de fusion membranaire *in vitro* [22]. Les vacuoles d'endocytose fusionnent avec des lysosomes. Huismans *et al.* [23] ont montré qu'une heure après pénétration du virus de la BT dans la cellule, la capsid externe contenant les protéines VP2 et VP5 a été hydrolysée. Cette décapsidation est nécessaire à l'activation de la transcriptase virale [23]. Un mode de pénétration directe du virus de la BT dans la cellule cible a été décrit pour les particules infectieuses subvirales (qui résultent de la digestion du virion, *in vitro*, par la chymotrypsine et qui contiennent les produits de clivage de la protéine VP2) et les cores viraux (particules virales ne contenant pas les protéines externes VP2 et VP5) [24]. Les particules infectieuses subvirales et les cores sont 100 à 500 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes (*Aedes albopictus*) que pour les cellules de mammifères et sont 100 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes que les particules virales intactes [25]. La protéine d'attachement du virus aux cellules de *Culicoides* est la VP7 [26, 27].

L'induction de la transcription est effectuée dans les virions décapsidés. La protéine VP1 du virus de la fièvre catarrhale ovine, l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus, a une température optimale d'activité de 28 °C alors que celle des autres réovirus est de 47 à 52 °C [28]. Cette propriété est à relier avec le fait que le BTV, comme l'AHSV, est transmis par des insectes hétérothermes dans lesquels il se réplique. Les brins négatifs des ARN db sont transcrits en ARN messagers précoces.

La transcription précoce est définie comme l'étape de transcription se déroulant dans le *core* viral et produisant des ARNm coiffés qui permettront la synthèse de protéines et serviront de matrice à la synthèse des ARN négatifs. Les ARNm précoces sont coiffés et polyadénylés. La protéine

VP4 serait, toujours chez le virus de la fièvre catarrhale, la guanilyl-transférase [29]. Les ARNm synthétisés à l'intérieur du *core* quitteraient celui-ci selon un mécanisme encore mal connu qui impliquerait un changement de conformation du *core* viral. Les ARN génomiques négatifs sont synthétisés à partir des ARN positifs préalablement transcrits. Cette synthèse s'effectue simultanément avec la formation des particules provirales. La protéine NS2, une phosphoprotéine, se fixe sur les ARN simples brins et interviendrait dans la réplication. Les brins complémentaires ainsi synthétisés restent associés sous forme d'ARN double brin. Les mécanismes par lesquels les dix ARN db génomiques s'associent ensemble à l'intérieur de chaque particule virale en formation restent inconnus. Les protéines VP6/VP6a du BTV, produits de traduction du segment 9 et qui possèdent des séquences en acides aminés communes à celles des hélicases, pourraient jouer un rôle dans l'encapsulation des ARN db [10]. Dans la particule virale, les segments d'ARN sont intimement associés aux complexes de transcription (VP1 + VP4 + VP6) situés aux 12 sommets de la particule à symétrie icosaédrique. Un seul segment d'ARN est localisé à chaque sommet, ce qui explique qu'un maximum de 12 segments d'ARN peut être intégré dans une particule virale de ce type (applicable à tous les réovirus). La réplication de l'ARN s'effectue au niveau de ces complexes, les ARN néosynthétisés étant libérés en dehors de la particule virale par les pores situés aux sommets de la particule icosaédrique. Deux heures après l'infection de la cellule, des protéines d'origine virale peuvent être détectées dans le cytoplasme. Cette production de protéines virales s'effectue aux dépens de la synthèse des protéines cellulaires. L'inactivation, inexpliquée, de la protéine VP4 responsable du phénomène de coiffe des ARNm explique l'arrêt de la traduction des ARNm coiffés (traduction « coiffe-dépendante ») aux profits de la traduction des ARNm tardifs non coiffés (traduction « coiffe-indépendante »). Ces derniers codent pour des protéines structurales.

L'étude des produits d'expression en système eucaryote des protéines structurales VP2, VP3 et VP5 du virus de la fièvre catarrhale ovine [10, 30] permet de proposer le schéma d'assemblage suivant. Les protéines VP3 synthétisées forment dans le cytoplasme une particule instable à géométrie icosaédrique. Les trois protéines VP1, VP4 et VP6 interagissent avec cette structure dans laquelle les ARN double brin sont encapsidés. La protéine VP7, sous forme de trimère, se fixe à la surface de cette capsid interne et en rigidifie la structure, puis les protéines VP2 et VP5 constituent, dans une dernière étape, la capsid externe. Les particules virales sont associées aux filaments du cytosquelette *via* les protéines VP2 et/ou VP5 et transportées vers le système membranaire de la cellule (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi). Les protéines NS3 et NS3A sont

ancrées dans les membranes des vésicules intracellulaires et dans la membrane plasmique. Ces deux protéines permettraient la fixation et le transport des particules virales dans les compartiments membranaires de la cellule et favoriseraient la libération des virions par bourgeonnement [31]. Des échanges de segments génomiques peuvent se produire lors d'infections simultanées d'une cellule par deux *Orbivirus* d'un même groupe mais de sérotype différent [32]. La fréquence de réassortiment des gènes est variable : certains gènes, soumis à une forte pression de sélection, sont plus fréquemment échangés que d'autres [5]. Ce phénomène de réassortiment participe à l'évolution génétique des *Orbivirus*. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur l'importance et la fréquence de ces réassortiments dans la nature.

Interactions hôtes-virus et pathologies associées

Infection chez les ruminants

Après infection par piqûre d'insecte, le virus se réplique d'abord dans le nœud lymphatique adjacent puis diffuse par la voie lymphatique et hématique à l'ensemble des organes et tissus. Il infecte les cellules endothéliales vasculaires, les macrophages et les cellules dendritiques. L'infection des cellules endothéliales a pour conséquence des thromboses vasculaires et des nécroses ischémiques des tissus irrigués, à l'origine de lésions d'ulcération buccale, de nécrose musculaire et d'extravasation sanguine (pétéchies). L'infection naturelle produit une virémie prolongée, jusqu'à 11 jours chez le mouton et jusqu'à 49 jours chez le bovin et la transmission du virus au vecteur a été montrée jusqu'à 21 jours post-infection chez le mouton et le bovin [33]. Toutefois, l'ARN viral peut être détecté jusqu'à 111-222 jours post-infection. Le virus circule associé aux cellules blanches et rouges du sang dans les premières phases de l'infection, puis il est presque exclusivement associé aux globules rouges dans les phases tardives. Cette association favorise probablement la persistance du virus et sa transmission aux diptères hématophages. Un récent travail incrimine les lymphocytes $T\gamma\lambda$, particulièrement abondants chez les ruminants, dans la persistance du virus au niveau de la peau, jusqu'à 9 semaines chez le mouton après infection intradermique, soit 5 à 6 semaines après que le virus n'est plus détecté dans le sang périphérique [34]. La réponse inflammatoire intense résultant des piqûres de culicoïdes recruterait et activerait ces lymphocytes $T\gamma\lambda$ au niveau de la peau, permettant alors un cycle de réplication viral important et favorisant la transmission du virus aux vecteurs lors des prochains repas de sang. Ce mécanisme pourrait contribuer à la persistance du virus chez l'animal au cours de l'hiver dans les régions les plus septentrionales,

lorsque les culicoïdes ne sont plus actifs sur plusieurs semaines consécutives.

C'est dans l'espèce ovine que la maladie peut revêtir toute sa gravité. Cependant, pour diverses raisons (telles que des variations du pouvoir pathogène selon les sérotypes ou les souches, les vecteurs impliqués ou la résistance particulière de certaines races ovines), l'infection n'entraîne pas toujours l'apparition de symptômes. Ainsi, tous les intermédiaires entre la forme aiguë et les formes inapparentes sont observés. Les formes cliniques graves ne sont décrites que chez des ovins vivant dans des régions contaminées pour la première fois (cas de la Corse en 2000) ou sur des races améliorées (comme les races corses ou sardes) [35]. Après une période d'incubation moyenne de 2 à 6 jours (avec un maximum de 18 jours), les animaux présentent une hyperthermie (pouvant atteindre 42 °C) associée à une anorexie et un abattement pendant 4 à 8 jours. Des phénomènes congestifs, œdémateux et hémorragiques apparaissent alors. Au niveau des muqueuses buccales, de vastes zones de congestion (*figure 2*) et d'hémorragies punctiformes accompagnées d'hypersalivation apparaissent, évoluant vers l'ulcération, la langue devient cyanotique (d'où le nom de *bluetongue*), signe cependant inconstant. L'anorexie est alors totale. Des œdèmes sont observables dans l'espace interdigité et sur le bourrelet coronaire des onglons (*figure 2*). Des pétéchies sont visibles à travers le revêtement cutané et, par endroits, le tégument se rompt, donnant naissance à de petits ulcères allongés, engendrant une boiterie importante sur les animaux les plus touchés. La congestion de la peau peut se généraliser, entraînant une chute de la laine en quelques semaines. Parallèlement à ces signes cliniques, il est décrit une atteinte musculaire avec myosite dégénérative ainsi que des complications d'ordre pulmonaire ou digestif. Des avortements sont aussi signalés [36].

Chez les bovins et caprins, l'infection est généralement inapparente et se limite à une simple hyperthermie transitoire. Toutefois, dans quelques cas, une forme aiguë peut se manifester. Les symptômes suivants peuvent être retrouvés : hyperthermie accompagnée de dyspnée et d'hypersalivation. De plus, en raison de son passage par voie transplacentaire, le virus provoque des avortements et des mortinatalités. En Corse, chez les bovins et les caprins, aucune manifestation clinique n'a été rapportée. En revanche, l'épisode récent apparu en Europe du nord montre une sensibilité accrue des bovins au sérotype 8 circulant dans cette zone.

Des études sérologiques ont montré que, dans la faune sauvage africaine, de nombreuses espèces (notamment les buffles, les chameaux, les grands koudous, les impalas et les springboks) possédaient des anticorps contre le virus sans aucun signe clinique apparent. En Amérique du Nord, des cerfs muets et wapitis ont été trouvés séropositifs. Le rôle

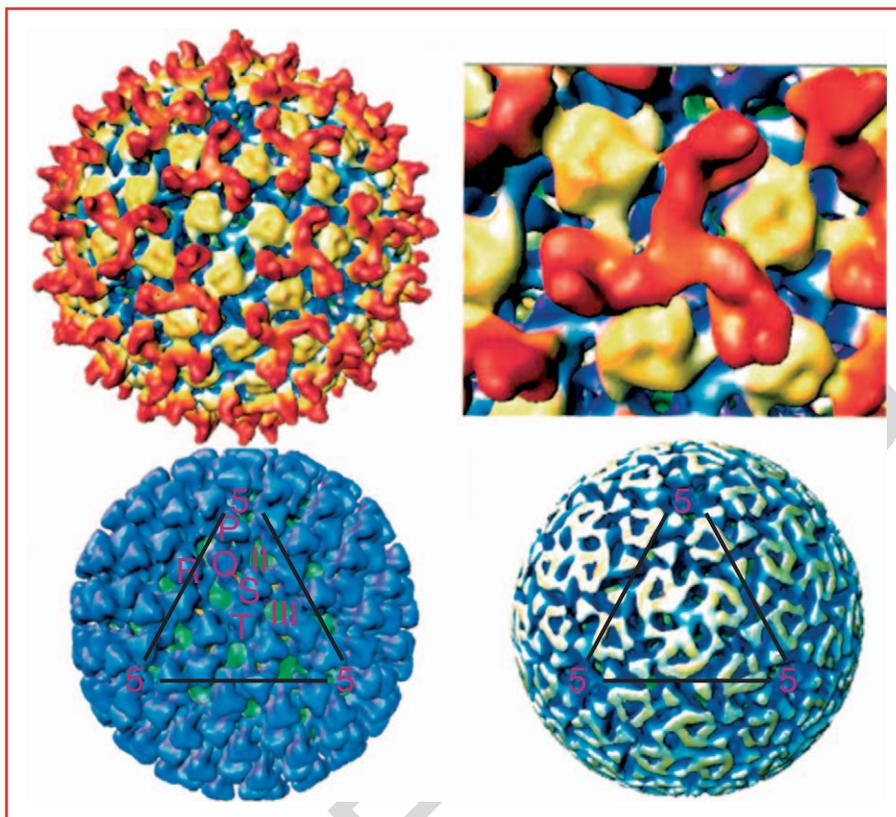


Figure 2. Représentation cristallographique de la capsid virale externe et interne du virus FCO, sérotype 10 [8]. L'image en haut à gauche représente la capsid externe avec les trimères de VP2 en rouge, et les trimères de VP5 en jaune. En haut, à droite, vue agrandie. En bas, à gauche, capsid interne de structure icosaédrique comprenant 12 pentons et 120 hexons. Deux cent soixante trimères de VP7, soit 780 molécules de VP7, entrent dans la constitution de ces 132 capsomères. Chacune des 60 unités de structure de la particule icosaédrique, représentée sur la figure par une surface triangulaire passant par trois axes de symétrie d'ordre 5, est constituée de 13 facettes (nombre de triangulation T égal à 13) correspondant à 13 molécules de VP7, arrangées en 5 trimères de VP7 repérés par les lettres P, Q, R, S et T. La coque VP7 interagit avec une structure icosaédrique interne formée par des monomères de VP3 (image de droite). Chaque unité de structure de la particule icosaédrique recouvre deux monomères de VP3 (T égal à 2). 120 molécules suffisent à la formation du polyèdre interne à 20 faces, grâce à une distorsion moléculaire des monomères VP3.

de ces espèces animales dans l'épidémiologie de la maladie n'est pas encore connu.

Infection du vecteur

Les *Culicoides* sont des diptères hématophages d'environ 2 mm de taille appartenant à la famille des *Ceratopogonidae* (figure 3). Seulement 17 espèces de *Culicoides* parmi les 1 254 répertoriées ont été incriminées dans la transmission du virus *bluetongue* [37]. Les espèces principales avérées ou fortement suspectées sont *C. imicola* (Afrique, Europe, Asie), *C. bolitinos* (Afrique), *C. brevitarsis* (Australie), *C. variipennis* (Amérique du Nord) et *C. insignis* et *C. pusillus* (Amérique centrale et du sud) [25, 37]. Cependant des foyers de FCO ont été déclarés dans des régions d'Europe où *C. imicola* n'a encore jamais été identifié. Ce fut le cas pour les épisodes bulgares de 1999 et 2001, impliquant le sérotype 9, pour lesquels le rôle des groupes

d'espèces *C. obsoletus* et *C. pulicaris* dans la transmission est fortement suspecté [38]. C'est le cas pour l'épisode actuel en Europe septentrionale. Le rôle d'espèces comme celles appartenant aux groupes *C. obsoletus* (*C. obsoletus* ss, *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. montanus* et *C. chiopterus*) et *C. pulicaris* très largement répandus au nord est à suspecter [39]. En outre, *C. obsoletus* et *C. pulicaris* peuvent être infectés de façon expérimentale par repas de sang contenant du virus *bluetongue* à des taux assez importants [40].

La température joue un rôle dans la capacité vectorielle (capacité du vecteur à transmettre l'infection) de ces espèces de *Culicoides*. Ainsi, il a été montré que, pour *C. imicola*, le délai nécessaire à la multiplication du virus à un titre minimal nécessaire pour une transmission à l'animal est de 4 jours à 30 °C et de 10 jours à 23,5 °C [41]. La réplication virale à 15 °C n'est pas suffisante pour une



Figure 3. Signes cliniques chez les ovins en haut (photos : C. Hamblin, Institute for animal Health, Pirbright, GB). A gauche : congestion des muqueuses. A droite : inflammations des bourrelets coronaires. En bas, signes cliniques observés sur les bovins lors du dernier épisode en Europe du nord (photos : Etienne Thiry, ULG, Belgique et Piet van Rijn, Pays-Bas).

éventuelle transmission et, à 10 °C, aucune répllication virale n'est détectée.

De même, des différences de compétence vectorielle (capacité du vecteur à s'infecter et à répliquer le virus) entre sérotypes ont été observées pour les vecteurs *C. imicola* ss ou *C. bolitinos* [42]. Le sérotype 8, en cause dans les récents foyers d'Europe du nord, n'est pas transmis pas *C. imicola*, non détecté dans les piégeages, mais probablement par des espèces européennes locales telles que *C. obsoletus* ou *C. scoticus* suspectées d'intervenir dans la transmission de la BT dans d'autres zones sud-européennes où *C. imicola* n'est pas présent (Balkans, Italie péninsulaire). *C. dewulfi* a été également incriminé dans la mesure où de l'ARN du BTv8 a été détecté chez des individus capturés à Limburg aux Pays-Bas dans la zone index de l'épizootie [Baldet, communication personnelle]. Finalement, la vision de la dynamique des vecteurs responsables de la trans-

mission du virus *bluetongue* est très restreinte. C'est en partie la conséquence d'un manque de ressources humaines en entomologie médicale et du trop récent développement des outils moléculaires sur les *Culicoides*. Toutefois, des tests PCR pour l'identification rapide des *Culicoides* adultes ou larvaires [43] associés à des tests PCR spécifique du virus *bluetongue*, ainsi que les études en phylogénétique [44, 45] permettent d'envisager une meilleure connaissance des vecteurs potentiels, de leurs biotopes et des méthodes possibles de contrôle.

Épidémiologie et diagnostic

Décrite pour la première fois en 1881 en Afrique du Sud, la fièvre catarrhale ovine s'est étendue, à partir de 1940, en Afrique centrale pour atteindre ensuite le bassin méditerranéen.

néen (Israël, Turquie, Syrie, Oman, Arabie Saoudite) et l'Asie (Inde, Chine, Pakistan, Japon, Indonésie, Inde, Malaisie). À l'heure actuelle, elle est également signalée en Amérique du Nord (États-Unis, Canada), Amérique Centrale, Amérique du Sud (Mexique, Chili, Brésil, Guyane), Australie et Nouvelle Zélande. Traditionnellement, elle est signalée sur tous les continents dans une zone comprise au nord entre le 40° et le 50° parallèle et au sud entre le 20° et le 30° parallèle, mais tous les sérotypes n'y sont pas représentés de façon identique. En Europe, la fièvre catarrhale ovine a déjà fait incursion à trois reprises (au Portugal et en Espagne de 1957 à 1960, à Chypre en 1977, en Grèce en 1980 sur l'île de Lesbos) mais l'efficacité des mesures défensives (abattage des animaux infectés et contaminés, désinsectisation...) ainsi que les conditions climatiques peu favorables à la survie du vecteur ont contribué à son éradication. Les territoires et départements d'outre-mer français sont infectés de façon endémique. Le dernier virus isolé sur l'île de la Réunion en 2002 était de sérotype 3 [46].

Plus récemment, en 1998, cette maladie a fait son apparition dans les îles grecques du sud-est de la mer Egée. En 1999, des cas ont été enregistrés en Grèce, Bulgarie, Tunisie et Turquie ; en 2000 en Tunisie, Algérie, Italie (Sardaigne, Sicile et Calabres), Espagne (îles Baléares), à nouveau en Grèce et finalement en France sur l'île de la Corse (49 foyers) [36, 47]. L'origine du virus dans le bassin méditerranéen est double, une introduction depuis l'Asie (Turquie ?) pour certains sérotypes retrouvés en Italie et une introduction depuis le Maghreb pour d'autres sérotypes retrouvés en Espagne, France et Italie [48]. La maladie s'est installée durablement au moins en Italie et en Corse. Elle a été dans un premier temps contrôlée en 2001, en Espagne (îles Baléares), puis réintroduite depuis le Maroc en 2004. En 2004, le Portugal a également été concerné en lien avec les foyers espagnols. Elle s'est également étendue au nord et a sévi en Bulgarie, au Kosovo et en Serbie [48]. En août 2006, plusieurs dizaines de foyers ont été diagnostiqués pour la première fois dans le nord de l'Europe, Allemagne, Belgique, Pays-Bas, Luxembourg et enfin France (Meuse et Ardennes). L'origine de l'infection reste indéterminée. Le vecteur principal du virus en Europe du sud (*C. imicola*) n'a pas été retrouvé en Europe du nord, suggérant qu'un nouveau vecteur a pris le relais. En effet, la transmission ne se fait presque exclusivement que par les vecteurs *Culicoides* : un animal infecté ne peut contaminer un autre animal par contact direct. Des cas de transmission par voie vénérienne ou par transfert d'embryons ont été décrits mais ils restent anecdotiques sur le plan épidémiologique.

Les sérotypes impliqués au cours des différents épisodes récents observés en Europe sont indiqués en *figure 4*.

Chez les ovins, la fièvre catarrhale ovine peut être diagnostiquée cliniquement lors de l'observation de syndromes



Figure 4. *Culicoides imicola* (photo Bruno Matthieu, EID).

fébriles associés à des lésions des muqueuses oronasales. Dans les autres espèces (bovine ou caprine), le diagnostic est difficile du seul point de vue clinique. Sur un plan épidémiologique, cette maladie ne survient sous nos latitudes que durant les périodes chaudes de l'année qui permettent au vecteur de se multiplier. À l'autopsie, les lésions sont caractérisées par la présence d'œdèmes dans la plupart des tissus. Les muqueuses du tractus digestif et génito-urinaire sont le siège de pétéchies ou d'ecchymoses localisées, parfois cyanotiques. Il est quelquefois observé de l'œdème et des hémorragies dans les poumons et sur la paroi artérielle à la base de l'artère pulmonaire. Le tissu conjonctif sous-cutané est infiltré de liquide gélatineux. Les muscles sont le siège d'une importante dégénérescence. Le diagnostic différentiel en France doit tenir compte de la présence enzootique de l'ecthyma contagieux provoquant des lésions péri-buccales de nature papulocroûteuse ou ulcéralative. Cependant, des vésiculopustules ou des nodules sont observées sur l'ensemble du corps et cette infection ne provoque pas d'œdème. La fièvre aphteuse, en raison des lésions buccales et podales qu'elle provoque, devrait être suspectée de façon systématique. Ses lésions sont cependant beaucoup moins prononcées que lors d'un épisode de fièvre catarrhale ovine et surtout ne sont pas accompagnées d'œdèmes. La fièvre catarrhale ovine peut également être confondue avec la nécrobacillose qui provoque des ulcères profonds chez des animaux dénutris ou immunodéprimés et les allergies aux piqûres d'insectes qui se caractérisent par des papules œdémateuses puis par des vésicules et ulcères superficiels.

Le diagnostic de laboratoire est la plupart du temps indispensable pour confirmer le diagnostic clinique, mais surtout pour identifier le sérotype incriminé. Le diagnostic virologique consiste à mettre en évidence le virus (diagnos-

tic conventionnel) ou son génome (diagnostic moléculaire). En cas de suspicion, il convient de prélever 5 ml de sang sur anticoagulant (EDTA) pendant la phase d'hyperthermie qui correspond à la phase de virémie. Sur le cadavre frais, seront prélevés la rate, le cœur et/ou les nœuds lymphatiques. Après acheminement des prélèvements au laboratoire, sous régime du froid, le virus pourra être isolé après passage sur œufs embryonnés de 9 à 11 jours [49], puis sur culture cellulaire (cellules BHK ou Vero). Le typage peut être effectué, après isolement du virus, par neutralisation virale sur cultures de cellules à l'aide des 24 sérums hyperimmuns spécifiques produits sur ovins ou lapins. Des techniques plus rapides font appel à l'amplification génique ou RT-PCR : l'amplification de gènes hautement conservés (les segments 7, 8, 9 et 10) chez les 24 sérotypes permet le diagnostic du virus *bluetongue* en 24 heures [13]. Ces techniques présentent une haute spécificité ainsi qu'une grande sensibilité. Une amélioration technologique (la PCR en temps réel) basée sur l'utilisation de fluorophores permet maintenant la quantification du génome dans les prélèvements [50]. Le typage peut aussi être effectué par RT-PCR spécifique de type [47].

De nombreuses techniques de détection des anticorps sériques ont été mises au point mais seules deux d'entre elles sont recommandées par l'OIE [51] : l'immunodiffusion en gélose et l'Elisa de compétition qui est aujourd'hui le test plus utilisé (plusieurs kits sont commercialisés). Ces deux techniques permettent un diagnostic de groupe puisqu'elles reposent sur la reconnaissance d'antigènes communs aux 24 sérotypes. Les prélèvements à effectuer sont des prises de sang sur tube sec (10 ml environ). Dans les régions où les cheptels ovins sont vaccinés, la séropositivité peut être attribuée à la détection d'anticorps post-vaccinaux. La neutralisation virale sur culture de cellules est utilisée pour identifier le sérotype en cause ou pour déterminer le ou les sérotypes contre lesquels un animal a été immunisé. Cependant, en raison des nombreuses réactions croisées entre sérotypes, l'interprétation peut être délicate.

Contrôle

Conformément aux prescriptions de l'OIE et aux recommandations de l'Union européenne qui visent à prévenir toute extension de la maladie, des restrictions aux mouvements des ruminants sont appliquées aux régions infectées. Ces mesures consistent pour l'essentiel en l'isolement des animaux malades, la mise sous surveillance de l'exploitation par arrêté préfectoral, l'interdiction de tout mouvement des espèces sensibles, la réalisation de prélèvements destinés à localiser la présence de la fièvre catarrhale ovine, le traitement des animaux et des bâtiments contre les insectes et, enfin, la surveillance entomologique par la mise en

œuvre de piégeages. En raison de la présence du virus en Corse, en Espagne et en Italie, des enquêtes sérologiques et entomologiques ont été organisées dans les départements du littoral méditerranéen. Cependant, compte tenu du caractère vectoriel de la FCO, l'efficacité des mesures de contrôle sanitaires est limitée. La vaccination est actuellement le meilleur moyen de lutte contre cette maladie vectorielle. Dès la connaissance de la présence du virus de la fièvre catarrhale ovine en Corse, les services vétérinaires français ont pris la décision de la mise en œuvre d'une prophylaxie médicale. Ainsi, une campagne de vaccination à l'aide d'un vaccin à virus atténué monovalent (sérotypé 2, [52, 53]) a été organisée après l'isolement et le typage du virus responsable des premières épizooties corses en 2000. Après deux campagnes de vaccination en 2000 et 2001 contre ce sérotypé, celui-ci n'a plus été isolé lors des épizooties de 2003 et 2004. En 2004, des campagnes similaires ont été menées contre les sérotypes 4 et 16, toujours avec des vaccins à virus atténué. En décembre 2004, l'utilisation du vaccin à virus atténué sérotypé 16 a été suspendue, suite à l'apparition, dans les élevages ovins vaccinés, de signes cliniques évocateurs de la maladie. La mauvaise atténuation du vaccin semblait en être la cause. L'utilisation d'un vaccin vivant peut présenter un certain nombre de risques : atténuation insuffisante ou retour à la virulence de la souche vaccinale, effets tératogènes (les animaux en gestation ne pouvant être vaccinés), risque de réassortiment génétique avec un virus sauvage et, enfin, les souches vaccinales circulent dans le sang périphérique et sont susceptibles d'être transmises à d'autres animaux par le biais des *Culicoides*. Depuis 2004, les autorités vétérinaires françaises ont préconisé l'utilisation de nouveaux vaccins à virus inactivé. Ces vaccins contre les sérotypes 2 et 4, réalisés à partir d'isolats corses, sont maintenant utilisés en Corse, en Italie et en Espagne. D'autres vaccins, utilisant des antigènes composés de pseudo-particules constituées des protéines de structure VP2-VP5 ou basés sur des vaccins recombinants de type vaccine, canarypox ou capripox, ont donné des résultats prometteurs mais ne sont pas encore commercialisés [12, 54-56].

Compte tenu de la pluralité antigénique du virus *bluetongue* (24 sérotypes différenciés par séroneutralisation), la vaccination contre un sérotypé à l'aide d'un vaccin à virus atténué ou inactivé monovalent n'engendre pas de protection croisée avec les 23 autres sérotypes. La vaccination contre plusieurs sérotypes nécessite l'utilisation en mélange de plusieurs sérotypes atténués ou inactivés. Des vaccins de nouvelle génération permettant de vacciner contre plusieurs sérotypes sont en cours de développement. Ils sont basés sur l'expression d'antigènes conservés comme la VP7 [56] (*figure 5* Merci de replacer cet appel de figure, initialement absent du texte, au bon endroit.).

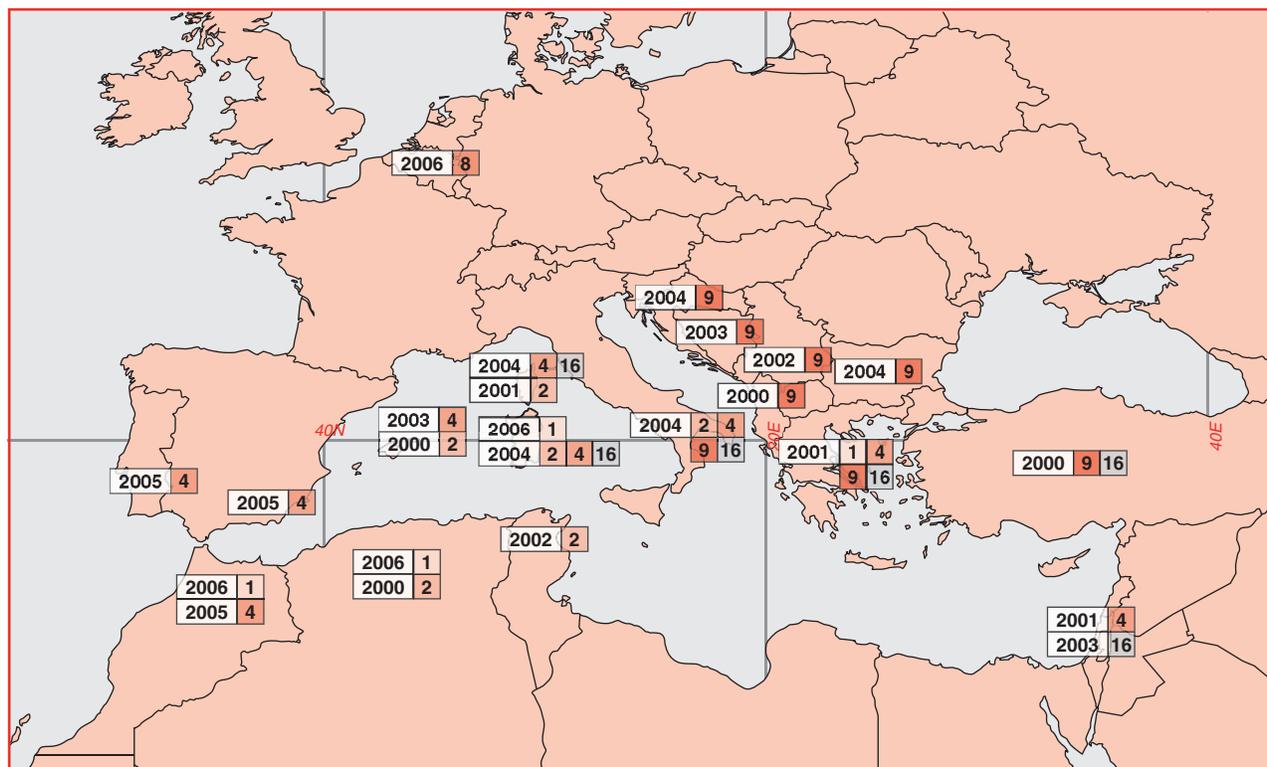


Figure 5. Distribution des sérotypes du virus de la bluetongue identifiés en Europe depuis la fin des années 90 (source FAO).

Conclusion

La fièvre catarrhale ovine, traditionnellement maladie exotique en Europe, est en quelques années devenue enzootique dans les pays d'Europe du sud (Portugal, Espagne, Italie et France) et s'est même tout récemment invitée en Europe du Nord (Allemagne, Pays-Bas, Belgique et Luxembourg). Si dans le premier cas, le réchauffement climatique peut être incriminé comme à l'origine de l'infection, en permettant aux vecteurs de remonter vers le nord, dans le second cas, l'émergence des foyers est probablement liée à l'introduction d'un animal virémique suivie d'une transmission locale par de nouveaux vecteurs endémiques encore non identifiés. Dans les deux cas, le lecteur trouvera une origine humaine à l'extension de cette infection « tropicale », conséquence de la globalisation des activités et de leurs effets secondaires et des échanges commerciaux.

Références

1. Tatem AJ, Baylis M, Mellor PS, *et al.* Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and north Africa using satellite imagery. *Vet Microbiol* 2003 ; 97 : 13-29.
2. Sabin AB. Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* 1959 ; 20 : 1387-9.

3. Mertens PPC, Attoui H, Duncan R, Dermody TS. Reoviridae. In : Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London : Elsevier/Academic Press, 2005.
4. Urbano P, Urbano FG. The Reoviridae family. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994 ; 17 : 151-61.
5. Gould AR, Hyatt AD. The orbivirus genus. Diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994 ; 17 : 163-88.
6. Vreede FT, Huismans H. Cloning, characterization and expression of the gene that encodes the major neutralization-specific antigen of African horsesickness virus serotype 3. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 3629-33.
7. Burrage TG, Trevejo R, Stone-Marschat M, Laegreid WW. Neutralizing epitopes of African horsesickness virus serotype 4 are located on VP2. *Virology* 1993 ; 196 : 799-803.
8. Nason EL, Rothagel R, Mukherjee SK, *et al.* Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *J Virol* 2004 ; 78 : 8059-67.
9. Gouet P, Diprose JM, Grimes JM, *et al.* The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* 1999 ; 97 : 481-90.
10. Roy P. Bluetongue virus proteins. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 3051-64.
11. Iwata H, Yamagawa M, Roy P. Evolutionary relationships among the gnat-transmitted orbiviruses that cause African horse sickness, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease as evidenced by their capsid protein sequences. *Virology* 1992 ; 191 : 251-61.
12. Roy P, Bishop DH, LeBlois H, Erasmus BJ. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles : evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 1994 ; 12 : 805-11.

13. Bréard E, Sailleau C, Coupier H, *et al.* Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Vet Res* 2003 ; 34 : 1-13.
14. Yu YD, Fukusho A, Roy P. Nucleotide sequence of the VP4 core protein gene (M4 RNA) of US bluetongue virus serotype 10. *Nucleic Acids Res* 1987 ; 15 : 7206.
15. Lee J, Roy P. Complete sequence of the NS1 gene (M6 RNA) of US bluetongue virus serotype 10. *Nucleic Acids Res* 1987 ; 15 : 7207.
16. van Staden V, Theron J, Greyling BJ, Huismans H, Nel LH. A comparison of the nucleotide sequences of cognate NS2 genes of three different orbiviruses. *Virology* 1991 ; 185 : 500-4.
17. Mizukoshi N, Sakamoto K, Iwata A, *et al.* The complete sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 5 and its predicted polypeptide compared with NS1 of bluetongue virus. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 2425-8.
18. Modrof J, Lymperopoulos K, Roy P. Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *J Virol* 2005 ; 79 : 10023-31.
19. Breese Jr. SS, Ozawa Y. Intracellular inclusions resulting from infection with African horsesickness virus. *J Virol* 1969 ; 4 : 109-12.
20. Hassan SS, Roy P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein : role in cell entry. *J Virol* 1999 ; 73 : 9832-42.
21. Eaton BT, Crameri GS. The site of bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 3347-53.
22. Forzan M, Wirblich C, Roy P. A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 2100-5.
23. Huismans H, van Dijk AA, Bauskin AR. In vitro phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA. *J Virol* 1987 ; 61 : 3589-95.
24. Mertens PP, Burroughs JN, Anderson J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology* 1987 ; 157 : 375-86.
25. Mellor PS. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990 ; 162 : 143-61.
26. Xu G, Wilson W, Mecham J, Murphy K, Zhou EM, Tabachnick W. VP7 : an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *J Gen Virol* 1997 ; 78 : 1617-23.
27. Tan BH, Nason E, Staeuber N, Jiang W, Monastyrskaya K, Roy P. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *J Virol* 2001 ; 75 : 3937-47.
28. Kapuler AM. An extraordinary temperature dependence of the reovirus transcriptase. *Biochemistry* 1970 ; 9 : 4453-7.
29. Le Blois H, French T, Mertens PP, Burroughs JN, Roy P. The expressed VP4 protein of bluetongue virus binds GTP and is the candidate guanylyl transferase of the virus. *Virology* 1992 ; 189 : 757-61.
30. Liu HM, Booth TF, Roy P. Interactions between bluetongue virus core and capsid proteins translated in vitro. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 2577-84.
31. Beaton AR, Rodriguez J, Reddy YK, Roy P. The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 13154-9.
32. Gorman BM, Taylor J, Walker PJ, Young PR. The isolation of recombinants between related orbiviruses. *J Gen Virol* 1978 ; 41 : 333-42.
33. Bonneau KR, DeMaula CD, Mullens BA, MacLachlan NJ. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet Microbiol* 2002 ; 88 : 115-25.
34. Takamatsu H, Mellor PS, Mertens PP, Kirkham PA, Burroughs JN, Parkhouse RM. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *J Gen Virol* 2003 ; 84 : 227-35.
35. Zientara S, Gourreau JM. La fièvre catarrhale du mouton. *Virologie* 2001 ; 5 : 449-51.
36. Zientara S, de la Rocque S, Gourreau JM, *et al.* La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000. *Epidemiol Santé anim* 2000 ; 38 : 133-44.
37. Meiswinkel R. Afrotropical *Culicoides* : a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera : Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 1989 ; 56 : 23-39.
38. Purse BV, Nedelchev N, Georgiev G, *et al.* Spatial and temporal distribution of bluetongue and its *Culicoides* vectors in Bulgaria. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 335-44.
39. Caracappa S, Torina A, Guercio A, *et al.* Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet Rec* 2003 ; 153 : 71-4.
40. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol* 2006 ; 43 : 73-8.
41. Paweska JT, Venter GJ, Mellor PS. Vector competence of South African *Culicoides* species for bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. *Med Vet Entomol* 2002 ; 16 : 10-21.
42. Venter GJ, Mellor PS, Paweska JT. Oral susceptibility of South African stock-associated *Culicoides* species to bluetongue virus. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 329-34.
43. Cetre-Sossah C, Baldet T, Delecolle JC, *et al.* Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res* 2004 ; 35 : 325-37.
44. Perrin A, Cetre-Sossah C, Mathieu B, Baldet T, Delecolle JC, Albina E. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 219-28.
45. Gomulski LM, Meiswinkel R, Delecolle JC, Goffredo M, Gasperi G. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 229-38.
46. Breard E, Sailleau C, Hamblin C, Zientara S. Bluetongue virus in the French island of Réunion. *Vet Microbiol* 2005 ; 106 : 157-65.
47. Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, *et al.* Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet Rec* 2002 ; 19 : 598-601.
48. Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PPC, Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 2005 ; 3 : 171-81.
49. Clavijo A, Heckert RA, Dulac GC, Afshar A. Isolation and identification of Bluetongue virus. *J Virol Methods* 2000 ; 87 : 13-23.
50. Orru G, Ferrando ML, Meloni M, Liciardi M, Savini G, De Santis P. Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *J Virol Methods* 2006 ; 137 : 34-42.
51. OIE. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th Edition.* Paris : Office international des épizooties, 2004.
52. Hunter P, Modumo J. A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue virus vaccine confers homologous protection in sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 2001 ; 68 : 331-3.
53. Hammoumi S, Bréard E, Sailleau C, *et al.* Studies on the safety and immunogenicity of the South African bluetongue virus serotype 2 monovalent vaccine : specific detection of the vaccine strain genome by RT-PCR. *J Vet Med B Inf Dis Vet Pub Health* 2003 ; 50 : 316-21.
54. Lobato ZI, Coupard BE, Gray CP, Lunt R, Andrew ME. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 1997 ; 59 : 293-309.
55. Boone JD, Balasuriya UB, Karaca K, *et al.* Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. Vaccine, 2006 ; volume? pages?.
56. Wade-Evans AM, Romero CH, Mellor P, *et al.* Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology* 1996 ; 220 : 227-31.