



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 10923

To cite this version :

Servera, Alexandre. *Infection expérimentale par le virus de la fièvre catarrhale ovine : étude de la sensibilité des races ovines*.
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 108 p.

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

ANNEE 2014 THESE : 2014 – TOU 3 – 4008

INFECTION EXPERIMENTALE PAR LE VIRUS DE LA FIEVRE CATARRHALE OVINE : ETUDE DE LA SENSIBILITE DES RACES OVINES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

SERVERA Alexandre
Né, le 16 mai 1987 à Orléans (45)

Directeur de thèse : M. Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :
M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
M. Gilles MEYER
M. Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
CONTRACTUELS**

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre président de thèse

A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux

A notre jury de thèse

A Monsieur de Professeur Gilles MEYER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des Ruminants

Qui nous a confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,

Pour son soutien, sa disponibilité et sa patience,

Sincères remerciements

A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des Ruminants

Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse,

Sincères remerciements

A Martine DELPLANCHE

Pour son travail au laboratoire de virologie,

Sincères remerciements

A Faouzi LYAZHRI

Pour son aide pour les analyses statistiques,

Sincères remerciements

Aux animaliers de la PFIE de l'INRA de Nouzilly

Pour leur aide au quotidien et leur accueil chaleureux,

Sincères remerciements

A **mes parents**, sans qui je ne serai pas là. Pour leur soutien et leur amour en toute circonstance, leur patience (il en aura fallu). Je suis heureux d'être votre fils.

A **mes grand-parents**, sans qui mes parents ne seraient pas là.

A la famille.

Aux copains de prépa : **Coralie** et **Tiffaine**, les ribosomes c'est le diable ; **Fabien** et **Rémi**, pour les khôlles d'anglais copier-coller ; **Sylvain**, pour Cunégonde et les MOMOMOLECUUUULES de CELLULOOSSE ! ; **Alexandra** et notre rhum aux crêpes ; **Mathieu** et **Miche**, pour cette année de 5/2, « les cubes, vous la fermez ou vous giclez ! » ; **Maud**, à la photo que Guégué n'aura jamais eu.

A **Elsa**, la plus belle. Pour tout (malgré tout aussi). Parce que tu m'apporte plus d'équilibre qu'un Activia® de Danone® et un bol de Spécial K® réunis.

A Saint Sim', château-fort de la finesse et du raffinement :

Camille, pour les intrusions à la Breloc', tes fins de boom à 19 h, tes moult passages aux urgences (de l'école et de Purpan), aux geôles australiennes ; **Rémi**, grosse blatte et fin cuisinier, aux 6 h en temps cumulé où on a dû se voir l'année dernière, à ta meuf ; **Stéph**, crève, pourriture communiste !, à tes lendemains de booms embaumants ; **Lulu**, que rien n'arrête, une coco en Suisse c'est pas banal ; **Marco** et tes cacas chez nous ; **Etienne**, à ta thèse, pour être tout à la fois une pince, une blatte et un bof', aux gens qui ne te connaissent pas, merci d'avoir péti le berlingot vert, celui de Hervé est vachement mieux ; **Julo**, Mélanchon président ! au pays du communisme, les consultations véto se font à l'œil ? ; **Sarita**, touche d'exotisme, à ton bonnet impressionnant et à ta délicieuse maman ; **Blandine**, tu aurais quand même pu nous présenter des célébrités, à Scarlett la voiture sans permis ; **Julien**, pyromane et poète, « et là, tu l'enc*les et tu t'essuies dans les rideaux ».

Au nouveaux : **Sara**, **Anaïs** et **Philippe**, soyez beaux (il y a du boulot), pour l'éternel squat des anciens (enfin, surtout moi).

A la famille Ingals et aux Ch'tis, à Laurent Romejko et Julien Lepers, à W9, pour nous avoir accompagné toutes ces heures durant ; à Nostalgie, la radio de légende.

A Marine, parce que je me rends compte en écrivant ces remerciements qu'on y trouve bien trop de communistes fumeurs de drogue. Allez donc vous laver, que diable !

Aux intelligents de la promo Crépin :

Mathieu, aux femmes fontaines, au russe blanc, à Ratus, Mamie et tous leurs descendants ; **Sandra**, la femme facile ; **Stouf**, le meilleur poste de l'Amicale, c'est deuxième ligne ! ; **Commandant Cousteau**, Picardia Independenzia ! ; **Sophie**, j'aime pas les poneys ; **Marion**, à tous les hommes (ou adolescents) de ta vie ; **Guillaume**, parce que contrairement à Joe Dassin, Eminem, 30 ans après sa mort, on en parlera encore ; **Hadrien**, à ta profonde méchanceté, comme ta petite taille le laisse deviner ; **Léa**, vedette méconnue de « Vété junior » ; **Nicolas**, tes poils et ta dermatophytose prurigineuse qui n'est pas une teigne, à ton prochain mariage, à ta maman ; **Julien**, pédophile émigré, au crapahut qui a sauvé les clandestins ; **Mattias**, fier représentant de la noblesse anglaise décadente.

A Joe Dassin et Jeanne Moreau, on n'a pas fait mieux depuis.

A Gwinette, Arthur, Nico, Margaux, Greg, Bala, François, Raph et toute la clique, merci d'être plus idiots que nous.

Vous êtes à la philosophie ce que Justin Bieber est à la musique.

Aux patrons de bar, **Julia**, **Camille**, **Stouf**, nous étions formidables. A toute l'**Amical'amarre**, la dernière Amicale digne de ce nom, et à toutes les Amicales passées et futures. A tous ceux qui font vivre l'ENVT.

A la **BD-Tek**, où tout n'est que luxe, calme et volupté.

Aux plus vieux : **Julie**, **Elsa**, **Marivan**, **Marco**, **Chaton**, **Jean-Séb** et **Chloé**, **Elisa**, **les Lourd**, merci d'avoir contribué à faire de nous la fine fleur de la France. A **Laurette**, **Marie** et **Clémence**, souvenir ému du dernier des Taïaut. A **Max** l'extraterrestre, **Yohann**, ton rire et tes dreadlocks dégueulasses.

Aux moins vieux : **Dugland**, **Béber**, **Fanny**, **Manon**, **Malech**, **Amélia**, **le Métrononne**, **Mathieu**, **Claire**, **H**, **Tanis**, **Marousia** et tous ceux que j'ai pu oublier mais c'est que vous n'êtes pas très importants, vous êtes de bons poulots.

Aux p*tes : **Anne-Lise**, binôme de choc et hyperactive pathologique ; **Tiffany**, la cochonne ; **Pascale** AKA Brigitte Bardot ; **Auréline**, notre maman à tous, cougar, 90 ans et presque

toutes ses dents ; **Isabelle**, à tes yeux qui crient braguette ; **Carole**, l'ASV tout de rose vêtue ; **Paul** et **Franck**, les pêcheurs ; **Solène**, les chatons c'est trop mignon ; **Catherine**, à ta thèse.
A **Francis** et à ta puberté tardive, courage, les poils sont pour bientôt.

Aux gros lourds de bovine, mention spéciale au second semestre (trimestre ?) :

Anne-Lise, calme-toi bon dieu ! ; **Romain**, t'es pas ben malin, mais on t'aime quand même (?) ; **Martin**, t'inquiète, ils ont fait de francs progrès en greffe de cheveux ; **Clément**, fier représentant du Nord ; **Alex**, « il est où AS ?! » ; **Bastien**, « BDCDM !!!!! c'est quoi ce merdier ???!!!! » ; **Mathieu**, fagot en anglais, ça veut dire saucisse de porc, ou un truc comme ça ; **Amélie**, la plus casse-couille des trinômes.

A **Mumu**, le plus velu des CC, j'espère que les Duvel® et les baraques à frites te plaisent et que tu as dorénavant dans les yeux le soleil que tu n'as pas dehors. A **Golden**, **Kévin** et **Marie**.

Vous êtes beaux.

A tous les vétos qui ont su me transmettre leur amour (si si) du métier,

A la **clinique de Naucelle**, pour supporter mes premières bourdes. Rassurez-vous, il y en aura plein d'autres.

Aux **60 moutons** qui ont donné leur vie pour la science.

Vous êtes tous très CUIR !

SOMMAIRE

INTRODUCTION	15
PARTIE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Le virus de la Bluetongue (BTV)	19
A. Classification	19
B. Le virion	19
1. Structure	19
2. Les protéines structurales	20
3. Les protéines non structurales	22
C. Le génome	23
D. Cycle de multiplication	24
E. Pathogénie	26
1. Dissémination et tropisme cellulaire	26
2. Pathogénie cellulaire	27
F. Réponse immunitaire	28
1. Réponse non-spécifique	28
2. Réponse spécifique	29
3. L'immunité chez le fœtus et le jeune	31
II. La Fièvre Catarrhale Ovine (FCO)	32
A. Signes cliniques	32
1. Chez les ovins	32
2. Chez les bovins	34
3. Chez les autres ruminants	34
4. Infection expérimentale	34
B. Lésions	35
1. Macroscopiques	35
2. Microscopiques	36

C. Diagnostic	37
1. Epidémioclinique	37
2. Différentiel	37
3. De laboratoire	38
D. Prophylaxie	40
1. Sanitaire	40
2. Médicale	40
III. Epidémiologie de la maladie	44
A. Epidémiologie descriptive	44
1. Avant 1998	44
2. De 1998 à 2005	45
3. De 2006 à aujourd'hui	46
B. Epidémiologie analytique	50
1. Cycle épidémiologique	50
2. Vecteurs	51
3. Réservoirs	52
4. Modes de propagation	53
5. Recrudescence virale après l'hivers (overwintering)	53
6. Sensibilité des animaux	55
PARTIE 2. ETUDE EXPERIMENTALE	57
I. Objectifs	59
II. Matériel et méthodes	60
A. Virus et cultures cellulaires	60
B. Protocole expérimentale	60
a. Animaux	60
b. Préparation de la souche de BTV W1B1	61
c. Infection expérimentale	61
C. Suivi clinique	61
D. Etude lésionnelle	63

a. Lésions macroscopiques	63
b. Histopathologie	63
E. Suivi virologique	64
a. RT-qPCR	64
b. Isolement viral	64
F. Réponse de l'hôte	65
a. Sérologie	65
b. Réponse en interférons de type I	66
c. Analyse transcriptomique de la réponse des cellules mononucléées sanguines	66
G. Analyses statistiques	67
III. Résultats	68
A. Suivi clinique et lésionnel	68
a. Signes cliniques	68
b. Hématologie	70
c. Lésions	71
B. Etude virologique	74
a. Virémie	74
b. Détection virale tissulaire	75
C. Etude de la réponse de l'hôte	77
a. Réponse immunitaire humorale	77
b. Réponse immunitaire innée	78
IV. Discussion	83
CONCLUSION	89
BIBLIOGRAPHIE	93
ANNEXES	108

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant les protéines structurales et les segments d'ARN du BTV.	20
Figure 2 : Dessin représentant l'organisation des segments d'ARN.	24
Figure 3 : Cycle de multiplication du BTV.	25
Figure 4 : Dissémination et tropisme cellulaire du BTV.	27
Figure 5 : Carte de la répartition mondiale estimée du BTV avant 1998.	44
Figure 6 : Principales voies d'incursion du BTV en Europe.	45
Figure 7 : Répartition géographique du BTV-8 en 2006.	46
Figure 8 : Répartition géographique du BTV-8 en 2007.	46
Figure 9 : Répartition géographique du BTV-8 en 2009.	48
Figure 10 : Répartition géographique du BTV-1 en 2006.	48
Figure 11 : Répartition géographique du BTV-1 en 2007.	49
Figure 12 : Répartition géographique du BTV-1 en 2008 et 2009.	49
Figure 13 : Répartition géographique du BTV-1 en 2010.	50
Figure 14 : Les différents mécanismes d'overwintering plausibles.	54
Figure 15 : Evolution de la température rectale des moutons.	68
Figure 16 : Evolution du score clinique des moutons.	70
Figure 17 : Evolution de la proportion (en % par rapport à la ligne de base) de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles et thrombocytes des moutons.	71
Figure 18 : Evolution des charges virales sanguines des moutons infectés.	74
Figure 19 : Charges virales infectieuses dans le sang en TCID ₅₀ /mL.	75
Figure 20 : Titres BTV pour les moutons Préalpes et MBB infectés à J2, J6 et J10 post-infection, respectivement dans les poumons, la rate et les nœuds lymphatiques pré scapulaire (du site d'injection) et médiastinal.	76
Figure 21 : Evolution de la réponse en anticorps anti-VP7.	77
Figure 22 : Evolution de la réponse en anticorps neutralisant.	78
Figure 23 : Evolution de la réponse en interférons de type I.	79

Figure 24 : Analyse comparative du nombre de gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes de moutons infectés.	79
Figure 25 : Gènes sur- ou sous-exprimés chez tous les animaux du groupe Préalpes.	80
Figure 26 : Tables des valeurs prédictives de l'activation ou la répression des fonctions biologiques et des molécules régulatrices des différentes voies de signalisation cellulaires.	81
Figure 27 : Gènes différentiellement exprimés entre moutons MBB et Préalpes à J2 et J6 post-infection, avec le nombre de gènes identifiés pour chaque cluster.	82

TABLEAUX

Tableau 1 : Fréquence (%) des signes cliniques exprimés par les ovins et bovins atteints par le BTV-8 d'août à décembre 2007 dans le département des Ardennes.	33
Tableau 2 : Foyers de FCO en Europe de 1998 à 2005.	45
Tableau 3 : Foyers de FCO à BTV-8 en Europe de 2006 à 2008.	47
Tableau 4 : Grille de notation du score clinique.	62
Tableau 5 : Nombre de gènes sur- ou sous-exprimés avec un fold-change > 2 ou < -2 dans les deux groupes infectés.	80

PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : <i>Culicoïdes imicola</i> .	51
Photographie 2 : Cyanose de la langue.	69
Photographie 3 : Congestion du lobe pulmonaire crânial droit.	73
Photographie 4 : Nœud lymphatique préscapulaire droit réactionnel.	73

LISTE DES ABREVIATIONS

%	Pourcentage
°C	Degré celsius
AGID	Agar gel immunodiffusion
ARN	Acide ribonucléique
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BHK	Baby hamster kidney (rein de bébé hamster)
BTV	Bluetongue virus (virus de la bluetongue)
BTV-x	Bluetongue virus de serotype x
BVDV	Virus de la diarrhée bovine virale
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CLT	Lymphocyte T cytotoxique
Ct	Cycle threshold (cycle seuil)
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	Enzyle-linked immunosorbent assay
FCO	Fièvre catarrhale ovine
g.cm⁻³	Gramme par centimètre cube
h	Heure
IBR	Infectious bovine rhinotracheitis (rhinotrachéite infectieuse bovine)
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IPI	Infecté permanent immuno-tolérant
kDa	Kilodalton
mm	Millimètre
MRC	Maladie réputée contagieuse
nm	Nanomètre
OIE	Office international des épizooties
RT-qPCR	Reverse transcriptase

INTRODUCTION

La fièvre catarrhale ovine (FCO) ou maladie de la langue bleue (bluetongue) est une arbovirose des ruminants domestiques et sauvages, les ovins faisant des formes cliniques sévères. Elle est due au virus de la Bluetongue (BTV), du genre *Orbivirus*, transmis par la pique d'arthropode hématophage du genre *Culicoïdes*. On compte actuellement 26 sérotypes, répartis dans le monde entier.

Jusqu'en 2006, seuls quelques pays du pourtour méditerranéen étaient occasionnellement touchés par des cas de FCO. A partir d'août 2006, une épidémie majeure, due au sérotype 8 du BTV (BTV-8) a atteint l'Europe du Nord et de l'Ouest. Cette épidémie a été à l'origine d'importantes pertes économiques, en raison de l'expression clinique de la maladie et de la restriction des mouvements d'animaux imposée pour limiter sa propagation. Une particularité de cette épidémie a été l'atteinte clinique observée chez les bovins, qui étaient habituellement considérés comme des porteurs sains.

La variabilité de la réceptivité à la maladie est une caractéristique majeure de la FCO. Des études et surtout des observations de terrain suggèrent que, si tous les ruminants peuvent être infectés par le BTV, l'expression clinique de la maladie diffère selon l'espèce, voire la race. Ainsi, les races ovines des régions subtropicales, où la maladie est endémique, seraient plus résistantes, alors que les races ovines européennes dites améliorées, naïves, seraient plus sensibles. Les mécanismes qui expliquent ces différences de sensibilité ne sont actuellement pas connus.

Dans cette étude, nous avons cherché à clairement démontré l'existence d'une différence de sensibilité entre deux races ovines en condition expérimentale et à déterminer les mécanismes impliqués dans ces différences. Pour cela cette étude s'appuie sur l'infection expérimentale par du BTV-8 de deux races ovines : la race Martinik Black Belly et la race Préalpes.

Dans une première partie, nous décrivons les grandes caractéristiques du virus et de la maladie, ainsi que l'épizootie en Europe. La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale.

PARTIE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le virus de la Bluetongue (BTV)

A. Classification

Le virus de la bluetongue (BTV) appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*. Les *Reoviridae* incluent des pathogènes de vertébrés, d'arthropodes et de plantes. Ils contiennent notamment les *Reovirus* et les *Rotavirus*. Les *Orbivirus* sont des « arbovirus » (arthroborne virus), dont la transmission d'un animal à un autre est effectuée par la pique d'un arthropode hématophage. Ils sont répartis en 19 sérogroupes, dont le BTV, l'African Horse Sickness virus et l'Epizootic Hemorrhagic Disease virus. Au sein du séro groupe BTV, 26 sérotypes ont été définis, sur la base de tests de neutralisation croisée.

B. Le virion

Le BTV est un virus non-enveloppé, d'une densité de $1\,337\text{ g.cm}^{-3}$. Il est constitué d'une coque icosaédrique d'environ 90 nm de diamètre, formée de trois couches protéiques et contient 10 segments d'ARN double-brin.

La description du virion qui suit s'appuie sur les données recueillies dans le livre « Fields Virology » (Knipe, Howley et al., 2013).

1. Structure

La capsid externe est composée de 2 protéines structurales à raison de 60 trimères de protéine VP2, la protéine structurale immunodominante, et de 120 trimères de protéine VP5. La capsid interne est composée de 2 couches ou coques, une coque intermédiaire avec 260 trimères de protéine VP7 et une coque interne de 12 décamères de protéine VP3.

La double capsid entoure le génome viral, ainsi que 3 protéines mineures intervenant dans l'expression et la multiplication génétique : VP1, VP4 et VP6.

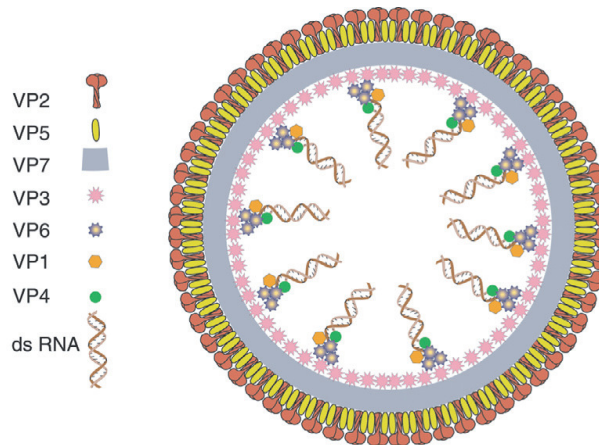


Figure 1 : Schéma représentant les protéines structurales et les segments d'ARN du BTV
(Schwartz et al., 2008)

2. Les protéines structurales

- **VP2**

60 trimères de VP2 s'organisent en une spirale triple-brin au sein de la capsid externe. Chaque protéine est composée de 956 acides aminés pour un poids moléculaire de 111 kDa.

VP2 est responsable de l'attachement aux récepteurs cellulaires et de l'entrée du virus dans les cellules, puis de l'interaction des virus matures avec les filaments intermédiaires des cellules. VP2 a notamment une forte affinité pour la glycoprotéine A de la membrane des érythrocytes. Cela permettrait la fixation du BTV dans des replis membranaires des érythrocytes (Hassan et al., 1999).

La production d'anticorps neutralisants spécifiques est essentiellement dirigée contre VP2. C'est donc majoritairement elle qui détermine le sérotype, avec VP5 dans une moindre mesure. Entre les sérotypes, et dans une moindre mesure au sein d'un même sérotype selon l'origine géographique, il existe une importante variabilité du segment L2 du génome, codant pour VP2.

- **VP5**

120 trimères de VP5 forment le motif globulaire de la coque externe. Chaque protéine est composée de 526 acides aminés pour un poids moléculaire de 59 kDa.

VP5 est une glycoprotéine de type II qui permet la fusion de la capsid externe avec la membrane des vésicules endosomales et ainsi la libération de la capsid interne dans le cytoplasme cellulaire. L'interaction entre VP5 et la membrane de l'endosome est inhibée en présence de VP2.

- **VP7**

260 trimères de VP7 s'organisent en capsomère, formant la coque intermédiaire. Cette organisation permet de conserver l'intégrité de la structure du core viral. Chaque protéine est composée de 349 acides aminés pour un poids moléculaire de 38 kDa.

La capsid interne est peu à pas infectieuse pour les cellules des mammifères, mais l'est bien plus pour les cellules des *Culicoides* adultes. Dans ces cellules, VP7 permet l'attachement et la pénétration du core viral sans doute par fixation à un récepteur spécifique, encore non identifié.

VP7 induit la production d'anticorps, qui n'interviennent pas dans la neutralisation virale. VP7 subissant peu de variation, elle détermine avec VP3 le sérotype. Les tests sérologiques ELISA sont donc majoritairement dirigés vers la détection des anticorps anti-VP7.

- **VP3**

12 décimères de VP3 s'organisent en capsomère. Chaque protéine est composée de 526 acides aminés pour un poids moléculaire de 100 kDa. Ce capsomère soutient les trimères de VP7 et les 3 protéines mineures du noyau viral VP1, VP4 et VP6 s'y lient également.

Le complexe VP3/VP7 protège l'ARN viral des mécanismes de surveillance de la cellule hôte. Tant que le complexe VP3/VP7 est présent, il n'y a pas de synthèse d'interférons de type I ni d'interférence de l'ARN.

De même que VP7, VP3 subit peu de variations.

- **Les protéines mineures du noyau : VP1, VP4 et VP6**

Ces protéines mineures interviennent dans la transcription et la réplication de l'ARN viral. Elles subissent chacune très peu de variations.

VP1 est composée de 1302 acides aminés pour un poids moléculaire de 149 kDa. Elle est présente en 12 exemplaires par virus. C'est une ARN-polymérase, qui agit aussi bien dans les cellules des mammifères que dans celles des insectes.

VP4 est composée de 654 acides aminés pour un poids moléculaire de 76 kDa. Elle est présente en 24 exemplaires par virus. C'est une enzyme de coiffage de l'ARN viral.

VP6 est composée de 328 acides aminés pour un poids moléculaire de 36 kDa. Elle est présente en 60 exemplaires par virus. C'est une ARN-hélicase. Elle interviendrait dans la réplication de l'ARN viral et dans l'assemblage du virus (Stäuber et al., 1997).

3. Les protéines non-structurales

Les protéines non-structurales joueraient un rôle dans la réplication, la maturation est le relargage du BTV.

- **NS1**

Elle est composée de 552 acides aminés. Elle s'organise en polymères sous forme de tubules spécifiques d'une infection par le BTV, visibles en microscopie électronique. Bien que sa fonction soit mal connue, elle aurait un rôle dans la formation des virions néoformés et dans la cytopathogénicité (Owens et al., 2004).

C'est la protéine la plus synthétisée par les cellules infectées des mammifères.

- **NS2**

Elle est composée de 357 acides aminés. Elle est le constituant majeur des corps d'inclusions viraux. Elle joue un rôle majeur dans la réplication virale ainsi que le recrutement et l'encapsidation du génome viral dans la coque interne.

C'est la seconde protéine la plus synthétisée par les cellules infectées des mammifères.

- **NS3 et NS3A**

Elles sont composées respectivement de 229 et 216 acides aminés. NS3A est une forme plus courte de NS3, à laquelle il manque les 13 acides aminés N-terminaux. NS3 et NS3A sont très peu exprimées par les cellules infectées des mammifères, mais se retrouvent en grande quantité dans les cellules infectées des insectes.

Ce sont les seules protéines de membrane synthétisées par les *Orbivirus*. Elles interviennent dans le relargage du virus. Deux mécanismes d'actions sont décrits. D'une part, ce sont des porines, elles induisent une perméabilisation des membranes cellulaires. Ce mécanisme domine dans les cellules des mammifères. D'autre part, elles se lient à une protéine cellulaire, et induisent alors un mécanisme de bourgeonnement similaire à celui des *Retrovirus*, sans destruction de la membrane cellulaire. Ce mécanisme dominerait dans les cellules des insectes, pour lesquelles le BTV n'a pas d'effet cytophatique significatif.

Par ailleurs NS3 interviendrait dans l'interférence avec la réponse interféron de type I (IFN-I) (Vitour et al., 2013). Des IFN de type I sont produits suite à une infection par le BTV. Ce sont des acteurs essentiels de la réponse immunitaire cellulaire. NS3 est un antagoniste de la synthèse d'IFN-I.

C. Le génome

Le génome du BTV est composé de 19 200 paires de bases, réparties en 10 segments linéaires d'ARN double-brin. Il contient 57 % de bases A et U et 43 % de bases C et G.

Dans le virion, ces segments sont organisés en suite de coques concentriques régulières, liés avec les protéines majeures VP3 au niveau de 5 axes de symétrie. Cela constitue, avec les protéines mineures, les complexes transcriptionnels. L'ARN de la couche la plus externe s'écarterait en spirale autour des complexes transcriptionnels en effectuant deux tours avant d'être limité par l'ARN voisin et passerait alors à l'intérieur pour former la coque concentrique d'ARN suivante.

Les 10 segments se répartissent, selon leur taille, en 3 grands segments larges : L1, L2 et L3, qui codent respectivement pour VP1, VP2 et VP3 ; 3 segments moyens : M4, M5 et M6, qui codent respectivement pour VP4, VP5 et NS1 ; ainsi que 4 petits segments : S7, S8, S9 et S10, qui codent respectivement pour VP7, NS2, VP6 et NS3 et NS3A.

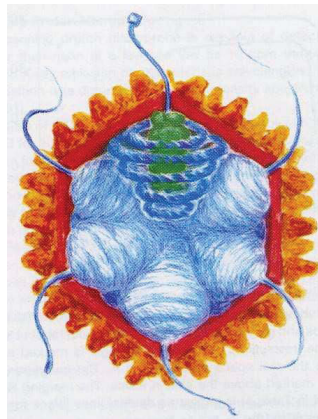


Figure 2 : Dessin représentant l'organisation des segments d'ARN (Gouet et al., 1999).

L'ARN en bleu s'enroule autour des complexes de transcription en vert.

D. Cycle de multiplication

Le virus se lie à la cellule, par l'attachement des trimères de VP2 aux glycoprotéines membranaires. D'autres récepteurs pourraient intervenir lors de cette étape. Le virus est alors internalisé, par la formation d'endosomes. VP2 se désolidarise ensuite rapidement de la capsid externe, puis le pH acide entraîne la fusion des protéines VP5 et la membrane de l'endosome. La capsid interne, contenant les complexes de transcription, est alors libérée dans le cytoplasme. Le BTV se réplique ensuite dans le cytoplasme.

Au sein de la capsid interne, l'ARN-polymérase VP1 transcrit les 10 segments d'ARN double-brin en ARN simple-brin positif. L'enzyme VP4 coiffe cet ARN qui quitte ensuite la capsid interne par des canaux situés aux niveaux des 5 axes de symétrie. L'ARN viral est alors traduit dans le cytoplasme cellulaire. Cette traduction commence dans les 2 heures post-infection.

L'assemblage des nouvelles particules virales commence par l'encapsulation des 10 segments d'ARN double-brin. Elle résulte de l'action combinée de VP6 (hélicase), NS2 (enzyme d'attachement de l'ARN simple-brin), VP1 (ARN-polymérase) et VP4 (enzyme de coiffage). Cet assemblage se fait dans ce que l'on appelle des corps d'inclusion viraux, majoritairement composés par NS2.

Ce capsomère va ensuite servir de matrice pour l'assemblage des trimères de VP7 formant la coque intermédiaire, plus résistante et plus stable.

Les trimères de VP2 et les trimères de VP5 formant la capsid externe sont ajoutés à leur tour dans le cytoplasme cellulaire. La production de particules virales matures est exponentielle entre la 8^{ème} et la 24^{ème} heure post-infection.

Ces particules matures ainsi formées sont transportées dans le cytoplasme le long des microtubules (NS1, VP2 ?) et les porines NS3 permettent le relargage des virions.

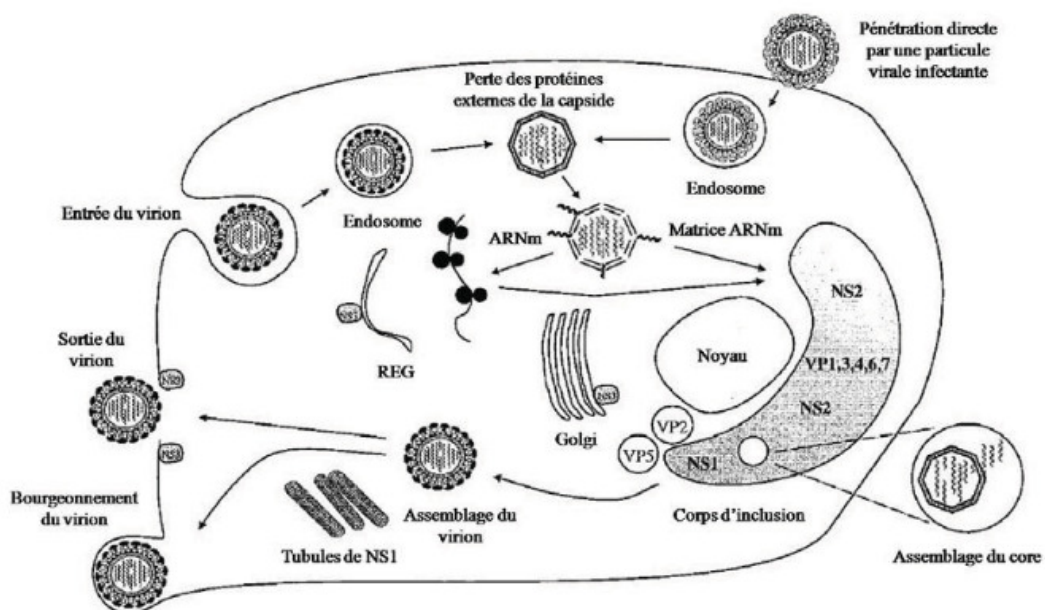


Figure 3 : Cycle de multiplication du BTV (d'après Roy et al., 1996).

E. Pathogénie

1. Dissémination et tropisme cellulaire

Suite à l'inoculation cutanée par la pique d'un *Culicoides* porteur du BTV, le virus est transporté au nœud lymphatique drainant, majoritairement en infectant des cellules dendritiques conventionnelles. Il y a une première réplication du virus dans les nœuds lymphatiques drainant en 2 à 3 jours. Il y a ensuite dissémination par voie sanguine et lymphatique, donnant lieu à une première phase de virémie discrète dès le 3^{ème} jour. Les principales cibles cellulaires sont alors les cellules mononuclées sanguines, notamment les monocytes et cellules dendritiques. Le virus atteint les sites secondaires en 3 à 5 jours : nœuds lymphatiques, poumons et rate principalement. Le virus s'y multiplie alors dans les cellules de l'endothélium en 4 à 20 jours. Puis il y a dissémination par voie sanguine dans les autres tissus, donnant lieu également à une seconde phase de virémie.

Lors de cette seconde phase de virémie, le BTV peut s'associer de façon prolongée avec les globules rouges, probablement au sein de replis membranaires où il ne se multiplie pas. Le virus peut être isolé dans le sang des animaux infectés entre 35 et 60 jours post-infection chez les bovins et entre 20 et 40 jours chez les ovins. L'ARN viral peut quant à lui être détecté jusqu'à 140 jours post-infection par RT-qPCR, ce qui pourrait correspondre à la durée de vie moyenne des globules rouges (120 jours).

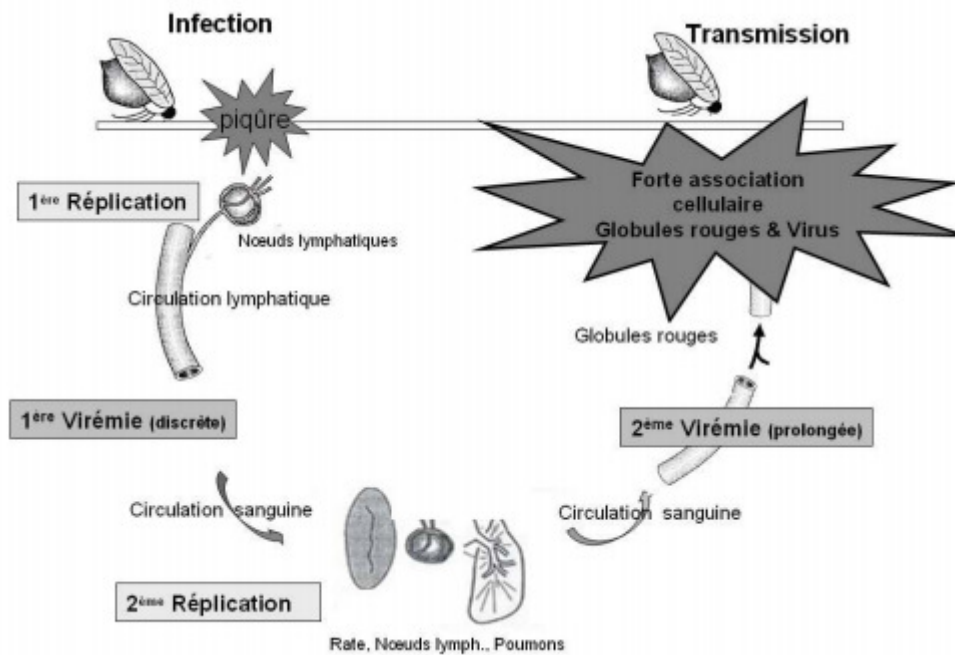


Figure 4 : Dissémination et tropisme cellulaire du BTV (d'après Barrat-Boyes et al., 1995).

2. Pathogénie cellulaire

Les maladies virales hémorragiques, dont le BTV, sont dues non seulement à la mort cellulaire, conséquence directe de l'infection virale, mais aussi à la réaction inflammatoire post-infectieuse intense voire excessive. Les deux phénomènes sont observés à différentes intensités d'une espèce à l'autre et d'un individu à l'autre, sans explication connue. Dans les deux cas, les signes cliniques observés sont dus à une atteinte, fonctionnelle ou structurelle, des endothéliums.

- **Mort cellulaire**

Elle est due chez les mammifères infectés à des mécanismes d'apoptose ou de nécrose. Cela est observé dans les cellules endothéliales, les monocytes, les plaquettes et les lymphocytes $\gamma\delta$ T et est dû aux protéines de la coque externe du BTV : VP2 et VP5. Cette atteinte des endothéliums, en particulier des vaisseaux sanguins, est responsable d'une partie des signes cliniques de la FCO : ulcérations des phanères et hémorragies (Maclachlan et al., 2008).

Chez les insectes, pas ou peu d'effet cytopathique est observé lors d'infection, probablement en partie en raison du mode de relargage des virions, principalement par bourgeonnement, contrairement aux cellules de mammifères.

- **Induction de cytokines et de prostanoides**

L'infection des endothéliums vasculaires par le BTV entraîne la synthèse d'interleukines (IL-1, IL-8 et IL-6), de la cyclooxygénase-2 et de la « nitric oxide synthase » ainsi que l'augmentation des concentrations plasmatiques en prostacycline et en thromboxane (Demaula et al., 2002).

Les interleukines, la cyclooxygénase et la « nitric oxide synthase » interviennent dans la pathogénie des fièvres hémorragiques virales sévères. La prostacycline est un vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Le thromboxane est quant à lui un puissant facteur de la coagulation. La diminution du ratio prostacycline/thromboxane peut expliquer une partie des signes cliniques de la FCO : coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) avec thrombose et infarcti.

Chez les bovins, le ratio prostacycline/thromboxane est bien plus élevé que chez les ovins et la médiation de l'inflammation par les cellules endothéliales est plus importante. Ceci peut expliquer la moindre sensibilité des bovins aux atteintes vasculaires et aux thromboses lors d'une infection par le BTV (Demaula et al., 2002).

D'autre part, l'infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Ruscanu et al., 2012) et des monocytes, entraînerait une activation des voies de signalisation cellulaires et également le relargage de chimiokines intervenant dans la réponse de l'hôte.

F. Réponse immunitaire

1. Réponse non-spécifique

Une étude récente (Ruscanu et al., 2012) met en évidence la synthèse d'IFN- α/β et de plusieurs cytokines par les cellules lymphatiques de la peau et les cellules sanguines, au sein

des cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp), et ce indépendamment d'une éventuelle inactivation et donc réplication du BTV.

Lors d'une infection expérimentale par le BTV inactivé aux rayons UV, la voie de signalisation entraînant la synthèse d'IFN- α/β implique l'adaptateur MyD88, et ce indépendamment des récepteurs Toll-Like (TLR).

Les IFN auraient une double action. Ils rendraient réfractaires à la multiplication virale les cellules infectées et les cellules voisines ; ils favoriseraient aussi une réponse immunitaire spécifique plus efficace. Toutefois, il n'influenceraient pas la persistance du virus dans l'organisme (Maclachlan et al., 1994).

D'autre part, la protéine non-structurale NS3 du BTV interfère dans la cascade de réaction entraînant la synthèse d'IFN-I, par inhibition des récepteurs RIG-I-Like (Chaveau et al., 2013).

Par ailleurs, la réaction inflammatoire induit l'action de cellules Natural Killer (NK) et de phagocytes, qui contribuent à l'élimination des cellules infectées. Il est à noter que la phagocytose peut être facilitée par la présence d'anticorps et de facteurs du complément (opsonisation).

2. Réponse spécifique

- **Réponse humorale**

Chez les ovins, les protéines virales de la capsid, en particulier VP2 et, dans une moindre mesure, VP5 induisent la synthèse d'anticorps neutralisants. La réponse immunitaire humorale dirigée contre VP2 est spécifique de sérotype. Toutefois, il semble pouvoir exister une protection croisée entre certains sérotypes, qui présenteraient des épitopes communs de VP2. De plus, d'autres protéines virales sont la cible de la réponse immunitaire humorale. C'est notamment le cas de VP7, qui subit peu de variations d'un sérotype à l'autre. Les anticorps anti-VP7 sont d'ailleurs la cible des tests de diagnostic ELISA. Par contre ils n'induisent pas d'anticorps neutralisants et n'interviennent pas dans la réponse protectrice.

La séroconversion VP7 dure 6 à 7 jours chez les ovins et 8 à 10 jours chez les bovins, temps au bout duquel apparaissent également les signes cliniques, avec un plateau atteint vers 10 jours chez les ovins et 18 jours chez les bovins (Darpel et al., 2007).

Les anticorps neutralisants sont détectables à partir d'environ 2 semaines et l'immunité durerait plus d'un an après infection naturelle.

Toutefois, lors d'essais vaccinaux, le taux d'anticorps neutralisant n'est pas toujours corrélé au niveau de protection vaccinale contre le BTV. Ceci est dû à l'existence d'une réponse immunitaire cellulaire au virus.

- **Réponse cellulaire**

- *Lymphocytes T cytotoxiques*

Chez les ovins, les protéines virales VP2 et NS1 et, dans une moindre mesure, VP3, VP5 et VP7, induisent la synthèse de lymphocytes T cytotoxiques (CLT). La réponse immunitaire cellulaire dirigée contre VP2, VP3, VP5 et VP7 est homologue, alors que celle dirigée contre NS1 est hétérologue.

Les CLT sont détectables au bout de 6 jours dans les nœuds lymphatiques drainant le point d'inoculation et au bout d'environ 2 semaines dans le sang. Comme pour l'immunité humorale, l'immunité cellulaire serait plus durable suite à une infection par le virus que suite à la vaccination.

- *Lymphocytes T auxiliaires*

Chez les ovins, les protéines virales VP2 et VP7 et, dans une moindre mesure, VP5, induisent la synthèse de lymphocytes T auxiliaires. Ces lymphocytes produisent des cytokines qui activent les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages.

3. L'immunité chez le fœtus et le jeune

Lors d'une infection par le BTV d'une femelle gravide, le virus passe la barrière placentaire dans environ 10 % des cas. Le fœtus acquiert sa propre immunité vis-à-vis du BTV vers la moitié de la gestation, soit 75 jours pour les ovins et 135 jours pour les bovins. Il est alors capable de produire des anticorps et des interférons.

Ainsi, lors de la première moitié de la gestation, une infection par le BTV peut entraîner avortements et malformations. Lors de la seconde moitié de la gestation, le fœtus est immuno-compétent. La durée de la virémie est la même que lors d'une infection post-natale.

II. La Fièvre Catarrhale Ovine (FCO)

A. Signes cliniques

Jusqu'à l'épizootie de 2006 à 2009 à BTV-8 en Europe du Nord, la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) touchait essentiellement les ovins et quelques espèces de ruminants sauvages. Les bovins, les caprins et la majorité des ruminants sauvages faisaient des formes asymptomatiques ou subcliniques. Toutefois, au cours de cette épizootie, des formes cliniques sévères ont été observées chez les bovins, avec une morbidité de 5 %.

1. Chez les ovins

En France continental, la morbidité de la FCO à BTV-8 est d'environ 12 % (Afssa hors-série, 2010).

La période d'incubation dure en moyenne de 2 à 6 jours, avec un maximum de 18 jours. S'ensuit une première phase : un syndrome fébrile avec hyperthermie sévère de 40 à 42 °C, qui dure 24 à 72 h. La phase d'état se caractérise par :

- une atteinte de l'état général, avec diminution de l'état corporel, anorexie, léthargie, baisse de la production laitière,
- des phénomènes œdémateux : œdème de la face et du cou, du scrotum ou de la vulve, voire œdème pulmonaire avec détresse respiratoire et cyanose de la langue (langue bleue ou bluetongue),
- une atteinte des muqueuses (catarrhale), avec des phénomènes congestifs et hémorragiques : conjonctivite avec larmoiement ; congestion de la face, de la vulve et des zones glabres, rhinite avec érosions, jetage séreux à hémorragique et formation de croûtes autour des narines ; stomatite avec érosions, ulcères et hypersalivation,
- des boiteries avec inflammation du bourrelet coronaire et du pododerme, ulcères interdigités,
- une atteinte cutanée : piqueté hémorragique, souvent localisé aux espaces interdigités et aux trayons ; chute de laine ; rarement associée à une dermatite chronique,

- une atteinte musculaire : myosite et fonte musculaire avec raideurs, torticolis et douleurs,
- des troubles de la reproduction : avortements et mortinatalités avec des fœtus tératogènes (notamment hydranencéphalie, kystes sous-corticaux lors d'une infection au cours de la première moitié de la gestation). Sont aussi observés quelquefois une dégradation des performances de reproduction probablement liée à l'hyperthermie sévère : allongement de l'intervalle vêlage – insémination fécondante avec chute de taux de réussite en première insémination chez la femelle ; infertilité transitoire de 2 à 4 mois pouvant évoluer vers une atrophie testiculaire et la stérilité chez le mâle.

Les signes cliniques majeurs sont le plus souvent observés au bout de 8 à 10 jours, au-delà desquels l'animal meurt ou reste convalescent plusieurs semaines. La mortalité est d'environ 10 % et la létalité est d'environ 30 %. Il y a passage à la chronicité dans environ 30 % des cas et la maladie est très débilitante.

Les complications sont d'ordre pulmonaire (pneumonie) ou digestif (diarrhée) et des maladies intercurrentes peuvent se développer.

Tableau 1 : Fréquence (%) des signes cliniques exprimés par les ovins et bovins atteints par le BTV-8 d'août à décembre 2007 dans le département des Ardennes (d'après Le Gal et al., 2008).

Signes cliniques	Ovins (n=375) (IC 95 %)	Bovins (n=1 297) (IC 95 %)
Amaigrissement	27,7 (23,1-32,3)	24,0 (21,6-26,4)
Abattement	25,8 (21,3-30,4)	25,9 (23,5-28,4)
Hyperthermie	25,3 (20,8-29,8)	23,1 (20,7-25,4)
Congestion bouche	20,5 (16,3-24,7)	7,8 (6,3-9,3)
Jetage	20,0 (15,8-24,1)	19,8 (17,6-22,0)
Œdème de la face	20,0 (15,8-24,1)	6,7 (5,3-8,1)
Ptyalisme	17,6 (13,6-21,5)	16,9 (14,8-18,9)
Lésions podales	17,0 (13,1-20,9)	19,7 (16,5-20,9)
Lésions oculaires	15,7 (11,9-19,5)	18,1 (15,9-20,2)
Raideur	12,5 (9,1-15,9)	16,3 (14,3-18,4)
Irritation mufle	9,8 (6,8-12,9)	22,1 (19,8-24,4)
Signes pulmonaires	7,4 (4,7-10,2)	9,4 (7,7-11,0)
Lésions buccales	6,4 (3,8-8,9)	9,4 (7,7-11,0)
Cyanose de la langue	1,6 (0,3-2,9)	1,5 (0,8-2,1)

2. Chez les bovins

Depuis 2006, des formes cliniques proches de celles observées chez les ovins ont été décrites chez les bovins. Ces formes cliques sont majoritairement observées après infection par le sérotype 8 du BTV. Les atteintes sont généralement moins sévères que chez les ovins et le tableau clinique est prédominé par l'abattement, l'atteinte des membres (raideur, œdème des bourrelets coronaires) et de la tête (conjonctivite et œdème péri-oculaire ; jetage séreux, ulcères ou croûtes sur le mufler ; congestion et ulcères de la muqueuse buccale), chute de la production laitière et troubles de la reproduction.

En France continentale, la morbidité de la FCO à sérotype 8 est d'environ 5 % et la mortalité d'environ 1 %. Le passage à la chronicité est rare. Les signes cliniques sont plus fréquents chez les vaches et plus sévères chez les nouveau-nés.

3. Chez les autres ruminants

Les autres ruminants sont le plus souvent porteurs asymptomatiques.

Chez les caprins, les signes cliniques occasionnels sont difficilement imputables avec certitude à la FCO, car elle est souvent associée à d'autres infections. Les symptômes les plus fréquents semblent toutefois être une hyperthermie transitoire, de la faiblesse, des avortements, des malformations congénitales et des maladies pulmonaires par surinfection.

Chez les lamas, des infections mortelles au BTV-1 ont été décrites (Meyer et al., 2009). Les symptômes rapportés ont été avortement, anorexie, léthargie, détresse respiratoire aiguë, œdème et raideur des membres chez un mâle. La mortalité est possible mais est probablement très faible.

4. Infection expérimentale

Plusieurs modèles expérimentaux d'infection par le BTV sont décrits chez les ovins. L'administration de virus passé *in vitro* (œufs de poulet embryonnés, lignées cellulaires de *Culicoides* ou cellules de rein de bébé hamster BHK-21) permet d'obtenir des signes cliniques

mais souvent de moindre intensité que lors d'une infection naturelle. L'administration de sang infectieux (un ou deux passages sur des animaux d'un prélèvement initial d'un animal infecté en conditions naturelles) a permis d'obtenir des signes cliniques et des lésions très sévères chez jusqu'à 100 % des animaux infectés : hémorragies et ulcérations des muqueuses buccales et des pré-estomacs, hémorragies de la paroi de l'artère pulmonaire, œdème pulmonaire, œdème de la face, nécrose des muscles squelettiques et écoulements pleural et péricardique (MacLachlan et al., 2008) .

L'administration par voie intraveineuse permet d'obtenir des symptômes semblables à ceux observés lors d'une infection naturelle. La voie sous-cutanée et la voie intradermique sont souvent utilisées en parallèle, car les plus proches de celle d'une infection naturelle (piqûre de *Culicoïde*).

Chez les bovins, les infections expérimentales ne sont que peu concluantes.

B. Lésions

1. Macroscopiques

A partir d'observations de terrain et d'autopsies d'animaux infectés expérimentalement, les lésions rencontrées sont :

- œdème de la tête, du cou (en particulier autour du ligament nuchal) et de la sangle abdominale,
- lésions hémorragiques sous-cutanées,
- stase sanguine,
- nécrose des muscles squelettiques et du myocarde (en particulier le muscle papillaire du ventricule gauche),
- lésions hémorragiques de l'aorte et de l'artère pulmonaire, de la plèvre et du péricarde, en particulier hémorragie sous-intimale de l'artère pulmonaire, pathognomonique de la FCO,
- œdème pulmonaire, atélectasie, broncho-pneumonie aiguë diffuse suppurative,

- hyperhémie, lésions hémorragiques, érosions et ulcères de la muqueuse du tractus digestif supérieur (cavité buccale, œsophage et pré-estomacs),
- œdème et lésions hémorragiques des nœuds lymphatiques,
- lésions hémorragiques de la rate, des reins et de la vessie.

Ces lésions sont d'avantage décrites chez les ovins, en raison de la faible mortalité chez les bovins.

2. Microscopiques

Les mêmes lésions sont retrouvées à l'examen histologique, avec une atteinte majoritaire des vaisseaux :

- hyperhémie et œdème du derme, du bourrelet coronaire,
- fibrose, vacuolisation, gonflement et infiltration leucocytaire des muscles squelettiques et du myocarde,
- hémorragies de la vasa vasorum de la media et de l'adventice des grosses artères,
- œdème pulmonaire exsudatif, avec hypertrophie de l'endothélium vasculaire et œdème ou hémorragies péri-vasculaires des artères pulmonaires,
- ulcération et érosion de l'épithélium de la muqueuse buccale, avec parfois hémorragie et inflammation des vaisseaux sanguins proches, pouvant être légères, voire hypertrophie de l'endothélium vasculaire avec œdème ou hémorragies péri-vasculaires et infiltration péri-vasculaire de lymphocytes et de macrophages,
- œdème, hémorragies et infiltration leucocytaire de la lamina propria de la muqueuse digestive,
- hyperhémie et œdème des nœuds lymphatiques réactionnels,

La sévérité des lésions microscopiques n'est pas toujours le reflet de la sévérité de l'atteinte clinique et des lésions macroscopiques. Elle serait d'avantage liée à la durée d'évolution de la maladie. En particulier, les lésions des muscles squelettiques et cardiaque peuvent aller d'hémorragies et nécroses (phénomène aigu) à de la fibrose avec infiltration de cellules inflammatoires mononuclées (phénomène chronique). De même, les hémorragies et ulcérations des muqueuses sont très variables et peuvent se limiter à une simple hypertrophie de l'endothélium parfois associée à un œdème ou des hémorragies péri-vasculaires

(phénomène aigu), avec infiltration péri-vasculaire de lymphocytes et de macrophages (Maclachlan et al., 2009).

C. Diagnostic

1. Epidémiologie-clinique

Etant donné le large diagnostic différentiel, l'épidémiologie, la clinique et l'autopsie ne permettent qu'une suspicion de FCO. La seule lésion pathognomonique de la FCO est l'hémorragie sous-intimale de l'artère pulmonaire. Le diagnostic de laboratoire est donc nécessaire pour poser un diagnostic de certitude.

2. Différentiel

- **Chez les ovins**

Chez les ovins, les principales maladies intervenant dans le diagnostic différentiel sont l'ecthyma contagieux, la fièvre aphteuse, les allergies aux piqûres d'insectes, toutes les maladies provoquant un œdème sous-glossien (fasciolose, coenurose, strongylose, etc.), les maladies provoquant une boiterie (piétin, panaris, fourbure, polyarthrite, etc.), les maladies provoquant des hémorragies dans la cavité buccale (intoxication, septicémie, traumatismes, dermatoses ulcéraives, etc.).

L'ecthyma contagieux est à l'origine de lésions péribuccales papulo-croûteuses ou ulcéraives. Toutefois, ces lésions sont présentes sur l'ensemble du corps et il n'y a pas d'œdème.

La fièvre aphteuse est à l'origine de lésions buccales et podales. Toutefois, ces lésions sont moins sévères que lors de FCO et il n'y a pas d'œdème.

- **Chez les bovins**

Chez les bovins, les principales maladies intervenant dans le diagnostic différentiel sont le coryza gangréneux, la photosensibilisation, la maladie des muqueuses, la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), la stomatite mycosique, la stomatite vésiculeuse, toutes les maladies provoquant une boiterie, la thélite infectieuse bovine.

La maladie des muqueuse est à l'origine d'une stomatite ulcéro-nécrotique, de congestion, d'ulcères interdigités, de signes oculaires et d'avortement. Toutefois, les ulcères « en coup d'ongle » sont alors caractéristiques et il n'y a pas d'œdème ni d'hémorragie.

L'IBR est à l'origine de jetage, de ptyalisme, de stomatite ulcéreuse, de conjonctivite, de polypnée et d'avortement. Toutefois, il n'y a pas d'œdème ni d'hémorragie.

3. De laboratoire

- **Virologie**

La méthode standard pour l'isolement du BTV est l'inoculation d'embryons de poule par voie intraveineuse puis par passages successifs en cellules BHK21. Les prélèvements à réaliser sont du sang sur tube EDTA au cours de la phase d'hyperthermie pour un animal vivant et la rate, le cœur et les nœuds lymphatiques pour un animal mort.

Le typage du virus est réalisé par un test de neutralisation virale. Le délai d'obtention des résultats (isolement et typage) est de 15 jours à 1 mois.

Le diagnostic moléculaire, qui apporte une réponse plus rapide, est réalisé par détection du génome viral par technique d'amplification génétique par réaction de polymérisation en temps réel ou quantitative (RT-qPCR).

Le délai d'obtention des résultats est de 48 heures. De plus, la sensibilité, de 99,5 %, et la spécificité, de 98,5 %, sont excellentes. Il existe des RT-qPCR spécifiques de chaque sérotype qui ciblent le gène VP2 et des RT-qPCR pan-sérotype qui ciblent le gène de l'ARN polymérase.

Par ailleurs, des critères ont été établis, en l'absence de bases scientifiques strictes, pour corréler les résultats de RT-qPCR à l'infectiosité du prélèvement. Pour un Ct (Cycle

threshold, ou cycle seuil) < 30, le prélèvement est considéré comme infectieux ; pour un Ct > 35, le prélèvement n'est pas infectieux ; entre les deux, une confirmation par isolement est nécessaire.

- **Sérologie**

Les méthodes recommandées par l'Office International des Epizootie (OIE) sont l'immunodiffusion sur gélose et l'ELISA. Les prélèvements à réaliser sont du sang sur tube sec.

L'immunodiffusion sur gélose (AGID) est simple et rapide à mettre en œuvre. Toutefois, sa sensibilité et sa spécificité sont faibles. Elle est très rarement utilisée.

L'ELISA de compétition détecte spécifiquement les anticorps anti-VP7. Il n'y a donc pas de réaction croisée avec d'autres *Orbivirus*. La protéine VP7 subissant peu de modification d'un sérotype à l'autre, ces deux méthodes permettent un diagnostic de groupe.

La sensibilité de l'ELISA sur sérum est bonne et sa spécificité est excellente, respectivement de 87,8 % et 98,2 % pour le « ID Screen Bluetongue Competition (ID-Vet) » (Vandebussche et al., 2007). Toutefois, les anticorps des animaux vaccinés étant dirigés contre VP2 et VP5, cette méthode ne permet pas de différencier un animal vacciné d'un animal infecté.

Un test ELISA sur lait est également disponible dans le commerce (ID-Vet), dont la sensibilité et la spécificité relatives à celles de l'ELISA sur sérum du même fabricant sont respectivement de 96,5 et 98,9 % (Kramps et al., 2008).

L'ELISA sandwich VP7 (double antigène) peut également être utilisée. Elle est plus sensible que l'ELISA de compétition. Elle permet notamment la détection des anticorps des animaux vaccinés, à des titres plus faibles qu'avec l'ELISA de compétition (Oura et al., 2009).

D. Prophylaxie

1. Sanitaire

Les mesures de protection sanitaire s'appuient sur deux axes : le contrôle des mouvements d'animaux en provenance de pays infectés et la lutte contre les vecteurs. Le contrôle des mouvements d'animaux doit prendre en compte les durées extrêmes de virémie (40 jours pour les ovins, 60 jours pour les bovins) par des quarantaines et doit s'appuyer sur des dépistages virologiques ou sérologiques. La lutte contre les vecteurs passe par des traitements insecticides réguliers des animaux.

D'autre part, l'utilisation d'élevages sentinelles et des enquêtes sérologiques permettent de suivre l'éventuelle propagation de la maladie. Le piégeage des arthropodes permet de définir les zones d'activité des vecteurs.

Depuis décembre 2012, la France métropolitaine est indemne de FCO, à l'exception de la Corse. Toutefois, la FCO est une maladie réputée contagieuse (MRC), au sens de l'article 223.21 du code rural. Ainsi, la suspicion puis la confirmation d'un ou plusieurs cas de FCO entraîne la mise en œuvre de mesures de police sanitaire, définies par les réglementations nationale et communautaire. Cette police sanitaire prévoit notamment l'instauration d'un zonage avec limitation stricte de mouvements (périmètre interdit, zone de protection, zone de surveillance) et la possibilité d'abattage total. C'est notamment le cas de la Corse où sévit depuis juillet 2013 une épizootie de BTV-1.

2. Médicale

La vaccination constitue le meilleur moyen de protection contre la FCO, car il est difficile de se prémunir des piqûres d'insectes. En France, seuls des vaccins inactivés sont disponibles dans le commerce, leur innocuité étant maximale. La protection qu'ils offrent est spécifique de chaque sérotype (en raison du rôle de la protéine VP2, très modifiée d'un sérotype à l'autre).

Des vaccins de nouvelles générations sont en cours de développement qui doivent aussi permettre de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés. Enfin, des vaccins multivalents peuvent être indiqués dans des zones où plusieurs sérotypes sont présents.

- **Les vaccins vivants atténués**

Ils ont longtemps été utilisés pour contrôler la maladie en Afrique du Sud et, plus récemment, en Italie et dans les îles Baléares.

Ils offrent une forte protection pour un faible coût, avec un schéma vaccinal simple : une seule injection en primo-vaccination puis rappel annuel.

Toutefois, il existe un risque de réversion de virulence et des défauts d'innocuité peuvent être observés chez les espèces et les races les plus sensibles (Veronesi et al., 2005). Ainsi, des signes cliniques de la maladie peuvent apparaître suite à la vaccination, avec notamment des avortements, des effets tératogènes, une baisse de la production laitière et une baisse des performances de reproduction (Savini et al., 2008). De même, une période de virémie pouvant durer plus de 2 semaines suite à la vaccination avec risque de transmission vectorielle a été observée (Veronesi et al., 2005). De plus, des réarrangements entre souches vaccinales et souches sauvages peuvent donner naissance à de nouvelles souches virales (Savini et al., 2008).

Enfin, les vaccins atténués ne permettent pas de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés.

- **Les vaccins inactivés**

Les vaccins inactivés offrent une meilleure innocuité. Ils ne contiennent pas ou peu de protéines non structurales, des sérologies ELISA anti-NS1, NS2 ou NS3 permettraient donc théoriquement de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés et sont actuellement en développement. Pour le moment, les tests ELISA différentiels entre animaux vaccinés et infectés n'ont pas réellement abouti.

Les vaccins inactivés sont plus difficiles à produire et donc plus chers et la primo-vaccination nécessite le plus souvent deux injections par bovins.

Ce sont les vaccins recommandés par l'Agence Européenne de la Sécurité Alimentaire. Les vaccins commercialisés en France contre le BTV-1 et le BTV-8 sont des vaccins inactivés.

- **Les vaccins de nouvelle génération**

- *Les vaccins sous-unités*

Ils sont constitués des capsides externe et interne via la production des protéines structurales du BTV, en système *baculovirus*. Ne contenant pas d'information génétique, ils ne nécessitent aucune inactivation et sont parfaitement sécuritaires. Ils permettraient également la production de vaccins multivalents contre les différents sérotypes de BTV, en utilisant plusieurs variantes de la protéine VP2 (Roy et al., 1992).

Des essais de laboratoire montrent une protection homologue efficace et une protection hétérologue partielle (Roy et al., 1992).

Leur stabilité à long terme, leur coût de production et leur efficacité sur le terrain restent à préciser.

- *Les vaccins recombinants*

Plusieurs vaccins recombinants expérimentaux ont été décrits. Certains gènes codant les protéines immunogènes VP2, VP5, voire VP7 et NS1, du BTV sont intégrés dans le génome d'un virus vecteur, qui exprime alors les protéines structurales. Des vecteurs dérivés de *poxvirus* (myxomavirus, capripoxvirus, et canaripoxvirus) ont montré des résultats intéressants. Ces vaccins ont pour avantages d'être sécuritaires, hétérologues, peu chers et peuvent permettre de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés.

Toutefois, la primo-vaccination nécessite 2 injections à 21 jours d'intervalle, pour une efficacité moindre que celle des vaccins inactivés. A l'heure actuelle il n'y a pas de commercialisation de ces vaccins.

- *Les vaccins vivants non virulents*

Ils sont produits à partir de virus génétiquement modifiés : un ou plusieurs gènes nécessaire(s) à la réplication du BTV sont supprimés. Produits en système cellulaire complétant la protéine essentielle du gène délété, ces virus sont phénotypiquement complets et génétiquement délétés. Une fois inoculés, ils ne peuvent réaliser qu'un cycle de multiplication cellulaire le plus souvent abortif. Ces vaccins associeraient l'efficacité des

vaccins actuels et une parfaite innocuité. Ils sont actuellement à l'étude, notamment par délétion du gène codant VP6 (Boyce et al., 2008).

III. Epidémiologie de la maladie

A. Epidémiologie descriptive

1. Avant 1998

La FCO est une maladie connue depuis le début du XX^{ème} siècle. Les premiers cas ont été décrits en Afrique du Sud en 1902, lors de l'introduction de moutons de race Mérinos. Il est probable que l'infection existait depuis longtemps et ait été révélée par l'arrivée d'animaux sensibles.

Pendant la première moitié du XX^{ème} siècle, le virus est resté confiné à l'Afrique et à Chypre. Puis en quelques années, la maladie s'est propagée en Amérique, en Asie, en Australie. Jusqu'à 1998, seulement deux incursions du BTV ont été observées en Europe du Sud : en Espagne et au Portugal entre 1956 et 1960, puis en Grèce en 1979. Ces premières incursions du virus ont montré la grande sensibilité des races européennes.

A la fin du XX^{ème} siècle, le virus était présent sur quasiment la totalité du globe entre les latitudes 35 ° S et 40 ° N, parfois jusqu'à 50 ° N.

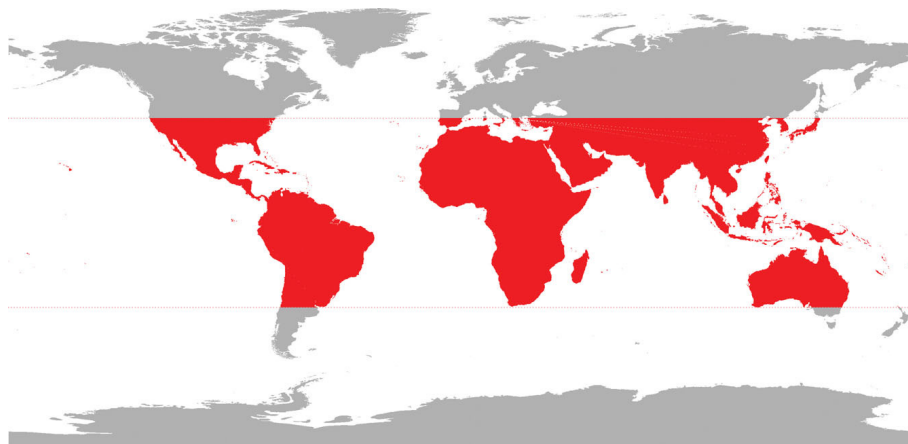


Figure 5 : Carte de la répartition mondiale estimée du BTV avant 1998 (d'après Wilson et al., 2009).

2. De 1998 à 2005

A partir de 1998, le pourtour méditerranéen a subi de multiples incursions de plusieurs souches de BTV. Des cas de FCO à BTV-1, BTV-4, BTV-9 et BTV-16 ont été décrits dans l'Est du bassin méditerranéen dès 1998, en lien avec les mouvements d'animaux entre l'Europe et l'Asie. Des cas de FCO à BTV-1, BTV-2, BTV-4 et BTV-16 ont été décrits dans l'Ouest du bassin méditerranéen dès 2000, en lien avec les mouvements passifs de vecteurs entre l'Afrique du nord et l'Europe du Sud. En France, jusqu'en 2005, seule la Corse avait été atteinte, par les sérotypes BTV-2, BTV-4 et BTV-16.



Figure 6 : Principales voies d'incursion du BTV en Europe (d'après Wilson et al., 2008).

A : Maroc – Espagne ; B : Tunisie – Sicile ; C : Turquie – Grèce / Bulgarie.

Tableau 2 : Foyers de FCO en Europe de 1998 à 2005 (d'après Saegerman et al., 2008).

Country	Year of first outbreak	BTV serotype(s)	Main suspected or identified vector(s)
Albania	2002	9	<i>Culicoides obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Bosnia–Herzegovina	2002	9	ND
Bulgaria	1999	9	<i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Croatia	2001	9, 16	<i>C. obsoletus</i> , <i>C. scoticus</i>
Cyprus	2003	16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> ,
Former Yugoslav Republic of Macedonia	2001	9	ND
France (Corsica)	2000	2, 4, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. pulicaris</i> , <i>C. obsoletus</i>
Greece	1998	1, 4, 9, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i>
Italy	2000	1, 2, 4, 9, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Kosovo	2001	9	ND
Montenegro	2001	9	ND
Portugal	2004	2, 4	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Serbia	2001	9	ND
Spain	2000	2	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Turkey	1998	4, 9, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>

3. De 2006 à aujourd'hui

- L'épizootie de FCO à BTV-8

En août 2006, le premier cas de FCO en Europe du Nord et de l'Ouest est observé en Allemagne. Le sérotype incriminé était le BTV-8, qui n'avait été jusque-là isolé qu'en Afrique sub-saharienne. Dans les mois suivants, l'épidémie s'est rapidement répandue dans toute l'Allemagne, puis aux Pays-Bas, en Belgique, au Luxembourg et dans le nord-Est de la France, avant de connaître une accalmie hivernale. Les raisons de cette incursion du BTV-8 n'ont pas été élucidées.

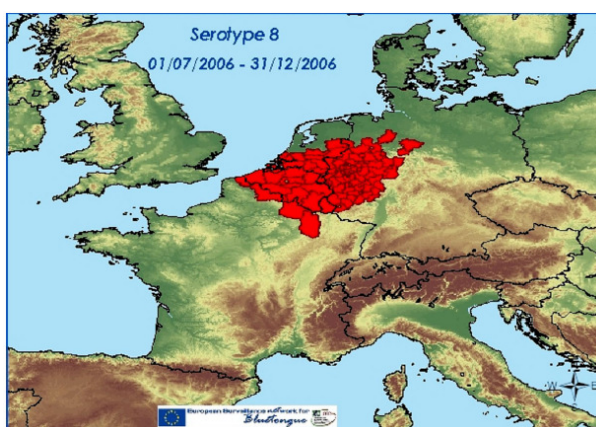


Figure 7 : Répartition géographique du BTV-8 en 2006 (d'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>).

A la fin de l'automne 2007, des très nombreux cas de FCO à BTV-8 sont observés, à la fois dans ces pays, mais aussi au Danemark, en Suisse, en République Tchèque et au Royaume-Uni et ce malgré les limitations des mouvements d'animaux.

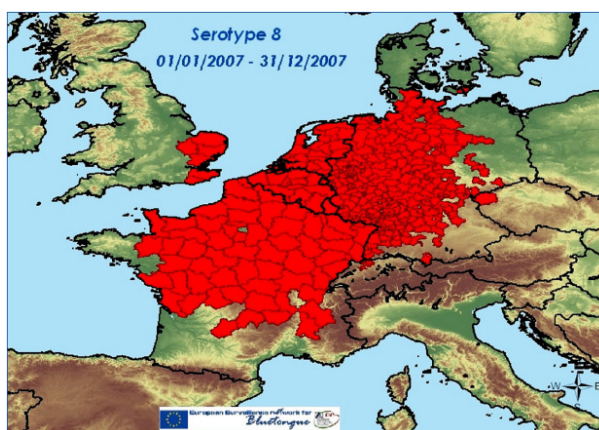


Figure 8 : Répartition géographique du BTV-8 en 2007 (d'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>).

En 2008, des programmes de vaccination ont été mis en place dans les pays atteints, avec des vaccins inactivés bénéficiant d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU). Cette vaccination a permis un recul de la maladie dans la plupart des pays. Toutefois, de nombreux cas ont toujours été déclarés en France en 2008. Ceci s'explique par la faible quantité de vaccins disponibles à cette époque, pendant la période d'activité du vecteur, et par la politique de vaccination en fonction des zones réglementées. La vaccination est devenue obligatoire sur l'ensemble du territoire qu'à l'hiver 2008 – 2009.

Tableau 3 : Foyers de FCO à BTV-8 en Europe de 2006 à 2008 (d'après Saegerman et al., 2008).

	Nombre de cas notifiés entre août 2006 et juin 2007 (première vague)	Nombre de cas notifiés entre juillet 2007 et avril 2008 (deuxième vague)	Nombre total de cas notifiés depuis août 2006
Allemagne	885	23.443	24.328
France	6	19.322	19.328
Belgique	695	6.870*	7.565
Pays-Bas	456	6.442*	6.898
Luxembourg	5	1.315*	1.320
Royaume-Uni	-	125	125
Espagne	-	12	12
Suisse	-	7	7
Italie	-	3	3
République Tchèque	-	2	2
Danemark	-	1	1
Total	2.047	57.542	59.589

En 2009, seuls 56 foyers de BTV-8 ont été déclarés en France continentale. Aucun cas n'a été déclaré par la suite et depuis décembre 2012, la France continentale est officiellement indemne de FCO.

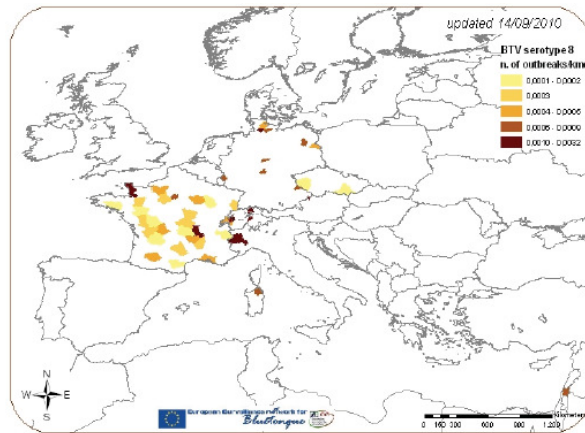


Figure 9 : Répartition géographique du BTV-8 en 2009 (d'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>).

- **L'épizootie de FCO à BTV-1**

En parallèle à l'épidémie de FCO à BTV-8, une épidémie de FCO à BTV-1 est partie de l'Europe du Sud-Ouest. Le BTV-1 avait auparavant été isolé de façon sporadique en Europe du Sud-Est.

A l'automne 2006, des cas ont été observés au Maghreb, en Tunisie puis en Italie.

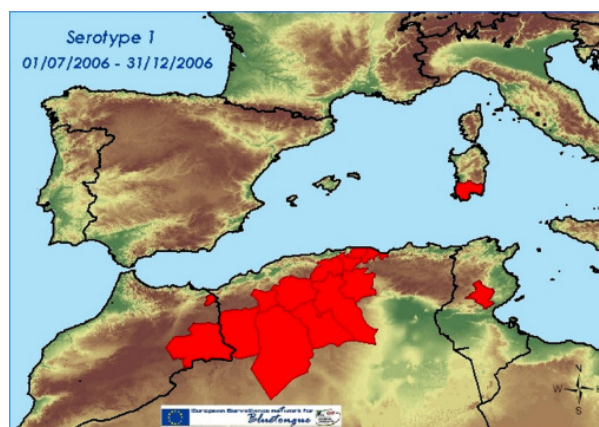


Figure 10 : Répartition géographique du BTV-1 en 2006 (d'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>).

En 2007, le BTV-1 a été isolé en Espagne et au Portugal. Une campagne de vaccination a très vite été mise en place dans ces deux pays ainsi qu'en Italie. Les premiers cas français ont concernés le Sud-Ouest à la fin de l'automne 2007. Le programme de vaccination contre le BTV-1 en France a commencé fin 2007 et ne concernait alors que le Sud-Ouest.

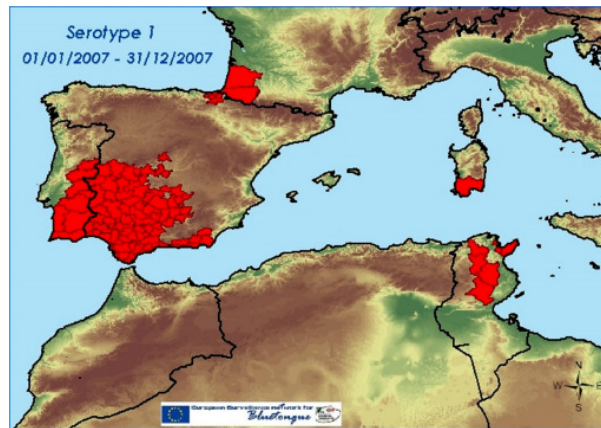


Figure 11 : Répartition géographique du BTV-1 en 2007 (d'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>).

En 2008, l'épizootie a connu une nette régression au Portugal (moins de 100 cas), mais de nombreux cas ont été recensés sur l'ensemble du territoire espagnol (plus de 2000 cas) et français (près de 4400 cas). A la fin de l'année 2008, la vaccination en France est rendue obligatoire dans tout le pays.

En 2009, seuls 9 foyers ont été déclarés en France. L'épizootie a reculé en Espagne (1375 cas) et une recrudescence de cas a été observée au Portugal (130 cas). Quelques foyers isolés ont été recensés en Grèce, au Maroc et en Tunisie.

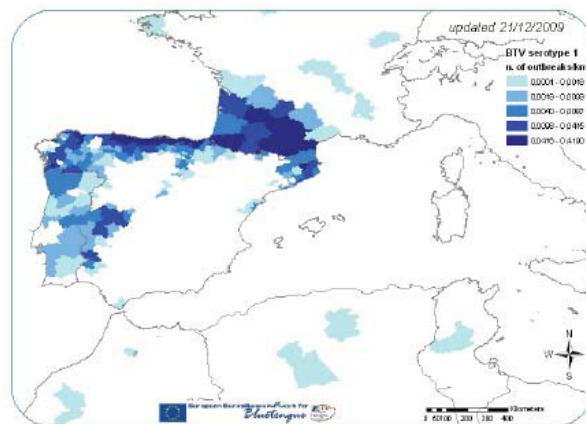


Figure 12 : Répartition géographique du BTV-1 en 2008 et 2009 (d'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>).

En 2010, seuls 8 cas ont été déclarés en France. Seuls quelques cas sporadiques ont été recensés en Grèce, en Italie, au Maroc et en Tunisie (moins de 10 cas par pays). L'épizootie persistait en Espagne et au Portugal (plusieurs centaines de cas).

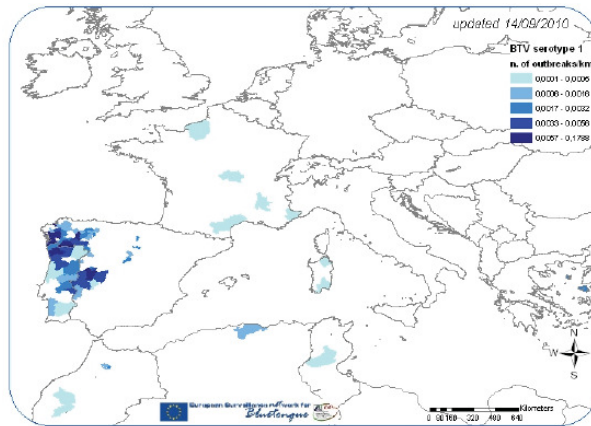


Figure 13 : Répartition géographique du BTV-1 en 2010 (d'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>).

Depuis décembre 2012, la France continentale est officiellement indemne de FCO. L'épizootie de FCO au BTV-1 a été bien mieux contrôlée que celle au BTV-8. Ceci s'explique par son arrivée plus tardive, dans un contexte d'épizootie déjà existant avec des moyens de prophylaxie déjà mis en œuvre. La vaccination rapidement mise en place puis généralisée à l'ensemble du territoire a permis de mieux contenir la maladie.

Toutefois le BTV-1 est réapparu en Sardaigne au printemps 2013. Bien que l'on dispose de peu d'informations, les données locales suggèrent une épizootie massive dans cette île. En Septembre 2013, les premiers d'infection à BTV-1 ont été notifiés et confirmés en Corse en 2013. Les données actuelles suggèrent une extension de l'infection dans cette île. La France continentale reste indemne de FCO pour la communauté européenne.

B. Epidémiologie analytique

1. Cycle épidémiologique

Le vecteur compétent ingère le BTV lors d'un repas sanguin sur un animal virémique. Le virus s'attache à la surface luminale des cellules intestinales, y pénètre et s'y multiplie. Les nouvelles particules virales sont relarguées par la lame basale des cellules intestinales dans l'hémolymphe. Elles atteignent ensuite les organes cibles secondaires, en particulier les glandes salivaires. Le vecteur contamine alors un animal lors d'une pique.

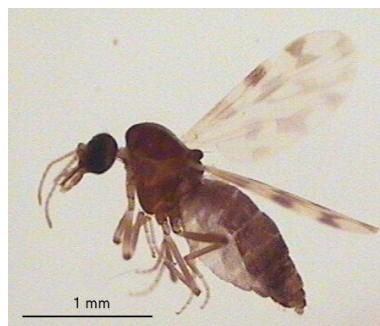
Ce cycle dure 10 à 15 jours à 25 °C. Les *Culicoïdes* sont porteurs à vie (la durée de vie de l'adulte hématophage est généralement de 4 semaines).

2. Vecteurs

- **Classification et morphologie**

Les *Culicoïdes* appartiennent à l'ordre des *Diptères*, au sous-ordre des *Nématocères*, à la famille des *Cératopogonidés*.

Ce sont des insectes de type moucheron. Ils font 2 à 3 mm de longueur. Ils ont un corps grêle et allongé avec des pattes fines et longues. Les antennes sont composées de 14 à 16 articles. Les ailes sont courtes, souvent tachetées et peu velues ; au repos, elles sont repliées sur l'abdomen.



Photographie 1 : *Culicoïdes imicola* (<http://bluetongue.cirad.fr>).

Lors de l'épidémie en Europe du Nord et de l'Ouest, les principaux *Culicoïdes* incriminés ont été *C. obsoletus*, *C. scoticus* et *C. dewulfi*. Ce dernier est un potentiel nouveau vecteur du BTV en Europe du Nord. *C. imicola*, principal vecteur du BTV en Europe du Sud, n'aurait pas joué de rôle dans l'épidémie en Europe du Nord (Meixwinkel et al., 2008).

- **Cycle de vie**

Seules les femelles sont hématophages ; elles font leur repas sanguins au crépuscule et durant la nuit. Après un repas sanguin, la femelle gravide pond ses œufs sur de la matière organique en décomposition. Les œufs sont brun à noir, cylindriques et mesurent environ 0,5 mm. Les œufs éclosent au bout de 2 à 9 jours, selon la température extérieure. Se succèdent ensuite 4 stades larvaires en 14 à 25 jours, selon les conditions extérieures. La larve L4 est

brunâtre. Elle présente une tête noire, un corps segmenté et des soies sur le segment terminal. Les larves ont un habitat terrestre ou aquatique. L4 se développe en une puppe brunâtre à noir, de 2 à 4 mm. La forme adulte, également appelée imago, émerge après 3 à 10 jours, selon les conditions extérieures. La durée de vie de l'adulte est courte, généralement 4 semaines.

- **Compétence et capacité vectorielle**

La compétence vectorielle est l'aptitude du vecteur à s'infecter, amplifier et transmettre le virus : c'est la proportion d'insectes chez lesquels le virus est retrouvé dans les glandes salivaires, après une période d'incubation. Elle est liée à des facteurs génétiques et peut varier entre deux individus d'une même espèce.

La capacité vectorielle est le potentiel de transmission du virus : c'est le nombre moyen d'inoculations probables par hôte et par unité de temps. Elle se base sur la dynamique de la population d'insectes, fonction de facteurs extrinsèques (température, humidité, etc.) et de facteurs entomologiques (abondance de l'insecte, préférence trophique, taux de survie, etc.).

Ainsi, un culicoïde est vecteur s'il est permissif au virus et sa population est adaptée à l'aire géographique considérée.

Culicoides imicola, principal vecteur du BTV en Europe du Sud, a une faible compétence mais une forte capacité en raison du pic d'abondance et d'activité des femelles hématophages dans les zones où le virus est présent.

3. Réservoirs

Mis à part le cerf rouge, les ruminants sauvages ne semblent pas jouer de rôle dans la persistance et la circulation du BTV (Corbière et al., 2012). En France continentale, la séroprévalence globale était en 2008 de 41 % (8 à 70 %) chez le cerf, 1 % chez le chevreuil, 2 % chez le mouflon, 1 % chez l'isard et nulle chez le chamois et le bouquetin (Rossi et al., 2010).

La propagation du virus et sa recrudescence après l'hiver (overwintering) seraient liés aux mouvements des *Culicoides* et des ruminants domestiques (bovins et ovins).

4. Modes de propagation

Deux voies interviennent dans la propagation des arboviroses : les mouvements d'insectes infectés et les mouvements d'animaux ou de produits infectés (semences ou embryons). Les mouvements d'insectes peuvent eux-mêmes être actifs (un *Culicoïde* adulte peut parcourir quelques centaines de mètre) ou passifs (par le vent, sur plusieurs centaines de kilomètres sous certaines conditions).

Lors d'une propagation locale, les mouvements d'animaux et les mouvements actifs d'insectes dominant. Lors d'une propagation sur une longue distance, les mouvements passifs d'insectes dominant et les mouvements d'animaux peuvent également intervenir, les transports humains actuels pouvant couvrir de grandes distances.

D'autre part, les changements climatiques influent sur les maladies vectorielles. Par exemple, dans le cas des arboviroses, une hausse de la température et de la pluviométrie augmente la capacité vectorielle (portée et activité des insectes, taux de développement du virus chez les insectes, possibilité de transmission par d'autres espèces de *Culicoides*) et la compétence vectorielle. Les changements climatiques sont considérés comme l'un des facteurs de l'épidémie de FCO en Europe du Nord.

5. Recrudescence virale après l'hiver (overwintering)

La FCO est une maladie saisonnière. Cela est étroitement lié à la période d'activité du vecteur, de la fin du printemps au début de l'hiver selon les pays concernés et les critères climatiques. L'overwintering est la capacité du virus à ré-émerger après plusieurs mois de non détection : typiquement l'hiver, en l'absence de cas clinique, de virémie et de séroconversion chez les ruminants. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène. Le BTV peut survivre via les vecteurs ou via les hôtes :

- Chez les larves de *Culicoides*, forme de survie des insectes en hiver. De l'ARN du BTV a été retrouvé dans des larves, suggérant un passage transovarien (White et al.,

2005). Toutefois ce passage n'a jamais été démontré et cette voie n'est actuellement pas considérée comme majeure.

- Chez les *Culicoides* adultes. Ils peuvent survivre à un hiver doux ou à l'intérieur des étables. Ce scénario peut être envisagé pour les pays méditerranéens, plus difficilement pour l'Europe du Nord. Toutefois il semble que les espèces locales de *Culicoides* puissent persister en petit nombre, en Europe du nord, dans des lieux protégés type bergerie et étables.
- Chez les ruminants, lors d'infections avec virémie longue (> 2 mois) associées à un hiver court.
- Chez les ruminants, par transmission transplacentaire. Lors de l'infection d'une femelle gravide pendant la deuxième moitié de la gestation, le système immunitaire du virus est compétent et peut lutter contre l'infection. La phase de virémie dans le fœtus est alors la même que lors d'une infection post-natale, soit jusqu'à 30 jours pour les ovins et 60 jours pour les bovins. Un animal peut donc naître virémique.

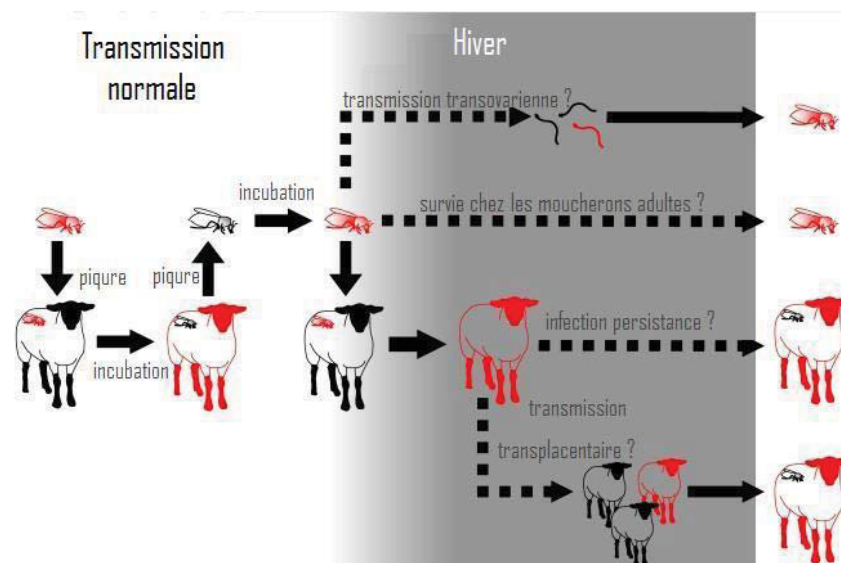


Figure 14 : Les différents mécanismes d'overwintering plausibles (d'après Wilson et al., 2008).

Les trois dernières hypothèses semblent les plus probables, mais aucune ne s'est encore imposée comme responsable de l'overwintering (Wilson et al., 2008).

6. Sensibilité des animaux

Les espèces de ruminants, les races d'une même espèce et les individus d'une même race ne présentent pas tous la même sensibilité à la FCO.

Chez les bovins, le ratio prostacycline/thromboxane (dont la diminution est responsable en partie de la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) observée lors d'atteinte clinique) est bien plus élevé que chez les ovins et la médiation de l'inflammation par les cellules endothéliales est plus importante. Ceci pourrait expliquer la moindre sensibilité des bovins aux atteintes vasculaires et aux thromboses lors d'une infection par le BTV.

D'autre part, les races européennes dites « améliorées », meilleures productrices mais qui seraient plus faibles sur un plan immunitaire, sont très sensibles à la FCO, alors que les races rustiques africaines sembleraient plus résistantes à la maladie. Toutefois il n'existe pas de publications scientifiques ayant clairement démontré une différence de sensibilité clinique entre deux races de ruminants.

PARTIE 2. ETUDE EXPERIMENTALE

I. Objectifs

Depuis août 2006, deux principaux sérotypes 1 et 8 du BTV ont été détectés en France et en Europe. L'épizootie due au BTV-8 a affecté en quelques années une grande partie des pays de l'union Européenne avec des répercussions différentes selon les espèces. Les facteurs qui influencent le devenir clinique de l'infection sont encore peu connus et font probablement intervenir la virulence du sérotype et de la souche de BTV mais aussi la réponse de l'hôte. Pour le BTV-8 les bovins et ovins se sont révélés sensibles à l'infection alors que dans le cas du BTV-1, ce sont essentiellement les moutons qui ont payé le plus lourd tribut. A l'intérieur d'une espèce des différences de sensibilité sont observées entre races rustiques et races dites améliorées, principalement sur la base d'observations de terrain. Ainsi, en Afrique du Sud, seules les races ovines améliorées sont vaccinées, les races locales n'étant pas cliniquement sensibles à la FC0. La preuve expérimentale directe d'une différence de sensibilité à l'infection n'a cependant jamais été publiée.

Les objectifs de cette étude étaient (i) de mettre en évidence une variabilité de réponse clinique à l'infection par le BTV entre deux races ovines, (ii) de voir si les différences cliniques observées étaient liées à des différences de réceptivité à l'infection par le BTV-8 et (iii) d'étudier les mécanismes immunitaires impliqués dans ces différences. Pour cela nous avons réalisé une infection expérimentale à BTV-8 sur deux races ovines, la race Préalpes sensible à l'infection par le BTV-8 et une race Martinik Black Belly supposée résistante à l'expression clinique dans les pays où l'infection sévit de manière enzootique (Martinique, Guadeloupe).

II. Matériel et méthodes

A. Virus et cultures cellulaires

La souche virale utilisée est la souche W1B1 du sérotype 8, isolée en France en 2007, à partir d'un mouton mort de FCO. Elle a été aimablement fournie par le Dr S. Zientara, ANSES LERPAZ, Maison-Alfort, France. Tous les milieux et réactifs proviennent de chez Gibco-BRL-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France. Les cellules rénales de hamster nouveau-né (BHK-21, n° ATCC = CCL10) et les cellules de rein de singe Vero (n° ATCC = CCL81) ont été cultivées sur un milieu Dulbecco's Modified Eagle supplémenté avec 10 % de sérum foetal de vache (SVF). Le milieu de culture a été supplémenté avec 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

B. Protocole expérimental

L'étude a eu lieu dans les unités expérimentales de niveau 3 de biosécurité de la Plateforme d'Infectiologie Expérimentale du centre INRA de Nouzilly. Elle a été réalisée en respectant les règles sur l'expérimentation animale, définies par l'Union Européenne (European Community Council of Animal Care 86/609/CEE) et a obtenu un agrément du comité d'éthique (Direction départementale de la protection des populations, autorisation B-37-175-3).

1. Animaux

Trente ovins mâles de races Préalpes, âgés de 4-5 mois au début de l'expérience, provenant du centre INRA UCEA de Brouëssy, et 30 ovins mâles de race Martinik Black Belly (MBB) et du même âge, provenant du centre INRA de Nouzilly, ont été utilisés. Les animaux ont été répartis en 3 groupes, isolés dans 3 cellules physiquement séparées : les moutons Préalpes infectés (groupe 1, n = 19), les moutons MBB infectés (groupe 2, n = 19) et les moutons contrôles non infectés (groupe 3, n = 22, 11 MBB et 11 Préalpes). Ils ont reçu une alimentation conventionnelle à base de fibres compactées (Fourracub®). Ces animaux ont été

confirmés indemnes de BTV jusqu'au challenge, par RT-qPCR (Taqvet BTV, Lsi, Lyon), ELISA de compétition VP7 (ID-Vet, Montpellier) et séroneutralisation BTV.

2. Préparation de la souche de BTV W1B1

L'inoculum a été préparé par 2 passages préalables sur moutons avec récupération du virus à 7 et 6 jours post-infection. Pour cela deux moutons ont d'abord été inoculés par voies sous-cutanée et intraveineuse avec 20 et 3 mL respectivement, de virus BTV-8 multiplié en cellules BHK-21 et titrant à 5.10^4 TCID₅₀/mL. La virémie a été suivie par RT-qPCR. Sept jours post-infection, le sang d'un mouton (Ct : 21,1) a été collecté et immédiatement utilisé pour inoculer 2 moutons sains, selon le même protocole. Six jours plus tard, le sang des moutons a été collecté et la charge virale a été calculée par RT-qPCR comme étant de $8.1 \cdot 10^6$ copies d'ARN par mL (Ct de 19,7). Le sang a été conservé deux jours à +4 °C avant d'être utilisé comme inoculum. Il a été re-testé deux heures après l'inoculation d'épreuve sur moutons, et titrait à $2-4 \cdot 10^6$ copies d'ARN par mL de sang.

3. Infection expérimentale

Les animaux des groupes 1 et 2 ont été inoculés par le BTV-8 à J0 par voies sous-cutanée et intraveineuse avec 20 et 3 mL respectivement, de sang infecté. Les animaux contrôles ont reçus le même volume de sang de moutons provenant d'animaux non infectés et non malades.

C- Suivi clinique

Un examen clinique quotidien a été réalisé par le même opérateur de J-3 à J21, deux fois par jour. Les signes cliniques ont été notifiés sur une fiche prévue (annexe 1) et au final un score clinique a été attribué pour chaque jour et chaque animal (tableau 4). Le score clinique journalier correspond à la moyenne des deux observations journalières (somme des points de chaque examen). Les paramètres correspondent à des signes cliniques fréquemment observés et le score est un score utilisé par l'ensemble des équipes de recherche françaises. (cf. tableau 4).

Tableau 4 : Grille de notation du score clinique.

Signes cliniques	Présentation	Score
État général	Bon	0
	Apathique	1
	Prostré	2
	Allongé	3
Perte de poids	Nulle	0
	Modérée	1
	Sévère	2
Hyperthermie	Absence (< 40°C)	0
	40-41°C	1
	41-42°C	2
	> 42°C	3
Œdème	Absence	0
	Facial	1
	Nasal	1
	Mandibulaire	1
	Labial	1
	Lingual	1
Congestion	Absence	0
	Peau	2
	Sabot	4
Problèmes locomoteurs	Absence	0
	Raideur	2
	Boiterie	2
Symptômes respiratoires	Absence	0
	Jetage modéré	1
	Jetage important	2
	Toux	1
Symptômes digestifs	Absence	0
	Présence	1
Autres symptômes	Conjonctivite	1
	Ulcères buccaux	1
	Plainte	1
	Hypersalivation	1

Des prélèvements de sang sur EDTA ont été réalisés tous les 2 jours pour analyse hématologique le jour même au moyen d'un analyseur hématologique Vet abc (Scil). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une valeur seuil qui a été fixée comme la moyenne des 3 jours qui précèdent l'inoculation de BTV-8 :

$$\% = (10^3 / \mu\text{L})_{\text{échantillon}} / (10^3 / \mu\text{L})_{\text{m (J-2, J1, J0)}} \times 100$$

D. Etude lésionnelle

1. Lésions macroscopiques

Trois moutons des groupes 1 et 2 et 4 moutons du groupe 3 (2 Préalpes et 2 MBB) ont été euthanasiés et autopsiés à J2, J6 et J10 après infection. A la fin de l'expérimentation (J22), 4 moutons de chaque groupe (2 Préalpes et 2 Martinik Black Belly pour le groupe 3) ont également été euthanasiés et autopsiés. L'euthanasie a été réalisée par saignée sous anesthésie générale et profonde (injection de kétamine, 5 mg/kg, suivie 10 minutes plus tard par une injection de pentobarbital sodique, 20 mg/kg).

Les lésions macroscopiques ont été notifiées et photographiées.

2. Histopathologie

Lors de l'autopsie, les tissus suivants ont été prélevés pour analyse histopathologique : muqueuse buccale (lèvre), poumon (lobe crânial droit), base de l'artère pulmonaire, base de l'aorte, cœur, rate, rein et nœuds lymphatiques préscapulaire, trachéobronchique et médiastinal.

Les prélèvements ont été fixés dans du formol à 10 % et envoyés au service d'histopathologie de l'ENVT pour être travaillés de manière classique enrobage paraffine. Les lames ont été lues en aveugle par le Pr M. Delverdier (Histopathologie, ENVT) après coloration classique au May-Grumwald-Giemsa.

E- Suivi virologique

Le suivi virologique a été réalisé :

- par RT-qPCR, sur des prélèvements de sang et sur des prélèvements de tissus post-mortem : poumon, rate et nœuds lymphatiques préscapulaire et médiastinal,
- par isolement viral, sur des prélèvements de sang.

1- RT-qPCR

Le sang a été prélevé sur tubes EDTA tous les 2 jours de J-3 à J20 et conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse. Les tissus post-mortem (poumon, rate et nœuds lymphatiques préscapulaire et médiastinal) ont été conservés dans un milieu de conservation de l'ARN selon les recommandations du fabricant (RNA-later, Quiagen).

Pour les prélèvements de sang, l'ARN a été extrait à l'aide d'un kit Nucleospin[®] RNA virus (Macherey-Nagel). Pour les prélèvements de tissus, l'ARN a été extrait à l'aide d'un kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel). L'ADN a été recherché par RT-qPCR à l'aide d'un kit Taqvet[®] Bluetongue Virus all genotypes (LSI), ciblé sur le gène L1 du BTV codant pour la protéine VP1, avec un thermolyseur Applied[®] 7000 (Biosystem Life Technologies Corporation). Les résultats ont été analysés avec le logiciel SDS v1.2. Le nombre de copies d'ARN a été quantifié par rapport à une gamme plasmidique d'un plasmide pBTVM contenant un amplicon du gène L1 (fourni aimablement par le Dr Sellal, LSI, Lissieu, France).

Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ARN (log) par mL de sang

2- Isolement viral

L'isolement viral a été réalisé sur plaque de 96 puits de cellules BHK-21. Brièvement, chaque prélèvement sanguin a été dilué dans du milieu MEM à raison d'un facteur 10 jusqu'à une dilution de 10⁻⁵. Pour chaque dilution, 100 µl ont été déposés dans chaque puits de cellules BHK-21 à raison de 6 puits utilisés pour une même dilution. Après deux heures à 37 °C, le milieu a été changé et remplacé par du milieu de culture classique (DMEM + 4%SVF).

La lecture des effets cytopathiques a été réalisée 5 jours après infection. Le titre est exprimé en TCID₅₀/mL et a été calculé selon la méthode de Spearman-Kärber.

F- Réponse de l'hôte

Le suivi de la réponse de l'hôte a été réalisé :

- par sérologie, en ELISA de compétition et en séroneutralisation,
- par la réponse en interféron de type I (IFN-I),
- par l'analyse transcriptomique de la réponse des cellules mononuclées sanguines.

NB : La réalisation des manipulations et l'analyse du transcriptome des cellules du sang ont été réalisés après mon stage de thèse par le reste de l'équipe.

1. Sérologie

Le sang a été prélevé sur tubes secs tous les 2 jours de J-3 à J20 puis le sérum a été aliquoté et conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse.

- **ELISA**

L'ELISA de compétition a été réalisée à l'aide d'un kit ID Screen[®] Bluetongue competition (ID-Vet), ciblé sur les anticorps anti-VP7. Le conjugué anti-VP7 utilisé est marqué à la peroxydase (POD) et la solution de révélation est une solution de tétraméthylbenzidine à 2,4 mg/mL (Sigma). Après blocage de la réaction à l'acide sulfurique, la densité optique (DO) a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm. La DO est proportionnelle à la quantité de complexes antigène-conjugué-POD et donc inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-VP7 contenus dans le sérum à tester.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de compétition ou pourcentage d'inhibition : $\% \text{ inhibition} = \text{DO}_{\text{échantillon}} / \text{DO}_{\text{contrôle négatif}} \times 100$. Le seuil de positivité est fixé à 45 % d'inhibition.

- **Séroneutralisation**

La séroneutralisation a été réalisée à partir de dilutions décroissantes d'un facteur 2 de sérum et à titre constant de virus BTV-8 (250 TCID₅₀ / puit), sur plaques 96 puits de cellules Vero (Top et al., 2012). Le titre en anticorps neutralisant est la réciproque de la plus grande dilution de sérum qui entraîne au moins 50 % d'inhibition de l'effet cytopathique du BTV, selon la méthode de Spearman-Kärber.

Les résultats sont exprimés en ED₅₀ (effective dose 50 %). Le seuil de positivité est fixé à 10.

2. Réponse en interférons de type I

Le sang a été prélevé sur tubes secs tous les 2 jours de J-3 à J20 puis le sérum a été aliquoté et conservé à -20 °C jusqu'à l'analyse.

Le suivi de la réponse en interférons de type I (IFN I) a été réalisé par test biologique d'inhibition de l'infection par le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) en cellules MDBK, cultivées à raison de 50 000 cellules / puits, en milieu EMEM 5 % SVF + PS.

Pour cela des dilutions décroissantes (au tiers) de sérums à tester ont été incubées sur cellules MDBK pendant une nuit à 37 °C. Un contrôle positif a été réalisé en parallèle (INF-a porcin (MPA1)). Le virus VSV est ensuite ajouté en milieu EMEM 1 % SVF + PS + 2 % bicarbonate pour 24 h à 37 °C. L'effet cytopathique est détecté par coloration au cristal violet et l'unité (UI) définie comme la dilution limite par rapport à la référence.

3. Analyse transcriptomique de la réponse des cellules mononuclées sanguines

Pour les analyses transcriptomiques, du sang a été prélevé chez 6 animaux par groupe à J0, J2, J6 et J10 après infection, sur tubes EDTA.

Brièvement, l'ARN total a été immédiatement extrait après prélèvement au moyen du kit RNeasy (Quiagen). L'ARN a été quantifié au spectrophotomètre (NanoDrop Technologies)

et sa qualité analysée par bioanalyseur (Agilent Bioanalyzer 2100 slide). Seuls les ARN avec un score d'intégrité (RIN) > 9 ont été conservés pour les analyses ultérieures. 50 ng d'ARN ont été rétro-transcrits et amplifiés en ADNc selon le protocole du kit « Low Input Quickamp Labelink Kit (Agilent G4190-90040) ». Le marquage fluorescent de l'ADNc a été réalisé au moyen du fluorochrome Cy3.

Cinq lames (Agilent Technologies, 251992110206, -207, -208, -125, -126) composées chacune de 8 microarrays ovins contenant 15008 sondes ovines ont été utilisées pour l'hybridation avec les ADNc (65 °C pendant 17 h) selon les recommandations du fabricant (Agilent technologies). Les analyses statistiques des différents résultats de microarrays ont été réalisées au moyen du logiciel GeneSpring GX11. Sur les 15008 sondes, environ 8850 étaient annotées par le « Human ortholog HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) ». Certains gènes supplémentaires ont été annotés au moyen du site « GeneBank and Basic Local Alignment Search Tool program on the NCBI website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ».

Les fonctions biologiques et les réseaux de gènes ont été obtenus au moyen des logiciels « Ingenuity Pathway Analysis, version 7.5 (<http://www.Ingenuity.com>) » et « IPA ».

G- Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad software (La Jolla, USA). La comparaison des résultats cliniques, virologiques et sérologiques s'est faite par des ANOVAs à 2 facteurs, sans répétition de mesures. Quand les effets « jour » et « traitement » étaient significatifs parmi les interactions, un test de Bonferroni parmi les contrastes a été réalisé pour comparer les traitements de chaque jour.

Une ANOVA simple, sans répétition des mesures, a été réalisée pour comparer les résultats de RTqPCR. Quand l'effet du facteur « traitement » était significatif, il a été effectué un test de Newman-Keuls pour comparer les effets « traitement » à chaque moment.

III- Résultats

A. Suivi clinique et lésionnel

1. Signes cliniques

Les animaux infectés ont tous présenté de l'hyperthermie avec des différences individuelles. En moyenne, la fièvre a démarré à J5 post-infection, avec un pic moyen à 41,2 °C pour les moutons Préalpes et à 40 °C pour les moutons MBB à J6 post-infection et un retour à la normothermie à J10 post-infection. Les moutons contrôles n'ont pas présenté d'hyperthermie. Les différences entre MBB et Préalpes sont significatives ($p < 0,05$) à J6 et J7 post-infection.

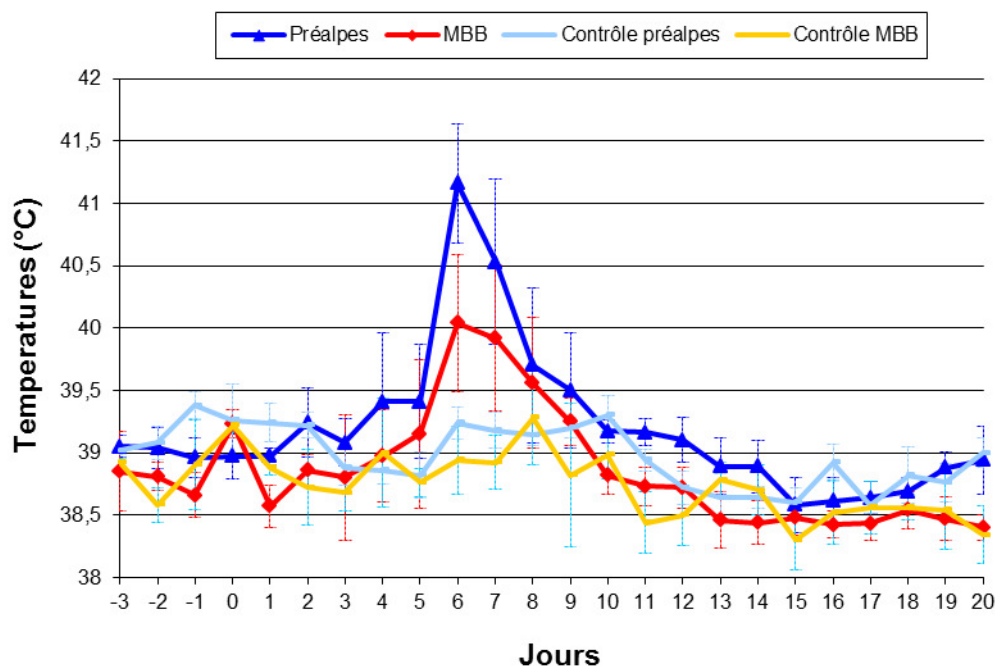
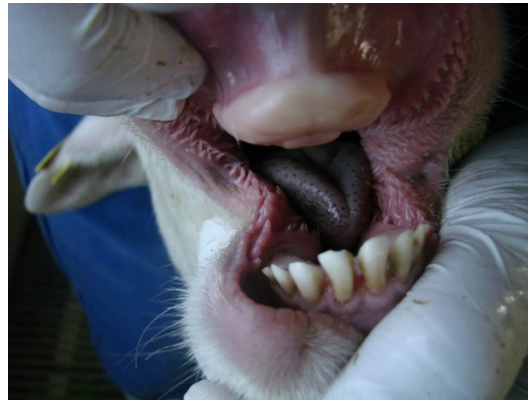


Figure 15 : Evolution de la température rectale des moutons.

Les signes cliniques observés chez les moutons Préalpes infectés ont été caractérisés par de l'œdème et une congestion de la face, un jetage nasal et un ptyalisme séromuqueux modérés, des ulcères du mufle et de la cavité buccale, une congestion du fourreau et de la face médiale des cuisses. Par ailleurs, tous les moutons Préalpes ont présenté un abattement

modéré à sévère avec une baisse de l'appétit et de l'anorexie pour certains pendant 2 à 4 jours. Les signes cliniques ont été observés de J5 post-infection jusqu'à la fin de l'expérimentation, avec un pic de sévérité à J7 post-infection et une guérison clinique à partir de J18 post-infection. Un mouton Préalpes infecté (n° 90336) a présenté une cyanose de la langue à partir de J8 post-infection (photographie 2).



Photographie 2 : Cyanose de la langue (mouton n° 90336).

Les signes cliniques observés chez les moutons MBB infectés ont été très frustrés. Les animaux n'ont présenté aucun abattement mise à part pour un mouton qui a présenté une légère anorexie et de l'apathie.

Les moutons contrôles n'ont pas présenté de signe clinique.

Les scores cliniques (SC) sont présentés à la Figure 16. Pour le groupe Préalpes, le pic moyen est observé à J7 post infection avec une valeur de 7,33 +/- 3,46. Les SC moyens évoluent par la suite entre 4 et 6 jusqu'à J14 post-infection. Pour le groupe MBB, il n'a pas été observé de pic de SC, les SC sont proches de 0 exceptés pour les jours 6, 7 et 8 où les valeurs fluctuent entre 1 et 1,5, deux moutons ayant présenté de légers signes cliniques dans le groupe MBB.

Des différences significatives ($p < 0,05$) ont été observés entre les groupes Préalpes et MBB infectés pour les jours 6 à 15 post-infection.

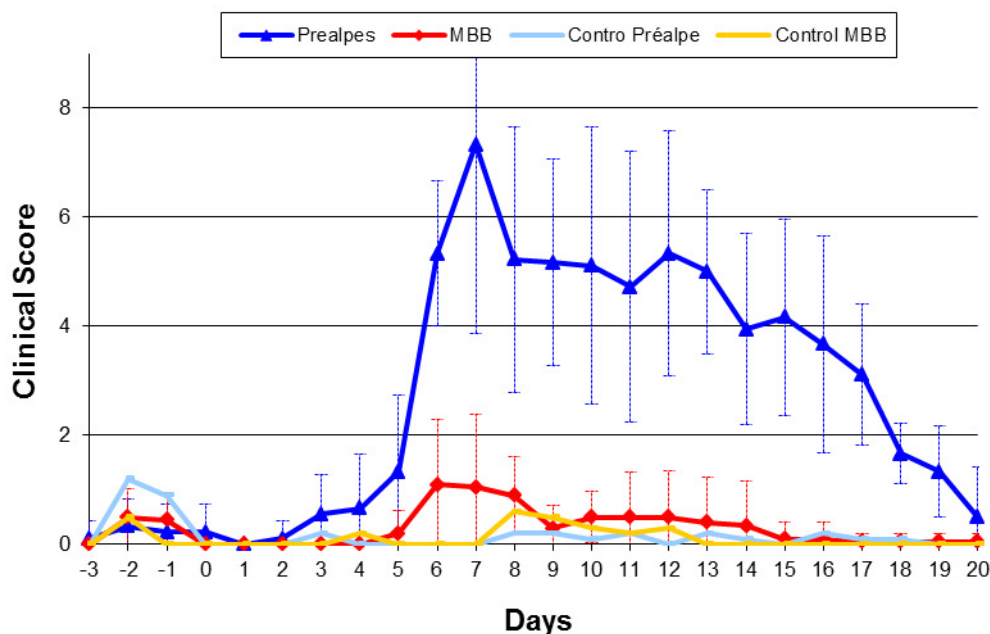


Figure 16 : Evolution du score clinique des moutons.

2. Hématologie

Les résultats de l'hématologie sont présentés à la Figure 17. Une grande variabilité du nombre de leucocytes et des sous populations cellulaires a pu être observée entre moutons dans les jours qui ont précédé l'inoculation. Les résultats ont donc été exprimés, pour chaque mouton, en % par rapport à une valeur dite pré-infection, constituée de la moyenne des données obtenues aux J-2, J-1 et J0 avant inoculation.

Une leucopénie est observée chez tous les animaux infectés (Figure 17), mais avec un retour à la normale plus rapide chez les moutons MBB que chez les moutons Préalpes : de J3 à J5 post-infection chez les moutons MBB et de J3 à J7 post-infection chez les moutons Préalpes. Cette leucopénie est associée à une lymphopénie, une monocytopénie et une neutropénie. Il n'a pas été observé de différence significative entre les deux groupes infectés.

Une thrombocytopénie est observée chez les moutons Préalpes infectés de J3 à J10 post-infection.

Aucune modification de la numération sanguine n'a été observée chez les animaux contrôles.

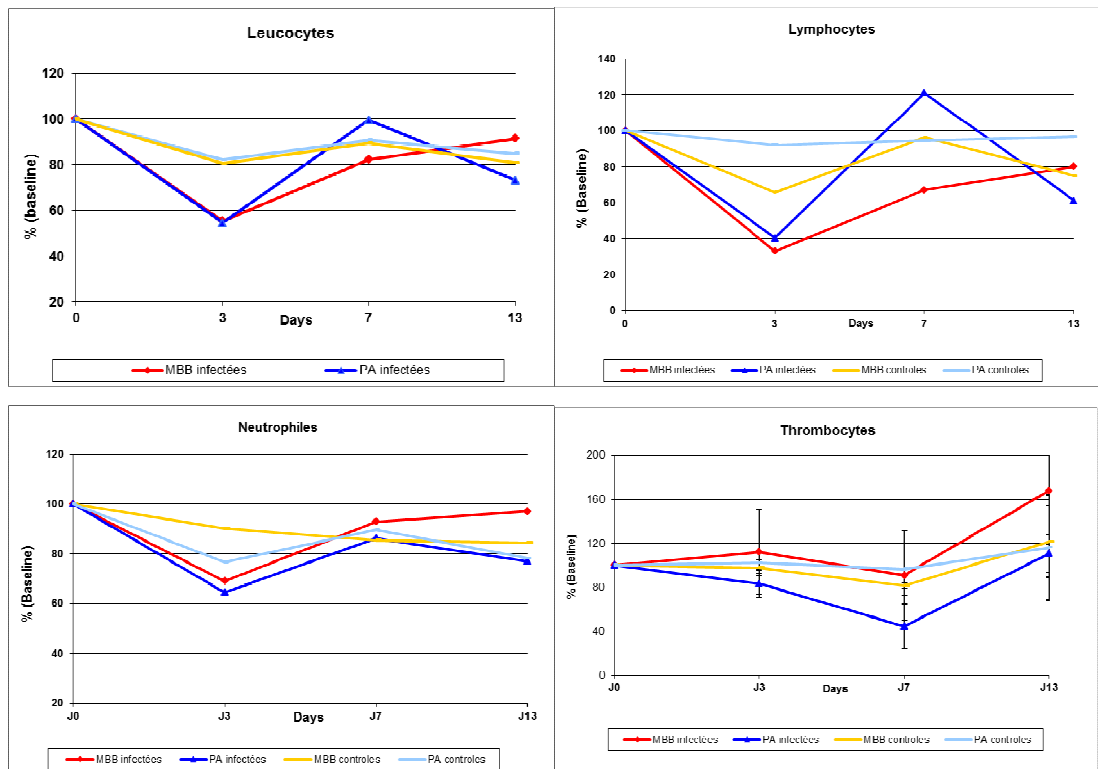


Figure 17 : Evolution de la proportion (en % par rapport à la ligne de base) de leucocytes, lymphocytes, neutrophiles et thrombocytes des moutons.

3. Lésions

- **Macroscopiques**

En plus des lésions visibles lors de l'évaluation clinique, les lésions macroscopiques étaient les suivantes.

A J2 post-infection, un mouton Préalpes infecté (n° 90359) présentait une bronchopneumonie de type alvéolaire au niveau du lobe crânial droit, d'évolution subaiguë et donc probablement non imputable à l'infection par le BTV-8. Les deux autres moutons Préalpes, les moutons MBB infectés et les moutons contrôles ne présentaient aucune lésion macroscopique d'intérêt nécropsique.

A J6 post-infection, un mouton Préalpes infecté (n° 90378) présentait une lésion hémorragique à la base de l'artère pulmonaire et une hypertrophie du nœud lymphatique

préscapulaire droit réactionnel. Un deuxième mouton Préalpes infecté (n° 90382) présentait une congestion diffuse des poumons et des suffusions hémorragiques à la base de l'artère pulmonaire. Le troisième mouton Préalpes infecté, les moutons MBB infectés et les moutons contrôles ne présentait aucune lésion macroscopique d'intérêt nécropsique.

A J10 post-infection, un mouton Préalpes infecté (n° 90371) présentait des hémorragies diffuses et de petites tailles (1-5 mm) du lobe pulmonaire crânial droit et une hémorragie à la base de l'artère pulmonaire. Un deuxième mouton Préalpes infecté (n° 90379) présentait des hémorragies de la rate, un œdème pulmonaire diffus avec 20 mL d'un liquide translucide dans la cavité thoracique, une lésion hémorragique à la base de l'artère pulmonaire et 10 mL d'un liquide translucide dans la cavité abdominale. Le troisième mouton Préalpes infecté ne présentait aucune lésion macroscopique d'intérêt nécropsique.

Chez un mouton MBB infecté (n° 98068), une collection liquidienne de 20 mL, de type transudat, a été identifiée entre le rumen et le diaphragme. Les deux autres moutons MBB infectés ne présentaient aucune lésion macroscopique d'intérêt nécropsique, comme les moutons contrôles.

A J22 post-infection, les principales lésions macroscopiques dans le groupe Préalpes infectés étaient : un transsudat 5 à 10 mL dans le sac péricardique et une congestion (photographie 3) du lobe pulmonaire crânial droit pour un mouton (n° 90336) ; le nœud lymphatique préscapulaire droit réactionnel (photographie 4), un vestige de lésion hémorragique à la base de l'artère pulmonaire, une congestion du lobe pulmonaire caudal gauche et 20 à 30 mL d'un liquide translucide dans la cavité thoracique pour un 2^{ème} mouton (n° 90341) ; et des microhémorragies sur le cœur pour un 3^{ème} mouton (n° 90377). Le quatrième mouton Préalpes infecté ne présentait aucune lésion macroscopique d'intérêt nécropsique.

Un mouton MBB infecté (n° 90018) présentait 40 mL d'un liquide translucide dans la cavité abdominale. Les trois autres moutons Martinik Black Belly infectés ne présentaient aucune lésion macroscopique d'intérêt nécropsique, comme les moutons contrôles.



Photographies 3 et 4 : Congestion du lobe pulmonaire crânial droit (mouton n° 90336) ; Nœud lymphatique préscapulaire droit réactionnel (mouton n° 90341).

- **Microscopiques**

L'analyse histologique ne fait pas apparaître de lésions d'intérêt à J2 et J6 post-infection, quel que soit la provenance du mouton. Seul un mouton MBB à J6 présentait dans l'artère pulmonaire quelques infiltrats de cellules mononucléées (lymphocytes, macrophages) dans l'adventice. L'extension était très limitée et l'intensité lésionnelle légère.

A J10 post-infection, les lésions ont principalement été observées dans les gros vaisseaux et chez les moutons Préalpes infectés.

Pour l'artère pulmonaire ces lésions se caractérisaient, pour les 3 moutons Préalpes étudiés, par plusieurs foyers hémorragiques d'étendue limitée dans la média, contenant pour certains des lésions élémentaires de vascularite thrombosante dans des capillaires. Quelques images de leucostase étaient aussi observées dans des capillaires dont les cellules endothéliales étaient turgescents. Seuls quelques foyers d'ischémie dans la tunique media, avec des images discrètes de leucostase à polynucléaires neutrophiles étaient observés dans l'aorte.

Pour les moutons MBB, un animal présentait des lésions similaires aux trois moutons Préalpes et les deux autres moutons MBB ne présentaient aucunes lésions microscopiques.

B. Etude virologique

1. Virémie

- Par RT-qPCR

Les RT-qPCR réalisées sur les moutons Préalpes et MBB infectés montrent des charges en ARN viral dans le sang similaires dans les deux groupes, avec des valeurs fortes à partir de J3 post-infection (Figure 22). Les pics moyens ont été obtenus à J5 et J7 post infection pour les moutons Préalpes et MBB infectés, avec des valeurs de $6,56 \pm 0,77$ et $6,36 \pm 0,77$ respectivement.

Aucune charge en ARN viral n'a été détectée dans les groupes contrôles.

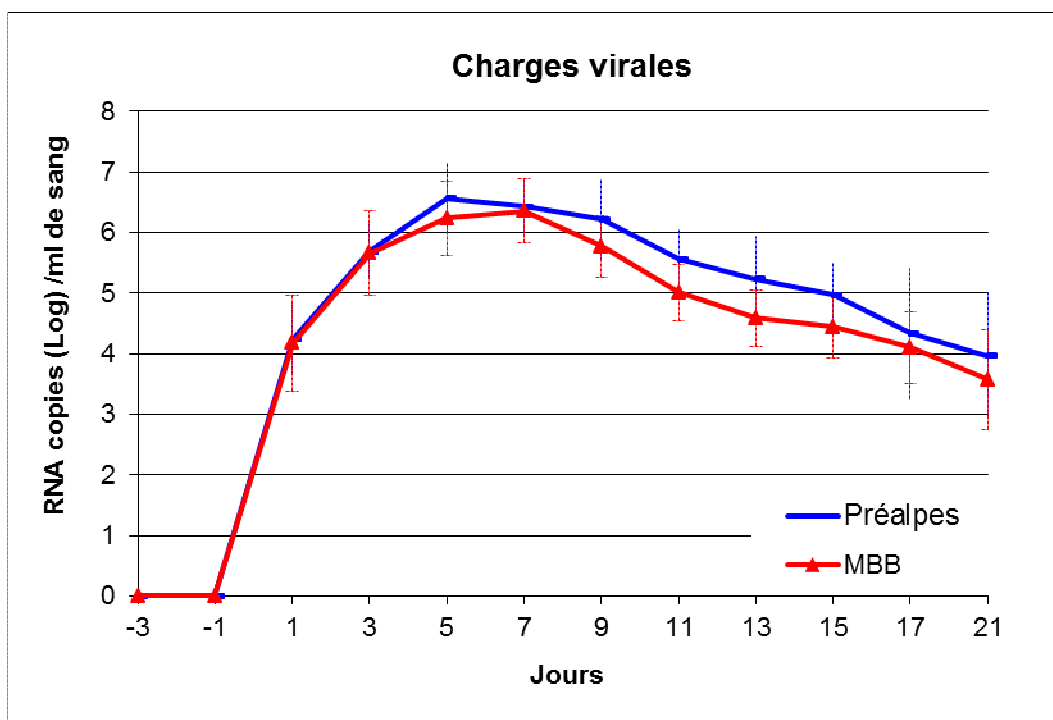


Figure 18 : Evolution des charges virales sanguines des moutons infectés.

- Par isolement viral

Les isolements réalisés montrent une charge en virus infectieux dans le sang qui augmente de façon semblable jusqu'à J3 post-infection pour les deux groupes de moutons infectés à partir du jour de l'inoculation. A partir de J3 post-infection, les charges infectieuses

augmentent pour le groupe Préalpes alors qu'elles atteignent un plateau pour le groupe MBB. A J17 post-infection, aucun virus n'a pu être isolé. Des différences significatives ont pu être observées entre les deux groupes à J7 et J10 post-infection.

L'isolement s'est révélé négatif pour tous les animaux du groupe contrôle.

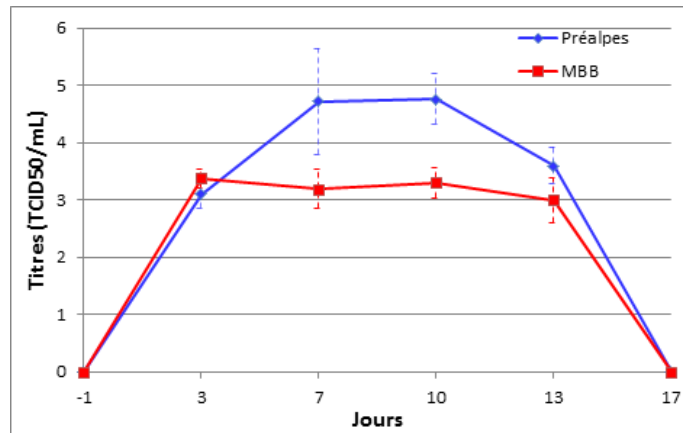


Figure 19 : Charges virales infectieuses dans le sang en TCID₅₀/mL.

2. Détection virale tissulaire

La détection du BTV par RT-qPCR dans les prélèvements tissulaires (poumons, rate, nœuds lymphatiques médiastinal et pré-scapulaire du site d'injection) est représentée à la figure 24.

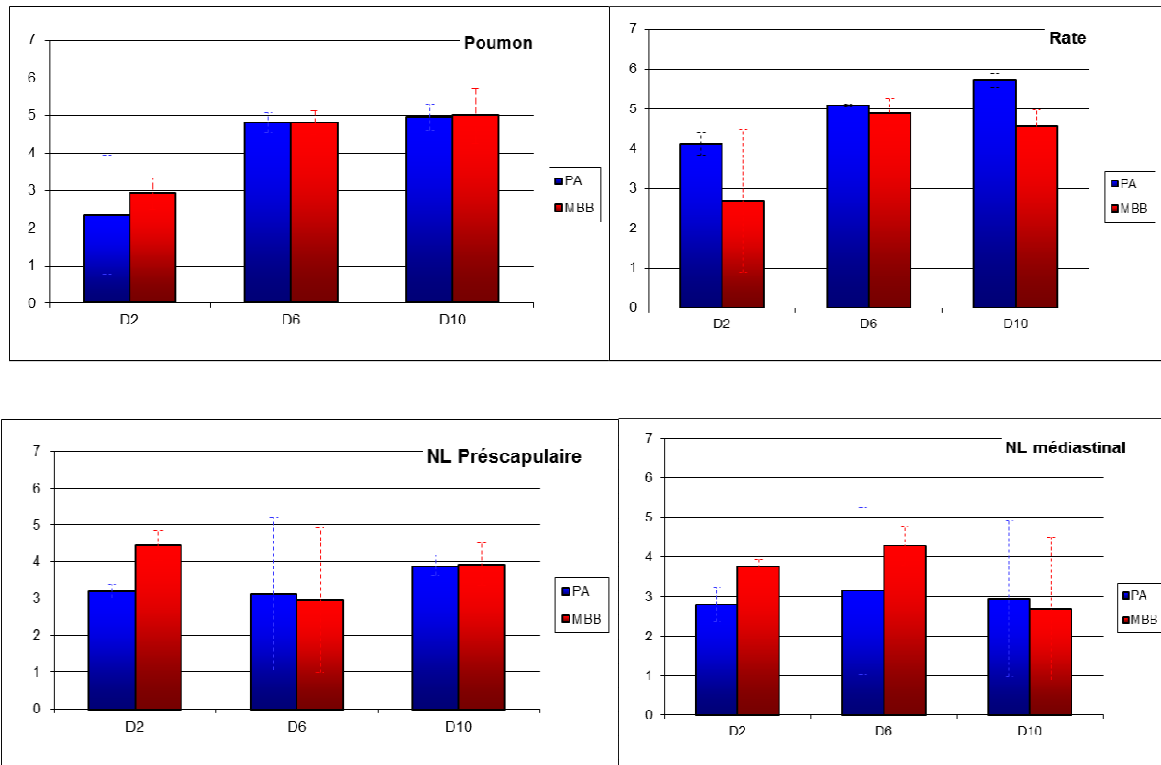


Figure 20 : Titres BTV en Log10 de copies d'ARN par 100 mg de tissus pour les moutons Préalpes (bleu) et MBB (rouge) infectés à J2, J6 et J10 post-infection, respectivement dans les poumons, la rate et les nœuds lymphatiques pré scapulaire (du site d'injection) et médiastinal. Trois moutons pour chaque groupe et à chaque temps ont été analysés.

Du virus BTV a pu être détecté dans la grande majorité des tissus prélevés et dans les deux races. A J6 et J10 post-infection, les charges virales sont supérieures, pour les deux groupes, dans les poumons et la rate par rapport aux nœuds lymphatiques. Elles sont aussi supérieures à celles observées à J2 pour les poumons et la rate. Enfin, il semblerait que les charges virales soient légèrement supérieures pour le groupe MBB dans les nœuds lymphatiques à J2 (NL préscapulaire et médiastinal) et J6 (NL préscapulaire). Toutefois il n'a pas pu être observé de différences significatives entre les deux groupes, sauf à J2 pour le NL préscapulaire.

C- Etude de la réponse de l'hôte

1. Réponse immunitaire humorale

- Par ELISA

Les ELISA de compétition VP7 réalisés sur les 3 groupes d'animaux montrent une séroconversion semblable entre les moutons Préalpes infectés et les moutons MBB infectés. Tous les animaux infectés ont converti à J5 post-infection (seuil de positivité à 45 % d'inhibition), avec maximum d'inhibition atteint à J11 post-infection.

Les moutons contrôles sont tous restés séronégatifs tout au long de l'expérimentation.

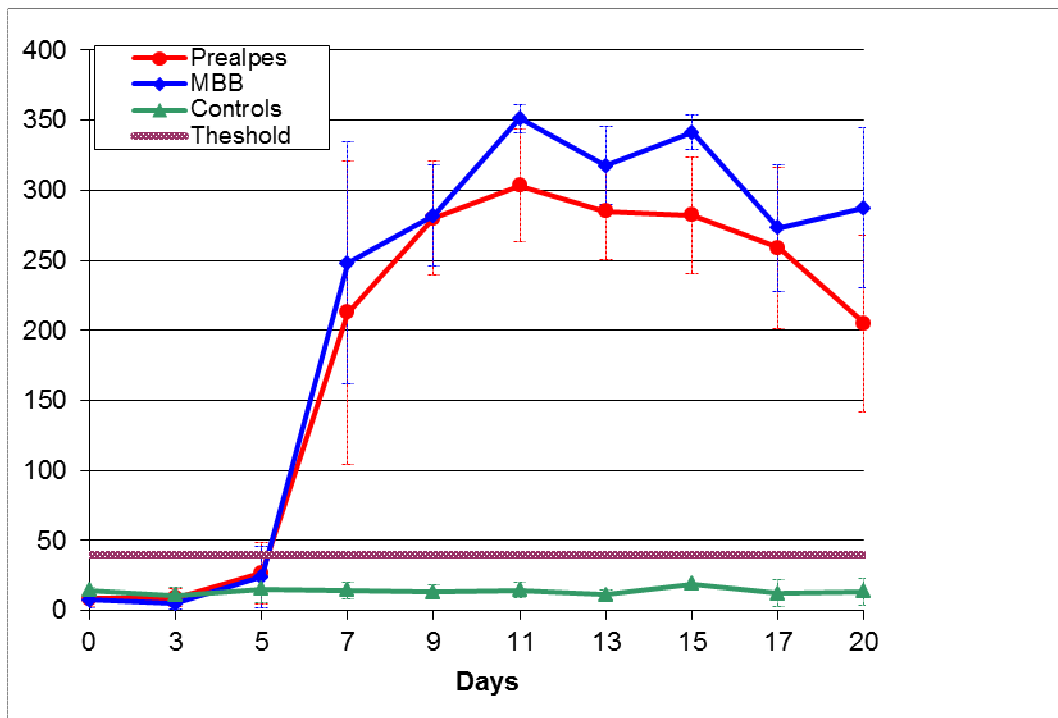


Figure 21 : Evolution de la réponse en anticorps anti-VP7.

- Par séroneutralisation

Les séroneutralisations réalisées sur les moutons infectés montrent une réponse en anticorps neutralisants dès J7 post-infection pour les moutons MBB et dès J9 post-infection

pour les moutons Préalpes. A partir de J9 post-infection, les titres en anticorps neutralisants des deux groupes sont semblables.

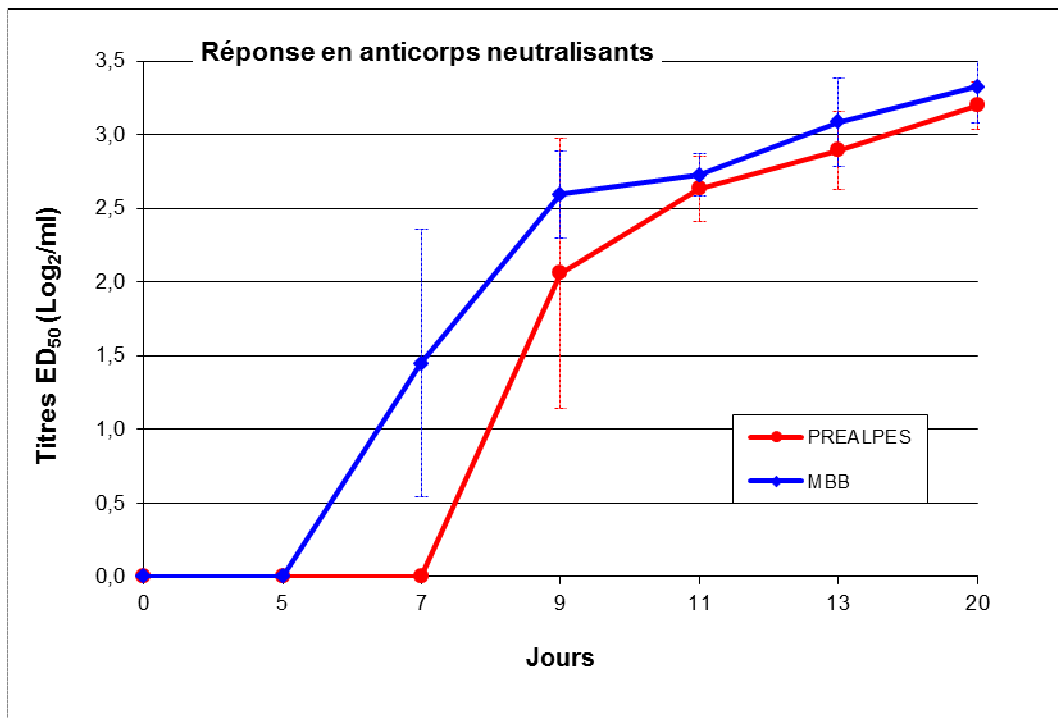


Figure 22 : Evolution de la réponse en anticorps neutralisant.

2. Réponse immunitaire innée

2.1. Réponse en interférons de type I

Les titrages des interférons de type I montrent une réponse rapide de l'immunité innée chez les animaux infectés, au moins pour les moutons Préalpes. A J6 post-infection, les titres décroissent pour arriver à leur niveau de base à J10 post-infection. Une différence significative a pu être observée entre les deux groupes à J2 post-infection.

Les moutons contrôles n'ont pas synthétisé d'interférons de type I.

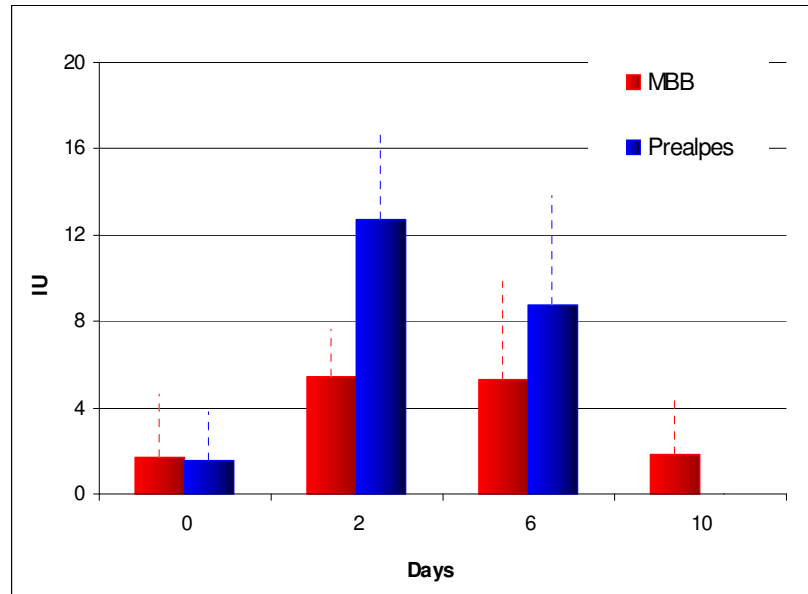


Figure 23 : Evolution de la réponse en interférons de type I.

2.2 Réponse transcriptomique des cellules du sang

2.2.1. Analyse de l'expression des gènes dans chaque groupe

L'étude de la réponse transcriptomique a été réalisée hors du travail de thèse, nous décrivons dans ce paragraphe les principaux résultats en cours d'analyse qui ont été obtenus.

L'analyse transcriptomique des cellules du sang a montré qu'un grand nombre de gènes était sur- ou sous-exprimés pour les moutons Préalpes (n= 1297) par rapport aux moutons MBB (n= 278) (Figure 28).

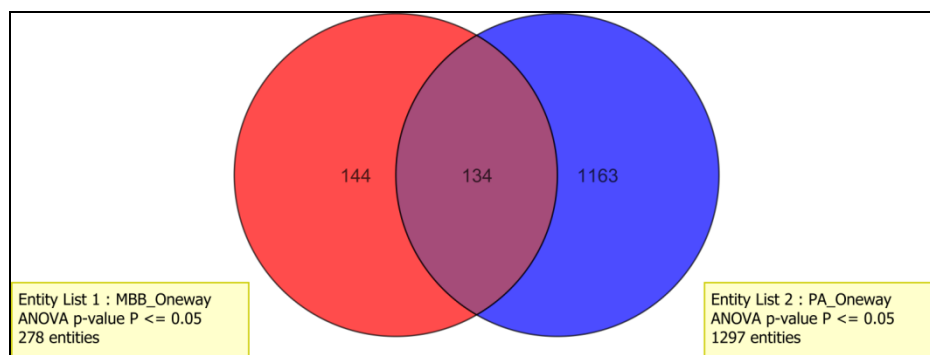


Figure 24 : Analyse comparative du nombre de gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes de moutons infectés.

En prenant un « fold change » de +/- 2, les différences d'expression (par rapport à J0) se retrouvent principalement à J2 post-infection où 479 gènes sont différentiellement exprimés pour les moutons Préalpes et seulement 70 pour les moutons MBB (Tableau 5).

Tableau 5 : Nombre de gènes sur- ou sous-exprimés avec un fold-change > 2 ou < -2 dans les deux groupes infectés.

Genes régulés (FC >2)	MBB	Préalpes	Communs
Jour 2/Jour 0	70	479	24
Jour 6/Jour 0	134	196	77
Jour 10/Jour 0	79	94	50

Pour le groupe Préalpes, sur les 1297 gènes différentiellement exprimés, 153 gènes le sont chez tous les animaux testés et aux différents temps après infection. Ces gènes ont pu être regroupés en 4 clusters et les gènes identifiés soumis à une analyse logicielle (Innate DB) pour évaluer leurs fonctions. Deux clusters principaux ont été observés impliqués dans la réponse interférons de type I et l'induction d'une réponse cellulaire.

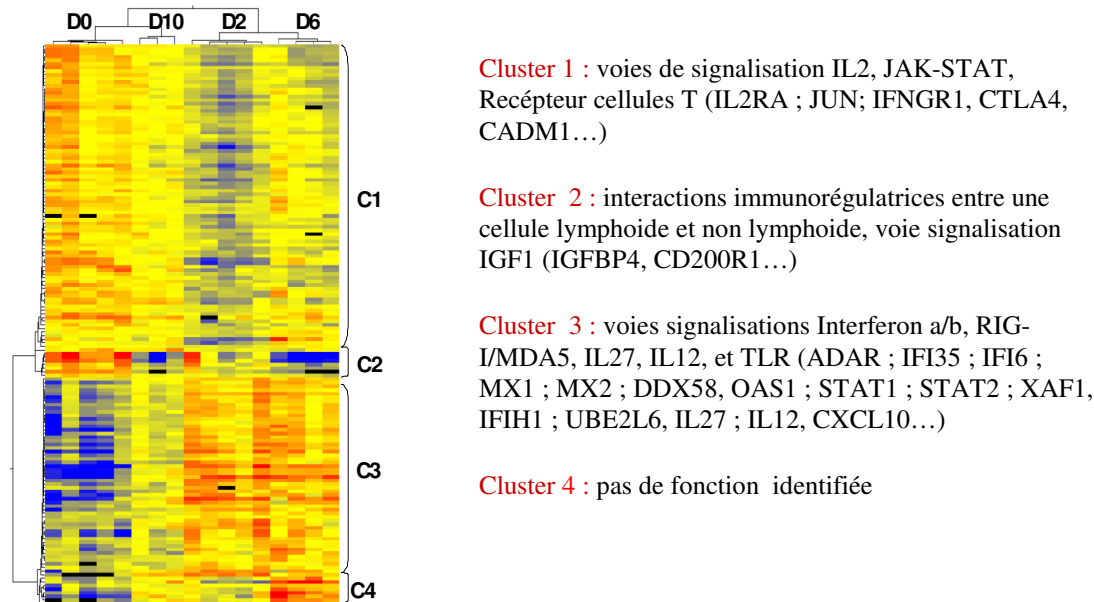


Figure 25 : Gènes sur- (FC > 2, rouge) ou sous-exprimés (FC < -2, bleu) chez tous les animaux du groupe Préalpes.

Pour le groupe MBB, seuls 18 gènes sur les 298 sont différentiellement exprimés chez tous les animaux du groupe et à tous les temps. Parmi eux, 11 gènes codent des protéines de type cytokines ou chimiokines (CXCL10, CCL4, CCL5 (RANTES) MARCKSL1, TIFA, MX2, MX1, DDX58, ISG15, IFI35 et CCL7 (MCP-3)) ou des protéines impliquées dans la réponse interférons de type I.

Enfin les fonctions biologiques déduites des niveaux d'expression différentielle des gènes ont été étudiées au moyen du logiciel « Ingenuity » et sont présentées à la Figure 30.

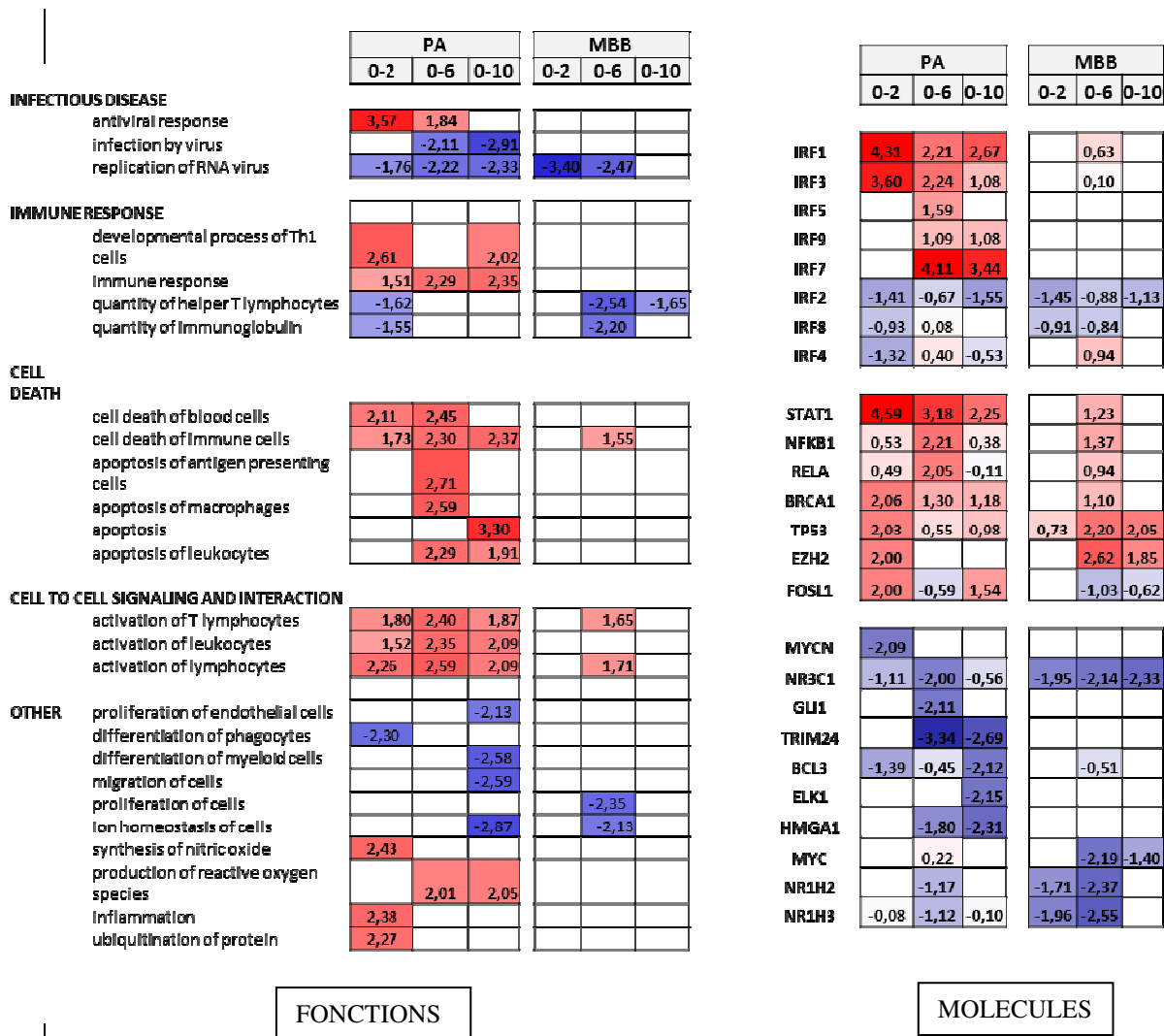


Figure 26 : Tables des valeurs prédictives de l'activation (en rouge) ou la répression (en bleu) des fonctions biologiques et des molécules régulatrices des différentes voies de signalisation cellulaires (valeurs statistiquement significatives pour un score Z > 2 ou < 2 (Ingenuity pathway), les scores Z sont indiqués dans les boîtes).

2.2.2. Analyse comparative entre moutons Préalpes et MBB

L'analyse comparative entre les moutons Préalpes et MBB, pour chaque jour, a permis de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes pour J2 et J6 post-infection, mais pas pour J10 post-infection (Figure 31).

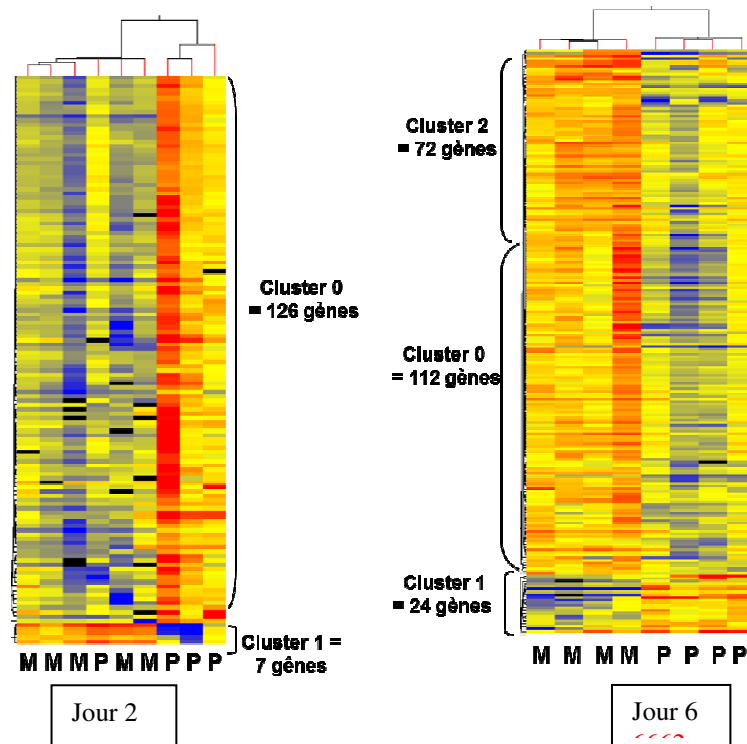


Figure 27 : Gènes différentiellement exprimés entre moutons MBB (M) et Préalpes (P) à J2 et J6 post-infection, avec le nombre de gènes identifiés pour chaque cluster.

A J6 post-infection, l'analyse permet de clairement classer les moutons dans leurs groupes respectifs. A J2 post-infection, un mouton Préalpes a montré un profil identique aux moutons MBB.

Une analyse rapide (Innate Database) des différents clusters ($p < 0,001$) fait ressortir les fonctions suivantes :

- Pour le cluster 0 à J2 : métabolisme cellulaire, réponse cellulaire T et voie de signalisation TLR.
- Pour le cluster 2 à J6 : mort cellulaire et apoptose.
- Pour le cluster 0 à J6 : maintenance des vaisseaux.
- Pour le cluster 1 à J6 ($p < 0,05$) : réponse cellulaire T.

IV- Discussion

Des observations en conditions naturelles suggèrent des différences de sensibilité à la FCO selon la race. Ainsi, les races ovines des régions subtropicales, où la maladie est endémique, seraient plus résistantes, alors que les races ovines européennes dites améliorées, naïves, seraient plus sensibles. Les mécanismes à l'origine de ces différences de sensibilité sont actuellement inconnus.

L'objectif de cette étude était de démontrer l'existence d'une différence de sensibilité entre la race Martinik Black Belly et la race Préalpe, en condition expérimentale et de déterminer les mécanismes impliqués dans ces différences.

Au cours de cette étude, les signes cliniques observés dans le groupe Préalpes et les lésions macroscopiques et microscopiques mises en évidence par l'abattage séquentiel correspondaient à ceux observés sur le terrain (Elbers et al., 2008) et décrits dans la littérature (Darpel et al., 2007, Backx et al., 2007, Worwa et al., 2010), aussi bien en termes de nature (hyperthermie, œdème et congestion de la face et des membres) que de cinétique (du 5^{ème} au 18^{ème} jour post-infection, avec un pic de sévérité au 7^{ème} jour post-infection).

Toutefois, aucune forme grave n'a été obtenue (amaigrissement rapide et important, difficultés respiratoires). Lors d'infection expérimentale, les signes observés sont rarement sévères. La virulence naturelle de la souche utilisée, la préparation de l'inoculum par passages consécutifs sur moutons et la voie d'inoculation sont autant de paramètres qui peuvent influencer la sévérité d'une infection expérimentale.

La souche utilisée est une souche qui fût isolée en France lors de l'épidémie de 2007 à partir d'un troupeau de moutons présentant des signes cliniques sévères de FCO. Cette souche a été isolée sur œufs embryonnés et a ensuite subi 7 passages en cellules BHK21. Pour réadapter la souche à l'hôte naturel, nous avons préparé l'inoculum par 2 passages consécutifs sur moutons. Les données bibliographiques suggèrent en effet que le passage sur culture cellulaire atténue rapidement le BTV (Mclachlan et al., 2009). Le choix de l'inoculation intraveineuse repose sur un modèle reconnu dans la littérature comme permettant de reproduire fidèlement une infection naturelle et ayant permis d'obtenir des formes sévères (MacLachlan et al., 2008). Le choix non commun d'y ajouter la voie sous-cutanée reposait sur un modèle préalablement établi au sein de l'équipe pour reproduire une infection clinique

chez le mouton de race Lacaune (Top et al., 2012). Lors de cette étude, les signes cliniques observés dans le groupe contrôle non vacciné étaient apparus plus sévères entraînant l'euthanasie, pour raison éthique, de deux moutons sur les cinq inoculés. Les différences majeures entre les 2 études sont d'une part des passages intermédiaires sur mouton différents mais de même race et d'autre part, la nature des moutons infectés. Lors des passages successifs sur moutons, l'inoculum final est du sang récolté. Même si les titres viraux entre les deux inoculums étaient similaires on peut supposer que la variabilité individuelle de réponse de l'hôte (réponse inflammatoire, présence d'anticorps neutralisants) puisse en partie expliquer les différences observées. L'âge des animaux utilisés dans les deux études était le même. Les races Préalpes et Lacaune sont des races proches qui possèdent le même rameau génétique, ces deux races se sont avérées cliniquement sensibles au BTV-8 lors de l'épizootie de 2007-2009. Par contre, les moutons Préalpes provenaient d'une station d'élevage de l'INRA et les moutons Lacaune avaient été achetés en fermes indemnes de FCO. Des facteurs de risque liés à l'élevage pourraient en partie expliquer les différences observées.

Au-delà de la méthode de préparation de l'inoculum, la ou les voies d'inoculation semble(nt) joué sur la sévérité de la maladie obtenue en conditions expérimentales. La voie sous-cutanée se rapproche de celle observée lors d'une infection naturelle (pique de *Culicoïde*). Des études utilisant cette voie ont montré son efficacité par l'obtention de cas sévères de la maladie (Worwa et al., 2010, Darpel et al., 2007). D'autres études utilisant la voie d'inoculation intraveineuse ont montré son efficacité (Maclachlan et al., 2008). Toutefois dans notre étude, nous ne pouvons dire si l'association des 2 voies d'inoculation apporte un plus en termes de pathogénicité dans la mesure où ce protocole n'a jamais été directement comparé à l'utilisation de voies uniques d'injection.

Par ailleurs nous aurions aussi pu travailler avec la race Mérinos, connue pour être cliniquement extrêmement sensible à l'infection par le virus BTV et souvent utilisée en expérimentation animale. L'obtention de moutons Mérinos était impossible à la période souhaitée.

Lors de cette étude, nous avons montré, pour la première fois en conditions expérimentales, une différence de sensibilité clinique entre les deux races. En effet les moutons MBB se sont avérés pour 95% d'entre eux complètement résistants à la maladie. Seul un mouton a présenté une forme clinique très légère. Cette expérience a été menée sur 19 moutons par groupe, ce qui, compte tenu des contraintes expérimentales, peut déjà être

considéré comme significatif. Une reproduction de ce modèle comparatif d'infection expérimentale permettrait toutefois de confirmer les différences de susceptibilité entre races ovines.

La différence de sensibilité clinique est principalement corroborée par le suivi clinique des animaux. En effet, les données de l'hématologie ne montrent que peu de différences entre les deux groupes si ce n'est pour la numération plaquettaire où une thrombocytopénie a pu être détectée chez les moutons Préalpes infectés du 3^{ème} au 10^{ème} jour post-infection. Une leucopénie a également été observée dès le 3^{ème} jour post-infection chez les deux lots de moutons infectés, avec un retour à la normal plus précoce pour les moutons MBB, dès le 7^{ème} jour post-infection. Ceci semblerait cohérent avec les lésions hémorragiques observées principalement chez les moutons Préalpes infectés. Les résultats de l'hématologie sont cependant à prendre avec beaucoup de précautions car nous avons rencontré plusieurs obstacles pratiques à leur réalisation dans les unités expérimentales (commandes en urgence de kits avec délai dans la réalisation des numérations, calibration de l'appareil pour les moutons ?).

Les lésions macroscopiques confirment une dominante du tableau lésionnel hémorragique chez les moutons Préalpes par rapport aux moutons MBB, même si elles apparaissent modérées, notamment par rapport à la clinique observée. La sévérité des lésions n'est toutefois pas toujours le reflet de la sévérité de l'atteinte clinique. Elle serait d'avantage liée à la durée d'évolution de la maladie (Maclachlan et al., 2009).

Par ailleurs, lors de signes cliniques sévères de FCO, sont souvent observées des lésions macroscopiques minimales et des lésions histopathologiques modérées dans les sites primaires d'infection (poumons, gros vaisseaux, nœuds lymphatiques) (Maclachlan et al., 2008). La pathogénicité s'expliquerait alors par une atteinte fonctionnelle et pas forcément lésionnelle de la perméabilité des vaisseaux. En effet, des études montrent que lors de cas sévères de FCO, de fortes modifications des facteurs de coagulation sont observés, associées à peu de lésions tissulaires, suggérant que les effets indirects sur les cellules endothéliales participent à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, responsable des signes cliniques observés (Howerth et al., 1998, Maclachlan et al., 2008). Ces effets indirects seraient induits par des médiateurs tels que les facteurs de nécrose tissulaire (TNF), les interleukines (IL-1 et 6) et les interférons (IFN-I) (De Maula et al., 2001 ; 2002).

Les RT-qPCR réalisées sur les moutons infectés montrent une charge en ARN viral dans le sang similaire dans les deux races. Celle-ci augmente rapidement à partir du jour de l'infection jusqu'au 5^{ème} jour post-infection puis décroît lentement, ce qui est en accord avec ce qui est décrit dans d'autres infections expérimentales (Darpel et al., 2007, Backx et al., 2007, Worwa et al., 2010). Ces résultats sont confirmés lors de la détection du BTV dans les prélèvements tissulaires des moutons infectés euthanasiés au 2^{ème}, 6^{ème} et 10^{ème} jour post-infection. Ils indiquent que la différence de sensibilité clinique entre les deux races n'est pas expliquée par une différence du niveau d'infection du sang. On ne peut toutefois exclure dans cette étude une différence de réceptivité des cellules des tissus cibles, comme par exemple une différence au niveau des récepteurs au virus. Le récepteur spécifique au BTV n'est pas identifié. La présence de virus dans les prélèvements tissulaires peut s'expliquer par la présence du virus dans la microcirculation. Pour évaluer une différence de tropisme cellulaire, il aurait fallu à minima faire de l'immunohistochimie sur les coupes tissulaires. Cela n'a pas été possible, les 10 anticorps que nous avons testé, ne fonctionnaient pas avec cette technique.

Par ailleurs compte tenu des valeurs des charges virales et des résultats de l'isolement, il est clair que des moutons MBB infectés par le BTV sont contagieux pour les *Culicoides*. Cela est d'autant plus inquiétant qu'ils ne peuvent être détectés sur base de l'observance clinique.

Les isolements réalisés montrent une charge en virus infectieux dans le sang qui augmente de façon semblable pour les deux groupes de moutons infectés à partir du jour de l'inoculation, puis atteint un plateau le 3^{ème} jour post-infection pour les moutons MBB infectés et le 7^{ème} jour post-infection et à un titre supérieur pour les moutons Préalpes infectés. Il n'a pas été réalisé lors de cette étude d'isolement viral à partir des prélèvements tissulaires. Des différences de charge infectieuse sont toutefois observées entre J3 et J5 post-infection, ce qui n'est pas le cas quand on utilise la PCR quantitative.

L'isolement viral permet de mettre en évidence les particules virales infectieuses, alors que la PCR ne permet pas d'en distinguer que le matériel génétique. Ceci traduirait donc une charge virale initiale similaire, mais une destruction ou une neutralisation du virus plus précoce et donc à un titre viral plus faible par les moutons MBB. Cela est corrélé avec une détection plus précoce des anticorps neutralisants dès 7 jours chez la race résistante et 9 jours chez les Préalpes.

Les données bibliographiques montrent d'ailleurs que les manifestations cliniques sont liées à la charge infectieuse et pas forcément à la charge en ARN (Worwa et al., 2010). Toutefois, les moutons MBB n'ont développé aucune clinique alors que du virus a été isolé dans le sang, certes à des titres inférieurs.

Les titrages des interférons de type I montrent une réponse rapide de l'immunité innée chez les animaux infectés pour les deux races. Celle-ci est toutefois significativement plus importante au 2^{ème} jour post-infection pour les moutons Préalpes que pour les moutons MBB. Si les IFN rendent les cellules infectées refractaires à la multiplication du BTV, ils n'empêchent pas la persistance du virus dans l'organisme (Maclachlan et al., 1994), ce qui est compatible avec les résultats de RT-qPCR obtenus mais contradictoire avec les résultats d'isolement viral. Ceci laisse penser que d'autres mécanismes sont en jeu.

L'analyse transcriptomique des cellules du sang a montré qu'un grand nombre de gènes était sur- ou sous-exprimés pour les moutons Préalpes par rapport aux moutons MBB.

En particulier, les fonctions liées à la réponse immune cellulaire apparaissent amplifiées dès le 2^{ème} jour post-infection chez les moutons Préalpes, de même que la réponse IFN-I est surexprimée aux 2^{ème} et 6^{ème} jours post-infection. Ceci est cohérent avec les titrages en IFN-I réalisés. Par ailleurs les analyses comparatives entre les deux groupes montrent que des gènes impliqués dans la réponse immunitaire cellulaire T sont surexprimés au 2^{ème} et 6^{ème} jour post-infection chez les Préalpes par rapport aux MBB.

A l'inverse l'infection à BTV-8 dans la race MBB semble activer peu de gènes (principalement des chimiokines) et peu de fonctions ressortent de l'analyse par le logiciel Ingenuity. Ceci semble indiquer que la race Martinik Black Belly présente une meilleure tolérance ou résistance à une infection expérimentale au BTV-8 par rapport à la race Préalpes.

Dans l'analyse comparative au 6^{ème} jour post-infection, les gènes impliqués dans la maintenance des vaisseaux sont surexprimés chez les moutons MBB par rapport aux moutons Préalpes.

En bilan, les résultats préliminaires de l'approche transcriptomique semblent indiquer que la différence de sensibilité clinique s'opère très tôt après infection, dès le 2^{ème} jour. Des analyses supplémentaires sont en cours pour affiner ces résultats. Les données de l'approche

transcriptomique ont d'ailleurs été confirmées par des approches quantitatives par PCR pour les principaux gènes sur-ou sous-exprimés.

CONCLUSION

Les objectifs de cette étude étaient (i) de mettre en évidence une variabilité de réponse clinique à l'infection par le BTV entre deux races ovines, (ii) de voir si les différences cliniques observées étaient liées à des différences de réceptivité à l'infection par le BTV-8 et (iii) d'étudier les mécanismes immunitaires impliqués dans ces différences.

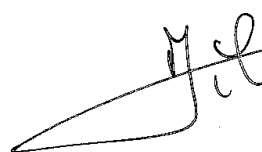

Les résultats montrent qu'une différence de sensibilité clinique et lésionnelle à une infection au BTV-8 existe entre la race Préalpes et la race Martinik Black Belly, cette dernière exprimant moins la maladie. La race Martinik Black Belly présente ainsi une meilleure résistance ou tolérance à la maladie. Cette différence s'expliquerait en partie par un titre infectieux plus faible chez la race MBB, associée à une réponse en anticorps neutralisants plus précoce, ainsi qu'à une réponse innée différente de l'hôte.

L'étude de la réponse transcriptomique des cellules du sang lors d'une infection au BTV-8 chez ces deux races, actuellement en cours, doit permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Gilles MEYER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **SERVERA Alexandre** intitulée « *Infection expérimentale par le virus de fièvre catarrhale ovine : étude de la sensibilité des races ovines* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

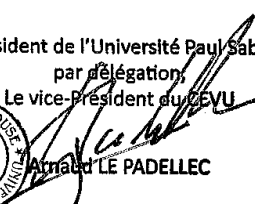

Fait à Toulouse, le 17 DECEMBRE 2013
Professeur Gilles MEYER
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON


Virologie des Ruminants
Ecole Nationale Vétérinaire
23 chemin des Capelles
31076 TOULOUSE Cedex

Vu : 17/12/2013
Le Président du jury :
Professeur Jacques IZOPET
Professeur Jacques IZOPET
Chef de service de Virologie
Plateau Technique d'Infectiologie
Institut Fédératif de Biologie
330, avenue de Grande-Bretagne
TSA 40031 - 31059 TOULOUSE Cedex 9
Tél. 05 67 69 04 22 - Fax 05 67 69 04 25

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
Le vice-Président du CEVU

Arnaud LÉPADELLEC


M. SERVERA Alexandre
a été admis(e) sur concours en : 2008
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012
a validé son année d'approfondissement le : 27/06/2013
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

AFSHAR A (2002). Bluetongue: laboratory diagnosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **17 (3-4)**, 221-242.

Agence française de sécurité sanitaire des aliments (2010). Hors-série spécial FCO. *Bulletin épidémiologique*, **35**.

ALBINA E, ZIENTARA S, SAILLEAU C (2007). La fièvre catarrhale ovine : quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie*, **11**, 63-74.

ALLEPUZ A, GARCIA-BOCANEGRA I, NAPPA S (2010). Monitoring bluetongue disease (BTV-1) epidemic in southern Spain during 2007. *Prev Vet Med*, **96 (3-4)**, 263-271.

ANDREW M, WHITELEY P, JANARDHANA V (1995). Antigen specificity of ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Vet Immunol Immunopathol*, **47 (3-4)**, 311-322.

BACKX A, HEUTINK CG, VAN ROOIJ EMA, VAN RIJN PA (2007). Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats. *The Veterinary Record*, **161**, 591-593.

BACKX A, HEUTINK R, VAN ROOIJ E, VAN RIJN P (2009). Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Vet Microbiol*, **138 (3-4)**, 235-243.

BARROS SC, CRUZ B, LUIS TM (2009). A DIVA system based on the detection of antibodies to non-structural protein 3 (NS3) of bluetongue virus. *Vet Microbiol*, **137 (3-4)**, 252-259.

BARRAT-BOYES SM, ROSSITTO PV, SCOTT JL, MACLACHLAN NJ (1992). Flow cytometric analysis of *in vitro* bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. *Journal of General Virology*, **73**, 1953-1960.

BARRAT-BOYES SM, MACLACHLAN NJ (1994). Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet Microbiol*, **40 (3-4)**, 361-371.

BARRAT-BOYES SM, MACLACHLAN NJ (1995). Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. *JAVMA*, **206 (9)**.

BERNARD A, BENOIT-VALIERGUE H, LEROY I (2008). Observation clinique : un épisode de fièvre catarrhale ovine dans le département de l'Yonne : étude sur le terrain dans l'élevage ovin du centre d'application de l'ENVA à Champignelles. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire Elevage et Santé*, 11-17.

BHATTACHARYA B, NOAD RJ, ROY P (2007). Interaction between bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *J Virol*, **4**, 7.

BOSQUET G (2007). Signes cliniques de la FCO observés sur le terrain dans le Nord et l'Est de la France. *Bulletin des GTV*, **41**, 11-15.

BOYCE M, WEHFRTZ J, NOAD R (2004). Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity. *J. Virol*, **78 (8)**, 3994-4002.

BOYCE M, CELMA CC, ROY P (2008). Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J. Virol*, **82 (17)**, 8339-8348.

BRODIE SJ, WILSON WC, O'HEARN P, MUTHUI D, DIEM K, PEARSON LD (1998). The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virus burden in blood monocytes and tissues by reverse transcription-in situ PCR. *J Virol*, **72 (7)**, 5599-5609.

BUTAN C, TUCKER P (2010). Insights into the role of the non-structural protein 2 (NS2) in bluetongue virus morphogenesis. *Virus Research*, **151** (2), 109-117.

Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD). *La fièvre catarrhale ovine (Bluetongue)* [en ligne]. Disponible sur : <http://bluetongue.cirad.fr/> (consulté le 22/06/2013).

CELMA CC, ROY P (2009). A viral non-structural protein regulates bluetongue virus trafficking and release. *J Virol*, **83** (13), 6806-6816.

CHATZINASIIOU E, DOVAS CL, PANAPASTASSOPOULOU M, GEORGIADIS M, PSYCHAS V, BOUZALAS I, KOUMBATI M, KOPTOPOULOS G, PAPAPOPOULOS O (2010). Assessment of bluetongue viraemia in sheep by real-time PCR and correlation with viral infectivity. *J Virol Methods*, **169** (2), 305-315.

CHAVEAU E, DOCEUL V, LARA E, BREARD E, SAILLEAU C, VIDALAIN PO, MEURS EF (2013). NS3 of Bluetongue Virus interferes with the induction of type I interferon, *J Virol*, **87** (14), 8241. DOI: 10.1128/JVI.00678-13.

DARPEL KE, SHAW AE, KGOSANA L, MÜLLER-DOBLIES UU, TAKAMATSU HH, MELLO PS, MERTENS PPC, OURA CAL (2007). Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *The Veterinary Record*, **161**, 253-261.

DARPEL KE, OURA C, MELLOR P (2008). Overwintering of BTV-8 in the UK and northern Europe. Arbovirology Department, IAH Pirbright.

DARPEL KE, MONAGHAN P, ANTHONY SJ (2009). Bluetongue virus in the mammalian host and the induced immune response. In *Mellor P, Baylis M, Mertens P, Bluetongue*. Londre: Elsevier, 265-284

DE CLERCQ K, DE LEEUW I, VERHEYDEN B (2008). Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type bluetongue virus serotype 8 natural infection. *Transbound. Emerg. Dis*, **55** (8), 352-9.

DEMAULA CD, JUTILA MA, WILSON DW, MACLACHLAN NJ (2001). Infection kinetics, prostacycline release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells. *Journal of General Virology*, **82**, 787-794.

DEMAULA CD, LEUTENEGGER CM, BONNEAU KR, MACLACHLAN NJ (2002). The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology*, **296**, 330-337.

ELBERS ARW, BACKX A, EKKER HM, VAN DER SPEK AN, VAN RIJN PA (2007). Performance of clinical signs of detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006 epidemic in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, **129**, 156-162.

ELBERS ARW, BACKX A, MEROE E, GERBIER G, STAUBACH C, HENDRICKX G, VAN DER SPEK AN, MINTIENS K (2008). Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 21-30.

ELBERS ARW, BACKX A, MINTIENS K, GERBIER G, STAUBACH C, HENDRICKX G, VAN DER SPEK AN (2008). Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 31-40.

ERASMUS BJ (1990). Bluetongue virus. In *Dinter Z, Morein B: Virus infections of ruminants*, New-York: Elsevier **21**, 227-237.

ESCHBAUMER M, HOFFMANN B, KÖNIG P, TEIFKE JP, GETHMANN JM, CONRATHS FJ, PROBST C, METTENLEITER TC, BEER M (2009). Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine*, **27**, 4169-4175.

FERRARI G, DE LIBERATO C, SCAVIA G, LORENZETTI R, ZINI M, FARINA F, MAGLIANO A, CARDETI G, SCHOLL F, GUIDONI M, SCICLUNA MT, AMMADEO D, SCARAMOZZINO P, AUTORINO GL (2005). Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype 2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev Med Vet*, **68 (2-4)**, 103-113.

FORZAN M, MARSH M, ROY P (2007). Bluetongue virus entry into cells. *J Virol*, **81 (9)**, 4819-4827.

FOSTER NM, LUEDKE AJ, PARSONSON IM, WALTON TE (1991). Temporal relationship of viraemia, interferon activity and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. *Am J Vet Res*, **52 (2)**.

GALLEAU S, HAMERS C, BLOSSE A, BOLON A, BLANCHET M, GOUTEBROZE S (2009). Can vaccination prevent transplacental transmission of BTV-8 ?. In *Proc 3rd annual meeting*, 2009, Epizone. Antalya: 71.

GERBIER G, BITEAU-COROLLER F, GUIIS H, TRAN A, ZIENTARA S, BALDET T (2007). Fièvre catarrhale ovine : le point sur l'épidémiologie en Europe fin 2006. *Bulletin des GTV*, **39**, 83-88.

GOUET P, DIPROSE JM, GRIMES JM, MALBY R, BURROUGHS JN, ZIENTARA S, STUART DI, MERTENS PC (1999). The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell*, **97**, 481-490.

GRIMES JM, BURROUGHS JN, GOUE P (1998). The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature*, **395 (6701)**, 470-478.

GUIRAKHOO F, CATALAN JA, MONATH TP (1995). Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles. *Arch Virol*, **140 (5)**, 967-974.

GUYOT H, MAUROY A, THIRY E, LOSSON B, BODMER M, KIRTEN P, ROLLIN F, SAEGERMAN C (2007). Description Clinique des cas de FCO survenus au Nord de l'Europe Durant l'été et l'automne 2006. *Bulletin des GTV*, **39**, 89-96.

HAMERS C, GALLEAU S, CHERY R, BLANCHET M, BESANCON L, CARIOU C, WERLE-LAPOSTOLLE B, HUDELET P, GOUTEBROZE S (2009). Use of inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccine against virulent challenge in sheep and cattle. *The Veterinary Record*, **165**, 369-373.

HAN Z, HARTY RN (2004). The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties. *J Biol Chem*, **279** (41), 43092-43097.

HASSAN SS, ROY P (1999). Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *J. Virol*, **73** (12), 9832-42.

HASSAN SH, WIRBLICH C, FORZAN M (2001). Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role un cellular permeabilization. *J. Virol*, **75** (18), 8356-8367.

HEMATI B, CONTRERAS V, URIEN C, BONNEAU M, TAKAMATSU H, MERTENS P, BREARD E, SAILLEAU C, ZIENTARA S, SCHWARTZ-CORNIL I (2009). Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J. Virol*, **787** (83), 8789-99.

HUNTER P, MODUNO J (2001). A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue vaccine confers homologous protection in sheep. *Onderstepoort J Vet Res*, **68** (4), 331-333.

JAMESON P, SCHOENHERR CK, GROSSBERG SE (1977). Bluetongue virus, and exceptionally potent interferon inducer in mice. *Infection and Immunology*, 321-323.

JEGGO MH, GUMM ID, TAYLOR WP (1983). Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus type. *Res Vet Sci*, **34** (2), 205-211.

JONES LD, CHUMA T, HAILS R (1996). The non-structural proteins of bluetongue virus are dominant source of cytotoxic T cell peptide determinant. *J Gen Virol*, **77** (5), 997-1003.

KAR AK, BHATTACHARYA B, ROY P (2007). Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Mol Biol*, **8**, 4.

KIRSCHVINK N, RAES M, SAEGERMAN C (2007). Impact de l'infection naturelle par le sérotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV-8) sur la qualité de la semence des béliers. *Epidémiologie et santé animale*, **54**, 109-113.

KIRSCHVINK N, RAES M, SAEGERMAN C (2009). Impact of a natural bluetongue serotype 8 infection on semen quality of Belgian rams in 2007. *The Veterinary Journal*, **182**, 244-251.

KOUMBATI M, MANGANA O, NOMIKOU K, MELLOR PS, PAPADOPOULOS O (1998). Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, **64**, 277-285.

KRAMPS JA, VAN MAANEN K, MARS MH, POPMA JK, VAN RIJN PA (2008). Validation of commercial ELISA for the detection of bluetongue virus (BTV)-specific antibodies in individual milk samples of Dutch dairy cows. *Veterinary Microbiology*, **130**, 80-87.

LACETERA N, RONCHI B (2004). Evaluation of antibody response and non-specific lymphocyte blastogenesis following inoculation of a live attenuated bluetongue virus vaccine in goats. *Am J Vet Res*, **65** (10), 1331-1334.

LOBATO ZIP, COUPAR BEH, GRAY CP, LUNT R, ANDREW ME (1997). Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **59**, 293-309.

LE GAL MC, DUFOUR B, GEOFFROY E, ZANELLA G, MOUTOU F, MILLEMANN Y, RIEFFEL JN, POUILLY F (2008). Bluetongue virus serotype 8 in the Ardennes in 2007. *Veterinary Record*, **163**, 668.

MACLACHLAN NJ, OSBURN BI, GHALIB HW, STOTT JL (1985). Bluetongue virus – induced encephalopathy in fetal cattle, *Vet. Pathol*, **22 (4)**, 415-417.

MACLACHLAN NJ, JAGELS G, ROSSITTO PV, MOORE PF, HEIDNER HW (1990). The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Vet Pathol*, **27**, 223-229.

MACLACHLAN NJ (1994). The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*, **17 (3/4)**, 197-206.

MACLACHLAN NJ, CONLEY AJ, KENNEDY PC (2000). Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Anim Reprod*, **60-61**, 643-651.

MACLACHLAN NJ (2004). Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Vet. Ital*, **40 (4)**, 462-467.

MACLACHLAN NJ, OSBURN BI (2008). Induced brain lesions in calves infected with bluetongue virus. *The veterinary record*, **162**, 490-491.

MACLACHLAN NJ, CRAFFORD JE, VERNAU W, GARDNER IA, GODDARD A, GUTHRIE AJ, VENTER EH (2008). Experimental reproduction of severe Bluetongue in Sheep. *Vet Pathol*, **45**, 310–315.

MACLACHLAN NJ, DREW CP, DARPEL KE, WORWA G (2009). The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Path*, **141**, 1-16.

MACLACHLAN NJ, GUTHRIE AJ (2010). Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases. *Vet. Res*, **41**, 35.

MACLACHLAN NJ (2011). Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, **102**, 107-111.

MAHRT CR, OSBURN BI (1986). Experimental bluetongue virus infection of sheep: effect of vaccination: pathologic, immunofluorescent and ultrastructural studies. *Am J Vet Res*, **47** (6), 1198-1203.

MATSUO E, ROY P (2009). Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation. *Virology*, **83** (17), 8842-8848.

MEISWINKEL R, GOFFREDO M, LEIJS P, CONTE A (2008). The Culicoides « snapshot »: a novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of bluetongue in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 98-118.

MELLOR PS (1990). The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors. *Curr Top Microbiol Immunol*, **162**, 143-161.

MONACO F, CAMMA C, SERINI S, SAVINI G (2006). Differentiation between field and vaccine strain of bluetongue serotype 16. *Vet Microbiol*, **116** (1-3), 45-52.

MORTOLA E, NOARD R, ROY P (2003). Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *Journal of Virology*, **78** (6), 2875-2883.

MORTOLA E, NOAD R, ROY P (2004). Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *J Virol*, **78** (6), 2875-2883.

MOULTON JE (1961). Pathology of bluetongue of sheep. *JAVMA*, **138** (9), 493-498.

MULLER U, KEMMERLING K, STRAET D, JANOWITZ U, SAUERWEIN H (2009). Effects of bluetongue virus infection on sperm quality in bull: preliminary report. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.017.

NASON EL, ROTHAGEL R, MUKHERJEE SK (2004). Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *J Virol*, **78** (15), 8059-8067.

NOAD R, ROY P (2009). Bluetongue vaccines. *Vaccine*, **27** (4), 86-89.

Office international des épizooties (OIE). *Fiche technique de l'OIE sur la bluetongue* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bluetongue.pdf> (consulté le 11/06/2013).

OSBURN BI, SILVERSTEIN AM, PRENDERGAST RA, JOHNSTON RT, PARSHAL CJ JR (1971). Experimental viral-induced congenital encephalopathies. I. Pathology of hydranencephaly and porencephaly caused by bluetongue vaccine virus. *Lab Invest*, **25** (3), 197-205.

OSBURN BI (1994). The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, **17** (3-4), 189-196.

OURA CAL, WOOD JLN, SANDERS AJ, BIN-TARIF A, HENSTOCK M, EDWARDS L, FLOYD T, SIMMONS H, BATTEN CA (2009). Seroconversion, neutralizing antibodies and protection in bluetongue serotype 8 vaccinated sheep. *Vaccine*, **27**, 7326-7330.

OWENS RJ, LIMN C, ROY P (2004). Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *J. Virol*, **78**, 2875-2883.

PINI A (1976). A study on the pathogenesis of bluetongue: replication of the virus in the organs of infected sheep. *Onderstepoort J Vet Res*, **43** (4), 159-164.

PIOZ M, GUIZ H, CRESPIAN L, GAY E, CALAVAS D, DURAND B, ABRIAL D, DUCROT C (2012). Why did bluetongue spread the way it did? Environmental factors influencing the velocity of bluetongue virus serotype 8 epizootic wave un France. *PLoS ONE*, **7** (8), e43360.

PURSE BV, BROWN HE, HARRUP L, MERTENS PPC, ROGERS DJ (2008). Invasion of bluetongue and other Orbivirus infections into Europe: the role of biological and climatic processes. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, **27** (2), 427-42.

Réseau français de santé animale (RFSA). *Journée d'information et d'échanges sur la FCO* [en ligne]. Disponible sur : <http://www.rfsa.net/MANIFESTATIONS/2010/QR-FCO-VD-6.doc> (consulté le 17/06/2013).

RICHARDS RG, MACLACHLAN NJ, HEIDNER HW, FULLER FJ (1988). Comparison of virologic and serologic responses of lambs and calves infected with bluetongue virus serotype 10. *Veterinary Microbiology*, **18**, 233-242.

RINALDO CR JR, OVERALL JC JR, GLASGOW LA (1975). Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells. *Infect. MImmun*, **12**, 1070-1077.

ROY P, URAKAWA T, VAN DIJK AA, ERASMUS BJ (1990). Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *Journal of Virology*, 1998-2003.

ROY P (1992). Bluetongue virus proteins. *Journal of General Virology*, **73**, 3051-3064.

ROY P (1996). Orbivirus and their replication. In *Fields Virology*. Third edition, volume 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1709-34.

ROY P (2003). Nature and duration of protective immunity to bluetongue virus infection. *Dev Biol Basel, Karger*, **114**, 169-183.

RUSCANU S, PASCALE F, BOURGE M, HEMATI B, ELHMOUZI-YOUNES J, URIEN C, BONNEAU M, TAKAMATSU H, HOPE J, MERTENS P, MEYER G, STEWART M, ROY P, MEURS EF, DABO S, ZIENTARA S, BREARD E, SAILLEAU C, CHAUVEAU E, VITOUR D, CHARLEY B, SCHWARTZ-CORNIL I (2012). The double-stranded RNA bluetongue virus induces type I interferon in plasmacytoid dendritic cells via a MYD88-dependent TLR7/8-independent signaling pathway. *J Virol*, **86** (10), 5817-28.

SAEGERMAN C, BERKVEN D, MELLOR PS (2008). Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis. Journal*, **14** (4).

SAEGERMAN C, BOLKAERTS B, BARICALLA C, RAES M, WIGGERS L, DE LEEUW I, VANDENBUSSCHE F, ZIMMER JY, HAUBRUGE E, CASSART D, DE CLERQ K, KIRSCHVINK N (2009). The impact of naturally-occurring, trans-placental bluetongue virus serotype 8 infection on reproductive performance in sheep. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.11.012.

SAILLEAU C, BREARD E, ZIENTARA S (2006). La fièvre catarrhale ovine ou bluetongue. *Le Point Vétérinaire*, **252**, 2-5.

SAVINI G, MACLACHLAN NJ, SANCHEZ-VIZCAINO JM, ZIENTARA S (2008). Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparat. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **31** (2-3), 101-120.

SCHWARTZ-CORNIL I, MERTENS PPC, CONTRERAS V, HEMATI B, PASCALE F, BRÉARD E, MELLOR PS, MACLACHLAN NJ, ZIENTARA S (2008). Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.*, **39**, 46.

STAUBER N, MARTINEZ-COSTAS J, SUTTON G (1997). Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyse the unwinding of double-stranded RNA substrates. *J. Virol.*, **71** (10), 7220-26.

OIE Collaborating Centre for Veterinary Training, Epidemiology, Food Safety and Animal Welfare. *Surveillance network for bluetongue* [en ligne]. Disponible sur : <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm/> (consulté le 11/07/2013).

SUTTON G, GRIMES JM, STUART DI (2007). Bluetongue virus VP4 is a RNA-capping assembly line. *Nat Struct Mol Biol.*, **14** (5), 449-451.

TAN BH, NASON E, STAEUBER N (2001). RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to Culicoides cells. *J Virol*, **75** (8), 3937-3947.

TAKAMASU H, MELLOR PS, MERTENS PPC, KIRKHAM PA, BURROUGHS JN, PARKHOUSE RME (2003). A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of insect vector. *J Gen Virol*, **84**, 227-235.

THIRY E, SAEGERMAN C, GUYOT H, KIRTEN P, LOSSON B, ROLLIN F, BODMER M, CZAPLICKI G, TOUSSAINT JF, DE CLERCQ K, DOCHY JM, DUFEY J, GILLEMANN JL, MASSEMAN K (2006). Bluetongue in northern Europe. *The veterinary record*

THIRY E, GAUTHIER JF (2007). La fièvre catarrhale ovine est-elle installée durablement ?. *Le Point Vétérinaire*, **287**, 11.

TOP S, FOUCRAS G, DELPLANCHE M, RIVES G, CALVALIDO J, COTET L, BERTAGNOLI S, MEYER G (2012). Myxomavirus as a vector for the immunisation of sheep: protection study against challenge with bluetongue virus. *Vaccine*, **30** (9), 1609-16.

TOUSSAINT JF, SAILLEAU C, MAST J, HOUDART P, CZAPLICKI G, DEMEESTERE L, VANDENBUSSCHE F, VAN DESSEL W, GORIS N, BREARD E, BOUANAADJA L, THIRY E, ZIENTARA S, DE CLERCQ K (2007). Bluetongue in Belgium. *Emerging infectious diseases*, **13** (4).

VANDERBUSSCHE F, VANBINST T, VERHEYDEN B, VAN DESSEL W, DEMEESTERE L, HOUDART P, BERTELS G, PRAET N, BERKVENNS D, MINTIENS K, GORIS N, DE CLERCQ K (2007). Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Veterinary Microbiology*, **129**, 15-27.

VERONESI E, HAMBLIN C, MELLOR PS (2005). Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine*, **23** (48-49), 5509-5516.

WÄCKERLIN R, ESCHBAUMER M, KÖNG P, HOFFMANN B, BEER M (2010). Evaluation of humoral response and protective efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 one year after vaccination of sheep and cattle. *Vaccine*, **28**, 4348-4355.

WADE-EVANS AM, ROMERO CH, MELLOR P, TAKAMATSU H, ANDERSON J, THEVASAGAYAM J (1996). Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripoxvirus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology*, **220**, 227-231.

WALDVOGEL AS, ANDERSON GA, PHILLIPS DL, OSBURN BI (1992). Infection of bovine fetuses at 120 days gestation with virulent and avirulent strains of bluetongue virus serotype 11. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, **15** (1), 53-63.

WALTON TE (2004). The history of bluetongue and a current global overview. *Vet. Ital*, **40** (3), 31-38.

WHITE DM, WILSON WC, BLAIR CD, BEATY BJ (2005). Studies on overwintering of bluetongue virus in insects. *J. Gen. Virol*, **86**, 453-462.

WILSON AJ, DARPEL K, MELLOR PS (2008). Where does bluetongue virus sleep in the winter?. *PLoS Biol*, **6** (8), e210.

WILSON AJ, MELLOR PS (2009). Bluetongue in Europe: past, present and future. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **364**, 2669-2681.

WORWA G, HILBE M, CHAIGNAT V, HOFMANN MA, GRIOT C, EHRENSPERGER F, DOHERR MG, THUR B (2010). Virological and pathological findings in bluetongue virus serotype 8 infected sheep. *Veterinary Microbiology*, **144** (3-4), 264-273.

YOUNG S, CORDY DR (1964). An ovine fetal encephalopathy caused by bluetongue vaccine virus. *J Neuropathol Exp Neurol*, **23**, 635-659.

ZIENTARA S, SAILLEAU C, BREARD E (2002). Intérêts et limites des outils moléculaires dans le diagnostic et l'épidémiologie de la fièvre catarrhale des ovins. *Emidémiologie et santé animale*, **42**, 109-113.

ANNEXES

Annexe 1 : Grille de notification des signes cliniques

	J0	J1	J2	J3	J4
Température					
Rythme respiratoire					
Rythme cardiaque					
Jetage oculaire 0 = absent 1 = séromuqueux 2 = purulent					
Jetage nasal 0 = absent 1 = séromuqueux 2 = purulent					
Ptyalisme 0 = absent 1 = modéré 2 = sévère					
Cyanose de la langue					
Lésion du museau et chanfrein Nature Extension					
Lésion de la cavité buccale Nature Extension					
Lésions podales (bourrelet coronaire)					
Amaigrissement 0 = absent 1 = modéré 2 = marqué 3 = sévère					
Diarrhée					
Toux					
Autres					

NOM : SERVERA

Prénom : Alexandre

TITRE : Infection par le virus de la fièvre catarrhale ovine : étude de la sensibilité des races ovines

RESUME :

Le virus de la Bluetongue (BTV) a été responsable d'une épizootie sévère en Europe de 2007 à 2010. Cette épizootie a touché aussi bien les ovins que les bovins, alors que les caprins sont apparus plus résistants. L'objectif de cette thèse était d'objectiver la différence d'expression clinique de la fièvre catarrhale ovine entre deux races ovines et d'utiliser ce modèle pour déterminer les mécanismes responsables de la sensibilité clinique au BTV.

Trente béliers indemnes de BTV, âgés de 4 à 5 mois, de race Préalpes et de race Martinik Black Belly (MBB) ont été utilisés. 19 moutons de chaque race ont été infectés par une souche hautement virulente de BTV-8, par voies intraveineuse et sous-cutanée. 11 moutons de chaque race ont servis de contrôles négatifs. Nous avons observé d'importantes différences de sensibilité clinique entre les deux races ovines, les moutons MBB étant apparus très résistants au BTV.

Etonnamment, ces différences n'étaient pas dues à une différence de titre viral des cellules sanguine ou des endothéliums. La réponse en anticorps neutralisants au BTV-8 a été mise en évidence 2 jours plus tôt (soit 6 jours post-infection) chez les MBB que chez les Préalpes, mais était semblable au 21^{ème} jour post-infection. A la lumière de ces résultats préliminaires, des différences d'expression génétique au sein des cellules sanguines entre les races MBB et Préalpes a été mise en évidence. L'analyse de l'expression des gènes suggère que des paramètres intrinsèques à l'hôte semblent influencer sur la sensibilité à la maladie, probablement par la qualité de leur réponse immune innée.

MOT-CLES : Bluetongue, résistance, pathogénie, infection, expérimentation

TITLE: Bluetongue virus experimental infection: study of ovine breeds sensitivity

SUMMARY:

Bluetongue virus (BTV) was responsible for a severe epizootic in Europe between 2007 and 2010. Sheep and cattle were mainly clinically affected by BTV while goats were shown to be more resistant. The objectives of this thesis were to clearly demonstrate clinical differences to BTV between two ovine breeds and to use this model to define the host mechanisms involved.

Thirteen BTV-negative male sheep, between 4 to 5 months of age, of both Lacaune and Martinik Black Belly (MBB) breeds were used. 19 sheep of both breeds were infected for 21 days by intravenous and subcutaneous injections of a highly virulent BTV-8 strain. 11 sheep of both breeds were used as negative controls. We observed highly significant differences in clinical sensitivity between the two ovine breeds. Especially MBB sheep appeared to be highly resistant to BT disease.

Surprisingly, these differences were not explained by differences of BTV-8 distribution and quantification in the blood and endothelia of pm samples. The neutralising antibody responses to BTV-8 appeared two days before (day 6 pi) for MBB than for Lacaune sheep but were similar 21 days pi. Based on preliminary results, differences were observed in the gene expression profiling of blood cells between MBB and Lacaune breeds. Function analysis of genes differentially expressed suggested that at least intrinsic host parameters seem to control the sensitivity to the disease, possibly related to the quality of their innate responses

KEYWORDS: Bluetongue, resistance, pathogenicity, infection, experimentation