



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 : 14680

To cite this version :

Bethune, Marie-Anne. *Influence du génotype viral sur l'infection fœtale par le virus de la maladie de la frontière (border disease)*.
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2015, 129 p.

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

INFLUENCE DU GENOTYPE VIRAL SUR L'INFECTION FŒTALE PAR LE VIRUS DE LA MALADIE DE LA FRONTIÈRE (*BORDER DISEASE*)

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

BETHUNE Marie-Anne
Née, le 11 avril 1989 à Epernay (51)

Directeur de thèse : M. Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :

M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Gilles MEYER

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

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

Directrice : Mme Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- 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. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *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 **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
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*
Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
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*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
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)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*
M. **HERRY Vincent**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur Jacques Izopet

Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Virologie

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Qu'il trouve ici l'expression de nos hommages respectueux.*

A notre Jury de thèse

Monsieur le Professeur Gilles Meyer

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie des Ruminants

*Qui nous a fait l'honneur de nous confier ce travail.
Pour sa disponibilité sans réserve.
Sincères remerciements.*

Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Virologie

*Qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.
Qu'il soit assuré de notre plus grande reconnaissance.*

A Madame le Docteur Céline Pouget

Vétérinaire conseil à la Fédération des Organismes de Défense
Sanitaire de l'Aveyron

Sans qui ce travail n'aurait pu exister.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Martine Moulignié, Charlotte Foret et Angélique Teillaud

*Pour leur travail de fourmi colossal au laboratoire.
Sincères remerciements.*

A Hervé Cassard

Ingénieur de recherche/Praticien hospitalier à l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse

*Pour son aide précieuse lors des prélèvements, examens
cliniques, autopsies et dans le traitement des données.
Sincères remerciements.*

**A Iris, Eve, Pauline, Marie, Perrine, Florian, Dimitri, Amélia,
Julie F., Camille, Antoine, Sajid, Elias, Quentin B. et son coloc,
Alice, Elsa, Julie M., Mickael, Chloé, Elodie, Guilhem, Quentin L.
Colette et les autres**

*Pour leur aide précieuse lors des prélèvements matinaux,
des examens cliniques et des autopsies.
Merci à vous !*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	15
LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION.....	19
Première partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. LES PESTIVIRUS.....	23
1.1 Classification et historique des pestivirus	23
1.2 Organisation structurale et génomique	23
1.2.1 Génome	24
1.2.2 Protéines virales	25
1.3 Variabilité des pestivirus	26
1.3.1 Variabilité biologique	26
1.3.2 Variabilité génétique.....	27
1.3.3 Variabilité antigénique.....	33
1.4 Immunogénicité.....	34
1.4.1 Cinétique de production des anticorps (Loubière, 2012).....	34
1.4.2 Protection croisée entre pestivirus d'une même espèce.....	35
1.4.3 Protection croisée entre pestivirus d'espèces différentes.....	35
1.4.4 Conséquences sur la vaccination	36
2. LA MALADIE DE LA FRONTIERE.....	37
2.1 Historique – Importance de la Maladie de la Frontière	37
2.2 La maladie	37
2.2.1 Pathogénie générale et genèse des infectés permanents immunotolérants (IPI)...	37

2.2.2	Expression clinique	41
2.3	Modalités de transmission	43
2.3.1	Sources animales.....	43
2.3.2	Sources biologiques	43
2.3.3	Transmission horizontale	44
2.3.4	Transmission verticale	44
2.4	Diagnostics et contrôles.....	45
2.4.1	Méthodes diagnostiques (Manuel Terrestre OIE 2005).....	45
2.4.2	Mesures de lutte	51
Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE		55
1. OBJECTIFS.....		57
2. MATERIELS ET METHODES		57
2.1	Cultures cellulaires	57
2.2	Virus et titrage	58
2.3	Animaux	59
2.4	Infection expérimentale	60
2.5	Suivi clinique et hématologique	61
2.6	Suivi sérologique	62
2.7	Suivi virologique	63
2.8	Statistiques.....	64
3. RESULTATS		64
3.1	Infection expérimentale et suivi des mères.....	64
3.1.1	Suivi clinique	64
3.1.2	Hématologie.....	67
3.1.3	Suivi virologique par RT-PCR.....	72
3.1.4	Suivi sérologique par ELISA	73

3.2	Suivi de l'infection fœtale	74
3.2.1	Suivi des avortements	74
3.2.2	Analyse des fœtus	74
3.2.3	Sérologie des fœtus	82
3.2.4	Virologie des fœtus	82
4.	DISCUSSION	85
4.1	Critères de choix du modèle expérimental	85
4.1.1	Choix des souches.....	85
4.1.2	Choix de la voie et de la dose d'inoculation	86
4.1.3	Période d'inoculation et d'autopsie	87
4.2	Etude comparative du pouvoir pathogène des génotypes viraux chez la brebis gestante adulte	88
4.3	Etude comparative de l'infection fœtale par les différents génotypes de pestivirus ..	91
4.4	Souches favorables à l'élaboration d'un modèle expérimental d'infection fœtale	97
	CONCLUSION.....	99
	BIBLIOGRAPHIE	101
	ANNEXES	111

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Organisation structurale d'un pestivirus (Meyer 2012).....	24
Figure 2 : Organisation génomique du virus BVD (Neill, 2013).....	24
Figure 3 : Arbre phylogénétique et dates de divergence estimées des lignées majeures des pestivirus (Liu <i>et al.</i> , 2009)	30
Figure 4 : Arbre phylogénétique établi à partir de la comparaison des séquences NPro de souches de BDV isolées en France entre 1985 et 2006 (Dubois <i>et al.</i> , 2008)	32
Figure 5 : Schématisation de l'ELISA antigène (Meyer, séminaire ENVT 2007)	47
Figure 6 : Schématisation de l'ELISA indirecte (Meyer, séminaire ENVT 2007)	49
Figure 7 : Schématisation de l'ELISA compétition (Meyer, séminaire ENVT 2007).....	50
Figure 8 : Moyenne des températures rectales de J-3 à J20	66
Figure 9 : Moyennes des pourcentages du nombre de leucocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de leucocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation.....	68
Figure 10 : Moyennes des pourcentages du nombre de lymphocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de lymphocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation	69
Figure 11 : Moyennes des pourcentages du nombre de monocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de monocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation	70
Figure 12 : Moyennes des pourcentages du nombre de neutrophiles par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de neutrophiles à J-4, J-3 et J0 avant inoculation	71
Figure 13 : Moyennes des pourcentages du nombre de thrombocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de thrombocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation	72
Figure 14 : Pourcentage des fœtus morts et/ou malformés en fonction de la souche inoculée	75
Figure 15 : Pourcentage des fœtus malformés en fonction de la souche inoculée.....	77
Figure 16 : Pourcentage des fœtus morts en fonction de la souche inoculée.....	77

Figure 17 : Moyenne des poids des fœtus (en kg avec écarts-types) en fonction de la souche inoculée	78
Figure 18 : Longueurs moyennes des tibias (en cm, avec écart-types) en fonction de la souche inoculée	79
Figure 19 : Longueurs moyennes des radius (en cm, avec écart-types) en fonction de la souche inoculée	80
Figure 20 : Distance moyenne atlas-anus (en cm avec écart-types) en fonction de la souche inoculée	81
Figure 21 : Pourcentage de tissus fœtaux PCR-positifs en fonction de la souche inoculée.....	83
Figure 22 : Moyenne des charges virales (en copies d'ARN log ₁₀ /100mg de tissus fœtaux) des cerveaux et thymus PCR-positifs en fonction de la souche inoculée.....	84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des biotypes cp et ncp.....	26
Tableau 2 : Conséquences possibles de l'infection d'un fœtus ovin par le BDV selon le stade de gestation.....	39
Tableau 3 : Incidence des signes cliniques observés avant et après infection expérimentale..	65
Tableau 4 : Nombre de brebis présentant des signes cliniques minimales en fonction des jours et de la souche inoculée.....	65
Tableau 5 : Nombre de brebis PCR-positives en fonction des groupes et des jours post inoculation.....	73
Tableau 6 : Calcul de développement fœtal des agneaux du groupe BDV-5 en jours de gestation	92
Tableau 7 : Pourcentage des fœtus ELISA négatifs et des IPI en fonction de la souche inoculée	96

Liste des photographies

Photographie 1 : Photographie personnelle prise lors des euthanasies d'un fœtus du groupe BVDV-1 présentant de l'arthrogrypose.	75
Photographie 2 : Photographie personnelle prise lors des euthanasies de l'encéphale d'un fœtus du groupe BVDV-1 avec une atrophie cérébelleuse	76

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide Ribonucléique

BDV : Virus de la Border Disease

BVDV : Virus de la Diarrhée Virale Bovine

CP : Cytopathogène

CSFV : Virus de la Peste Porcine Classique

Ct : Cycle threshold = valeur de cycle correspondant au signal seuil

DICC₅₀ : Dose Infectieuse 50% en Culture Cellulaire

ELISA : Enzym Linked Immuno-Sorbent Assay

FODSA : Fédération des Organismes de Défence Sanitaire de l'Aveyron

HS : Sérum équin

IPI : Infecté Permanent-Immunotolérant

Kb : Kilo base

MDBK : Madin-Darby Bovine Kidney cells

MEM : Milieu Essentiel Minimum

NCP : Non Cytopathogène

OIE : Office International des Epizooties

ORF : Cadre Ouvert de Lecture

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

TSV : Tunisian Sheep Virus

UTR : Untranslated Region

INTRODUCTION

La Maladie de la Frontière a été mise en évidence pour la première fois en 1959 sur des ovins vivant à la frontière entre l'Angleterre et le Pays de Galles (Border Disease, BD). Elle a depuis été rapportée dans de nombreux pays dont l'Amérique du Nord, l'Australie, la Nouvelle-Zélande et la plupart des pays d'Europe.

C'est une affection virale qui touche principalement les ovins. Les caprins peuvent également être contaminés, cependant la maladie est moins décrite. Elle est causée par un Pestivirus, principalement le virus de la Border Disease (BDV). Toutefois il arrive que le virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) contamine également les petits ruminants.

En France, une forme suraiguë de la maladie alors dénommée « petega ovina » toucha le bassin de Roquefort dans les années quatre-vingt. Cependant la maladie était déjà présente depuis longtemps et connue sous différents noms tels que : l'entérite-leucopénie ovine ou agneaux bourrus et trembleurs. Toutefois, aucune souche de BDV n'avait été isolée auparavant sur le territoire national avant celle responsable de l'épizootie aveyronnaise, dénommée Aveyronite et isolée en 1984.

Une des caractéristiques des pestivirus est leur capacité à infecter le fœtus des femelles gestantes. L'infection fœtal a des implications diverses mais toutes aussi importantes. Les principaux signes évocateurs de la maladie sont ainsi la stérilité des brebis, les avortements (parfois seul symptôme), la mortinatalité des agneaux et la naissance d'agneaux chétifs pouvant présenter des tremblements et une toison hirsute qui font qu'ils sont qualifiés de « hairy-shaker ». Ces symptômes mènent à d'importantes pertes économiques au sein des élevages.

Depuis l'épizootie des années quatre-vingt, de nouvelles souches de BDV ont été isolées, chez les ovins mais aussi l'isard. Elles ont été classifiées en six génotypes différents. Toutefois, contrairement au BVDV, il n'existe que très peu d'études sur la variabilité du pouvoir pathogène en fonction des génotypes viraux, notamment la capacité des différentes souches à passer la barrière transplacentaire et mener à la création d'agneaux infectés permanents immunotolérants (IPI).

Fin des années 1990, la situation sanitaire vis-à-vis du BDV s'était stabilisée jusqu'à l'apparition d'une nouvelle épizootie en 2009. Dès lors, des mesures spécifiques de prévention et de contrôle de la maladie ont été initiées dans le bassin par les organismes locaux (FODSA, GDS). Depuis 2010, les éleveurs vaccinent contre la BD en utilisant des vaccins hétérologues dirigés contre le BVDV, hors AMM et en adaptant les doses (demi ou quart de dose). Ils mettent ainsi à profit les propriétés antigéniques croisées entre le BVDV et le BDV. Cependant, il n'existe actuellement pas de données publiées sur l'efficacité d'une telle vaccination.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'influence du génotype viral de cinq souches différentes de pestivirus sur l'infection fœtale et sur les conséquences directes pour le fœtus.

Plus spécifiquement il est de déterminer la capacité des souches à produire des avortements, malformations congénitales et/ou des animaux infectés permanents immunotolérants.

Cette étude doit aussi permettre de proposer un modèle d'infection fœtale à BDV, non disponible actuellement, pour tester l'efficacité de la protection fœtale des vaccins actuels.

Après une synthèse bibliographique sur les Pestiviroses en générale et la Border Disease en particulier, nous présenterons et discuterons les résultats de notre étude expérimentale.

Première partie

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES PESTIVIRUS

1.1 Classification et historique des pestivirus

Les pestivirus appartiennent à la famille des Flaviviridae (Collett *et al.*, 1988) qui affectent à la fois les humains et les animaux. Cette famille comprend trois genres : les genres flavivirus (virus de la fièvre jaune, virus de la Dengue, virus de l'encéphalite japonaise, virus du West Nile...), hépacivirus (virus de l'hépatite C notamment) et pestivirus. Parmi ces genres, les pestivirus infectent uniquement les animaux et plus particulièrement les ongulés.

La classification actuelle des pestivirus repose sur leurs propriétés biologiques et la nature de l'hôte chez qui ils ont été isolés. Elle regroupe quatre espèces de virus : le virus de la Peste Porcine Classique (CSFV), les virus de la Diarrhée Virale Bovine de type 1 (BVDV-1) et 2 (BVDV-2) et le virus de la Border Disease ou de la Maladie de la Frontière (BDV). Les BVDV et BDV ont été isolés chez des ovins, bovins, caprins et diverses espèces de ruminants sauvages (Peter F. Nettleton *et al.*, 1998). Le BVDV peut aussi infecter exceptionnellement les suidés domestiques. A l'inverse le tropisme du CSFV est plus restreint aux suidés domestiques et sauvages, excepté sur le plan expérimental (Vilcek *et al.*, 1997),

Le virus de la peste porcine classique (CSFV) a été le premier pestivirus isolé au XIX^{ème} siècle aux Etats-Unis et en Europe (Liess *et al.* 1981, Beynon *et al.* 1962).

Le BVDV a été isolé pour la première fois en 1946 au cours d'une épidémie de « grippe intestinale » touchant des bovins adultes (Olafson *et al.*, 1946). En 1953, ce virus a de nouveau été isolé chez de jeunes bovins entre six mois et deux ans. L'infection était de nature sporadique avec de la diarrhée et des ulcères buccaux. La létalité était de 100%. Le tableau lésionnel mis en évidence à l'autopsie recensait des ulcères sur tous les épithéliums pavimenteux malpighiens. C'est ce tableau clinique et lésionnel qui inspira le nom de « maladie des muqueuses » (Ramsey *et al.*, 1953).

En 1959, la Maladie de la Frontière fut décrite pour la première fois chez des ovins à la frontière entre l'Angleterre et le Pays de Galle (Hughes *et al.*, 1959).

1.2 Organisation structurale et génomique

Les pestivirus sont des virus sphériques enveloppés de 40 à 60 nm de diamètre possédant une capsidie icosaédrique entourée d'une enveloppe lipoprotéique (Gardiner *et al.*, 1972).

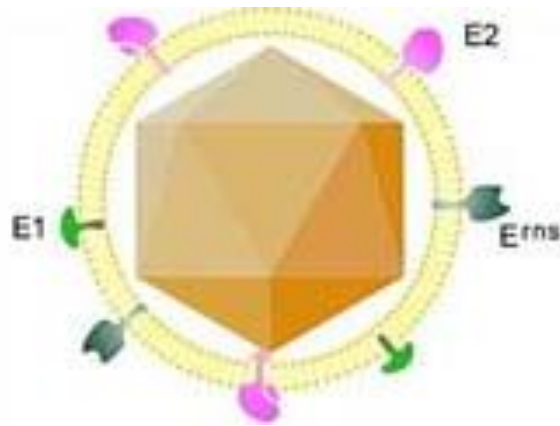


Figure 1 : Organisation structurale d'un pestivirus (Meyer 2012)

1.2.1 Génome

Le génome des pestivirus est composé d'une molécule unique d'un ARN simple brin de polarité positive et d'environ 12kb de long (Vilcek *et al.*, 2006). Il comprend deux extrémités 3' et 5' non transcrites et un long cadre de lecture ouverte (ORF pour Open Reading Frame) codant pour une polyprotéine d'environ 4000 acides aminés (Vantsis *et al.*, 1980).

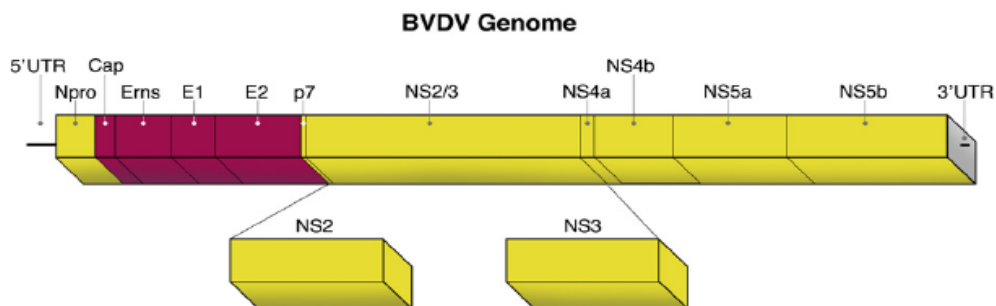


Figure 2 : Organisation génomique du virus BVD (Neill, 2013)

1.2.2 Protéines virales

Après infection, la polyprotéine traduite de l'ARN génomique est clivée par des protéases virales et cellulaires en quatre protéines structurales et huit protéines non structurales.

Parmi les protéines structurales, trois d'entre elles composent l'enveloppe (E0, E1 et E2) et représentent des cibles de choix pour les anticorps anti-virus (en particulier E0 et E2).

La glycoprotéine E0 possède une action ribonucléasique. Il a été démontré récemment qu'elle avait la capacité de se lier aux ARN doubles brins, et ainsi d'interférer avec la réponse interféron de type I de son hôte (Meyers *et al.*, 2007).

La glycoprotéine E2 est transmembranaire et à l'origine de la variabilité antigénique des pestivirus (Weiland *et al.*, 1999). En 2005, Pande *et al.* ont émis l'hypothèse, suite à leurs observations, que cette glycoprotéine pourrait être impliquée dans l'attachement et la pénétration du BVDV dans la cellule hôte. En effet, l'incubation de cellules avec de la protéine E2 recombinante avant et pendant une épreuve infectieuse avec une souche cytopathique de BVDV semble inhiber la pénétration des virions. Par ailleurs, c'est une protéine immunodominante, qui induit une forte réponse en anticorps neutralisants lors d'une infection naturelle ou suite à une vaccination (Pande *et al.*, 2005).

La dernière protéine structurale, est la protéine C et constitue la capsid (Rumenapf *et al.*, 1993).

Les protéines non structurales sont les suivantes : Npro, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a et NS5b.

La protéine Npro a une activité autoprotéolytique lui permettant de se cliver d'elle-même de la polyprotéine. Par ailleurs, en ciblant l'interféron de type 1, elle permet en association avec la protéine E0 un échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte (Szymanski *et al.*, 2009).

La protéine p7 jouerait un rôle dans la maturation glycoprotéique et/ou la morphologie du virus (Elbers *et al.*, 1996).

La protéine NS2-3 est composée de deux sous unités protéiques NS2 et NS3. Ce complexe protéique est clivé en protéines NS2 et NS3 dans les souches de pestivirus possédant un biotype cytopathique (cf infra).

La protéine NS3 possède trois activités enzymatiques majeures. Elle assure le déroulement de l'ARN favorisant la réplication du génome grâce à son ARN hélicase. Elle permet la production des protéines NS4a, NS4b, NS5a et NS5b grâce à sa sérine protéase. Enfin, elle contient un nucléoside triphosphatase, ayant une activité cytotoxique forte à

l'origine des effets cytopathiques. Lorsque les protéines NS2 et NS3 sont couplées, les effets répliatif et cytotoxique sont moindres. La protéine NS3 est très immunogène mais n'induit pas la production d'anticorps neutralisants (Warrener *et al.*, 1995).

Les protéines NS4a, NS4b, NS5a et NS5b jouent un rôle dans la réplication de l'ARN viral (Grassmann *et al.*, 2001).

1.3 Variabilité des pestivirus

1.3.1 Variabilité biologique

Notion de biotype

Il existe deux biotypes viraux dépendant du clivage de la protéine NS2-3 comme nous l'avons vu précédemment : le biotype cytopathique (cp) ou non cytopathique (ncp).

Leur distinction s'établit *in vitro*. En effet, les souches cytopathiques induisent une lyse des cellules sur lesquelles elles sont mises en culture à l'inverse des souches non cytopathiques. Ce comportement *in vitro* d'une souche ne reflète cependant en rien son pouvoir pathogène *in vivo*, la plupart des souches virulentes étant des souches ncp. Les deux biotypes ont des caractéristiques propres permettant de les différencier (tableau 1).

Seuls les biotypes ncp entraînent une virémie et sont donc capables d'induire une infection transplacentaire (Brownlie *et al.*, 1989). Par ailleurs la distribution des souches cp dans l'organisme est très réduite ainsi que leurs capacités de transmission entre individus. En résumé, le biotype ncp apparaît comme le biotype le plus important, d'un point de vue épidémiologique car il est responsable des transmissions horizontale et verticale du virus.

Tableau 1 : Caractéristiques des biotypes cp et ncp (Meyer, 2015)

Biotypes	ncp	cp
Transmission horizontale	+++	+
Transmission verticale	+++	-
Clinique	Signes très variables	Signes minimes
Réponse humorales	Apparition précoce (14 jours)	Apparition tardive (25 jours)

Anticorps neutralisants	Titres élevés, persistance longue	Titres faibles, persistance courte
Distribution tissulaire	Large	Réduite
Virémie	Fréquente	Rare

Les souches cp émergent de souches ncp chez les animaux infectés permanents par des modifications du génome viral de la souche ncp. Ces modifications sont diverses et font suite à des mutations et/ou des insertions de séquences virales ou cellulaires dans le génome, par recombinaison non homologe entre molécules d'ARN. Chaque type cp possède des modifications spécifiques dans son génome. Toutefois, l'insertion d'un gène cellulaire de type ubiquitine est fréquemment identifiée, associé ou non à une duplication du gène NS3.

Quelle que soit la mutation observée, la conséquence est un clivage de NS2-3 avec une surproduction de la protéine NS3 qui, d'une part, augmente les taux de réplication du virus et, d'autre part, exprime son effet cytotoxique par apoptose cellulaire (Peterhans *et al.*, 2010).

Ainsi les biotypes, cp seraient issus des biotypes ncp. C'est ce biotype cp que l'on isole lors de maladie des muqueuses chez les bovins (Nettleton *et al.*, 1998).

Tropisme cellulaire

Les pestivirus se localisent préférentiellement, après une phase virémique, au niveau de l'encéphale, du foie, de la rate et des poumons (Jeffrey *et al.*, 1989, Loken *et al.*, 1991).

Le tropisme cellulaire est fonction du biotype de la souche. Les souches ncp ont un tropisme pour les lymphocytes, monocytes et les organes lymphoïdes ce qui implique que les antigènes viraux sont à rechercher préférentiellement au niveau des organes lymphoïdes. Les souches cp ont un tropisme pour le tube digestif (Hamers *et al.*, 2001).

1.3.2 Variabilité génétique

Les noms des espèces de pestivirus leur ont historiquement été attribués en fonction des hôtes chez lesquels elles avaient été isolées. Il a par la suite été démontré que des infections croisées entre espèces étaient possibles.

Ainsi, alors qu'il est admis que le CSFV est presque exclusivement retrouvé chez le porc et le sanglier, les autres génotypes de pestivirus ont été retrouvés chez les ovins (Vilcek

et al., 1997). De même, une souche de BVDV a été isolée chez des caprins (Becher *et al.*, 1997).

Par ailleurs, des études sérologiques ont permis de montrer que de nombreuses espèces sauvages telles que des cerfs, sangliers, bisons, chamois, girafes *etc.* possédaient des anticorps anti-pestivirus montrant que ces espèces pouvaient également être infectées (Nettleton *et al.*, 1990).

Plus récemment, un important déclin de la population des isards (*Rupicapra pyrenaica*) dans les Pyrénées françaises a conduit à des études de terrain. Celles-ci ont permis de mettre en évidence une nouvelle souche de BD nommée BDV-4 (Hurtado *et al.*, 2004) jugée responsable du déclin observé. Ceci montre l'intérêt de la surveillance épidémiologique des animaux sauvages dans la lutte et la prévention des pestiviroses chez les animaux d'élevage.

Compte tenu de la diversité du spectre d'hôte, les pestivirus ont été classés ces dernières années plutôt en fonction de leur affinité avec des anticorps monoclonaux et finalement de leurs séquences génomiques (Nettleton *et al.*, 1998).

La variabilité génétique des pestivirus est essentiellement due à l'ARN polymérase ARN-dépendante à l'origine de mutations ponctuelles lors des cycles de réplication virale. La fréquence des mutations est estimée à 10^{-4} substitutions/nucléotides, soit environ une erreur toutes les 10kb.

Diversité au sein des pestivirus

La classification officielle des pestivirus reconnaît quatre espèces (Van Regenmortel *et al.*, 2000) :

- BVDV-1 : Diarrhée Virale Bovine de type 1
- BVDV2 : Diarrhée Virale Bovine de type 2
- BDV : Virus de la Maladie de la Frontière
- CSFV : Virus de la Peste Porcine Classique

Cependant depuis de nombreuses années des études phylogénétiques ont été entreprises. Elles ont montré l'importante variabilité génétique des pestivirus et ont aussi permis de proposer une classification génomique. Les premières études consistaient à analyser les séquences conservées de la région 5'UTR et du gène Npro. Ces dernières années certains auteurs proposent en plus d'analyser une partie du gène E2, un des plus variables d'un point

de vue génétique. Ainsi, en 2009, Liu *et al.*, ont proposé une classification phylogénétique plus précise reposant sur l'étude comparative des séquences codant 5'UTR, NPro et E2. Cette classification a mis en exergue quatre autres espèces non classifiées jusqu'à présent :

- Pestivirus de girafe
- BVDV-3
- Antelope/Bungowannah
- TSV

Le pestivirus de girafe, qui est représenté par une souche isolée sur une girafe au Kenya, avait déjà fait l'objet d'une tentative de classification par Plowright *et al.* en 1969. Cependant avec la méthode de Liu *et al.*, il apparaît désormais comme une espèce à part entière de pestivirus.

Le BVDV-3 fait référence à des pestivirus isolés dans un premier temps en laboratoire dans du sérum de veau fœtal, puis sur des bovins en Asie et Amérique du Sud. Ce virus a récemment été isolé en Italie et peut également infecter des ovins (Decaro *et al.*, 2015)

Antelope/Bungowannah fait référence à des pestivirus isolés sur des antilopes aux Etats-Unis et des porcs en Australie.

Enfin, TSV fait référence à des souches tunisiennes isolées sur des ovins et ne rentrant pas dans l'espèce du BDV.

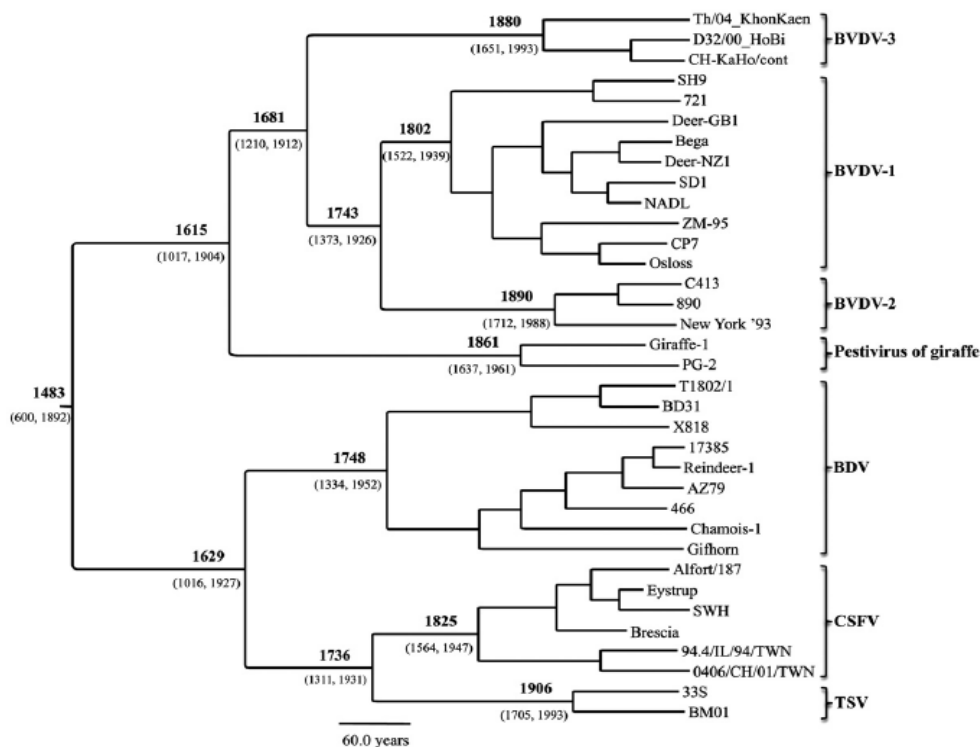


Figure 3 : Arbre phylogénétique et dates de divergence estimées des lignées majeures des pestivirus (Liu *et al.*, 2009)

D'après cette étude, la première divergence au sein des pestivirus aurait eu lieu en 1483. Il y avait à cette époque deux lignées majeures : une d'origine bovine (comprenant le BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3 et le pestivirus de la girafe) et au autre d'origine ovine et porcine (comprenant le CSFV, le BDV et le TSV).

Ensuite, la première évolution pour les pestivirus d'origine bovine concerna le pestivirus de girafe qui divergea et évolua indépendamment de son ancêtre commun en Afrique autour de 1615.

La seconde évolution concerna le BVDV-3, qui divergea en Amérique du Sud ou en Asie de l'Est autour de 1681.

La troisième évolution fut la séparation des BVDV-1 et BVDV-2 autour de 1743 lorsque le BVDV-2 évolua indépendamment en Amérique du Nord. Le BVDV-1 se diversifia ensuite autour de 1802 et se propagea à travers le monde.

La séparation entre les pestivirus ovin et porcine eu lieu en 1629, lorsque leurs hôtes sont devenus spécifiques : les ovins pour le BDV et les porcins pour le CSFV. Le BDV se diversifia en 1748.

Le dernier évènement marquant, fut la séparation entre le TSV et CSFV en 1736.

Diversité au sein du BVDV

Il existe trois espèces de BVDV : le BVDV-1, le BVDV-2 et le BVDV-3. Les deux premiers sont proches sur le plan génétique alors que le génotype BVDV-3 est plus distant des deux premiers. Leurs différences sont donc plutôt attribuées aux différents endroits où ils ont été isolés et à leurs relations antigéniques.

D'après Liu *et al.*, la première séparation concerna le BVDV-3, qui divergea en Amérique du Sud ou en Asie de l'Est autour de 1681. La divergence entre BVDV-1 et BVDV-2 s'est produite en 1743 lorsque le BVDV-2 évolua indépendamment en Amérique du Nord (Liu *et al.*, 2009). Le BVDV-1 se diversifia ensuite autour de 1802 et se propagea à travers le monde.

Vilcek *et al.* ont admis en 2004 que la variabilité génomique (basée sur la comparaison des séquences 5' UTR) au sein du BVDV-1 est comprise entre 76 et 99% et que celle du BVDV-2 est entre 81 et 99% (Vilcek *et al.*, 2004).

Il existe douze génotypes différents au sein du BVDV-1 : BVDV-1a à BVDV-1l alors qu'il n'en existe que trois au sein du BVDV-2 : BVDV-2a, BVDV-2b et BVDV-2c.

Le site internet www.bvdobservatoire.fr dresse la carte de la situation épidémiologique de la BVD actuellement en France. Ainsi, c'est le BVDV-1 qui prédomine actuellement en France avec comme génotypes majoritairement représentés : le BVDV-1b et BVDV-1e.

Pour le moment, il est impossible de corréler un quelconque pouvoir pathogène à un génotype particulier. Le BVDV-1, comme le BVDV-2, est capable d'infecter le fœtus et de provoquer des infections permanentes immunotolérantes. De même, lors d'infection transitoire horizontale, les deux biotypes possèdent des souches peu à très pathogènes. On retrouve cependant plus de souches très pathogènes (entérites sévères ou troubles hémorragiques) chez le BVDV-2.

Diversité au sein du BDV

Il n'existe qu'un génotype de BDV, suggérant que la diversité génétique est moins importante qu'entre, par exemple, le BVDV-1 et le BVDV-2. Toutefois le nombre de souches de BDV séquencées est moins important et la diversité intragroupe est bien réelle (Liu *et al.*, 2009).

Quatre génotypes étaient admis jusqu'en 2008 : BDV-1, BDV-2, BDV-3 et BDV-4. Dubois *et al.*, on mis en évidence deux nouveaux génotypes dans leur étude de 2008 : BDV-5 et BDV-6 (Dubois *et al.*, 2008). Dans cette étude, ils se sont basés sur la variabilité des

séquences de la région Npro pour classifier les génotypes. Le BDV-5 comprend notamment la souche Aveyronite (AV) isolée pour la première fois en France en 1984 sur des ovins.

Par contre, comme pour le BVDV, il n'a pas été attribué sur le terrain de différence de pouvoir pathogène entre génotypes de BDV et il n'existe à notre connaissance que très peu d'études expérimentales s'étant intéressées à ce problème.

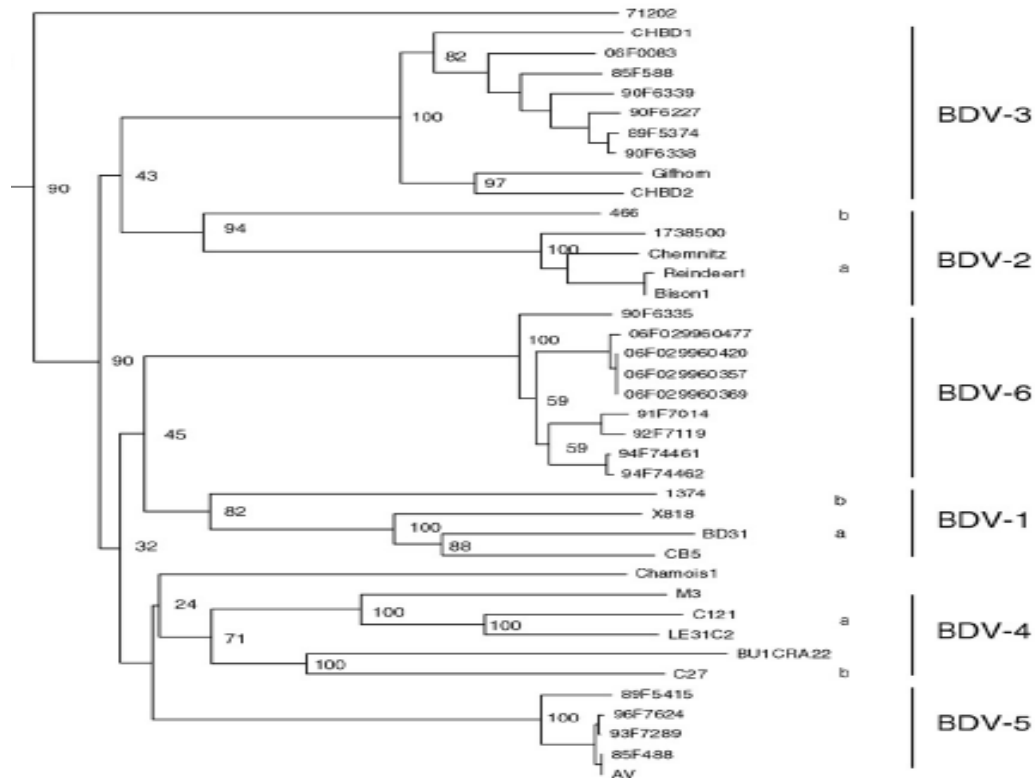


Figure 4 : Arbre phylogénétique établi à partir de la comparaison des séquences NPro de souches de BDV isolées en France entre 1985 et 2006 (Dubois *et al.*, 2008)

Conséquences

Cette variabilité génétique est à prendre en considération lors de diagnostics de laboratoire et notamment lors de réalisations de PCR. En effet, il convient d'adapter les outils diagnostics et notamment les amorces et les sondes de PCR. En cas d'infection par une souche très éloignée génétiquement des souches reconnues par les trousse diagnostics, cela pourrait conduire à l'obtention de résultats faux négatifs. Cependant, la plupart de ces trousse utilisent des régions très conservées pour l'amplification de l'ARN et sont testées vis-à-vis d'un large panel de souches de pestivirus.

1.3.3 Variabilité antigénique

Diversité antigénique des pestivirus

En 1989, Cay *et al.* ont montré que les espèces de pestivirus possédaient des antigènes en commun. En effet, en faisant réagir des anticorps monoclonaux (19 anticorps monoclonaux anti-CSFV, 42 anticorps monoclonaux anti-BVDV, 13 anticorps monoclonaux anti-BDV) de différentes souches de pestivirus (8 souches de CSFV, 16 souches de BVDV et 7 souches de BDV) avec ces mêmes souches, ils ont pu définir des réactions croisées entre ces anticorps monoclonaux et les différentes souches. Les anticorps monoclonaux anti-CSFV réagissaient uniquement avec les souches de CSFV. En revanche, les anticorps monoclonaux anti-BVDV et anti-BDV réagissaient avec toutes les souches montrant que les espèces BDV et BVDV semblent être proches sur le plan antigénique comparées au CSFV.

En 2012, Anne et Meyer réalisèrent dans le cadre d'une thèse d'exercice vétérinaire une inoculation d'épreuve de brebis naïves suite à une vaccination avec une souche inactivée de BVDV-1 (Bovilis ND). Suite à la vaccination, ils constatèrent la production d'anticorps neutralisants à la fois la souche NADL (BVDV-1), une souche de BDV-5 (Aveyronite) et une souche de BDV-3. La réponse vis-à-vis des deux souches de BDV était plus importante quantitativement par rapport à celle du BVDV-1 mais s'atténuait au bout de deux mois post-vaccination alors que celle du BVDV-1 perdurait de manière stable jusqu'à l'inoculation d'épreuve six mois plus tard.

Les pestivirus, subissant de nombreuses mutations, possèdent des séquences génétiques particulièrement variables telles que la séquence codant la glycoprotéine E2 à l'origine de la variabilité antigénique. Cette glycoprotéine est à l'origine de la sécrétion des anticorps neutralisants. Il a ainsi été démontré que des souches de BVDV et BDV pouvaient être distinguées grâce à l'utilisation de certains anticorps neutralisants (Edward *et al.*, 1988, Shannon *et al.*, 1991). Par ailleurs, il a été montré que E2 présentait deux domaines antigéniques, l'un conservé d'une espèce à l'autre, l'autre non (Paton *et al.*, 1992).

Diversité antigénique du BVDV

Il existe deux espèces de BVDV : le BVDV-1 et BVDV-2. Des réactions croisées entre ces espèces sont possibles et ont surtout lieu pour la protéine NS2-3 qui est très conservée d'une espèce à l'autre. Cependant, elles peuvent aussi parfois avoir lieu pour la protéine variable E2.

Par exemple, dans leur étude de 1998, Cortese *et al.* ont montré qu'un vaccin vivant atténué dirigé contre le BVDV-1 induisait l'apparition d'anticorps neutralisants contre les BVDV-1 et 2 (Cortese *et al.*, 1998).

Par ailleurs, il y a également des réactions croisées au sein des génotypes de ces mêmes espèces. Le sérum dirigé contre le BVDV-1k neutralise de manière très faible les autres sous génotypes, alors que les sérums dirigés contre les autres sous génotypes neutralisent efficacement le BVDV-1k (Bachofen *et al.*, 2008).

Diversité antigénique du BDV

Dans leur étude de 1998, Nettleton *et al.* ont mis en évidence des réactions antigéniques croisées au sein de souches de BDV. Après avoir infecté expérimentalement des agneaux naïfs avec cinq souches de BDV, le sérum des agneaux a été prélevé. Ils ont alors réalisé des tests de neutralisation croisée entre les sérums récoltés et les cinq souches inoculées. Tous les agneaux avaient séroconvertis et produits non seulement des anticorps neutralisants contre la souche qui leur avait été inoculée mais aussi contre les autres.

Anne et Meyer ont également mis en évidence une production en anticorps neutralisant la souche de BDV (BDV-3) qu'ils avaient utilisés pour inoculer leur brebis en 2012. Ils ont également démontré une réaction croisée avec une autre souche de BDV : le BDV-5.

Conséquences

Cette variabilité antigénique est à prendre en considération lors de diagnostics de laboratoire et c'est pourquoi les tests ELISA sont dirigés contre la protéine NS2-3 pour laquelle les réactions croisées sont importantes.

1.4 Immunogénicité

1.4.1 Cinétique de production des anticorps (Loubière, 2012)

Les anticorps neutralisants (anti-E2) apparaissent dans les deux semaines post-infection et atteignent un plateau vers la dixième semaine. Ils peuvent persister jusqu'à trois ans (Loken *et al.*, 1991).

Les anticorps fixant le complément apparaissent entre le 11^{ème} et le 35^{ème} jour post inoculation, atteignent un plateau entre le 40^{ème} et le 80^{ème} jour et persistent au moins trois mois.

Les anticorps précipitants sont d'apparition plus tardive. Ils apparaissent entre le 30^{ème} et le 40^{ème} jour post contamination.

1.4.2 Protection croisée entre pestivirus d'une même espèce

Concernant le BVDV, il existe une protection croisée relative entre le BVDV-1 et BVDV-2. Par exemple, l'immunisation contre le BVDV-1 entraîne une protection croisée limitée contre le BVDV-2 chez les bovins (Ridpath *et al.*, 2000). C'est à cause de cette protection croisée limitée, que des cheptels bovins vaccinés contre le BVDV-1 en Amérique du Nord ont vu l'émergence d'épidémies à BVDV-2 dans les années 90 (Bachofen *et al.*, 2008). Cette absence de protection totale est due à des titres en anticorps insuffisants.

En effet, dans leur étude de 1998, Cortese *et al.* ont montré qu'un vaccin vivant atténué dirigé contre le BVDV-1 induisait l'apparition d'anticorps neutralisants anti-BVDV-1 et anti-BVDV-2. Cependant, le titre en anticorps contre le BVDV-1 était supérieur d'un log au titre en anticorps anti-BVDV-2. Les titres en anticorps anti-BVDV-2 étaient en moyenne inférieurs à 1/16.

Une épreuve d'inoculation avec une souche hypervirulente de BVDV-2 sur des veaux a montré qu'un titre en anticorps anti-BVDV-2 de 1/16 était insuffisant et entraînait des signes cliniques sévères (Cortese *et al.*, 1998). Toutefois, dans ces études, la protection cellulaire spécifique n'a pas été testée.

En revanche chez les ovins, Paton *et al.* ont montré en 1999 que le BVDV-1 conférait une protection fœtale hétérologue contre le BVDV-2 chez des brebis gestantes infectées à 49 jours de gestation alors que le contraire n'était pas vérifié. L'immunisation hétérologue serait donc univoque chez la brebis, du moins pour le BVDV.

Il n'existe pas d'étude portant sur la protection croisée entre les différentes souches de BDV.

1.4.3 Protection croisée entre pestivirus d'espèces différentes

La protection croisée entre BDV et BVDV est encore sujette à controverse et les résultats des études à ce sujet divergent.

Vantsis *et al.* montrèrent en 1980, que des brebis gestantes exposées à une souche de BVDV-1 et inoculées ensuite avec une souche de BDV (souche Moredun) à leur 54^{ème} jour de gestation avaient 92% d'agneaux malades. Au contraire, les brebis gestantes exposées à la souche de BDV et inoculées ensuite avec la souche de BVDV-1 à la même période de gestation avaient seulement 55% d'agneaux malades. Par ailleurs, toutes les brebis gestantes challengées avec le même virus que celui avec lequel elles ont été exposées préalablement, obtenaient des agneaux sains.

Un essai terrain conduit entre 2003 et 2006 en Aveyron dans un élevage ovin positif Border Disease a montré que le vaccin inactivé BVD (BovilisND) présentait une protection hétérologue vis-à-vis des souches de BD (Poncelet *et al.*, 2007). Ce vaccin possède une AMM contre l'infection transplacentaire du fœtus par le virus de la BVD chez les bovins. Ainsi, un élevage de 1400 brebis et agnelles Lacaunes, confirmé Border Disease positif sur des sérologies de mélange, a été vacciné à partir de décembre 2003 jusqu'à juin 2005 avec le protocole suivant : primovaccination des femelles avec deux injections intramusculaires de 1ml – 1/2 dose bovine – à 4 semaines d'intervalle ; seconde injection 4 à 6 semaines avant la mise à la reproduction ; rappel annuel avec une injection intramusculaire de 1ml en minimum 1 mois avant la mise à la reproduction. Les contrôles sérologiques postérieurs (été 2004, 2005 et 2006) à la mise en place du programme vaccinal se sont tous révélés négatifs.

Enfin, il est important de pouvoir connaître la distance antigénique et génétique entre les différentes souches utilisées lors des études de protection croisée, que ce soit au sein d'une même espèce ou d'espèces différentes de pestivirus. Ainsi au sein du BVDV-1 les résultats de protection croisée peuvent apparaître optimaux si l'on utilise des souches et/ou génotypes proches à plus modérées pour des génotypes éloignés, par exemple entre le BVDV-1a et le BVDV-1k.

1.4.4 Conséquences sur la vaccination

Les réactions antigéniques croisées entre espèces de pestivirus sont une évidence. Cependant, les taux d'anticorps neutralisants produits divergent fortement lors de challenges entre souches homologues et hétérologues. Dans ce dernier cas, la protection croisée n'est pas toujours optimale. Ainsi, certains auteurs conseillent donc fortement d'incorporer plus d'une souche, voire une autre espèce de pestivirus dans les vaccins connaissant la susceptibilité des pestivirus à infecter plusieurs espèces.

2. LA MALADIE DE LA FRONTIERE

2.1 Historique – Importance de la Maladie de la Frontière

La Maladie de la Frontière a été identifiée pour la première fois en 1959 sur des ovins à la région frontalière entre l'Angleterre et le Pays de Galles (Hughes *at al*, 1959). A la suite de cette publication, il est rapidement devenu évident que cette maladie sévissait également chez les ovins en Nouvelle-Zélande, Australie et Etats-Unis (Hartley *et al.*, 1962). Aujourd'hui sa répartition est mondiale et les taux de prévalence chez les moutons varient de 5 à 50% selon les pays et même d'une région à l'autre dans un même pays (Nettleton *et al.*, 1998).

La Border Disease se manifeste par la présence de brebis vides dans le troupeau, d'avortements (parfois seul symptôme), de morts-nés, d'agneaux faibles présentant de façon plus ou moins importante des tremblements, des anomalies du squelette et un aspect hirsute. Ces diverses formes ont donné lieu à diverses dénominations : agneaux trembleurs, maladie du tremblement congénital, maladie du tremblement avec hirsutisme, hypomyélogénèse congénitale.

Dans l'Aveyron : en 1984, une forme suraiguë de la maladie est apparue et fut dénommée « Petega ovina » ou « Entérite Leucopénie Ovine » (E.L.O.).

En 2009, une forme aiguë de la Border Disease est réapparue en Aveyron. Suite au dépistage sérologique en 2010 dans les 2000 cheptels du département, la prévalence et l'incidence étaient respectivement de 6% et 2% en cheptel laitier alors qu'elles étaient de 22% et 9% cheptel allaitant (Paul Mondoly, Céline Pouget, 2011).

2.2 La maladie

2.2.1 Pathogénie générale et genèse des infectés permanents immunotolérants (IPI)

Infections horizontale et verticale

Lors d'infection horizontale, qui correspond à une infection transitoire, le virus pénètre par voie oro-nasale, puis se multiplie au niveau de l'arbre respiratoire avant de gagner le système lymphoïde. Cette phase est suivie d'une virémie courte et d'intensité faible lors de

laquelle le virus infecte les cellules mononuclées sanguines et/ou reste sous forme libre dans le compartiment sanguin. L'excrétion virale sera de courte durée et de faible intensité.

L'infection verticale se déroule de la mère au fœtus durant la période de gestation qui est de 150 jours environ chez la brebis. En effet, les pestivirus ont la particularité de pouvoir traverser la barrière placentaire et d'infecter le fœtus, lors d'infection transitoire de la mère.

En fonction du stade de gestation, le virus sera soit directement éliminé, soit infectera le fœtus. Il en résultera éventuellement une infection persistante en fonction du stade de gestation. Celle-ci sera caractérisée par une virémie persistante et de forte intensité. L'excrétion virale se fera tout au long de la vie de l'animal IPI avec une intensité élevée.

Infections fœtales

La vulnérabilité du fœtus dépendra du moment de l'infection par rapport au développement fœtal et à l'acquisition de ses compétences immunologiques.

➤ Infection entre 1 et 15 jours de gestation

Si l'infection a lieu au stade pré-implantatoire, le fœtus n'est généralement pas infecté car le virus est éliminé avant qu'il n'ait pu traverser la barrière placentaire. En effet, la formation du « pont placentaire » correspondant à l'union caroncule-trophoblaste a lieu vers le 28^{ème} jour de gestation. Les anticorps maternels apparaissent environ dix jours après l'infection, lorsque la virémie cesse. Ainsi, le virus est généralement éliminé par la mère avant d'atteindre le fœtus.

➤ Infection entre 15 et 60 jours de gestation

A ce stade, lorsqu'une brebis gravide non immunisée est infectée, le virus se propage rapidement au placenta qu'il traverse. Il en résulte parfois une placentite nécrosante pouvant entraîner un avortement (Caffrey *et al.*, 1997). En revanche, si la gestation se poursuit, la placentite va rétrocéder spontanément en raison de l'apparition d'anticorps maternels qui, par contre, ne protégeront pas le fœtus. Ce dernier va alors accepter, à tort, le virus comme faisant partie du « soi », son système immunitaire n'étant pas encore compétent. Ceci conduit à la création d'agneaux IPI (Infectés Permanents Immunotolérants) viropositifs et séronégatifs.

➤ Infection entre 60 et 85 jours de gestation

C'est la période à laquelle le système immunitaire adaptatif du fœtus est en cours d'acquisition. Le devenir du fœtus est alors moins prédictible. Les avortements deviennent plus rares. Certains agneaux naissent quand même IPI avec plus ou moins de signes cliniques associés selon la virulence de la souche. Certains autres font une réponse immunitaire classique contre le BDV et naissent séropositifs. Toutefois, l'infection virale, à ce stade de gestation, chez un agneau au système immunitaire compétent peut entraîner une forte réaction immunitaire ayant pour conséquence une hypoplasie ou dysplasie cérébelleuse ou encore une hydrocéphalie (Nettleton *et al.*, 1998).

➤ Infection après 85 jours de gestation

Le fœtus ovin de plus de 85 jours est mature du point de vue immunitaire. Ils éliminent le BDV et naissent majoritairement sains, vironégatifs et séropositifs (Barlow *et al.*, 1980). Cependant, certains peuvent apparaître faibles et mourir prématurément.

➤ Récapitulatif

Tableau 2 : Conséquences possibles de l'infection d'un fœtus ovin par le BDV selon le stade de gestation (D'après Pouget, 2013)

Date de l'infection				Conséquences	Virus	Anticorps
J0	J15	J60	J85			
				Virus éliminé par la mère	-	-
				Avortements, agneaux IPI, trembleurs, hirsutes, faibles ou normaux	+	-
				Avortements, agneaux IPI, malformés ou normaux	+/-	+/-
				Avortements, agneaux normaux ou faibles	-	+

Mécanismes de la genèse des infectés permanents immunotolérants

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer ce processus d'infection persistante. La majorité des expérimentations a été conduite chez les bovins.

Comme nous l'avons vu précédemment, la période de genèse des IPI est assez restreinte et correspond à une période de sensibilité fœtale (entre 15 jours et 85 jours chez les ovins).

La réponse immunitaire adaptative fœtale ne se met pas en place avant le 60^{ème} jour de gestation chez les ovins. Avant cette période, la réponse innée est, quant à elle, effective dès le 17^{ème} jour de gestation (Miyasaka *et al.*, 1988). Or, pourquoi, malgré une réponse immunitaire innée fœtale, la création d'IPI est quand même possible dans cette fenêtre ?

La réponse immunitaire innée met notamment en jeu des interférons de type I. Or les souches ncp possèdent des mécanismes permettant de limiter la réponse en interféron de type I, contrairement aux souches cp.

En effet, Meyers *et al.* ont réalisé en 2007, des inoculations intra-utérines de vaches à 60 jours de gestation avec différents virus : un BVDV-2 ncp sauvage, un BVDV-2 muté pour la région codant la protéine E0, un BVDV-2 muté pour la région codant la protéine NPro, un BVDV-2 muté pour les régions codant les deux protéines à la fois et un BVDV-2 cp. Les interférons de type I ont été détectés dans tous les sérums fœtaux, excepté dans ceux infectés par la souche sauvage ncp. Par ailleurs, le plus grand taux d'interféron de type I a été retrouvé chez les fœtus doubles mutants à J7 et J14 post-infection.

Ceci suggère que la capacité à interférer avec la réponse innée est due aux protéines E0 et NPro. Deux mécanismes sont mis en jeu : l'un par l'action de la protéine Npro qui cible le facteur 3 régulateur d'interféron en limitant sa fixation à son récepteur et bloque la production d'INF-I ; l'autre par la protéine sécrétée E0 qui a une action Rnase et qui dégrade les ARN viraux (simples et surtout doubles brins) limitant ainsi la réponse des INF-I induite par ceux-ci (Peterhans *et al.*, 2013).

Les souches cp produisent, elles, de très grandes quantités d'ARN viraux car leurs cycles de réplication sont amplifiés, contrairement aux souches ncp. La présence de grandes quantités d'ARN déborderait ainsi le système de régulation E0 (Meyers *et al.*, 2007).

La réponse immunitaire innée possède également d'autres voies caractérisées par le recrutement de cellules phagocytaires et l'activation de la réponse inflammatoire notamment. Or, les souches ncp interagissent avec ces voies également. Elles diminuent le chimiotactisme, la cytotoxicité cellulaire et l'activité microbicide des neutrophiles (Potgieter, 1995). Elles diminuent également l'effet microbicide des macrophages (Chase *et al.*, 2004).

Elles agissent sur les cytokines en diminuant la production du facteur de nécrose tumorale α (Potgieter, 1995) et en augmentant les inhibiteurs de l'interleukine 1 notamment (Jensen *et al.*, 1991).

Le développement du système immunitaire adaptatif chez le fœtus se produit entre le 43^{ème} et 75^{ème} jour de gestation (Sterzl *et al.*, 1967). Cependant, ce système n'est effectif qu'entre le 64^{ème} et 82^{ème} jour de gestation (Fahey *et al.*, 1978). Au-delà de cette période, le fœtus est capable d'éliminer le virus par lui-même.

En résumé, la capacité d'établir une infection persistante est liée à la capacité des souches ncp à bloquer la réponse interféron de type I et probablement d'autres voies de l'immunité innée entre le 15^{ème} jour et le 85^{ème} jour de gestation. Par la suite ces souches (antigènes) sont présentées par les cellules dendritiques au système adaptatif lymphocytaire, qui les accepte comme du soi (véritable phénomène de tolérance).

2.2.2 Expression clinique

L'expression clinique est dépendante de l'immunocompétence de l'hôte au moment de l'infection (Plant *et al.*, 1983) et de la souche virale. Elle va aussi dépendre du type d'animaux touchés.

Les adultes non gravides et les agneaux en bonne santé et dotés d'un système immunitaire compétent qui sont exposés au BDV présentent généralement une forme très atténuée, voire inapparente, de l'infection. Une très légère fièvre et une légère leucopénie (baisse des lymphocytes B et T) sont associées à une courte phase virémique d'environ une dizaine de jours précédant l'apparition des anticorps neutralisants (Nettleton *et al.*, 1998). L'apparition de ces anticorps neutralisants coïncide avec l'élimination apparente du virus (Thabti *et al.*, 2002).

Cependant, cette infection transitoire peut parfois être plus grave, notamment lorsqu'il s'agit de souches de virulence élevée, comme celle isolée en Aveyron en 1984. L'infection alors nommée *Petega ovina* à l'époque par les éleveurs locaux a provoqué une fièvre importante (41°C), de l'anorexie, une leucopénie importante et durable, une thrombocytopenie à l'origine de syndromes hémorragiques, du jetage nasal, de la dyspnée, de la diarrhée, 50% de mortalité chez les jeunes agneaux et 10% chez les adultes (Chappuis *et al.*, 1986).

L'infection transitoire de la brebis gestante est essentiellement sub-clinique mais les conséquences pour le fœtus peuvent être importantes. L'infection entraîne ainsi de nombreux troubles de la reproduction, tels que des anomalies du fonctionnement ovarien (croissance

folliculaire, ovulation, fécondation), du développement embryonnaire puis fœtal, une mortalité de l'embryon et du fœtus ou diverses malformations fœtales, ainsi que de la morbidité et mortalité néonatales. Les troubles de la reproduction, lors d'infection transitoire, peuvent être consécutifs à une contamination du tractus génital, suite à l'insémination chez la femelle, mais ils apparaissent le plus fréquemment à la suite d'une contamination par voie nasale ou digestive (Barlow *et al.*, 1982).

C'est également l'infection transitoire des brebis gestantes à un stade de gestation précis qui conduit à l'obtention d'agneaux infectés permanents immunotolérants (IPI). Les signes cliniques présentés par l'agneau IPI à sa naissance sont dépendants de sa race, de la souche virale en question (Barlow *et al.*, 1982 ; Bonniwell *et al.*, 1987) et de la dose infectieuse à laquelle la mère a été exposée (Richardson *et al.*, 1976a).

Une hypomyélogénèse congénitale est rencontrée lors d'infection par des souches virulentes. Elle correspond à un défaut de production de myéline durant le développement du système nerveux in utero conduisant à l'obtention d'agneaux « trembleurs » (Markson *et al.*, 1959).

Des anomalies de la toison conduisent à l'obtention d'agneaux ébouriffés, d'où le qualificatif de « hairy shaker » en anglais (Barlow *et al.*, 1982).

Généralement les agneaux IPI naissent plus petits que la moyenne et présentent un retard de croissance par la suite (Sweasey *et al.*, 1979).

Des anomalies anatomiques sont également parfois rencontrées telles que de l'arthrogrypose, du prognathisme, du brachygnathisme, une déviation latérale des articulations (Garcia-Perez *et al.*, 2009).

De l'ataxie caractérisée par l'hyperextension des articulations du carpe et du tarse, l'hyperflexion du tarse ou encore une démarche ébrieuse de l'arrière main est décrite (Garcia-Perez *et al.*, 2009).

Ces agneaux IPI sont plus sensibles aux affections intercurrentes que la normale. En effet, bien que leur réponse humorale contre les autres agents pathogènes ne soit pas affectée, leur immunité à médiation cellulaire est compromise (Gardiner *et al.*, 1983).

En revanche, les agneaux IPI infectés par une souche de faible virulence paraîtront bien souvent cliniquement sains à leur naissance.

Il arrive que ces agneaux IPI présentent un épisode aiguë de jetages nasal et oculaire associé parfois à de la détresse respiratoire et de la diarrhée. Ceci n'est pas sans rappeler la Maladie des Muqueuses chez les bovins, chez lesquels la souche non cytopathique a muté en souche cytopathique.

2.3 Modalités de transmission

2.3.1 Sources animales

Les animaux IPI sont les principales sources d'infection dans les élevages. Les animaux infectés transitoires peuvent également transmettre le virus lors de primo-infection dans les quinze jours suivant l'infection (Garcia-Perez *et al.*, 2009). Par ailleurs, étant donné que les pestivirus n'ont pas une haute spécificité vis-à-vis de leur hôte, il faut également se méfier des animaux IPI des autres espèces.

Ainsi, il a été démontré que des bovins IPI pour le BVDV pouvaient induire la Maladie de la Frontière s'ils sont introduits dans un troupeau ovin sain (Carlsson *et al.*, 1991). Ceci est particulièrement à prendre en compte, notamment dans le cas d'élevage mixte bovin/ovine. De plus, la faune sauvage peut également aussi être une source potentielle de contamination. Cet aspect est à prendre en compte notamment lors des estives.

2.3.2 Sources biologiques

Les matières virulentes sont par ordre d'importance : jetage, sperme, sang, lait, salive, urine et fèces (Sawyer *et al.*, 1986). La principale cible du virus est le fœtus pendant la gestation. Le BDV se distribue de manière importante dans ces tissus et le liquide utérin. L'avorton constituera ainsi une source considérable de virus.

Etant un virus enveloppé, le BDV résiste mal dans le milieu extérieur. Sa survie dans le fumier serait de moins de dix jours et la litière d'animaux contaminés n'infecterait pas un lot sain (Vaast *et al.*, 1986). Du fait de la structure lipidique de son enveloppe, le virus est très sensible aux détergents usuels. Il est rapidement inactivé par la chaleur à des températures supérieures à 56°C (Gardiner *et al.*, 1972). Cependant, il résisterait pendant au moins vingt mois à une température de -20°C (Shaw *et al.*, 1969), ce qui permet entre autres sa conservation à des fins d'analyses laboratoires. En revanche, ceci doit être pris en considération lors de conservation de semence.

Enfin, une autre source de contamination à connaître est celle des vaccins. En effet, les pestivirus représentent des contaminants importants des vaccins vivants modifiés. Ces vaccins sont en effet produits sur des cultures de cellules, ovines, bovines ou porcines dans des milieux complétés avec du sérum de veau fœtal pouvant être contaminé par le BVDV (Nettleton *et al.*, 1995).

2.3.3 Transmission horizontale

La transmission du virus peut se faire par simple contact entre animaux ou avec les matières virulentes. Ainsi en 1992, Nettleton *et al.* ont montré qu'il n'y avait aucune différence significative de résultats en infectant des brebis gestantes entre le 50^{ème} et 60^{ème} jour de gestation par injection ou simple mise en contact avec des agneaux IPI. En effet, les deux méthodes ont conduit à l'obtention d'agneaux IPI dans les mêmes proportions.

Les IPI excrètent cependant des charges virémiques plus importantes que les infectés transitoires, et ce, tout au long de leur vie.

La transmission par voie sexuelle est également possible. En effet, Gardiner *et al.*, montrèrent en 1981, que des brebis gestantes inséminées à 54 jours de gestation, avec du sperme de bélier IPI, produisaient des agneaux IPI.

Enfin, la transmission est théoriquement possible par certains insectes piqueurs (Mollot *et al.*, 1992) bien que ce mode de transmission est considéré comme négligeable.

2.3.4 Transmission verticale

La primo infection de brebis, avant les soixante premiers jours de gestation, aboutit à la mort du fœtus ou à la naissance d'un agneau infecté permanent immunotolérant (Garcia-Perez *et al.*, 2009).

Les souches BDV ncp ont la capacité de traverser les enveloppes fœtales alors que les souches cp ne sont pas capables d'établir une infection persistante (Brownlie *et al.*, 1989).

Les protéines Npro et E0 jouent un rôle essentiel dans la diffusion des souches ncp au fœtus.

En effet, Meyers *et al.* ont réalisé, en 2007, des inoculations par voies intranasale ou intramusculaire de vaches entre 60 et 90 jours de gestation avec différents virus : un BVDV-2 ncp sauvage, un BVDV-2 muté pour la région codant la protéine E0, un BVDV-2 muté pour la région codant la protéine NPro et un BVDV-2 muté pour les régions codant les deux protéines à la fois. Seul le virus double mutant n'a pas été retrouvé dans les tissus fœtaux lors de l'euthanasie des brebis deux mois post inoculation.

Pour vérifier si l'absence in utero du double mutant était due à l'absence de diffusion et/ou de passage transplacentaire ou à son élimination par le fœtus, ils réalisèrent des inoculations intra-utérines à 60 jours de gestation avec ces mêmes virus et un virus BVDV-2 cp. Tous les virus furent détectés dans les organes fœtaux à J5, J7 et J14 post-infection. Le titre viral le plus bas était retrouvé pour la souche cp alors que celui des souches simple

mutante et double mutante était intermédiaire entre les valeurs obtenues pour la souche cp et la souche sauvage.

Ainsi, dans cette étude, la prévention de l'infection fœtale nécessitait la double mutation et était principalement expliquée par le contrôle de la dissémination du virus chez l'adulte et son impossibilité à atteindre le fœtus (plutôt que par son élimination par le fœtus).

Les IPI jouent également un rôle important dans la transmission verticale du virus. Les agneaux IPI peuvent contaminer leur descendance. En effet, bien qu'ayant une fertilité diminuée, une brebis IPI donnera toujours naissance à un agneau IPI.

2.4 Diagnostics et contrôles

2.4.1 Méthodes diagnostiques (Manuel Terrestre OIE 2005)

Diagnostique épidémiologique-clinique et nécropsique de terrain

Dans un premier temps, les avortements causés par la Border Disease sont à différencier des autres maladies abortives chez les ovins. On pensera notamment à la brucellose, la chlamydiose, la toxoplasmose, la fièvre Q, la salmonellose ou encore le virus de Schmallerberg.

Par ailleurs, les signes cliniques observés chez les agneaux sont à différencier d'une méningo-encéphalite bactérienne, d'une encéphalomalacie symétrique focale ou encore de l'ataxie enzootique (carence en cuivre congénitale). Dans ce dernier cas, un dosage du cuivre chez la mère permettra d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse.

L'examen du système nerveux central à l'autopsie pourra révéler des informations intéressantes. Dans certains cas, une hypoplasie cérébelleuse, des kystes au niveau du *septum pellucidum*, un hydrocéphale ou encore une hydranencéphalie sont observés (Garcia-Perez *et al.*, 2009 ; Barlow *et al.*, 1982).

L'examen des organes internes peut aussi parfois révéler des modifications telles qu'une hydronéphrose ou un ictère (Garcia-Perez *et al.*, 2009).

Cependant, ces observations de terrain ne constituent en aucun cas un diagnostic de certitude qui fera appel à des analyses de laboratoire.

Méthodes de détection virale en laboratoire

Différentes méthodes existent pour mettre en évidence le BDV.

➤ Isolement sur culture cellulaire

Cette technique consiste à mettre en culture un échantillon sur des cellules cibles. Cet échantillon peut être prélevé sur des animaux vivants et être du sang total ou encore du sperme. Cependant, en raison de la forte cytotoxicité de ce dernier, une dilution au moins au 1/10 devra être réalisée. Il peut également être prélevé sur des animaux morts. Dans ce cas, la rate, le rein, le cerveau, le thymus, la thyroïde, les nœuds lymphatiques ou encore le tube digestif constituent des organes de choix.

Les cellules cibles utilisées sont des cellules rénales, testiculaires ou pulmonaires ovines qui ont la particularité d'être permissives au virus (Nettleton *et al.*, 1992).

Dans le cas d'une souche ncp, le virus sera mis en évidence à l'aide d'une technique d'immunofluorescence grâce à une immunoperoxydase. Dans le cas d'une souche cp, l'effet cytopathique pourra directement être lu par l'opérateur au microscope.

Cette méthode est considérée comme la méthode de référence. Cependant, elle est peu utilisée car les délais de réponse sont longs (environ une semaine si positif, le double sinon) et il y a des risques de faux négatifs. En effet, ceci peut se produire si le virus est inactivé par la présence des anticorps maternels (jusqu'à deux mois chez l'agneau) ou par des anticorps présents dans le sérum utilisé pour les cultures cellulaires (Nettleton *et al.*, 1992).

➤ Détection des antigènes viraux (ELISA antigène)

Cette technique consiste à mettre en contact un échantillon à tester avec des anticorps monoclonaux spécifiques. Si l'antigène en question est présent dans l'échantillon, il sera alors pris en sandwich entre l'anticorps monoclonal spécifique et un autre anticorps spécifique de l'antigène, couplé à une peroxydase. La révélation est assurée par l'enzyme qui agit comme un substrat chromogène. Il en résulte une densité optique proportionnelle à la quantité d'antigènes présents dans l'échantillon.

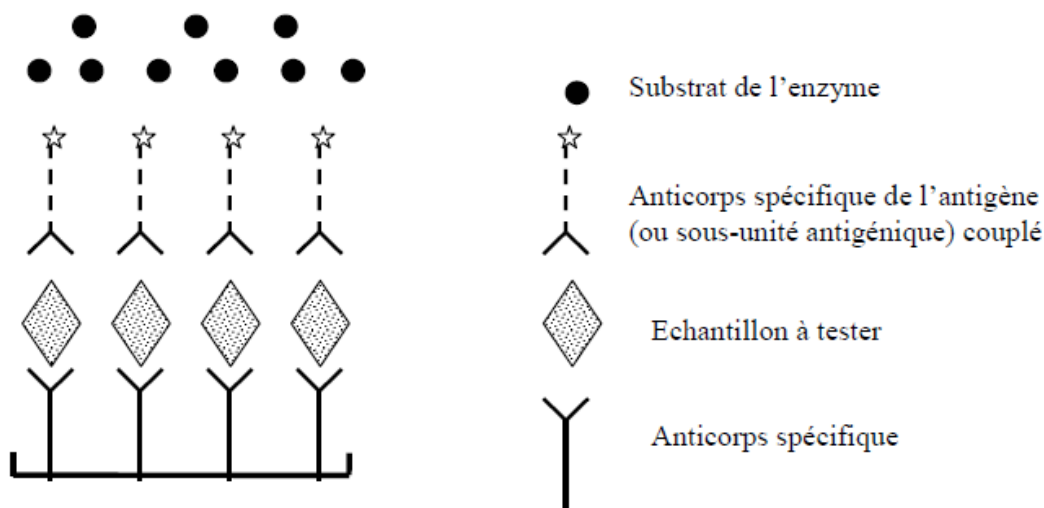


Figure 5 : Schématisation de l'ELISA antigène (Meyer, séminaire ENVT 2007)

Les antigènes recherchés sont surtout NS2-3, voire E0 ou E2 (Entrican *et al.*, 1994). Bien qu'il n'existe pas de tests spécifiques pour le BDV, ce sont ceux pour le BVDV qui sont utilisés, NS2-3 étant très conservé entre pestivirus.

Les avantages de ce test résident dans le fait qu'il soit simple, rapide et bon marché. Comme précédemment des précautions sont à prendre pour les animaux de moins de deux mois, pour lesquels des anticorps colostraux peuvent persister et altérer la réponse.

Cependant, ce test n'est pas assez sensible pour détecter des virémies transitoires comparé à la RT-PCR (Nettleton *et al.*, 1992). En 2009, Garcia-Perez *et al.*, n'ont détecté aucune virémie par ELISA antigène chez leurs brebis infectées expérimentalement alors qu'ils l'ont détectée par RT-PCR.

- Détection des acides nucléiques par Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Cette méthode consiste à amplifier, après rétrotranscription de l'ARN viral, un ADN complémentaire par réaction de polymérisation en chaîne suivie d'une révélation du produit de cette amplification.

Les prélèvements utilisés peuvent être du sang total, du sérum, du plasma, du lait ou encore des organes sur lesquels on aura pris soin d'extraire l'ARN au préalable.

Etant donné la variabilité génétique des pestivirus, les kits commerciaux ont été faits de manière à détecter l'ensemble des souches connues de BVDV et BDV en utilisant deux à trois couples d'amorces (Easton *et al.*, 1994).

La PCR Taqman® ou PCR en temps réel est une méthode couramment utilisée de nos jours. Elle permet de révéler les produits de l'amplification au cours de l'amplification elle-même. Auparavant, ces produits étaient révélés par électrophorèse notamment, ce qui ajoutait un délai à l'obtention des résultats.

La PCR constitue une technique 10 à 1000 fois plus sensible et spécifique que l'isolement viral (Hamers *et al.*, 2000).

Un des principaux inconvénients de ce test reste son prix du fait du matériel nécessaire pour le réaliser. Cependant, des mélanges de prélèvements de plusieurs individus peuvent être réalisés (mélange de vingt échantillons pour le sang ou lait de tank par exemple). Par ailleurs, il permet de s'affranchir de l'immunité colostrale, mais reste très sensible aux contaminations par des virus extérieurs notamment.

Méthodes de détection des anticorps en laboratoire

➤ Test de séroneutralisation

Cette technique permet de quantifier le nombre d'anticorps neutralisants présents dans du sérum.

Elle consiste à mettre en contact des quantités constantes de virus avec différentes dilutions du sérum à titrer puis de les inoculer à une culture cellulaire. La période d'incubation est de 3 à 5 jours.

Le virus non neutralisé est ensuite révélé, soit par visualisation directe de l'effet cytopathique dans le cas d'une souche cp, soit par immunohistochimie dans le cas d'une souche ncp. Ainsi, l'absence d'effet cytopathique ou de réaction immunohistochimique traduit la présence d'anticorps. La formule statistique de Spearman-Kärber est ensuite utilisée pour calculer le titre obtenu.

C'est une méthode de référence car sensible et spécifique, cependant elle est longue et fastidieuse.

➤ ELISA indirect

Avec cette technique, les anticorps recherchés se fixent aux antigènes (protéine E0 ou NS2-3) présents au fond des puits. Ils sont ensuite révélés par des antiglobulines spécifiques d'espèce conjuguée à une peroxydase. Cette enzyme agit ensuite sur un substrat chromogène. On obtient alors un signal lumineux, mesuré par densité optique, qui est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

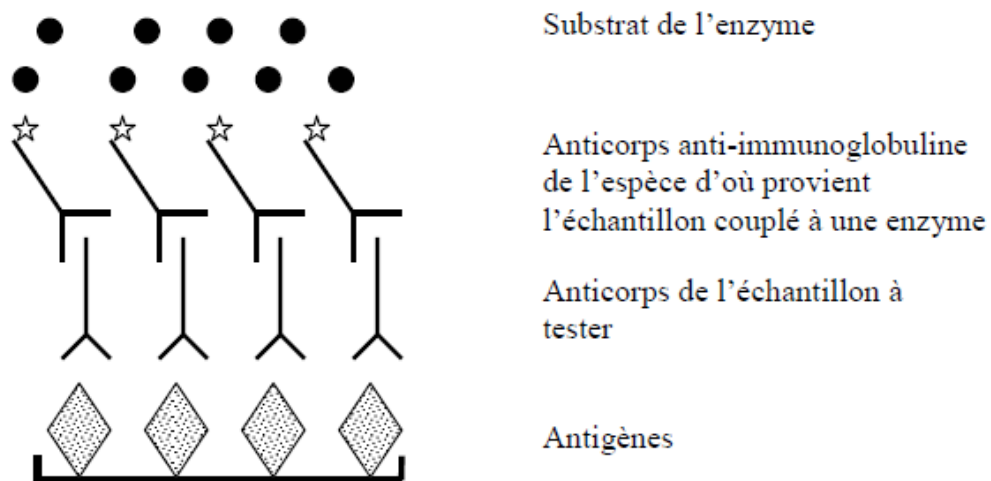


Figure 6 : Schématisation de l'ELISA indirecte (Meyer, séminaire ENVT 2007)

➤ ELISA compétition ou « Blocking » ELISA

Les anticorps recherchés sont en compétition avec des anticorps anti-NS2-3 marqués à la peroxydase, pour la fixation aux antigènes (protéine NS2-3) présents au fond des puits (Nettleton *et al.*, 1992). On obtient donc une densité optique inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

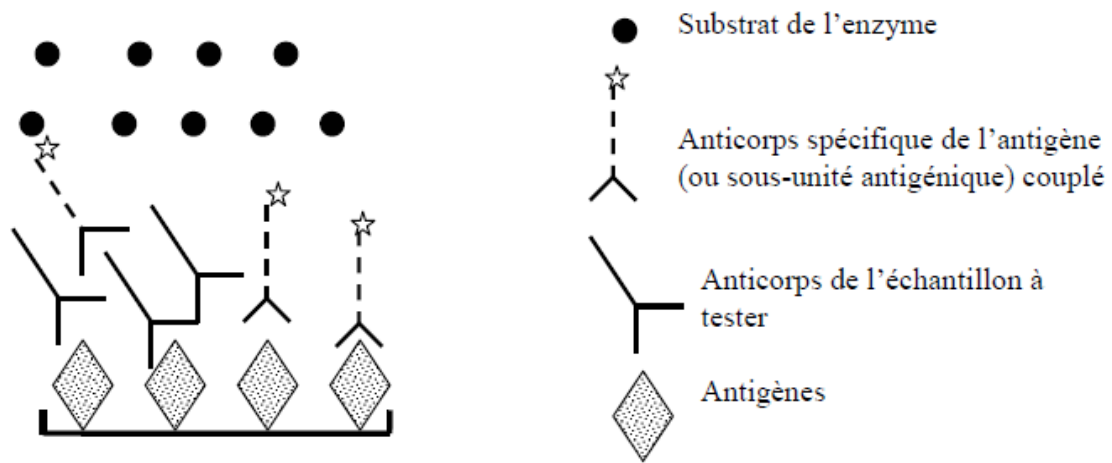


Figure 7 : Schématisation de l'ELISA compétition (Meyer, séminaire ENVT 2007)

Les techniques ELISA sont peu coûteuses, rapides et automatisables. Elles peuvent être réalisées sur sérum ou lait de mélange (Bernardin, 2011).

Interprétation des résultats

Un animal détecté virémique positif doit être testé de nouveau au moins trois semaines plus tard avant de déclarer qu'il s'agit d'un IPI. En effet, il peut s'agir d'un infecté transitoire (Nettleton *et al.*, 1992).

Un animal détecté virémique négatif n'est vraisemblablement pas IPI. Il convient toutefois de prendre en compte la méthode utilisée et l'interférence avec les anticorps colostraux chez les jeunes de moins de deux mois. L'animal a cependant pu être un infecté transitoire. Il peut être intéressant dans ce cas, d'envisager une sérologie.

Une sérologie positive en séroneutralisation indique que l'animal est immunocompétent suite à une infection et/ou une vaccination. Ces anticorps neutralisants peuvent persister jusqu'à trois ans (Loken *et al.*, 1991).

Chez un jeune agneau de moins de deux mois, un test ELISA positif peut révéler la présence d'anticorps colostraux, y compris chez un IPI.

Une sérologie négative indique que l'animal n'est pas infecté ou en cours de séroconversion ou qu'il est IPI.

2.4.2 Mesures de lutte

Les mesures de lutte en Border Disease s'inspirent de celles utilisées chez les bovins contre la BVD.

Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale repose essentiellement sur la vaccination. Bien qu'aucun vaccin avec AMM ne soit actuellement disponible pour les ovins, les éleveurs utilisent sur le terrain des vaccins contre les pestivirus bovines.

Cette vaccination a pour but d'éviter l'apparition des signes cliniques en protégeant les ovins contre une infection transitoire, de limiter l'excrétion virale mais aussi et surtout de protéger le fœtus contre une éventuelle infection transplacentaire et donc d'éviter la naissance d'IPI.

Sur le terrain, ces vaccins sont utilisés à demi voire quart de dose pour des raisons économiques (Anne, 2012). Le plus couramment utilisé est le vaccin vivant modifié MucosiffaND. Cependant ce vaccin, entraînant la production d'anticorps anti-NS2-3 en plus des anticorps neutralisants, pose problème dans le cas de détection sérologique. Anne et Meyer ont montré en 2012, que le vaccin inactivé BovilisND entraînait la production d'anticorps neutralisants chez des brebis non gestantes challengées avec une souche de BDV-3.

Par ailleurs en 2004, Berriatua *et al.*, proposèrent une méthode de « vaccination naturelle » dans les élevages où la maladie était difficilement contrôlable. Elle consiste à mettre délibérément en contact les brebis nullipares avec les agneaux IPI connus du troupeau avant la saison de reproduction. Un contact de trois semaines est requis et il convient de cesser l'exposition au minimum deux mois avant le début de la saison de monte. Cependant des échecs ont été observés. En effet, toute la population n'était pas correctement protégée avant la mise à la reproduction.

Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire repose sur la détection et l'élimination des IPI ainsi que l'ensemble des mesures de biosécurité visant à empêcher l'introduction de la maladie au sein de l'élevage.

Des tests sérologiques (sur mélange de sang notamment) réalisés sur des groupes de tranches d'âge différentes permettent de mettre en évidence la susceptibilité de certains animaux vis-à-vis du virus. Ils représentent également une bonne indication de la présence potentielle d'animaux IPI dans le troupeau (Houe *et al.*, 1995). Par la suite, des investigations plus poussées peuvent amener à tester les agneaux des groupes séropositifs identifiés. Dans ce cas, des RT-PCR là encore possibles sur sang de mélange pourront être réalisées dans le but d'identifier les animaux IPI. Ces animaux peuvent positiver les tests sérologiques classiques dans leurs premiers mois de vie. Ceci est dû aux anticorps maternels anti-NS2-3. Une fois identifiés, ces animaux doivent être éliminés. En fonction de leur valeur économique, ils sont soit euthanasiés, soit envoyés à l'abattoir. Dans tous les cas, ils doivent être écartés de la reproduction et de la commercialisation.

Pour éviter l'introduction de la maladie au sein de l'élevage, il est conseillé d'utiliser uniquement les agnelles nées sur l'exploitation comme agnelles de remplacement.

Les animaux achetés à l'extérieur (béliers, brebis, agnelles) devraient être testés par RT-PCR avant toute introduction ou placés en quarantaine.

Dans le cas où des femelles reproductrices aient été introduites sans être testées, il est conseillé de les mettre à la reproduction et de les garder isolées du reste du troupeau jusqu'à l'agnelage.

Par ailleurs, en raison du risque d'infection des ovins par des bovins IPI, il convient d'éviter tout contact entre des brebis gestantes et des bovins dans le cas d'élevages mixtes par exemple (Nettleton *et al.*, 1992).

Enfin, la transhumance étant chose courante chez les brebis, du moins dans le sud ouest de la France, le rôle de la faune sauvage est à prendre en considération. Les interrogations demeurent encore quant à l'origine du BDV-4 isolé chez les Isards. Les défenseurs des Isards accusent les brebis de les avoir contaminés, alors que les bergers blâment l'isard de répandre la Border Disease dans les alpages.

Dispositif d'épidémiologie-surveillance (Bernardin, 2011)

Un épisode très virulent de Border Disease dénommé *Petega ovina* qui a sévi dans le bassin de Roquefort en 1984 a conduit à la mise en place d'un important réseau d'épidémiologie-surveillance en Aveyron. Il s'agit du seul département français dans lequel une surveillance de la maladie est organisée à l'échelle collective.

Le principal acteur de ce dispositif est la Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron (FODSA 12). Cette organisation propose aux éleveurs locaux des dépistages de masse et la mise en place d'un plan de maîtrise de la maladie le cas échéant.

Au début de cette surveillance, les sélectionneurs et les cheptels fournisseurs d'agneaux d'engraissement étaient testés annuellement par analyse sérologique. Le nombre de cheptels atteints ayant fortement diminué entre 1998 et 2005, passant de 20% de prévalence à 4%, la filière a décidé de modifier le système de surveillance.

A partir de 2006, le statut sérologique des cheptels de plus de 130 brebis a été évalué par alternance tous les quatre ans. Par ailleurs, les cheptels sélectionneurs, les cheptels figurant sur une liste fournie par les opérateurs commerciaux acheteurs d'agneaux d'engraissement et les cheptels positifs à la prophylaxie de l'année précédente faisaient l'objet d'une surveillance annuelle.

Le suivi sérologique consistait en l'analyse de 30 sérums (6 petits mélanges de 5 sérums) issus de la campagne de prophylaxie réglementaire pour la brucellose. Entre 2006 et 2008, la prévalence est passée de 5,1% à 8%.

Fin 2008, une reprise de la circulation virale de la Border Disease a été observée. Ce constat a été confirmé en 2009, par la présence de formes cliniques de la maladie et d'une augmentation significative de la mortalité sur les agneaux dans quelques élevages naisseurs et dans certains ateliers d'engraissement.

Ainsi, il a été décidé, en mars 2009, d'élargir les recherches sérologiques, en évaluant le statut de la moitié des cheptels ovins de plus de 50 ovins tout en continuant de tester les cheptels positifs l'année précédente et les cheptels sélectionneurs et d'augmenter le nombre d'animaux testés (9 mélanges de 5 sérums). Enfin, lorsqu'un seul mélange se révélait positif, une reprise en analyse individuelle des 5 sérums le constituant a été réalisée, afin de limiter les faux positifs.

Soixante-trois cheptels aveyronnais ont été nouvellement détectés positifs en 2010. Au total, entre 2009 et 2010, 209 cheptels sont connus comme étant positifs soit environ 10% des cheptels.

Afin de renforcer le dispositif de surveillance, la FODSA a souhaité mettre en place un dépistage sur le lait de grand mélange, à l'image de ce qui est réalisé en élevage bovin en Bretagne. Cette méthode semble intéressante car elle permet des contrôles plus réguliers.

Deuxième partie
ETUDE EXPERIMENTALE

1. OBJECTIFS

Parallèlement au nouveau dispositif de surveillance en Aveyron, la FODSA a souhaité améliorer les mesures de prévention médicale autour de la vaccination. Les vaccins BVD actuels sont fréquemment utilisés dans les plans de contrôle de la maladie sans que l'on ne dispose de données scientifiques sur leur efficacité contre le virus BDV.

Chez les bovins, pour qu'un vaccin dispose d'une indication protection fœtale contre le BVD il doit répondre à plusieurs critères. Un de ces critères est sa capacité à protéger les fœtus de plus de 90% des vaches vaccinées et entre 40 et 120 jours de gestation (nombre minimum de 13 vaches dans le groupe vacciné) contre une inoculation d'épreuve alors que dans le groupe contrôle (minimum de 9 vaches) non vacciné, 100% des fœtus doivent être infectés. Il n'existe actuellement pas de modèle validé d'infection fœtale avec productions d'IPI pour le BDV. Par ailleurs, le nombre limité d'études menées dans les années 90 suggéraient des différences de pathogénicité entre les souches de BDV, quant à leur capacité à passer la barrière transplacentaire et à induire des avortements ou produire des IPI.

L'objectif de ce travail est multiple. Le premier consiste à évaluer la capacité de souches de BDV de génotypes différents et isolées à plus de 30 ans d'écart, à infecter des brebis à 52 jours de gestation et à passer la barrière transplacentaire.

Le deuxième consiste à évaluer l'impact de l'infection sur la viabilité des fœtus et la présence de malformations et en déduire la capacité des souches à produire des agneaux IPI.

Enfin, ce travail a pour but de valider un modèle qui permettrait par la suite d'évaluer la protection fœtale apportée par les vaccins hétérologues BVD contre une infection par le BDV.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Cultures cellulaires

Les cellules utilisées sont des cellules rénales bovines MDBK en lignée continue (Madin-Darby Bovine Kidney cells, ATCC CCL22). Les cellules sont cultivées en étuve à 37°C et 5% de CO₂, en Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle et de la L-glutamine (MEM complet 1X), additionné d'acides aminés non essentiels (AANE, 1X), de

pénicilline (1 UI/mL) et de streptomycine 100µg/mL. Pour l'entretien des cellules, on ajoute du sérum de veau fœtal (FCS) à 10%, ne possédant pas d'anticorps antipestivirus, ni de pestivirus (vérification au laboratoire par ELISA et RT-PCR en temps réel).

2.2 Virus et titrage

Cinq virus faisant partie de la banque de pestivirus du service de virologie ont été utilisés :

- BDV-5 Aveyronite, isolée en 1984 à partir d'un agneau IPI
- BDV-3 souche 10405, isolée en 2010 à l'ENVT à partir d'un agneau IPI
- BDV-4 souche Isard, isolée à partir d'un isard dans les Pyrénées en 2002
- BDV-6 souche 6390, isolée en 2010 à l'ENVT à partir d'un agneau IPI
- BVDV-1 souche Hanovre, déjà testée en modèle pour la protection fœtale chez le veau après inoculation d'épreuve (Meyer *et al.*, 2012)

Ils avaient reçu entre cinq et douze passages en MDBK en fonction des souches et étaient conservés à -80°C.

Un titrage viral pour chaque souche a été réalisé avant inoculation par la technique de titrage en $DICC_{50}$ (Dose Infectieuse 50% en Culture Cellulaire) et avec la formule statistique de Spearman-Kärber. Toutes les souches utilisées étant non cytopathiques. La révélation des puits infectés a été réalisée par immunohistochimie.

Pour cela les cellules MDBK infectées sont fixées avec de l'acétone diluée (90% acétone, 10 % eau distillée) pendant 15 minutes. La présence d'antigènes de pestivirus est révélée par un anticorps monoclonal spécifique de groupe pestivirus de ruminants WB 103/105 (ref RAE 0801 Veterinary Laboratories Agency, Weybridge UK), utilisé au 1/100°. Cet anticorps permet de détecter le BVDV et le BDV.

En parallèle, la même manipulation a été réalisée avec un anticorps spécifique du BDV (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge UK). L'anticorps secondaire est un polyclonal de lapin dirigé contre les immunoglobulines de souris et marqué à la peroxydase de raifort (1/500°, ref P0260 DakoCytomation Glostrup, Danemark). Le complexe antigène anticorps est ensuite révélé par un chromogène, l'aminoéthylcarbazole (ref 101 AEC chromogène Kit Sigma St Louis USA). Une coloration brun rouge du cytoplasme cellulaire révèle la présence du virus.

Les titres des virus BDV-3, BDV-4, BDV-5, BDV-6 et BVDV-1 étaient respectivement de $5,9.10^6$, $3,8.10^6$, $3,5.10^5$, $4,7.10^5$ et 10^6 DICC₅₀/mL.

La préparation des inocula a consisté à diluer, juste avant l'inoculation, les solutions virales dans du milieu MEM + pénicilline-streptomycine pour avoir un titre final de 4.10^4 DICC₅₀/mL dans un volume final de 50mL.

2.3 Animaux

Quarante-six brebis Lacaune adultes, inséminées le 21 août 2014 et confirmées gestantes (par échographie à 35 jours post-insémination) ont été utilisées pour cette expérimentation. Elles provenaient de deux élevages Aveyronnais certifiés indemnes de Border Disease et de BVD : absence initiale d'anticorps dirigés contre les virus BD et BVD (ELISA NS2-3 et séroneutralisation) et absence d'infection à pestivirus (RT-PCR quantitative pan pestivirus réalisées le jour de l'insémination). Elles ont de plus été testées par ELISA et PCR sur sang de mélange par le laboratoire vétérinaire départemental du Tarn-et-Garonne à leur arrivée sur l'école, soit le 6 octobre.

Quatre lots de neuf brebis et un lot de dix brebis ont été réalisés :

- ✓ Lot 1 (n=8+1 sentinelle) : 8 brebis infectées par du BDV-5 Aveyronite et une brebis non infectée
- ✓ Lot 2 (n=8+1 sentinelle) : 8 brebis infectées par du BDV-3 ENV-T-10405 et une brebis non infectée
- ✓ Lot 3 (n=8+1 sentinelle) : 8 brebis infectées par du BDV-4 Isard et une brebis non infectée
- ✓ Lot 4 (n=9+1 sentinelle) : 9 brebis infectées par du BDV-6 ENV-T-6090 et une brebis non infectée
- ✓ Lot 5 (n=8+1 sentinelle) : 8 brebis infectées par du BVDV-1 Hanovre et une brebis non infectée

Les lots étaient logés dans des bergeries individuelles de niveau expérimental A1 physiquement séparées (excepté le lot infecté avec du BVDV-1 Hanovre qui était dans une bergerie de niveau expérimental A2) et aucun contact entre eux ou d'autres espèces de ruminants n'était possible.

Chaque bergerie bénéficiait de son propre matériel (thermomètre, stéthoscope) et des surchausses et combinaisons étaient portées lors de chaque intervention.

Elles étaient nourries avec du foin et des concentrés et entretenues selon les conditions réglementaires des normes de la Directive Européenne (2010/63/CEE).

2.4 Infection expérimentale

Le protocole d'infection expérimental a été validé par le comité d'éthique national, sous la référence N° 20150728110201570v1 (APAFIS#1283).

Les brebis ont été inoculées à jour 0 (J0) par voie intramusculaire dans le cou, à 52 jours de gestation avec une charge virale de 2.10^5 DICCC₅₀/brebis. Chaque groupe a été inoculé avec une souche différente (cf supra) à raison de 5 mL par brebis. Dans chaque groupe, une brebis dite sentinelle n'a pas été inoculée.

La période et la voie d'inoculation ont été choisies en fonction de ce qui avait déjà été décrit auparavant (Caffrey *et al.*, 1997 ; Garcia-Perez *et al.*, 2009 ; Loken *et al.*, 1991 ; Richardson *et al.*, 1976a ; Nettleton *et al.*, 1992). Le jour 52 de gestation entre en effet dans la période fœtale où le fœtus peut « accepter » le virus et devenir IPI.

La voie intramusculaire est la voie la plus souvent utilisée dans la littérature pour les infections expérimentales à BDV.

Les virus utilisés ont été titrés de nouveau juste après inoculation pour vérifier l'absence de perte de pouvoir infectieux. Les résultats ont montré pour chaque souche une perte de moins de un demi-log par rapport aux titres initiaux.

Un calendrier des prélèvements sanguins pour les suivis virologique, hématologique et sérologique lors de la période autour de l'inoculation du virus jusqu'à J18 est fourni en annexe 1. Passée cette période, et jusqu'aux euthanasies, les prélèvements étaient réalisés une fois par semaine pour les suivis virologique et sérologique.

Les euthanasies des brebis ont été réalisées environ deux mois après l'inoculation des virus BDV ou BVDV-1. Pour des raisons logistiques, toutes les brebis n'ont pas pu être euthanasiées le même jour. Les brebis infectées avec le BDV-5 Aveyronite ont été euthanasiées à J63, soit à 116 jours de gestation. Celles infectées avec le BDV-3 10405 et BDV-6 6090 ont été euthanasiées à J64, soit à 117 jours de gestation. Enfin, celles infectées

avec le BVD-1 Hanovre et BDV-4 Isard ont été euthanasiées à J66, soit à 119 jours de gestation.

Le jour de l'euthanasie, les intervenants étaient répartis de la manière suivante : une équipe « sale » chargée de l'euthanasie en elle-même, de l'extraction des fœtus et des prélèvements sur brebis (placentation, rate, nœud lymphatique) et une équipe « propre » chargée des mesures et des prélèvements sur les fœtus.

L'euthanasie était réalisée par injection intra-veineuse de 10-20 ml d'un euthanasiant : T61ND (embrutramide, mébézonium et tétracaïne). Les brebis étaient ensuite suspendues puis saignées et leur cavité abdominale ouverte. Le liquide amniotique de chaque corne gestante était ponctionné et un échantillon de placenta prélevé avant de récupérer les fœtus.

Les fœtus récupérés étaient aussitôt transmis à l'équipe « propre » afin de prélever au plus vite le sang fœtal en intracardiaque avant qu'il n'ait eu le temps de coaguler. L'équipe « propre » mesurait ensuite les distances entre l'atlas et l'anus, la première vertèbre thoracique et l'anus, la longueur du radius et du tibia sur les fœtus, relevait les anomalies congénitales et prenait des photographies. Des échantillons de thymus, reins, rate, foie, de cartilage auriculaire et de cerveau étaient ensuite prélevés sur chaque fœtus.

Chaque tissu prélevé, était aliquoté en trois exemplaires, deux conservés à -80°C et un dans du formol (10%). Tous les échantillons prélevés n'ont pas été analysés pour cette thèse (cf infra).

2.5 Suivi clinique et hématologique

Un suivi clinique journalier des brebis a été réalisé de J-3 jusqu'à J20 post inoculation. Il consistait en une prise de température rectale, l'observation de l'état des brebis, de la présence ou non d'avortement, de diarrhée, de toux *etc.* Les signes cliniques observés ont été reportés sur une fiche de suivi clinique individuelle (annexe 2).

Jusqu'à l'euthanasie, les brebis ont également été inspectées, chaque jour lors de la distribution de l'alimentation, pour la présence éventuelle d'avortements (avorton présent sur le sol, effort expulsif des brebis, présence de matières fœtales à la vulve...).

En cas d'avortement, le protocole adopté était le suivant : la brebis était identifiée afin de réaliser un examen clinique approfondi et les organes de l'avorton en bons états prélevés (rate, cerveau notamment). Une partie des échantillons était conservée à -80°C pour les analyses virologiques et l'autre moitié était envoyée au Laboratoire Vétérinaire Départemental du Tarn-et-Garonne pour tester les principaux agents responsables des avortements chez les ovins par PCR (*Coxiella burnetii*, *Chlamydophila abortus*, *Brucella*

abortus, *Salmonella abortus*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* et bien sûr le BDV).

Par ailleurs des échographies ont été réalisées à J32 et J47 pour évaluer la viabilité des fœtus et vérifier l'absence d'avortements qui auraient pu échapper à la vigilance clinique.

Pendant la période post-inoculation des brebis, des prélèvements sur tubes EDTA ont été réalisés environ tous les deux jours jusqu'à J14 (voir calendrier, annexe 1) sur 6 animaux de chaque lot (5 brebis infectées + sentinelle) pour la réalisation d'hémogrammes.

Les sangs collectés étaient analysés directement au moyen d'un automate (MS9-5 analyserND, Melet Schloesing Laboratories) calibré pour les ovins par le laboratoire d'analyses biologiques de l'école. Les comptages en leucocytes, monocytes, lymphocytes, neutrophiles et thrombocytes ont ainsi été réalisés.

Les résultats ont été exprimés pour chaque jour et chaque animal en pourcentage de chaque population cellulaire ramené à une ligne de base. La ligne de base est calculée pour chaque individu et pour chaque population de cellules, comme la moyenne des données obtenues sur les 3 jours qui précèdent l'inoculation virale. Pour chaque population cellulaire, les données individuelles ont été transformées $((X/\text{ligne de base}) \times 100)$ puis les analyses statistiques ont été effectuées sur les données transformées.

2.6 Suivi sérologique

Pour le suivi sérologique, trois tubes secs étaient systématiquement prélevés (calendrier en annexe 1) sur chaque brebis. Ils étaient laissés à 4°C durant la nuit et centrifugés le lendemain pour récupérer le sérum.

Les sérums étaient ensuite aliquotés dans des eppendorfs. L'un était décomplémenté après chauffage à 56°C pendant 30 minutes puis conservé à -20°C pour les séroneutralisations (non réalisées dans cette étude). Les deux autres étaient conservés tels quels à -20°C, l'un pour la réalisation des ELISA, l'autre comme échantillon supplémentaire.

Concernant l'ELISA, un suivi de la réponse en anticorps NS2-3 a été réalisé sur les brebis à J0, J14, J21, J30 et J36. La réponse en anticorps NS2-3 a également été évaluée chez les fœtus. La réponse a été testée à l'aide d'un ELISA de compétition selon le protocole (annexe 3) du kit ID Screen BVD p80 Antibody One-StepND (ID Vet, Montpellier). Les contrôles positif et négatif étaient ceux fournis dans le kit.

2.7 Suivi virologique

Des RT-PCR quantitatives ont été réalisées sur le sang des brebis de J0 à J7, à J9, J11 et J14 ainsi que sur le placenta et les cerveaux, rate et thymus des fœtus.

Extraction de l'ARN

L'extraction d'ARN à partir du sang des brebis post-infection (tubes EDTA, calendrier en annexe 1) a été réalisée immédiatement après le prélèvement au moyen du kit NucleoSpin RNA bloodND (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant (annexe 4).

L'extraction à partir des tissus a été réalisée en utilisant le kit RNeasy Mini KitND de Qiagen. Un échantillon de cerveau d'un avorton constituait le contrôle positif d'extraction. Il avait été testé BDV positif (Ct de 18) par le Laboratoire Vétérinaire Départemental du Tarn-et-Garonne. Le témoin négatif d'extraction était de l'eau.

Le protocole d'extraction de l'ARN pour les tissus (annexe 5) a été légèrement modifié, celui du fabricant ne permettant pas d'obtenir un échantillon suffisamment homogène. Ainsi, 100mg de tissus ont été ajoutés à 800µl de tampon puis mixer à 6000g pendant une minute. Ensuite 350µl était récupéré et mélangé à 350µl d'éthanol 70% puis le protocole était repris à l'étape 5.

Détection par RT-qPCR

Le BDV a été détecté par RT-qPCR en temps réel au moyen du kit LSI VetMax BVDV ScreeningND (Life Technologies) selon les recommandations du fabricant (annexe 6) et à l'aide du thermocycleur LightCycler480ND.

Le contrôle positif de la PCR était un échantillon de BDV-5 utilisé pour l'inoculation des brebis. Le contrôle négatif de la PCR était de l'eau. Par ailleurs, les témoins positif et négatif d'extraction étaient également amplifiés.

La quantification a été réalisée par rapport à une gamme étalon obtenue en réalisant plusieurs dilutions (facteur 10) d'un contrôle interne positif (TaqMan® BVDV RNA ControlsND du laboratoire Applied Biosystems) correspondant à 10⁴ copies d'ARN de BVDV.

Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel (release 1.5.1) de l'appareil de PCR quantitative (Rocher LightCycler 480). Les charges virales sont exprimées en nombre de copies (Log10) par mL pour les sangs et en nombre de copies (Log10) par 100 mg de tissus.

2.8 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel GraphPad software (La Jolla, USA).

Pour les analyses cinétiques par groupe (RT-qPCR brebis, hématologie..), une analyse de variance à deux paramètres avec mesures répétées (two-way ANOVA) a été utilisée.

Quand les effets jours et paramètre (PCR, leucocytes..) étaient significatifs (significant among interactions), une correction de Bonferroni (Bonferroni test between contrasts) était utilisée pour comparer le paramètre entre les groupes sur chaque jour.

Pour les données sans cinétique (PCR fœtus, mesure fœtus par exemple), une ANOVA à un paramètre (one-way ANOVA) était utilisée avec une correction de Bonferroni, en considérant l'ensemble des groupes. Parallèlement, certaines données de probabilité ont été confirmées en réalisant des analyses de groupes deux par deux en utilisant un T-test (Mann-Whitney U test, GraphPad).

3. RESULTATS

3.1 Infection expérimentale et suivi des mères

3.1.1 Suivi clinique

Suite à l'arrivée des brebis sur le site de l'ENVT, des signes cliniques minimes à modérés, sans conséquence sur l'état général, ont pu être observés, probablement attribuables à la mise en lot. Ils se caractérisaient par une diarrhée minime et une congestion vulvaire à l'examen clinique (tableau 3). L'ensemble des lots était touché, y compris les sentinelles de chaque groupe, excepté les groupes infectés avec du BDV-3 1045 et BDV-6 6090. La veille de l'inoculation, tous les groupes, sauf le groupe BDV-4 Isard, présentaient ces symptômes minimes. Ces signes cliniques ont aussi été observés après inoculation expérimentale (tableau 3). Tout au long de l'expérimentation les brebis sont cependant restées vives, leur appétit n'a pas été affecté et leurs constantes biologiques sont restées stables.

Tableau 3 : Incidence des signes cliniques observés avant et après infection expérimentale

	BDV-5 Av	BDV-3 10405	BDV-4 Isard	BDV-6 6090	BVDV-1 Han	Total
Toux	1	1			1	3
Jetage nasal séreux	1	4	1		1	7
Jetage oculaire séreux				2		2
Fréquence respiratoire légèrement augmentée	2	1	1		1	5
Abattement minime	9					9
Diarrhée	3	5	2	2	4	16
Écoulements vulvaires séreux	2		2	1		5
Congestion vulvaire	3	2	4	2	1	12
Autres			1	2	3	6

Nombre de brebis ayant présenté au moins une fois ce signe clinique

Le nombre d'animaux touchés avant et après inoculation est présenté dans le tableau 4. La faible importance des signes observés expliquent les variations journalières au sein d'un groupe et entre groupes.

Tableau 4 : Nombre de brebis présentant des signes cliniques minimes en fonction des jours et de la souche inoculée

	J-3	J-2	J-1	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J20	
BDV-5 Av (9)			2	1	3	2	1		1	2	2	9	1								1	1		1	
BDV-3 10405 (9)	1		1	2	2		3	1		3		1		1				1							
BDV-4 Is (9)				2	5			1		1					1	2	1		1						
BDV-6 6090 (10)			2		2			2	1	1	1	2												1	
BVDV-1 Han (9)	1		4	3	2	2			1	2	1								2	1	1	1	2		

(X) : Nombre de brebis par lot, sentinelles comprises

Les signes cliniques observés sont très probablement attribuables au stress de la mise en lot, ils étaient présents avant l'infection expérimentale et également chez les brebis sentinelles. Toutefois, dans le groupe BDV-5 Aveyronite, toutes les brebis ont présenté en plus un abattement à J8 post-infection. A partir de J9, les signes cliniques ont progressivement disparu et les brebis sont restées en forme jusqu'à la fin de l'expérimentation, excepté pour 2 brebis du groupe BDV-5 et une brebis du groupe BVDV-1 Han qui ont avorté, mais sans conséquences cliniques pour elles.

Les données de la littérature ne rapportent pas de signes cliniques majeurs après inoculation expérimentale de brebis avec du BDV. En revanche, une légère hyperthermie est presque quasiment rapportée dans les expérimentations publiées.

Dans notre cas, bien qu'une brebis du groupe infecté avec du BDV-5 Aveyronite ait fait un pic d'hyperthermie à 40.2°C à J7, aucune différence significative d'écart de température entre ce groupe et le groupe sentinelle n'a été notée (figure 8). De même, les différences n'étaient pas significatives entre le groupe BDV-3 et les sentinelles, contrairement aux groupes BDV-4, BDV-6 et BVDV-1 qui ont au moins montré une température différente significativement des sentinelles dans les sept jours qui ont suivi l'inoculation (annexe 7). Des différences significatives de températures ont été mises en évidence au moins une fois entre tous les groupes, excepté entre les groupes BDV-3 et BVDV-1 et BDV-4 et BDV-6. Cependant, les groupes BDV-5 et BDV-4 et BDV-4 et BVDV-1 avaient déjà montré respectivement des différences significatives de température avant l'inoculation. Ces différences significatives n'ont jamais excédé trois jours d'affilée.

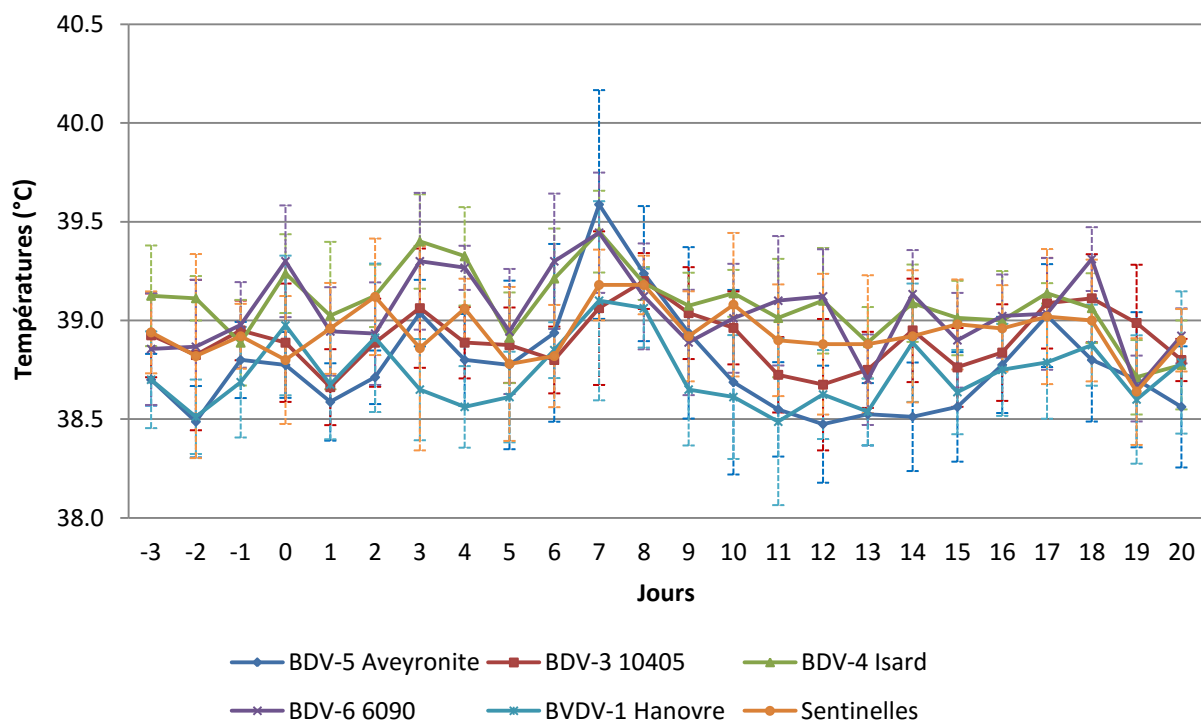


Figure 8 : Moyenne des températures rectales de J-3 à J20

3.1.2 Hématologie

Les résultats de l'hématologie sont présentés sous la forme de la moyenne (exprimée en pourcentage) pour chaque groupe et chaque jour, du pourcentage de chaque population cellulaire ramené à une ligne de base. La ligne de base est calculée pour chaque individu et pour chaque population de cellules, comme la moyenne des données obtenues sur les 3 jours précédant l'inoculation virale. Pour chaque population cellulaire, les données individuelles ont été transformées $((X/\text{ligne de base}) \times 100)$ puis les analyses statistiques ont été effectuées sur les données transformées.

Leucocytes

On constate une baisse du nombre moyen de leucocytes dans les cinq groupes de J2 à J7, alors que le nombre moyen de leucocytes chez les sentinelles reste quasiment stable. Le nombre moyen de leucocytes ré-augmente après J7, pour tous les groupes, sauf celui infecté avec du BDV-5 Aveyronite, et dans une moindre mesure le groupe BDV-3, où la réduction continue même jusqu'à J14 (figure 9).

Des différences significatives ont été obtenues entre tous les groupes et le groupe sentinelle pour au moins deux jours successifs à partir de J2. Par ailleurs, des différences significatives entre le groupe BDV-5 et les autres groupes (excepté BDV-3) ont été obtenues pour au moins un jour de J9 à J14 (annexe 8).

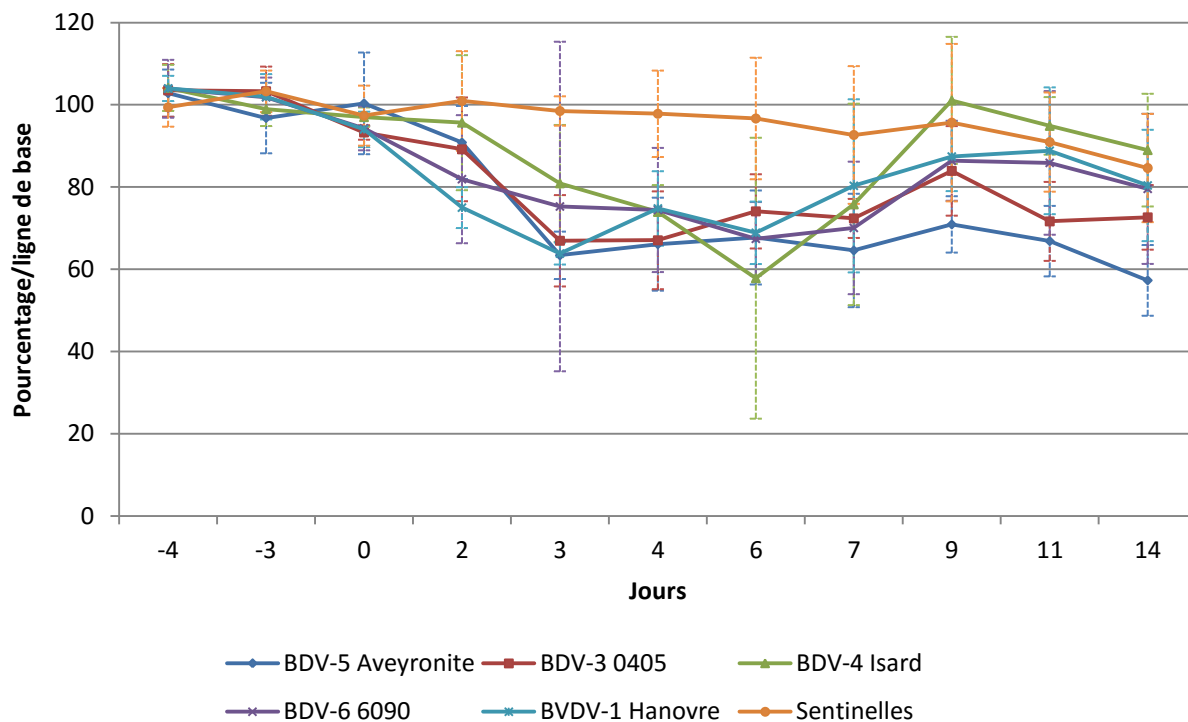


Figure 9 : Moyennes des pourcentages du nombre de leucocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de leucocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation

Lymphocytes

La courbe de lymphopénie suit celle de leucopénie (figure 10). La baisse du pourcentage moyen de lymphocytes est la plus sévère à J3 pour les groupes infectés avec du BDV-3, BDV-6 et le BVDV-1 Hanovre avec des baisses respectives de -35%, -48% et -33%, alors que le groupes infecté avec du BDV-4 Isard montre une baisse plus sévère à J6, de -53%. Quant au groupe infecté avec du BDV-5 Aveyronite, son pourcentage de lymphocytes le plus bas est enregistré à J7 avec une baisse de -44%.

Des différences significatives ont été obtenues entre tous les groupes (excepté le BVDV-1) et le groupe sentinelle pour au moins trois jours successifs à partir de J3 jusqu'à J7. Il y avait en plus des différences significatives entre le groupe BDV-5 et les sentinelles pour J14. Les résultats entre le groupe BVDV-1 et les sentinelles étaient significativement différents uniquement pour J2 et J6. Par ailleurs, des différences significatives entre les groupes BDV-5 et BDV-4, BDV-5 et BVDV-1, BDV-3 et BDV-4, BDV-4 et BDV-6, et BDV-6 et BDV-1 ont été obtenues pour au moins un jour entre J3 et J14 (annexe 9).

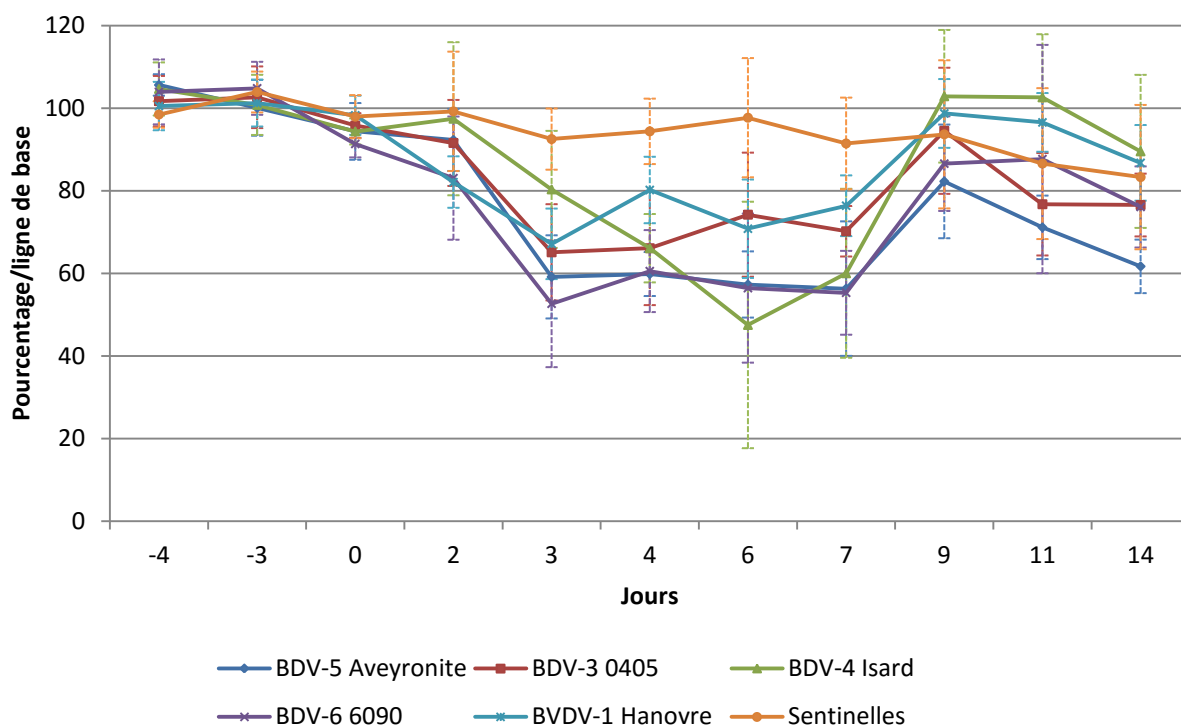


Figure 10 : Moyennes des pourcentages du nombre de lymphocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de lymphocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation

Monocytes

Les résultats montrent une absence de modification du pourcentage moyen pour tous les groupes par rapport aux sentinelles, excepté aux alentours de J9 post-infection (figure 11).

Le groupe BDV-4 Isard montre notamment une hausse de 200% ce jour et présente une différence significative avec les autres groupes ($p < 0,005$).

Les différences sont significatives entre les sentinelles et les autres groupes ce jour avec $p < 0,005$ pour les groupes BVDV-1, BDV-6 et BDV-4, $p < 0,01$ pour le groupe BDV-5 et $p < 0,05$ pour le groupe BDV-3 (annexe 10).

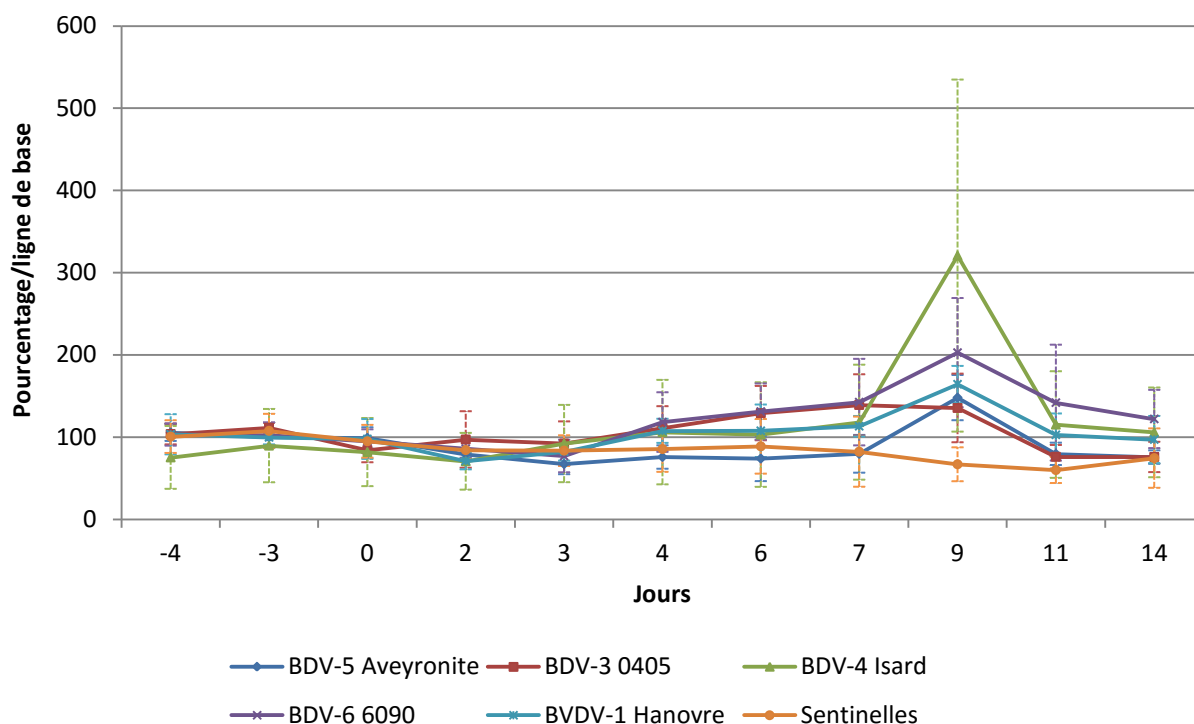


Figure 11 : Moyennes des pourcentages du nombre de monocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de monocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation

Neutrophiles

Une forte variabilité individuelle du nombre moyen de neutrophiles a été observée à l'intérieur des groupes, notamment le groupe BDV-5 Aveyronite et les groupes BDV-6 6090 et sentinelle à J3.

Toutefois, les résultats ne montrent pas de modifications majeures du nombre de neutrophiles lors de l'expérimentation (absence de différences significatives entre les groupes hormis entre le groupe infecté avec du BVDV-1 et les sentinelles à J3) (figure 12, annexe 11).

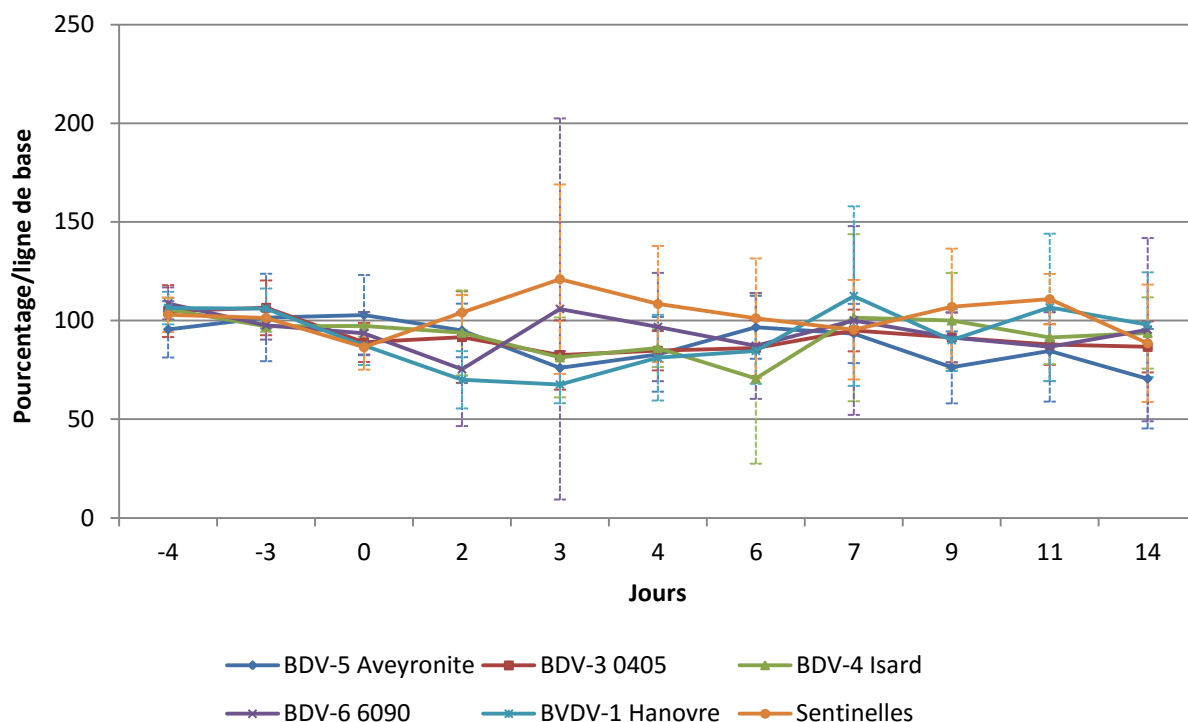


Figure 12 : Moyennes des pourcentages du nombre de neutrophiles par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de neutrophiles à J-4, J-3 et J0 avant inoculation

Thrombocytes

Là encore, d'importantes variations individuelles du nombre moyen de thrombocytes ont été observées à l'intérieur de tous les groupes.

Aucune différence significative, entre les groupes infectés et les sentinelles, n'a pu être mise en évidence (annexe 12). Entre les groupes eux-mêmes, des différences significatives ont été obtenues entre le groupe BDV-4 et les groupes BVDV-1 et BDV-5 uniquement pour J6 (annexe 12). La figure 13 suggère en effet une baisse du pourcentage moyen de thrombocytes pour le groupe BDV-4 isard entre J4 et J7 post infection.

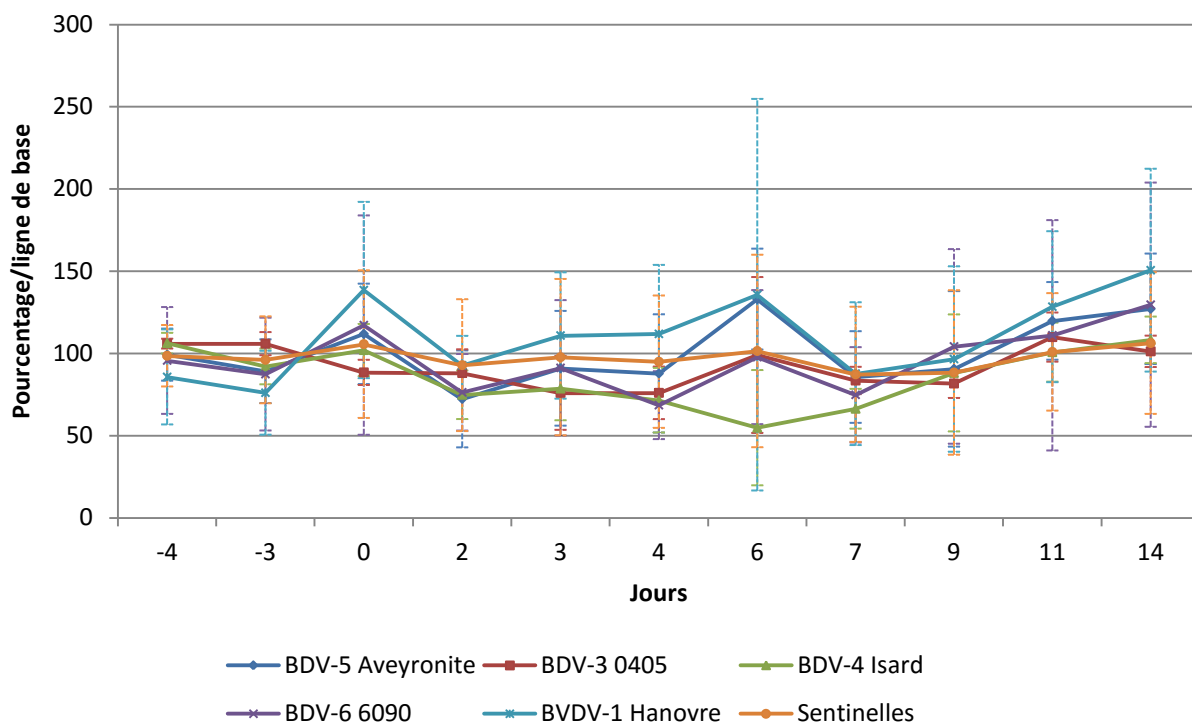


Figure 13 : Moyennes des pourcentages du nombre de thrombocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de thrombocytes à J-4, J-3 et J0 avant inoculation

3.1.3 Suivi virologique par RT-PCR

La virémie a été suivie chez les brebis après infection expérimentale par RT-qPCR.

Le BDV-5 Aveyronite a pu être détecté dans le sang de sept brebis sur huit entre J4 et J14 post-infection et sur une période de quatre à cinq prélèvements consécutifs pour chaque brebis (tableau 5).

Le BDV-3 ENVV-10405 a pu être détecté dans le sang de cinq brebis sur huit entre J5 et J14 post-infection et sur une période de un à trois prélèvements consécutifs pour chaque brebis (tableau 5).

Le BDV-4 Isard a pu être détecté dans le sang de quatre brebis sur huit entre J6 et J14 post-infection et sur une période de un à deux prélèvements consécutifs pour chaque brebis (tableau 5).

Le BDV-6 ENVV-6090 a pu être détecté dans le sang de six brebis sur neuf entre J5 et J14 post-infection et sur une période de un à deux prélèvements consécutifs pour chaque brebis (tableau 5).

Le BDV-1 Hanovre a pu être détecté dans le sang de huit brebis sur huit entre J4 et J11 post-infection et sur une période de trois à quatre prélèvements consécutifs pour chaque brebis (tableau 5).

Pour toutes ces brebis, les Ct de la PCR étaient comprises entre 30 et 35, indiquant des charges virales modérées à faibles ce qui correspond à des valeurs comprises entre $3.9 \cdot 10^3$ et $2,8 \cdot 10^1$ copies d'ARN/ml de sang.

Tableau 5 : Nombre de brebis PCR-positives en fonction des groupes et des jours post inoculation

	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J9	J11	J14
BDV-5 (n=8)	0	0	0	0	3	4	4	7	7	7	4
BDV-3 (n=8)	0	0	0	0	0	2	2	2	0	2	2
BDV-4 (n=8)	0	0	0	0	0	0	2	2	1	2	2
BDV-6 (n=9)	0	0	0	0	0	2	0	2	1	1	2
BVDV-1 (n=8)	0	0	0	0	3	5	8	7	3	7	0

3.1.4 Suivi sérologique par ELISA

Pour confirmer l'infection expérimentale, un suivi de la réponse sérologique en anticorps anti-NS2-3 a été réalisé. Une réponse a été observée chez toutes les brebis infectées.

Les séroconversions ont eu lieu entre J21 et J30 pour le groupe BDV-5 Aveyronite entre J14 et J36 pour le groupe BDV-4 Isard, entre J21 et J36 pour les groupes BDV-6 et BVDV-1 Hanovre et entre J14 et J21 pour le groupe infecté par le BDV-3.

A partir de J36, toutes les brebis étaient séropositives en anticorps NS2-3 et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les brebis sentinelles de chaque groupe n'ont pas séroconverties, confirmant l'absence d'infection sauvage, l'absence de contamination croisée et l'absence de contamination par les animaux infectés expérimentalement.

3.2 Suivi de l'infection fœtale

3.2.1 Suivi des avortements

Entre l'infection expérimentale et l'euthanasie des brebis, un suivi clinique journalier a été réalisé pour détecter d'éventuels avortements.

Par ailleurs, les deux suivis échographiques réalisés à J32 et J47 ont confirmé la présence des fœtus chez toutes les brebis.

Dans la loge infectée avec du BDV-5 Aveyronite, deux brebis sur huit ont avorté (deux avortons par brebis) à J50 (103 jours de gestation) et J54 (107 jours de gestation) post infection, sans autre signe clinique. Les morphologies et dimensions des avortons étaient conformes à l'âge attendu, sans présence de malformation. Ils ont été testés par PCR pour les maladies suivantes : fièvre Q, chlamydie, brucellose, salmonellose, toxoplasmose, listériose et maladie de la frontière. Ils se sont avérés positifs uniquement pour le BDV avec des Ct de 26,41, 25,62, 24,68 et 25,73 pour le cerveau.

Dans la loge infectée avec du BVDV-1 Hanovre, une brebis sur huit a avorté (1 avorton) la veille de l'euthanasie à J65 (118 jours de gestation). L'avorton a également été testé BDV positif par PCR avec un Ct de 24,7 pour le cerveau.

3.2.2 Analyse des fœtus

Le nombre de fœtus récupérés à la fin de l'expérimentation était respectivement de 12 (en plus des quatre avortons précédents), 14, 17, 20 et 15 (plus un avorton) pour les groupes BDV-5, BDV-3, BDV-4, BDV-6 et BVDV-1 respectivement.

Tout au long des autopsies, les mesures et observations des fœtus ont été reportées (annexe 13). D'importantes différences ont été observées entre les groupes quant à la viabilité et la présence de malformations congénitales (type arthrogrypose notamment) chez les fœtus. On note un important pourcentage de fœtus morts et/ou malformés (les avortons sont comptés parmi les fœtus morts) pour les groupes BDV-5, BDV-4 et BVDV-1 avec respectivement 62,5%, 58,8% et 43,7% de fœtus morts et/ou malformés (figure 14).

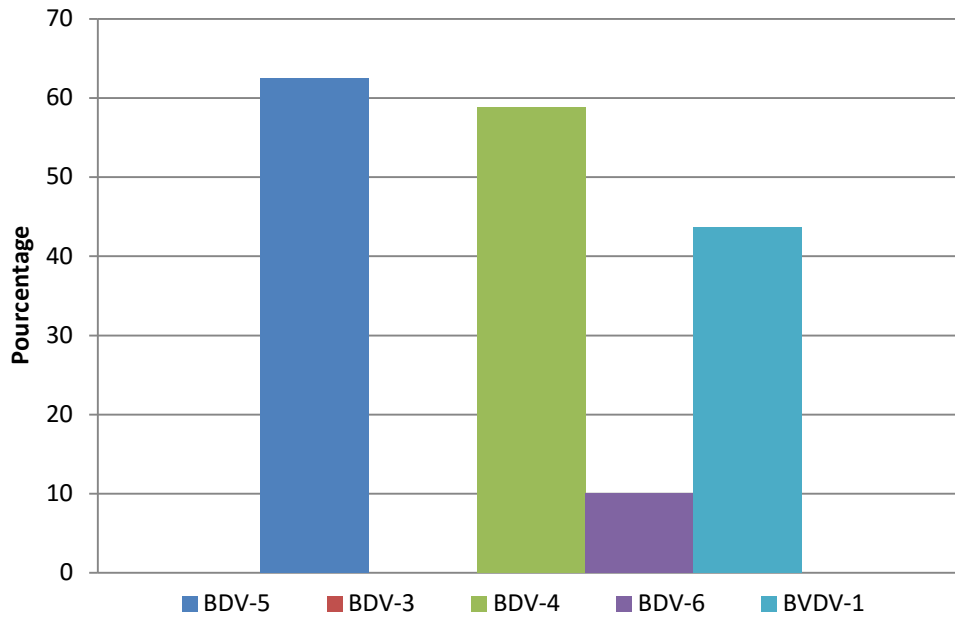
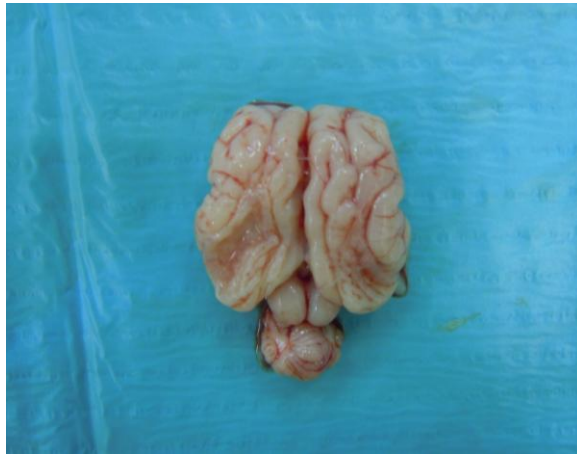


Figure 14 : Pourcentage des fœtus morts et/ou malformés en fonction de la souche inoculée

Les malformations observées étaient par ordre de fréquence : de l'hydrocéphalie, de l'arthrogrypose (photographie 1), de l'atrophie cérébelleuse (photographie 2) et des micro circonvolutions cérébrales.



Photographie 1 : Photographie personnelle prise lors des euthanasies d'un fœtus du groupe BVDV-1 présentant de l'arthrogrypose



Photographie 2 : Photographie personnelle prise lors des euthanasies de l'encéphale d'un fœtus du groupe BVDV-1 avec une atrophie cérébelleuse

Aucune malformation ou mortalité n'a été observée dans le groupe BDV-3 et deux fœtus infectés par le BDV-6 présentaient des malformations mineures (congestion diffuse et modérée du cerveau).

Les fœtus des sentinelles étaient morphologiquement normaux.

Plus en détail, le groupe BDV-5 comptait 62,5% de fœtus morts et 8,3% de fœtus malformés (ce qui correspond à un fœtus mort également). Le groupe BDV-4 comptait 58,8% de fœtus malformés, tous vivants. Le groupe BVDV-1 comptait 12,5% de fœtus morts et 8,3% de fœtus malformés, tous vivants. Enfin, le groupe BDV-6 comptait 10% de fœtus malformés vivants (figures 15 et 16).

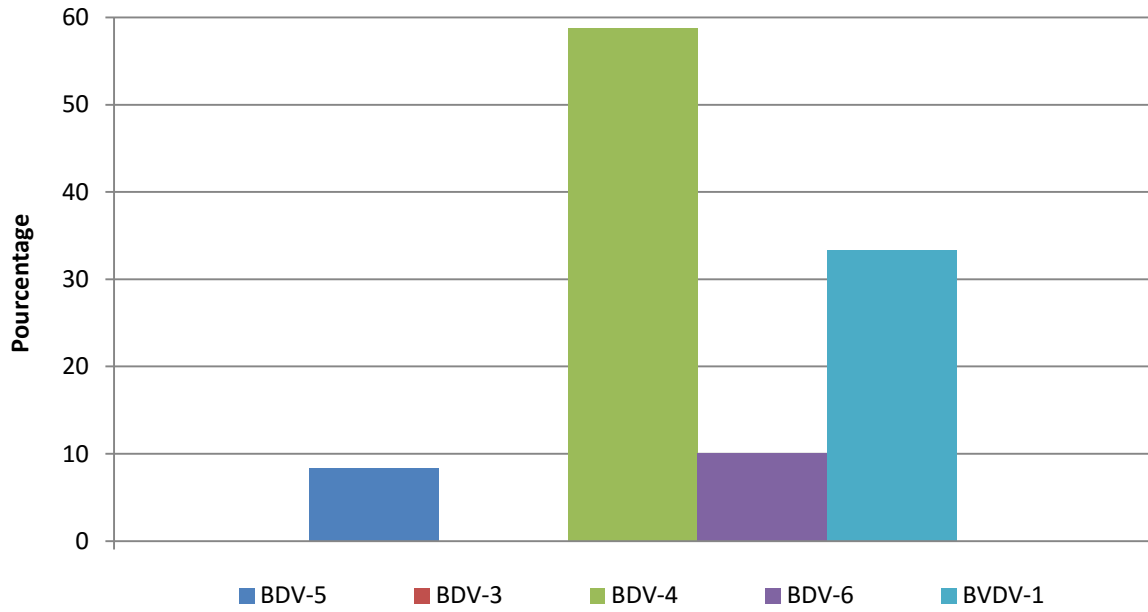


Figure 15 : Pourcentage des fœtus malformés en fonction de la souche inoculée

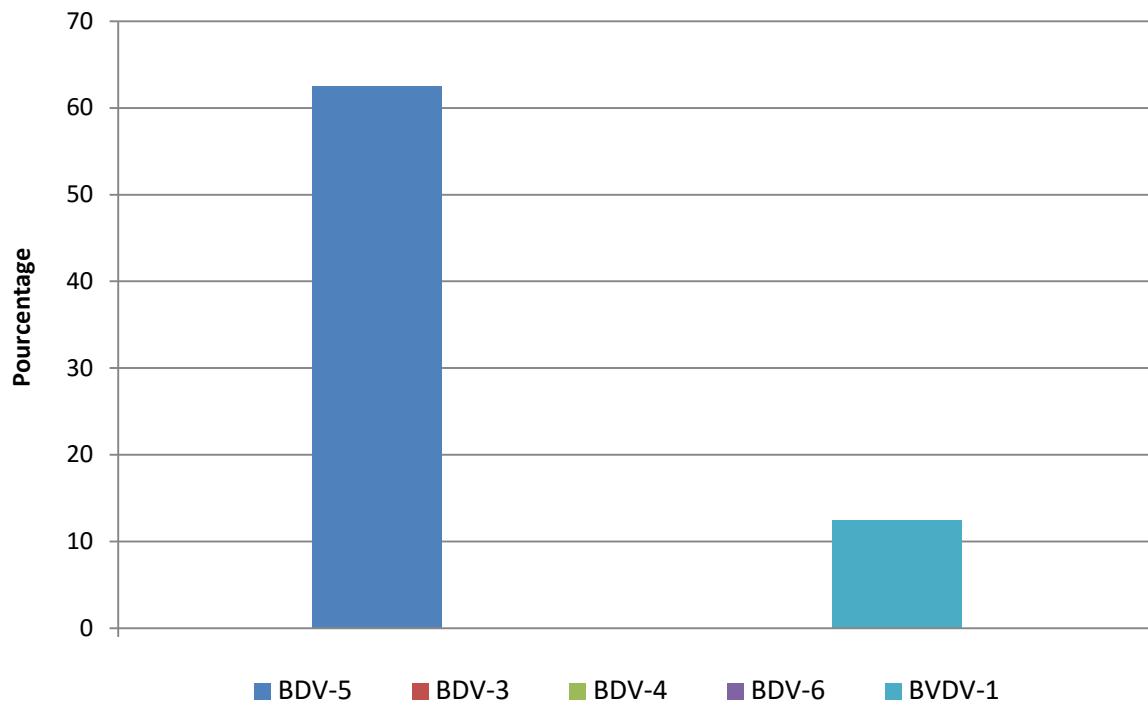
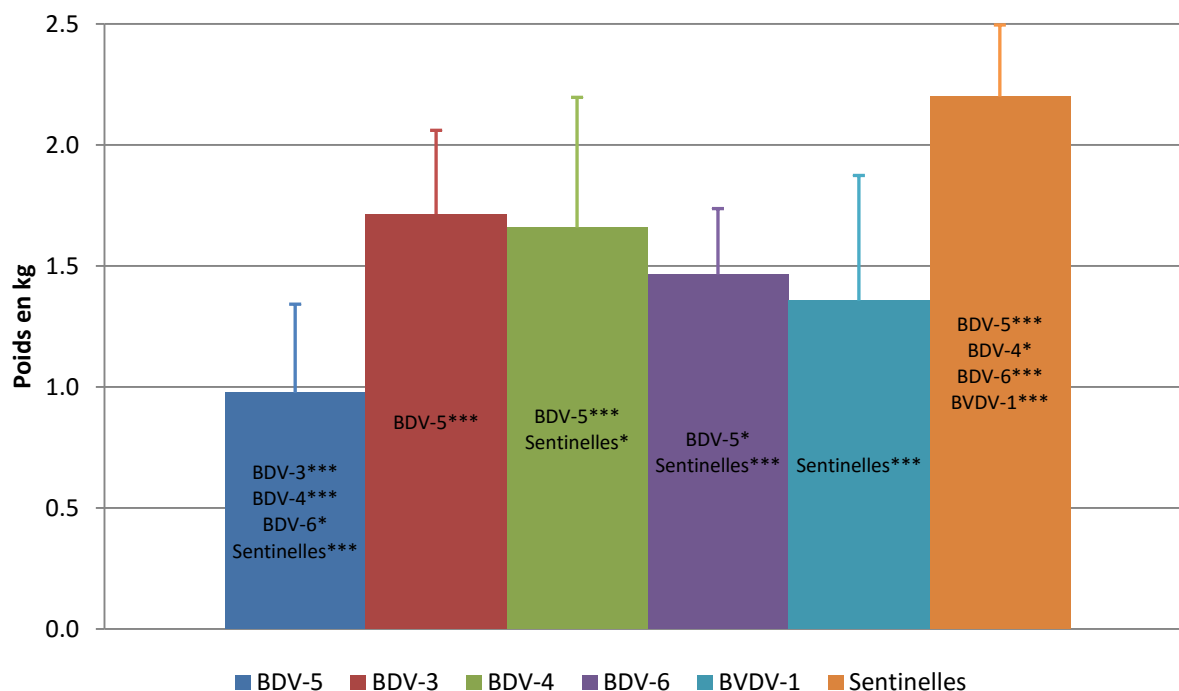


Figure 16 : Pourcentage des fœtus morts en fonction de la souche inoculée

Concernant le poids des fœtus (figure 17), le groupe BDV-5 apparaît significativement différent de tous les autres groupes, excepté du groupe BVDV-1. Tous les groupes apparaissent significativement différents par rapport aux sentinelles, excepté le groupe BDV-3.



Au centre des barres, figurent les groupes pour lesquels la différence moyenne de poids est significative avec :
 * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$

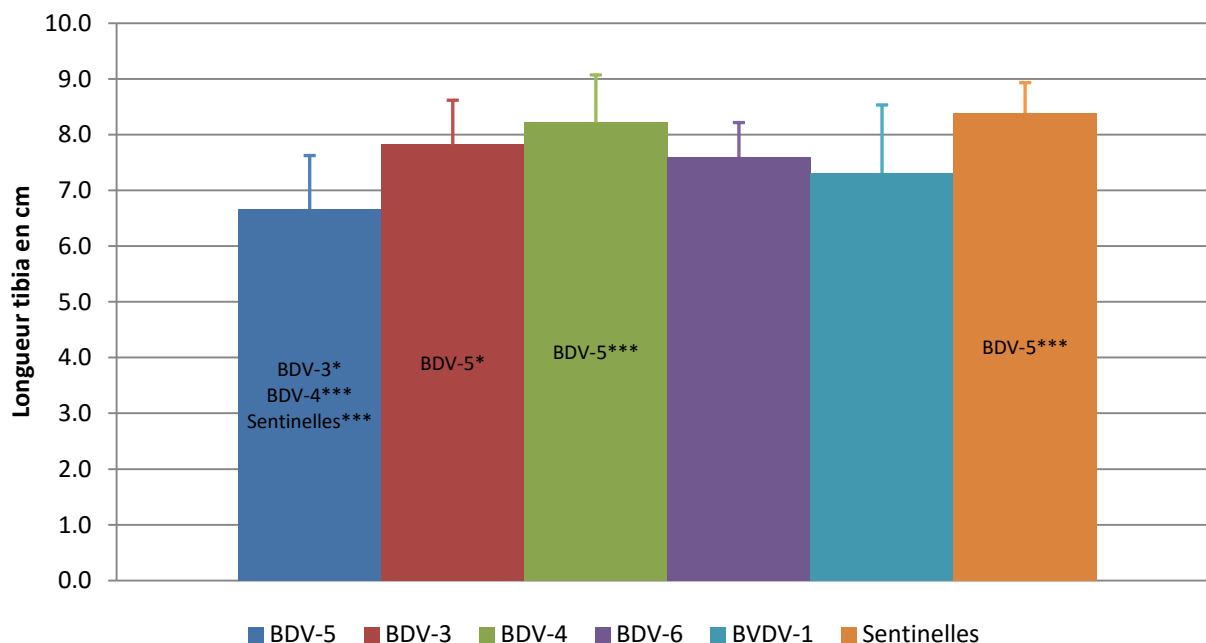
Figure 17 : Moyenne des poids des fœtus (en kg avec écarts-types) en fonction de la souche inoculée

Pour le groupe BDV-5, il n'y a pas de différence significative entre les fœtus morts et les fœtus normaux. Pour le groupe BVDV-1, il n'y a pas de différence significative entre les fœtus malformés et les fœtus normaux. En revanche, pour le groupe BDV-4, il y a une différence significative entre les fœtus malformés et les fœtus normaux ($p < 0,05$) (annexe 14).

Plus précisément, ce sont les fœtus morts du groupe BDV-5 qui sont significativement différents des groupes BDV-3, BDV-4, BDV-6 et des sentinelles. Les agneaux normaux du groupe BDV-5 sont eux, uniquement différents significativement des agneaux normaux du groupe BDV-4 et des sentinelles (annexe 14).

Les fœtus malformés ou morts (des groupes en possédant) ainsi que les fœtus normaux (de ces mêmes groupes) apparaissent significativement différents des fœtus sentinelles, excepté pour les fœtus normaux du groupe BDV-4 (annexe 14).

Concernant la longueur tibiale, elle apparaît uniquement significativement différente entre le groupe BDV-5 et les groupes BDV-3, BDV-4 et sentinelles (figure 18).



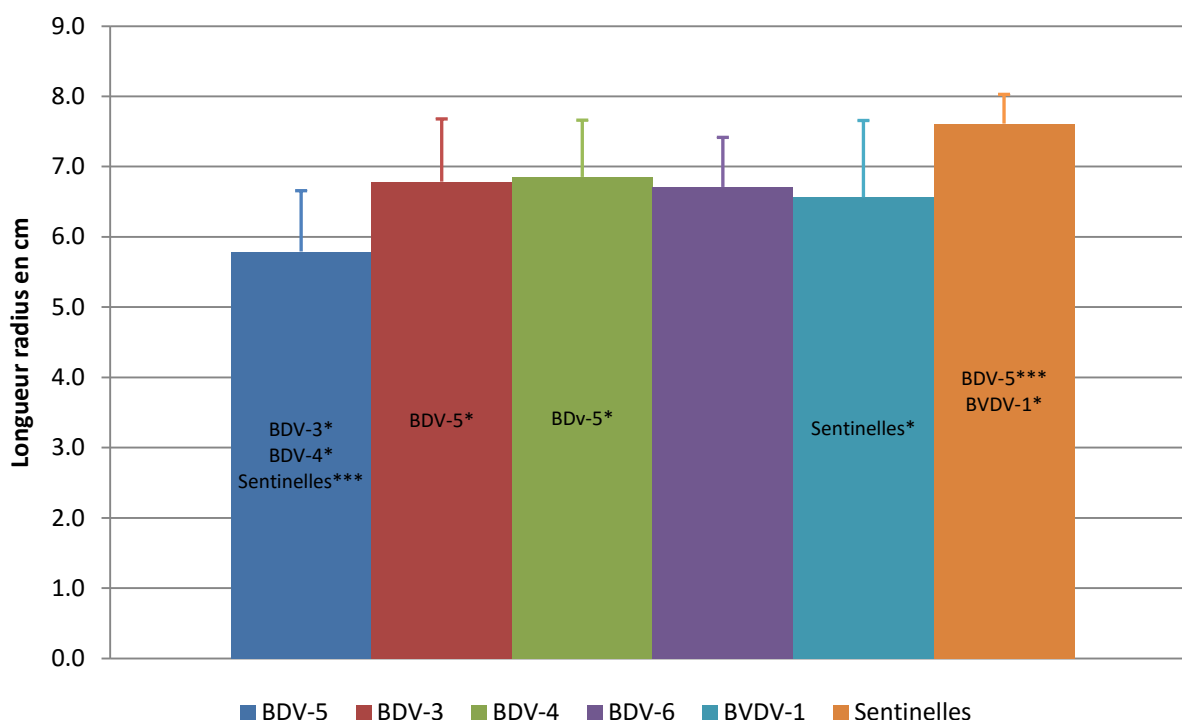
Au centre des barres, figurent les groupes pour lesquels la différence de longueur moyenne des tibias est significative avec : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$

Figure 18 : Longueurs moyennes des tibias (en cm, avec écart-types) en fonction de la souche inoculée

Si on regarde plus en détail, on s'aperçoit que les différences s'expliquent par le nombre de fœtus morts. En effet, les fœtus morts du groupes BDV-5 sont significativement différents des agneaux des groupes BDV-3, BDV-4 (fœtus malformés et agneaux vivants), BDV-6 et des sentinelles (annexe 14).

Concernant le groupe BDV-5 en lui-même, il y avait une différence significative ($p < 0,01$) de longueur tibiale entre les fœtus morts et les agneaux vivants que l'on ne retrouvait pas chez les groupes BDV-4 et BVDV-1 (annexe 14).

Concernant la longueur radiale, elle apparaît uniquement significativement différente entre le groupe BDV-5 et les groupes BDV-3, BDV-4 et les sentinelles. Elle apparaît de même significativement différente entre le groupe BVDV-1 et les sentinelles (figure 19).



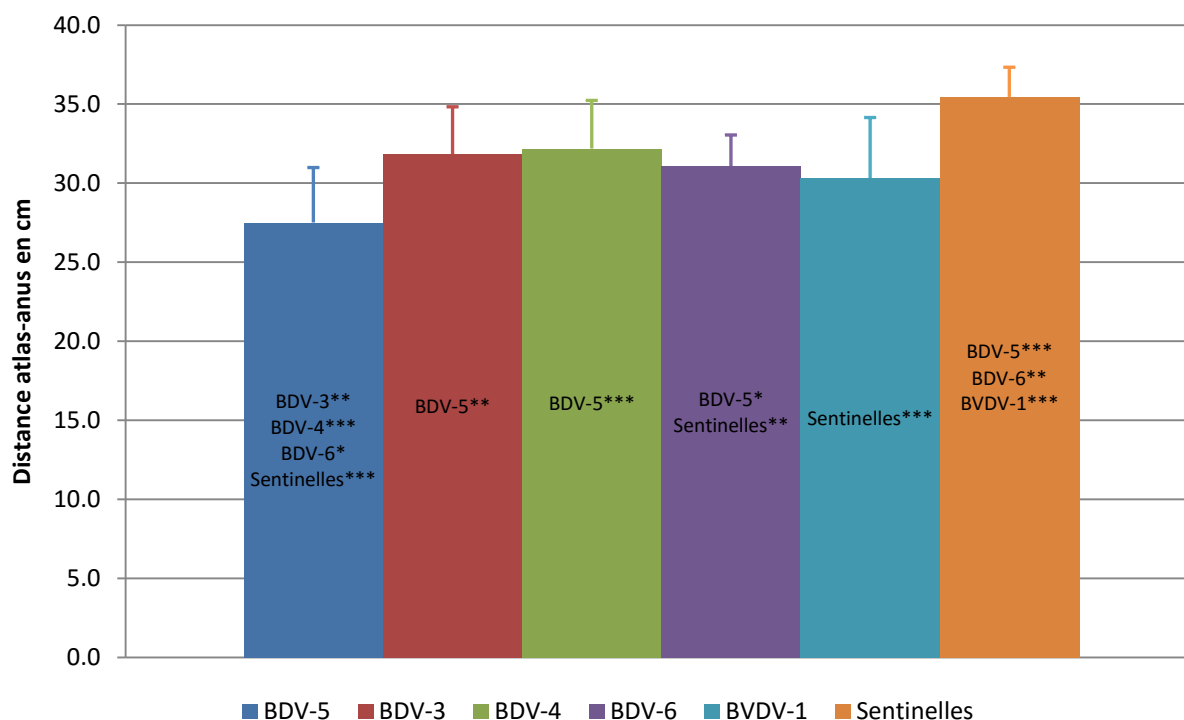
Au centre des barres, figurent les groupes pour lesquels la différence de longueur moyenne des radius est significative avec : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$

Figure 19 : Longueurs moyennes des radius (en cm, avec écart-types) en fonction de la souche inoculée

Si on regarde plus en détail, on s'aperçoit que ce sont les fœtus malformés du groupe BVDV-1 qui apparaissent significativement différents des sentinelles (annexe 14).

Les fœtus morts du groupes BDV-5 sont, quant à eux, significativement différents des agneaux des groupes BDV-3, BDV-4 (fœtus malformés et agneaux vivants), BDV-6, BVDV-1 (agneaux normaux uniquement) et des sentinelles. Concernant le groupe BDV-5 en lui-même, il y avait une différence significative de longueur radiale entre les fœtus morts et les agneaux vivants que l'on ne retrouvait pas chez les groupes BDV-4 et BVDV-1 (annexe 14).

Concernant la distance atlas-anus, elle apparaît uniquement significativement différente entre le groupe BDV-5 et les groupes BDV-3, BDV-4, BDV-6 et sentinelles. Elle apparaît de même significativement différente entre le groupe BVDV-1, BDV-6 et les sentinelles (figure 20).



Au centre des barres, figurent les groupes pour lesquels la différence de longueur moyenne atlas-anus est significative avec : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$

Figure 20 : Distance moyenne atlas-anus (en cm avec écart-types) en fonction de la souche inoculée

Si on regarde plus en détail, on s'aperçoit que ce sont les fœtus malformés du groupe BVDV-1 qui apparaissent significativement différents des sentinelles (annexe 14).

Les fœtus morts du groupes BDV-5 sont, quant à eux, significativement différents des agneaux des groupes BDV-3, BDV-4 (fœtus malformés et agneaux vivants), BDV-6, BVDV-1 (agneaux normaux uniquement) et des sentinelles. Les agneaux normaux du groupe BDV-5 sont également significativement différents des sentinelles. Concernant le groupe BDV-5 en lui-même, il y avait une différence significative de distance atlas-anus entre les fœtus morts et les agneaux vivants que l'on ne retrouvait pas chez les groupes BDV-4 et BVDV-1 (annexe 14).

3.2.3 Sérologie des fœtus

Une sérologie BDV a été réalisée sur les sangs fœtaux (sang cardiaque), pour infirmer ou confirmer une infection persistante immunotolérante.

Le test ELISA NS2-3 a mis en évidence 100% de fœtus séronégatifs dans les groupes BDV-5 Aveyronite et BDV-6.

En revanche, concernant les groupes BDV-3, BDV-4 Isard et BVDV-1 Hanovre on obtient respectivement seulement 85,7%, 70,6% et 78,6% de fœtus séronégatifs.

3.2.4 Virologie des fœtus

La présence du virus BDV a été recherchée par RT-qPCR sur le cerveau, le thymus et la rate de l'ensemble des fœtus ainsi que sur le placenta des brebis.

Les résultats ont montré que 100% des cerveaux étaient positifs pour les groupes BDV-5 et BVDV-1. 95% des cerveaux étaient positifs pour le groupe BDV-6 alors que les résultats étaient plus nuancés pour les groupes BDV-3 et BDV-4 avec respectivement 85,7% et 88,2% de cerveaux positifs (figure 21).

Les données issues des thymus confirment les résultats obtenus à partir des cerveaux. Pour les thymus, les groupes BDV-5, BDV-4 BDV-6 et BVDV-1 ont 100% de positivité alors que le groupe BDV-3 montre 92,3% de résultats positifs (figure 21).

En revanche, les résultats concernant les rates se sont révélés plus décevants. Alors que le groupe BDV-6 affichait 65% de résultats positifs, les groupes BDV-5, BDV-3, BDV-4 et BVDV-1 montraient respectivement 41,7%, 21,4%, 41,2% et 40% de résultats positifs (figure 21).

Globalement, l'ensemble des fœtus a été détecté positif pour au moins un prélèvement pour l'ensemble des groupes testés.

Finalement, les résultats sur les placentas ont montré respectivement 92,3%, 93,8% et 86,7% de résultats positifs pour les groupes BDV-4, BDV-6 et BVDV-1. Les groupes BDV-5 et BDV-3 ont montré respectivement 75% et 64,3% de résultats positifs.

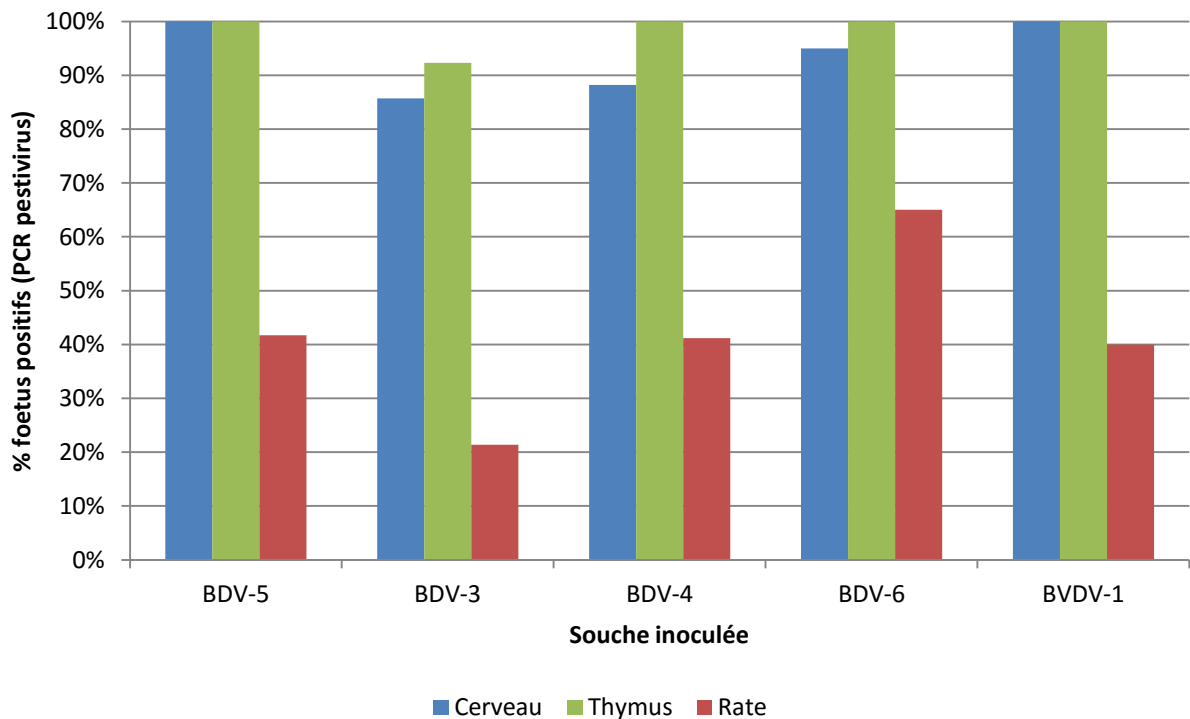
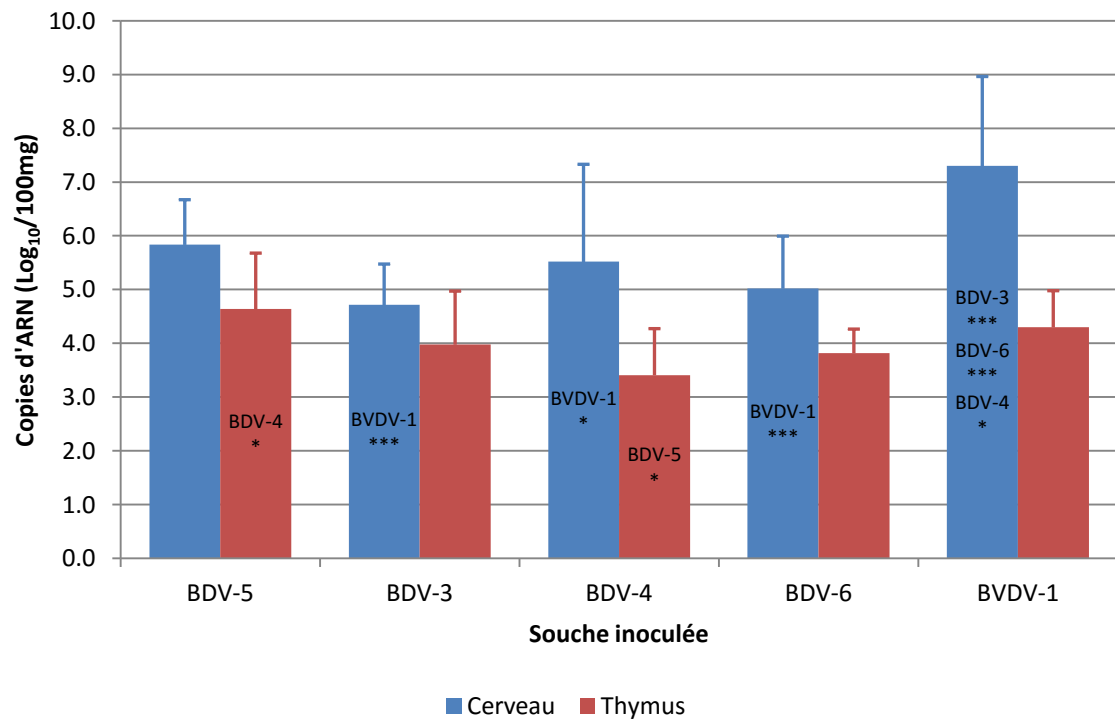


Figure 21 : Pourcentage de tissus fœtaux PCR-positifs en fonction de la souche inoculée

Concernant les charges virales, elles apparaissent globalement en moyenne similaires entre les groupes, que ce soit pour les prélèvements de thymus ou de cerveau (figure 22). Des différences significatives ont pu être observées pour le cerveau entre les groupes BVDV-1 et BDV-3 ($p < 0,001$), BVDV-1 et BDV-6 ($p < 0,001$), et BVDV-1 et BDV-4 ($p < 0,05$). Pour les prélèvements de thymus la seule différence significative ($p < 0,05$) était entre le BDV-5 et le BDV-4 (figure 22).

Les cerveaux PCR-positifs ont montré une charge virale moyenne plus importante que les thymus PCR-positifs tous groupes confondus (figure 22). Pour le cerveau, elle était en moyenne de $5,7 \log_{10}$ copies d'ARN pour 100mg d'échantillon pour l'ensemble des groupes (avec un écart-type de 1) alors que celle du thymus était en moyenne de $4 \log_{10}$ copies d'ARN pour 100mg d'échantillon (avec un écart-type de 0,5).



Au centre des barres, figurent les groupes pour lesquels la différence de charge virale moyenne est significative avec : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Figure 22 : Moyenne des charges virales (en copies d'ARN log₁₀/100mg de tissus fœtaux) des cerveaux et thymus PCR-positifs en fonction de la souche inoculée

4. DISCUSSION

Nous allons dans un premier temps discuter la méthodologie utilisée dans cette étude puis nous discuterons les résultats obtenus.

4.1 Critères de choix du modèle expérimental

Brièvement, l'objectif de ce travail était d'établir un modèle d'infection fœtale, de comparer les différences de pathogénicités entre cinq génotypes viraux, leurs capacités à infecter des brebis à 52 jours de gestation et à passer la barrière transplacentaire.

4.1.1 Choix des souches

Parmi les cinq souches utilisées, seules trois d'entre elles avaient déjà été utilisées au cours d'une infection expérimentale.

La souche BDV-3 ENVT 10405, isolée en 2010 et génotypée en 2012 avait servi à inoculer, par voie intranasale, des brebis non gestantes lors d'un challenge vaccinal dans une thèse précédente (Anne, 2012). L'infection était alors asymptomatique.

Le BDV-4 Isard avait déjà montré sa capacité à créer des IPI au cours d'une infection expérimentale chez des Isards (Vautrain, 2007 ; Martin *et al.*, 2013).

Enfin, le BVDV-1 Hanovre avait été testé chez des génisses lors d'une inoculation d'épreuve dans le cadre de l'essai de protection fœtale par un vaccin vivant atténué (Meyer *et al.*, 2012). Le virus avait alors été détecté par RT-PCR chez 100% des fœtus des génisses contrôles non vaccinées.

Nous pouvons nous interroger sur le choix d'un virus BVDV-1, d'une espèce différente, dans le cadre de l'élaboration d'un modèle expérimental ovin d'infection fœtale par le BDV. Ce choix repose sur deux idées.

Premièrement, le modèle va par la suite être utilisé pour valider l'efficacité de différents vaccins à protéger les fœtus ovins d'une infection à BDV mais aussi à BVD. En effet le virus BVD, s'il infecte prioritairement les bovins, est capable d'infecter les ovins et de produire des animaux IPI (Becher *et al.*, 1997).

Enfin, les vaccins contenant des souches de BDV n'existant plus en France, ce sont uniquement des vaccins BVD qui sont utilisés et seront testés dans ce modèle.

Or, Vantsis *et al.*, ont montré en 1980, que des brebis immunisées avec du BVDV (souche NADL cp) et challengées ensuite avec un virus homologue produisaient 100% d'agneaux normaux. Au contraire, des brebis immunisées avec du BVDV et challengées ensuite avec un virus hétérologue (BDV, souche Moredun cp) donnaient 92% d'agneaux anormaux. Ainsi, il semblerait ici que la souche d'inoculation qui sera choisie pour le modèle expérimental détermine par la suite les résultats du challenge vaccinal.

Cependant, les résultats de cette étude sont à prendre avec précaution, la différence avec les agneaux normaux ou anormaux étant faite sur de simples manifestations clinico-pathologiques, aucune sérologie ou PCR n'ayant été réalisée pour déterminer le statut IPI ou non de ces agneaux. De plus, il est désormais admis que les souches cytopathogènes ne passent pas la barrière transplacentaire.

Le choix d'utiliser différentes souches de BDV repose d'abord sur les données de la littérature. En effet, Nettleton *et al.* avaient comparé en 1992 la capacité de trois souches différentes de BDV à produire des agneaux IPI. Il y avait parmi elles, la souche Moredun cp ainsi que les souches Moredun ncp et Oban ncp. Ils avaient obtenu des différences de pathogénicité en fonction de la souche inoculée.

Par ailleurs, les souches BDV-3 et BDV-6 ont été sélectionnées, car ce sont les souches actuellement identifiées dans les élevages ovins, à l'origine des troubles cliniques observés ces dernières années notamment en Aveyron.

La souche BDV-5 est la souche originellement identifiée. Elle n'est plus détectée actuellement, mais elle est connue pour présenter un fort pouvoir pathogène par rapport aux autres souches de BDV.

Enfin, la souche BDV-4 a été initialement identifiée chez les isards, où elle a provoqué des mortalités importantes jusque dans les années 2003-2004, elle a cependant été détectée récemment dans les troupeaux ovins des Pyrénées (Valdazo-Gonzalez *et al.*, 2006).

4.1.2 Choix de la voie et de la dose d'inoculation

La difficulté résidait dans le fait de trouver une voie d'inoculation, une dose infectieuse et une période d'infection les plus propices à l'obtention d'agneaux IPI. Peu d'études traitent de l'infection expérimentale de brebis gestantes avec un pestivirus (et notamment un BDV).

En nous intéressant à ces publications, nous nous sommes rendu compte que la voie majoritaire d'inoculation était la voie intramusculaire, contrairement à la voie intra-nasale, couramment utilisée pour les infections par le BVDV. En effet, la voie intramusculaire était

utilisée dans trois publications (Caffrey *et al.*, 1997 ; Richardson *et al.*, 1976a ; Garcia-Perez *et al.*, 2009) sur sept alors que les autres voies d'inoculation étaient la voie sous-cutanée (Nettleton *et al.*, 1992), la voie parentérale (Barlow *et al.*, 1980), la voie intraveineuse (Plant *et al.*, 1983) ou encore la voie intra-nasale couplée à la voie intraveineuse (Scherer *et al.*, 2001). Par ailleurs, le fait que plusieurs épidémies de BDV aient été associées à des vaccins contaminés par des pestivirus, nous confortait dans ce choix (Loken *et al.*, 1991). Toutefois il faut garder en mémoire que la voie intramusculaire n'est pas la voie d'infection naturelle.

Concernant les doses infectieuses, celles utilisées dans les études précédentes varient entre 2.10^2 TCID₅₀ et 5.10^7 TCID₅₀. Par ailleurs, Richardson montra en 1976, que la dose d'inoculum utilisée influait sur la sévérité de la maladie induite chez le fœtus. En effet, une forte dose d'inoculum (avec 10% de suspension tissulaire d'animal malade) menait à d'avantage d'avortements qu'une faible dose (avec 0,1% de suspension tissulaire d'animal malade). Cependant, il restait difficile pour nous d'établir une dose appropriée étant donné que les souches et les voies d'administration n'étaient pas toutes les mêmes dans ces études.

La dose de 2.10^6 TCID₅₀ de BDV-4 a ainsi permis d'infecter 100% des fœtus, sans avortement, dans l'étude de Garcia-Perez *et al.* en 2009, alors que pour des souches plus classiques, les doses utilisées étaient moindres (Barlow *et al.*, 1980 ; Caffrey *et al.*, 1997 ; Richardson *et al.*, 1976a ; Nettleton *et al.*, 1992). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser une dose moyenne de 2.10^5 TCID₅₀, au cas où les autres souches utilisées soient plus abortives. En effet, nous voulions avoir la même dose infectieuse pour nos cinq virus afin de pouvoir comparer leur pouvoir pathogène et s'affranchir de l'effet dose.

4.1.3 Période d'inoculation et d'autopsie

Pour ce qui est de la période d'inoculation permettant de produire des fœtus IPI, les données étaient plus homogènes dans les études. La période de 54 jours, plus ou moins deux jours, ressortait dans trois études sur sept (Barlow *et al.*, 1980 ; Caffrey *et al.*, 1997 ; Garcia-Perez *et al.*, 2009). Dans les autres études, la période d'inoculation n'excédait jamais 60 jours de gestation, ce qui correspond à l'acquisition du système immunitaire adaptatif des fœtus. C'est donc en accord avec ces données que nous avons choisi une période d'inoculation à 52 jours de gestations pour toutes les brebis.

Les brebis ont été euthanasiées environ un mois avant leur terme. Cette période a été choisie pour des facilités logistiques. En effet, il était impossible de surveiller les mises bas des cinq groupes en même temps afin d'empêcher la prise de colostrum des agneaux nouveaux nés. Cependant nous sommes en droit de nous demander si cette période de trente

jours supplémentaires n'aurait pas mené à plus d'avortements. Il est en effet connu que les avortements à pestivirus peuvent être décalés par rapport au jour de l'infection, et plus spécialement pour le BDV. D'un autre côté, le modèle a pour objectif de tester des vaccins empêchant le passage transplacentaire du virus et donc à la fois de prévenir les avortements et la production d'agneaux IPI.

4.2 Etude comparative du pouvoir pathogène des génotypes viraux chez la brebis gestante adulte

La virulence des différents génotypes de BDV et BVD chez les brebis adultes a été analysée sur la base des réponses clinique, hématologique et virologique.

Sur le plan clinique, les symptômes présentés par les brebis étaient minimes et pouvaient être attribués à la mise en lot.

En comparaison, Garcia-Perez *et al.* (2009) n'avaient recensé aucun symptôme sur leurs brebis infectées par une souche BDV-4, hormis une hyperthermie transitoire avec un maximum de trois jours à plus de 40,5°C. Cette hyperthermie n'a pas été mise en évidence chez les brebis du groupe BDV-4. Leur température moyenne n'a jamais excédé 39,5°C. De plus, elle s'est révélée une seule fois différente significativement de la température moyenne des sentinelles dans la semaine ayant suivie l'inoculation.

Aucune des souches testées ne s'est révélée plus symptomatique qu'une autre. Ces résultats étaient prévisibles pour les souches BDV-3, BDV-6, BDV-4 et BVDV-1 dont les affections passent le plus souvent inaperçues sur le terrain. Cependant, la souche BDV-5 Aveyronite est au contraire réputée pour induire des signes cliniques, y compris chez les adultes.

Dans notre cas, bien qu'une brebis du groupe infecté avec du BDV-5 Aveyronite ait fait un pic d'hyperthermie à 40.2°C à J7, aucune différence significative d'écart de température entre ce groupe et le groupe sentinelle n'a été notée. Par ailleurs, toutes les brebis de ce groupe ont présenté en plus un abattement à J8 post-infection, mais sans jamais présenter de symptômes types de la « petega ovina ». Dans notre cas, il est possible que l'isolat obtenu dans les années 1980 ne fût pas très pathogène, il n'avait jamais été testé auparavant. De plus, la souche utilisée dans notre étude avait subi douze passages en cultures cellulaires, ce qui aurait pu atténuer son pouvoir pathogène.

Concernant les températures en général, les comparaisons entre groupes étaient difficiles à faire. En effet, une forte variabilité intra et inter groupe était déjà présente avant

l'inoculation. Il aurait été intéressant de réaliser la moyenne, exprimée en pourcentage, des températures par rapport à la température moyenne des trois jours précédant l'inoculation, pour chaque groupe et chaque jour comme ce qui a été fait pour les analyses hématologiques. Ceci aurait permis de mieux dégager les éventuels pics de température par rapport aux sentinelles et d'atténuer les variations présentes déjà avant l'inoculation.

Sur le plan hématologique, une leucopénie transitoire entre J2 et J7 a été notée pour tous les groupes, sauf le groupe BDV-5, pour qui elle a continué au-delà de J14 sans entraîner de différence d'expression clinique en tant que telle comparée aux autres groupes.

Si on compare les résultats du groupe BDV-4 à ceux obtenus par Garcia-Perez *et al.*, on observe des similitudes. En effet, ils avaient obtenu une baisse significative du nombre de leucocytes entre J2 et J5 alors qu'elle se situait entre J4 et J6 dans notre cas (J5 n'ayant pas été testé). Elle était donc légèrement plus courte et décalée dans le temps en ce qui nous concerne. Cela peut être attribué à la dose infectieuse, qui était dix fois plus forte que dans notre cas.

Des similitudes ont également été observées en comparant les résultats du groupe BDV-3 avec ceux de Anne (2012). Elle obtenait une leucopénie transitoire s'étalant de J2 à J8.

Cette leucopénie se caractérise principalement par une lymphopénie transitoire qui a été mise en évidence pour l'ensemble des groupes entre J2 et J7. Garcia-Perez *et al.*, ne font pas mention des lymphocytes dans leur étude. Anne avait obtenu une lymphopénie s'étalant entre J2 et J8, donc semblable à nos résultats. Dans notre cas, les différences significatives ont principalement été observées entre les différents groupes et le groupe sentinelle sur cette période. Aucun groupe ne s'est réellement détaché d'un autre. La leucopénie (lymphopénie par apoptose cellulaire) transitoire est un phénomène couramment observé après infection par les pestivirus, qui pourrait expliquer l'augmentation de la fréquence des signes cliniques post-infection observés dans les conditions naturelles.

Plus curieusement, une monocytose a été obtenue à J9 pour l'ensemble des groupes. Elle survient suite à l'épisode de lymphopénie dans notre cas. Le groupe BDV-4 se détache nettement des autres groupes de manière significative et présente une augmentation de 200% entre J7 et J9. Cette monocytose n'a jusqu'à présent jamais été décrite dans la littérature pour le BDV ou le BVDV. En l'absence d'analyse plus précise, comme l'étude des médiateurs sanguins pro-inflammatoires ou l'étude de la réceptivité virale des monocytes, il n'est pas possible d'émettre d'hypothèses sur cette monocytose transitoire.

Une virémie transitoire a pu être détectée chez quasiment toutes les brebis (annexe 15). Le fait que cette virémie n'ait pas été détectée chez certaines brebis dans certains groupes, peut être attribué à la souche en question. En effet, les souches BVDV-1 et BDV-5 ont induit une virémie détectable dans 100% et 87,5% des cas, respectivement. Alors que la virémie n'était détectable que dans 62,5%, 50% et 66,7% des cas pour les souches BDV-3, BDV-4 et BDV-6, respectivement. Par ailleurs, certains jours, des prélèvements n'ont pas été analysés (J8, J10, J12 et J13). Il est probable que les brebis vironégatives les autres jours aient été positives ces jours-là. Les PCR n'ont pas été réalisées pour les jours ultérieurs, les études rapportant que la virémie cesse en générale à J14, quand apparaissent les anticorps neutralisants.

Les groupes BDV-5 et BVDV-1 sont ceux ayant montré le plus de jours consécutifs de virémie avec, respectivement, 4 à 5 jours consécutifs et 3 à 4 jours consécutifs. En comparaison, les autres groupes présentaient au maximum entre 1 à 3 jours consécutifs de virémie. Cette particularité n'a pas eu d'incidence sur le taux d'infection fœtale. En effet, le virus a été mis en évidence chez tous les fœtus, tous les groupes confondus, pour au moins un organe (annexe 15). Ces données sont similaires à celles obtenues dans la littérature avec les modèles d'infection à BVDV chez les vaches gestantes, où la détection du virus chez la mère est très souvent fugace et à des titres faibles, alors que les charges dans les fœtus sont très importantes.

Dans notre étude, les charges virales étaient les plus importantes dans les cerveaux des fœtus du groupe BVDV-1 et BDV-5, les deux groupes pour lesquels les virémies chez les mères étaient les plus longues. Ainsi, la durée de la virémie pourrait avoir un lien avec la charge virale retrouvée ensuite chez les fœtus.

Le fait que la virémie n'excédait pas cinq jours consécutifs toutes souches confondues, indiquait probablement que le virus se concentre ensuite rapidement au niveau de l'utérus pour infecter le fœtus. Toutefois, pour en être sûr, il aurait fallu réaliser des ponctions de liquide amniotique afin d'évaluer sa concentration en charge virale. Ceci n'a pas été réalisé, le risque d'induire un avortement iatrogène étant trop grand.

Il n'est pas évident de comparer nos résultats à ceux d'autres expérimentations dans le sens où peu d'infections de brebis gestantes ont été réalisées. L'institut Moredun en Ecosse a mené des travaux à ce sujet dans les années 90 en utilisant la souche du même nom (souche Moredun) qui appartient au génotype BDV-1. Cependant, la virémie des brebis n'avait alors pas été investiguée. De plus, certaines infections expérimentales ne typaient pas le virus inoculé.

L'étude récente de Garcia-Perez *et al.*, en 2009, utilisait le génotype BDV-4, souche 0502234 isolée à partir des leucocytes d'une brebis IPI. Ils détectèrent une virémie dans 84,6% des cas qui s'étalait sur un à dix jours. Cependant, leur titre d'inoculum était dix fois supérieur à celui utilisé dans notre étude (la voie d'inoculation était la même).

Anne utilisa en 2012 la souche BDV-3 ENVT pour infecter des brebis non gestantes. Au cours de cette expérimentation aucune virémie n'avait pu être détectée. Ceci fut principalement attribué au fait qu'après vérification du titre viral de l'inoculum, celui-ci s'était avéré être quinze fois moins concentré que prévu. Par ailleurs, la voie d'inoculation (intranasale) et la dose prévue (10^5 DIC₅₀) étaient différentes comparées à notre étude.

Bien que la virémie n'ait pas été détectée chez toutes les brebis, l'infection a tout de même bien eu lieu car une séroconversion a été observée pour chacune d'entre elles.

4.3 Etude comparative de l'infection fœtale par les différents génotypes de pestivirus

Un des résultats les plus intéressants de cette étude concerne les différences qui ont pu être observées quant à la capacité des différents génotypes à induire des avortements et/ou des malformations congénitales.

La souche BDV-5 Aveyronite, est celle qui a induit le plus de mortalité et d'avortements au sein des différents groupes, suivi par la souche BVDV-1. En effet, la moitié des fœtus du groupe BDV-5 étaient morts à l'autopsie (annexe 15). Ce pourcentage pourrait être surestimé, du fait de la mort possible des fœtus lors de l'euthanasie des brebis. Cependant, il n'y a pas eu de mortalité aussi importante dans les autres groupes en utilisant le même protocole et les analyses topographiques donnent des mesures significativement moins importantes pour les fœtus morts, suggérant une mortalité antérieure. En effet, Richardson *et al.*, proposèrent en 1976 des équations permettant une estimation de l'âge d'un fœtus d'agneau (en jours de gestation) en se basant sur sa longueur atlas-anus, sa longueur tibiale et sa longueur radiale.

Tableau 6 : Calcul de développement fœtal des agneaux du groupe BDV-5 en jours de gestation (d'après Richardson *et al.*, 1976b)

BDV-5		normaux	morts	sentinelles†
longueur atlas-anus	longueur moyenne en mm	300	249	354
	âge en jours de gestation*	95	85	106
longueur tibiale	longueur moyenne en mm	73	60	84
	âge en jours de gestation**	118	106	128
longueur radiale	longueur moyenne en mm	64	52	76
	âge en jours de gestation***	130	115	145
moyenne des âges estimés (en jours de gestation)		114	102	126

† sentinelles de l'ensemble des groupes

* âge estimé calculé à l'aide de la longueur atlas-anus (X) avec l'équation suivante : $\text{âge}=(X+163)/4.86$

** âge estimé calculé à l'aide de la longueur tibiale (Y) avec l'équation suivante : $\text{âge}=(Y+59.6)/1.124$

*** âge estimé calculé à l'aide de la longueur radiale (Z) avec l'équation suivante : $\text{âge}=(Z+41.1)/0.807$

Ces équations nous ont permis d'estimer l'âge de nos fœtus sentinelles à 126 jours de gestation. Cette valeur n'est pas tout à fait exacte. En effet, les autopsies ont eu lieu à 116 jours de gestation pour deux d'entre eux, 117 jours de gestation pour quatre d'entre eux et 119 jours de gestation pour trois d'entre eux. L'âge moyen de nos fœtus sentinelles était donc de 117 jours. Cependant, malgré cette surestimation de neuf jours de l'âge moyen réel des sentinelles, les équations estimèrent les fœtus normaux du groupe BDV-5 à 114 jours et les fœtus morts à 102 jours de gestation confirmant l'antériorité de leur mort.

En plus de cette mortalité, 25% des brebis ont avorté, les avortements étant spécifiques au BDV. On peut aussi supposer que les brebis possédant des fœtus morts auraient pu avorter ultérieurement. Ces données confortent la virulence de cette souche observée au cours de l'épisode de *petega ovina* qui toucha l'Aveyron dans les années 80 (Chappuis *et al.*, 1986).

Les souches BDV-3 et 6, récemment isolées en France, n'ont entraîné ni avortement, ni mortalité durant cette étude.

Au contraire, la souche BDV-4 a essentiellement mené à des malformations (59% des agneaux). Ce chiffre est légèrement supérieur à ce qu'avaient obtenu Garcia-Perez *et al.*, dans leur infection expérimentale (40%) en 2009, cependant le nombre d'agneaux étaient nettement inférieur (5 contre 17 dans notre étude pour ce virus BDV-4). En revanche, l'arthrogrypose, et l'aplasie cérébelleuse étaient des symptômes communs aux deux études. Toutefois, l'hydrocéphalie n'était pas présente dans leur étude alors que c'était la lésion majoritaire dans celle-ci.

Le deuxième effet observé dans cette étude portait sur le retard de croissance de certains fœtus. Dès lors que la maladie fut décrite pour la première fois par Hughes *et al.*, en 1959, les agneaux atteints étaient qualifiés de plus chétifs que les autres. Pour certains, cela leur donnait un aspect semblable aux agneaux de brebis sous-alimentées pendant la gestation (Palsson *et al.*, 1952) et pour d'autres, aux agneaux de brebis ayant subi une insuffisance placentaire induite expérimentalement (Creasy *et al.*, 1972). Il faudra attendre 1973 pour que Terlecki *et al.*, quantifient ces différences morphologiques et montrent notamment que ces agneaux malades ont un poids et des longueurs des os longs inférieurs à ceux des agneaux sains. Depuis, de nombreux autres chercheurs se sont penchés sur la question. En 1976, Richardson *et al.*, en autopsiant des agneaux normaux à différents stades de gestation, postulèrent que le poids cérébral, le nombre de centres d'ossifications secondaires, la longueur de os longs et la distance atlas-anus étaient des paramètres morphologiques fiables pour déterminer leur développement fœtal. Ils pouvaient être utilisés à partir de 50 jours de gestation jusqu'au terme. Ce sont les longueurs que nous avons choisies d'utiliser pour cette étude. En effet, le calcul du nombre de centres d'ossifications secondaires faisant appel à la radiographie, imposait trop de contraintes et le poids cérébral était inenvisageable. Pour certains des cas, les modifications cérébrales étaient trop importantes et relevaient plutôt de l'action directe du virus que d'un éventuel retard de croissance.

De plus, dans l'étude de Caffrey *et al.* (1997), la mise en évidence du virus au niveau des os fœtaux chez des agneaux infectés par du BDV-1 et en retard de croissance était infructueuse jusqu'au 95^{ème} jour de gestation. Cela laisse supposer, soit que le virus est difficilement identifiable à cet endroit ou la technique inadaptée, soit que le retard de croissance n'est pas dû à l'action directe du virus sur les os eux-mêmes mais à d'autres mécanismes.

Dans notre cas, le paramètre le plus discriminant a été le poids. En effet, celui-ci s'est révélé significativement inférieur pour tous les groupes comparés aux sentinelles, excepté le groupe BDV-3. En revanche, les résultats pour les longueurs étaient hétérogènes. Seuls les fœtus morts du groupe BDV-5 et les fœtus malformés du groupe BVDV-1 présentaient un retard de croissance significatif par rapport aux sentinelles. Pour les fœtus morts du groupe BDV-5, ce retard de croissance a été attribué à une mortalité antérieure, les fœtus normaux du même groupe ne possédant pas de retard de croissance significatif par rapport aux sentinelles.

Ainsi, pour les cinq souches utilisées, un retard significatif de prise de poids a été mis en évidence chez tous les fœtus infectés, excepté ceux du groupe BDV-3, mais pas de retard de croissance, si on considère les longueurs des os, à l'exception des fœtus malformés viables

du groupe BVDV-1. Le fait que certains de ces agneaux nous apparaissaient chétifs lors de l'autopsie était donc plutôt dû à une maigreur relative plutôt qu'à une différence de taille.

En bilan, les souches ne se comporteraient donc pas de la même manière vis-à-vis des fœtus. Certaines seraient plus abortives (BDV-5 et BVDV-1 notamment), d'autres auraient des capacités à induire de la mortalité (BDV-5, BVDV-1), d'autres à induire des malformations (BDV-4, BDV-5, BDV-6) et d'autres à induire des malformations associées à des retards de croissance (BVDV-1). Pour le moment, nous ne disposons pas de données qui permettent de comprendre ces différences de pouvoir fœto-pathogène, elles pourraient être liées à la capacité des souches à entrainé une réponse inflammatoire fœtale différente (voir partie bibliographique sur la genèse des IPI) ou à un tropisme différent pour certains tissus fœtaux. Pour cela, il aurait fallu pouvoir étudier la réponse du fœtus immédiatement après l'infection des mères, au moins par ponction de liquide amniotique échoguidée.

Notons enfin que cette étude confirme bien que l'ovin est sensible à l'infection par le BVDV, avec les mêmes caractéristiques physiopathologiques qu'une infection à BDV. Si en France, la plupart des infections chez les ovins est due au BDV, la situation semble différente dans d'autres pays, comme, par exemple l'Autriche où les fréquences d'infection croisées entre BDV et BVDV sont importantes lors des estives en alpage (Krammeter *et al.*, 2010).

Si les souches virales présentent des caractéristiques différentes quant aux conséquences cliniques de l'infection fœtale, ces différences ne semblent pas corrélées à l'importance de l'infection au moins à la date de prélèvement. En effet, les charges virales du cerveau et du thymus étant similaires entre les différents groupes, excepté celles du cerveau du groupe BVDV-1 qui étaient significativement plus importantes par rapport aux groupes BDV-3, BDV-6 et BDV-4 (avec $p < 0,001$ pour BDV-3 et BDV-6 et $p < 0,05$ pour BVD-4). Néanmoins, il serait peut-être nécessaire d'envisager d'autres tissus fœtaux à tester.

Dans notre étude, la rate a montré des seuils de positivité nettement inférieurs aux autres organes (41,9% en moyenne contre 93,8% pour les cerveaux). Ces résultats diffèrent quelque peu de ceux avancés par Garcia-Perez *et al.* (2009) qui ont obtenu 100% de rates fœtales positives lors d'infection expérimentale de brebis en début de gestation par du BDV-4. Ces différences sont probablement attribuables dans notre étude à la présence d'inhibiteurs de la PCR et à la méthode d'extraction d'ARN utilisée qui ne conviendrait pas à cet organe.

In fine, une virémie a été mise en évidence chez 100% des fœtus toutes souches confondues pour au moins un organe (cerveau ou thymus) (annexe 15). Il n'était pas judicieux d'analyser le placenta comme un organe fœtal. En effet, Scherer *et al.*, (2001) avait montré

dans leur étude de 2001 une dichotomie entre le placenta côté maternel et le placenta côté fœtal quant à la répartition virale. Or, dans notre cas, le placenta était analysé tel quel, aussi bien le côté fœtal que maternel.

Dans l'étude sur le BDV-4 (Garcia-Perez *et al.*, 2009) le cerveau représentait, après la rate, l'organe où la détection virale (80% de positivité) et les charges virales étaient les plus importantes. Le thymus donnait 75% de positivité. Si on compare avec notre groupe BDV-4, nous obtenons des résultats plus élevés pour le cerveau et le thymus avec notamment 88,2% et 100% de positivité. Le nombre d'animaux utilisés respectivement dans notre étude (trois fois plus de brebis), le protocole d'extraction (notamment il n'est pas indiqué si les auteurs sont partis des mêmes quantités de tissus) et de RT-qPCR peuvent expliquer ces différences.

Par ailleurs, les mêmes auteurs ont montré que la PCR sur sang serait bien plus sensible que la PCR tissulaire concernant les fœtus. Ils attribuent cette différence à la présence d'inhibiteurs présents dans certains tissus qui ne seraient pas efficacement ôtés lors de l'extraction. La PCR sur sang fœtal n'a pas été réalisée dans notre cas, il aurait été intéressant de la réaliser afin de comparer les résultats.

La définition du statut d'infecté permanent immunotolérant (IPI) repose sur un fœtus vivant, malformé ou non, viropositif et séronégatif, dans la mesure où son système immunitaire accepte le BDV comme du soi. Sur le terrain, les avortons ou mort-nés pestivirus positifs sont souvent considérés comme des IPI. Si on regarde nos résultats, tous les fœtus étaient bien viropositifs, avec des charges en ARN importantes. Cependant, bien que les mères aient été infectées dans la période la plus propice à la création d'IPI, quelques agneaux étaient séropositifs au moment de l'autopsie (annexe 15). On peut alors considérer que ces agneaux font une réponse transitoire (et non pas permanente) avec développement d'une réponse immunitaire. Le tableau, ci-dessous, récapitule le pourcentage de fœtus séronégatifs (fœtus séronégatifs/fœtus dont le sang fœtal était disponible) obtenus en fonction de la souche inoculée ainsi que le pourcentage d'IPI (fœtus vivants, malformés ou non, viropositifs et séronégatifs/ l'ensemble des fœtus récoltés, morts et avortons compris) pour chaque groupe. Dans ce tableau, on considère que les fœtus morts ne sont pas IPI, même si la mort est provoquée par le BDV.

Tableau 7 : Pourcentage des fœtus ELISA négatifs et des IPI en fonction de la souche inoculée

	ELISA*	IPI**
BDV-5	100%	56%
BDV-3	86%	86%
BDV-4	71%	69%
BDV-6	100%	100%
BVDV-1	79%	69%

* calculé à partir des fœtus dont le sang fœtal était disponible (ni les avortons, ni les agneaux morts au moment de l'autopsie)

** calculé à partir de l'ensemble des fœtus récoltés (morts et avortons compris)

Ainsi nous pouvons voir que même si la souche BDV-5 a donné 100% de fœtus séronégatifs sur l'ensemble des fœtus testés, seuls 56% d'entre eux ont été identifiés comme IPI (voir définition plus haut). En effet, quatre d'entre eux étaient des avortons, et trois autres fœtus étaient morts lors de l'autopsie (annexe 15).

Ainsi, ce sont les souches BDV-6 et BDV-3 qui semblent donner les meilleurs résultats pour l'obtention d'IPI *sensu stricto* avec respectivement 100% et 86% de fœtus IPI obtenus.

Pour trois des groupes (BDV-3, BDV-4 et BVDV-1), une hétérogénéité des statuts fœtaux parfois même pour les fœtus d'une même brebis, était observée. En effet, l'un d'entre eux pouvait être IPI alors que son jumeau était viropositif et immunocompétent. Deux fœtus étaient concernés dans le groupe BDV-3, cinq dans le groupe BDV-4 et trois dans le groupe BVDV-1 (annex 15).

Ces différences de distribution ont déjà été rapportées dans la littérature mais pour des infections plus tardives à un moment où le fœtus avait déjà acquis son immunité, ce qui semble plus cohérent (Hurtado *et al.*, 2009 ; Campbell *et al.*, 1995).

Dans notre cas, la présence concomitante de virus et d'anticorps sériques s'est produite alors que la réponse immunitaire adaptative des fœtus était sensée ne pas être encore présente. Une première hypothèse aurait été une éventuelle contamination du sang fœtal par le sang maternel lors des euthanasies ou un défaut analytique du test.

Cependant, si on s'intéresse à la répartition virale au sein des fœtus, on s'aperçoit que la charge virale (cerveau et thymus) des fœtus viropositifs et séropositifs est inférieure en moyenne à celles des fœtus IPI viropositifs et séronégatifs de la même mère sans distinction

entre les souches BDV-3, BDV-4 et BVDV-1. La charge virale inférieure pourrait alors s'expliquer par la présence des anticorps et donc de la réponse immunitaire.

Deux informations auraient pu nous permettre de trancher quant au réel statut de ces individus immunocompétents. En effet, il aurait été intéressant, de quantifier leurs réponses sérologiques. Il a déjà été reporté le cas d'infectés permanents avec une très faible réponse sérologique contrairement aux individus infectés transitoires. Par ailleurs, Hurtado *et al.*, ont établi en 2009 un seuil de virémie sur sang fœtal permettant de distinguer un infecté permanent d'un infecté transitoire. Il aurait par conséquent été intéressant de réaliser des PCR sur sang fœtal dans notre cas.

Dans tous les cas, la présence d'une réponse immunitaire pour certains de ces fœtus soulève des questions. Est-elle due à une éventuelle contamination ou à un défaut analytique ? Mais dans ce cas, pourquoi ne la retrouve-t-on pas chez tous les groupes ? Un décalage de l'infection pour l'un des fœtus est-elle possible ? Elle surviendrait, dans ce cas, alors que son immunocompétence est acquise et une analyse plus tardive nous aurait peut être révélée une clairance du virus. Ou alors, la réponse innée, et notamment la réponse fœtale en interférons de type I ne serait pas inhibée, ce qui pourrait modifier le contexte de la présentation antigénique au système adaptatif.

4.4 Souches favorables à l'élaboration d'un modèle expérimental d'infection fœtale

Le protocole et les souches utilisées se sont révélés efficaces pour infecter les fœtus. En effet, l'infection a bien eu lieu chez toutes les mères, celles-ci ayant toutes séroconverti et le virus a également passé la barrière transplacentaire à chaque fois. Il a été retrouvé chez tous les fœtus, y compris les morts et les avortons.

Des différences ont été observées quant à la capacité des souches à induire des malformations et de la mortalité fœtale.

Un des critères d'un vaccin disposant d'une AMM « protection fœtale » contre le virus de la BVD chez les vaches est qu'il doit, notamment, empêcher l'infection de plus de 90% des fœtus des vaches vaccinées et ultérieurement infectées entre 40 et 120 jours de gestation. Par analogie, ceci correspondrait à une protection entre 15 et 85 jours chez la brebis, qui est la période à risque concernant la création d'IPI.

L'infection de vaches gestantes lors de la période critique avec une souche ncp de BVDV aboutit la plupart du temps à la création de veaux IPI. Les avortements sont plus

rarement observés à cette période d'infection. Dans notre étude, nous avons observé pour certaines souches un nombre conséquent d'avortements ou de mortalité fœtale. Les avortements lorsqu'ils ont eu lieu, se sont déroulés à 103, 107 (pour le groupe BDV-5) et 118 jours de gestation (pour le groupe BVDV-1). Comme cela est connu pour les Pestivirus, ils sont décalés par rapport à l'infection et se sont donc déroulés après la période à risque. De même, il est fort probable que certaines brebis possédant des agneaux morts aient avorté avant la mise-bas.

Lors d'essai de protection vaccinale où l'on compare les pourcentages de nouveau-nés IPI entre groupes vacciné et non vacciné, ce genre d'évènement réduit considérablement le nombre d'animaux vivants disponibles à la naissance dans le groupe contrôle, et peut par conséquent porter préjudice aux pourcentages du test vaccinal.

A l'inverse, pour les ovins, si l'on considère que les avortements et mortinatalités sont consécutifs à l'infection fœtale, ces paramètres sont aussi à prendre en compte lorsque l'on établit un test de protection. Avortements et mortinatalités ont aussi un impact économique sur le troupeau.

Ainsi, si l'on considère le critère IPI strict la survenue de mortalité ou d'avortements, ne permettrait pas de conclure quant à la réelle prévention de création des IPI sur la période donnée. De plus, cela pourrait poser problème pour déterminer la part du vaccin ou du virus dans la survenue de tels évènements au cours de l'expérimentation.

Cela exclurait les souches BDV-5 et BVDV-1 alors que les souches BDV-3, BDV-4 et BDV-6 s'avèrent des candidats intéressants pour l'élaboration d'un modèle d'infection transplacentaire en vue de tester un vaccin pour la prévention des IPI. En effet, elles ont infecté 100% des fœtus et n'ont pas induit de mortalité et d'avortements dans la période impartie. Parmi celles-ci, les souches BDV-3 et BDV-6 s'avèrent être les candidates idéales. En effet, elles ont permis une infection de 100% des fœtus et le meilleur rendement de création d'IPI par rapport aux autres souches testées.

Ainsi, si l'on considère la protection contre l'infection fœtale *sensu lato* et ses conséquences (avortements, mortinatalités, malformations congénitales et IPI) il pourrait être intéressant d'inclure une souche fœto-pathogène, comme la souche BDV-5 Aveyronite. L'utilisation de deux souches de challenge BDV éloignées d'un point de vue phylogénétique permettrait aussi de mieux tester la protection croisée apportée par les vaccins BVD.

CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer, pour la première fois, que des souches de BDV de géotypes différents ne possèdent pas le même pouvoir pathogène pour le fœtus ovin. L'ensemble des souches a montré la même capacité à infecter des brebis gestantes et à passer la barrière transplacentaire. Toutefois, les capacités des souches à entraîner de la mortalité fœtale, des avortements ou encore des retards de croissance et des malformations se sont révélées hétérogènes.

Ces différences pourraient expliquer les différents impacts que pouvaient avoir certaines souches de BDV sur des brebis gestantes. Elles sont donc à prendre en considération lors de la mise en place d'un plan de contrôle de la maladie, que ce soit en lutte sanitaire ou médicale.

Les résultats obtenus permettent aussi de proposer des pistes de souches potentiellement utilisables afin de tester ultérieurement un vaccin conférant une protection fœtale pour la Maladie de la Frontière chez la brebis.

En vue de tester un vaccin pour la prévention des IPI, les souches BDV-3 et BDV-6 s'avèrent les plus prometteuses. En vue d'une protection fœtale et de ses conséquences, la souche BDV-5 Aveyronite semble intéressante.

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 **BETHUNE Marie-Anne** intitulée « *Influence du génotype viral sur l'infection fœtale par le virus de la maladie de la frontière (Border Disease)* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 24 novembre 2015
Professeur Gilles MEYER
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
**La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse**
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jacques IZOPET



Mlle BETHUNES Marie-Anne
a été admis(e) sur concours en : 2010
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 26/06/2014
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2015
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :
**Administrateur Provisoire de
l'Université
Paul Sabatier**
Monsieur Amal SAYAH

L'Administrateur Provisoire

Amal SAYAH



**Université
de Toulouse**

BIBLIOGRAPHIE

ANNE S (2012). *Vaccination contre la Maladie des Frontières (Border Disease) chez le mouton : premiers essais d'efficacité du vaccin inactivé Bovilis-BVD*. Thèse de doctorat vétérinaire, ENVT, 94 p.

BACHOFEN C, STALDER H, BRAUN U, HILBE M, EHRENSPERGER F, PETERHANS E (2008). Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation, *Veterinary Microbiology*, **131**, 93-102.

BARLOW RM & PATTERSON DSP (1982). Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder. *Adv. Vet. Med. (Suppl. J. Vet. Med.)*, **36**, 1-87.

BECHER P, ORLICH M, SHANNON AD, HORNER G, KONIG M, THIEL HJ (1997). Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol.* **78**, 1357-1366.

BERNARDIN E (2011). *Utilisation du lait de tank pour l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau vis-à-vis de la Border Disease en élevage ovin lait : une étude pratique en Aveyron*. Thèse de doctorat vétérinaire, ENVT, 93 p.

BERRIATUA E, BARANDIKA J, ADURIZ G, ATXAERANDIO R, GARRIDO J, GARCIA-PEREZ AL (2004). Age-specific seroprevalence of Border Disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. *The Veterinary Journal*, **168**, 336 – 342.

BEYNON AG (1962). Swine fever in Great Britain. *Bulletin de l'office international des épizooties*, **57**, 1461–1487.

BONNIWEL MA, NETTLETON PF, GARDINER AC, BARLOW RM, GILMOUR JS (1987). Border Disease without nervous signs or fleece changes. *The Veterinary Record*, **120**, 246-249.

BROWNLIE J, CLARKE MC, HOWARD CJ (1989). Experimental infection of cattle in early pregnancy with a cytopathic strain of bovine virus diarrhoea virus. *Res Vet Sci* **46**, 307-311.

CAFFREY JF, DUDGEON AM, DONNELLY WJC, SHEAHAN BJ, ATKINS GJ (1997). Morphometric analysis of growth retardation in fetal lambs following experimental infection of pregnant ewes with Border Disease virus. *Research in Veterinary Science*, **62**, 245-248.

CAMPBELL JR, RADOSTITS OM, WOLFE JT, JANZEN ED (1995). An outbreak of Border disease in a sheep flock. *Can Vet J*, **36**, 307-309.

CARLSSON U (1991). Border Disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with Bovine Virus Diarrhoea virus. *The Veterinary Record*, **128**, 145-147.

CAY B, CHAPPUIS G, COULIBALY C, DINTER Z, EDWARDS S, GREISER-WILKE I, GUNN M, HAVE P, HESS G, JUNTTI N, LIESS B, MATEO A, MCHUGH P, MOENNIG V, NETTLETON P, WENSVOORT G (1989). Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an International workshop. *Veterinary microbiology*, **20**, 123-129.

CHAPPUIS G, BRUN A, KATO F, DAUVERGNE M, REYNAUD G & DURET C (1986). Etudes sérologiques et immunologiques réalisées à la suite de l'isolement d'un pestivirus dans un foyer ovina chez des moutons de l'Aveyron. In : *Journées nationales de la Société Française de Buiatrie et de son groupe d'étude sur la pathologie des ovins et des caprins (GEPOC)*, 6 et 7 décembre 1986, Paris. Paris : Espinasse J et Savey M, p. 55-66.

CHASE CCL, ELMOWALID G & YOUSSEF AAA (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: A constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, **20**, 95-114.

COLLETT MS, ANDERSON DK & RETZEL E (1988). Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flaviviridae. *J Gen Virol* **69**, 2637-2643.

CORTESE VS, WHITTAKER R, ELLIS J, RIDPATH JF, BOLIN SR (1998). Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea. *Am Vet Res*, **59**, 848-850.

CREASY RK, DE SWIET M, KANHANPAA KV, YOUNG WP, RUDOLPH AM (1972). Pathophysiological changes in the fetal lamb with growth retardation. In : *Sir Joseph Barcroft centenary symposium*, 25-27 July 1972, Cambridge. Cambridge : Cambridge University Press, p. 398.

DUBOIS E, RUSSO P, PRIGENT M, THIERY R (2008). Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Veterinary microbiology* **130**, 69-79.

EDWARD S, SANDS JJ, HARKNESS JW (1988). The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Archives of virology*, **102**, 197-206.

ELBERS K, TAUTZ N, BECHER P, STOLL D, RUMENAPF T, THIEL HJ (1996). Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *Journal of virology*, **70**, 4131-413.

EASTON LA, VILCEK S, NETTLETON PF (1994). Evaluation of a 'one tube' reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of ruminant pestiviruses. *J Virol Methods*, **50**, 343-348.

FAHEY KJ, MORRIS B (1978). Humoral immune responses in fetal sheep. *Immunology*, **35**, 651-66.

GARCIA-PEREZ AL, MINGUIJON E, ESTEVEZ L, BARANDIKA JF, ADURIZ G, JUSTE RA (2009a). Clinical and laboratorial findings in pregnant ewes and their progeny infected with Border Disease virus (BDV-4 genotype). *Research in Veterinary Science*, **86**, 345-352.

GARCIA-PEREZ AL, MINGUIJON E, BARANDIKA JF, ADURIZ G, POYEDANO I, JUSTE RA, HURTADO A (2009b). Detection of Border disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. *J Vet Diagn Invest*, **21**, 331-337.

GARDINIER AC, BARLOW RM (1972). Experiments in Border Disease : III. Some epidemiological considerations with reference to the experimental disease. *Journal of Comparative Pathology*, **82**, 29-35.

GARDINER AC, BARLOW RM (1981). Vertical transmission of Border Disease infection. *Journal of Comparative Pathology*, **91**, 467-470.

GARDINER AC, NETTLETON PF, BARLOW RM (1983). Virology and immunology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical Border Disease. *Journal of Comparative Pathology*, **93**, 463-469.

GRASSMANN CW, ISKEN O, TAUTZ N, & BEHRENS SE (2001). Genetic analysis of the pestivirus nonstructural coding region: defects in the NS5A unit can be complemented in trans. *J Virol*, **75**, 7791-7802.

HAMERS C, COUVREUR B, DEHAN P, LETELLIER C, LEWALLE P, PASTORET P & KERKHOFS P (2000). Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhea viral strains isolated from haemorrhagic syndromes. *Vet J*, **160**, 250-258.

HAMERS C, DEHAN P, COUVREUR B, LETELLIER C, KERKHOFS P, PASTORET P (2001). Diversity among bovine pestiviruses. *The Veterinary journal*, **161**, 112-122.

HAMERS C, DI VALENTIN E, LECOMTE C, LAMBOT M, JORIS E, GENICOT B, PASTORET P (2002). Virus neutralising antibodies against 22 Bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *The Veterinary journal*, **163**, 61-67.

HANSEN TR, AUSTIN KJ, PERRY DJ, PRU JK, TEIXEIRA MG, JOHNSON GA (1999). Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*, **54**, 329-339.

HARTLEY WJ & KATER JC (1962). Observations on diseases of the central nervous system of sheep in New Zealand; *N.Z. vet. J.*, **10**, 128-142.

HOUE H, BAKER JC, MAES RK, RUEGG PL, LLOYD JW (1995). Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **7**, 327-332.

HUGHES LE, KERSHAW GF, SHAW IG (1959). "B" or Border disease. An undescribed disease of sheep. *Veterinary record*, **71**, 313-317.

HURTADO A, ADURIZ G, GÓMEZ N, OPORTO B, JUSTE RA, LAVIN S, LOPEZ-OLVERA JR, MARCO I (2004). Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, **40**, 796-800.

HURTADO A, SANCHEZ I, BASTIDA F, MINGUIJON E, JUSTE RA & GARCIA-PEREZ AL (2009). Detection and quantification of pestivirus in experimentally infected pregnant ewes and their progeny. *Virology Journal*, **6**, 189-196.

JEFFREY M, WELLS GAH (1989). Immunohistochemical topography and cellular localization of BDV in the central nervous system in experimental Border disease of sheep. *Neuropath and applied Neurobiol*, **15**, 590-591.

JENSEN J, SCHULTZ RD (1991). Effect of infection by bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro on interleukin-1 activity of bovine monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **29**, 251-265.

KRAMETTER-FROETSCHER R, DUENSER M, PREYLER B, THEINER A, BENETKA V, MOESTL K, BAUMGARTNER W (2010). Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Veterinary Journal*, **186**, 342-346.

LISS B (1981). Hog cholera. In : *Virus Diseases of Food Animals: A World Geography of Epidemiology and Control*. Volume II. Londres : Gibbs EPJ, p. 627-650.

LIU L, XIA H, WAHLBERG N, BELAK S, BAULE C (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, **385**, 351-357.

LOKEN T, KROGSRUD J, BJERKAS I (1991). Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated of vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. *J Comp Path*, **104**, 195-209.

LOUBIERE A (2012). *La Border Disease en Aveyron*. Thèse de doctorat vétérinaire, ENVT, 176 p.

MARTIN C, DUQUESNE V, GUIBERT JM, PULIDO C, GILOT-FROMONT E, GIBERT P, VELARDE R, THIÉRY R, MARCO I, DUBOIS E (2013). Experimental infection of pregnant Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica*) with border disease virus subtype 4. *Journal of Wildlife Diseases*, **49**, 55-68.

MEYER G (2007). Sérologie et virologie bovine. Séminaires internes. Juin 2007, Toulouse, ENVT.

MEYER G, DEPLANCHE M, ROUX D, MOULIGNIE M, PICARD-HAGEN N, LYAZRHI F, RABOISSON D, MATHEVET P, SCHELCHER F (2012). Fetal protection against bovine viral diarrhoea type 1 virus infection after one administration of a live-attenuated vaccine. *The Veterinary Journal*, **192**, 242-245.

MEYERS G, EGE A, FETZER C, VON FREYBURG M, ELBERS K, CARR V, PRENTICE H, CHARLESTON B, SCHÜRMAN EM (2007). Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting E^{ms} RNase and N^{pro} protease. *Journal of Virology*, **81**, 3327-3338.

MIYASAKA M, MORRIS B (1988). The ontogeny of the lymphoid system and immune responsiveness in sheep. *Prog Vet Microbiol Immunol*, **4**, 21-55.

MONDOLY P, POUGET C. La Border Disease. *SNGTV commission ovine* [en ligne], fiche n°18. <http://ovine.sngtv.pagesperso-orange.fr/Border%20disease.pdf> (consulté le 15/09/2015).

NEILL JD (2013). Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, **41**, 2-7.

NETTLETON PF (1990). Pestivirus infections in ruminants other than cattle. *Rev Sci Tech*, **9**, 131-150.

NETTLETON PF, GILMOUR JS, HERRING JA, SINCLAIR JA (1992). The production and survival of lambs persistently infected with Border Disease virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **15**, 179-188.

NETTLETON PF, GILRAY JA, RUSSO P, DLISSI E (1998). Border Disease of sheep and goats. *Veterinary Research*, **29**, 327-340.

Observatoire BVD. L'observatoire de la BVD [en ligne]. Disponible sur : <http://www.bvdobservatoire.fr> (consulté le 12/09/2015).

OIE (2005). Maladie de la Frontière (« Border Disease »). *Manuel terrestre de l'OIE* [en ligne], 1142-1152.
http://web.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Chapitre%20final05%202.10.5_BD.pdf
(consulté le 20/09/2015).

OLAFSON P, MAC CALLU AD & BITSH V (1946). An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet*, **36**, 205-213.

PALSSON H & VERGES JB (1952). Effects of plane of nutrition on growth and development of carcass quality in lambs. *J Agr Sci*, **42**, 1.

PANDE A, CARR BV, WONG SY, DALTON K, JONES IM, MCCAULEY JW, CHARLESTON B (2005). The glycosylation pattern of baculovirus expressed envelope protein E2 affects its ability to prevent infection with bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, **114**, 54–62.

PATON DJ, LOWINGS JP, BARRETT ADT (1992). Epitope mapping of the gp 53 envelope protein of bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **190**, 763-772.

PETERHANS E, BACHOFEN C, STALDER H, SCHWEIZER M (2010). Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet res*, **41**, 44.

PETERHANS E, SCHWEIZER M (2013). BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, **41**, 39–51.

PLANT JW, ACLAND HM, GARD GP, WALKER KH (1983). Clinical variations of Border Disease in sheep according to the source of the inoculum. *The Veterinary Record*, **113**, 58-60.

PLOWRIGHT W (1969). Other virus diseases in relation to the JP15 programme. In : *Joint Campaign Against Rinderpest*, , 15 et 16 décembre 1969, Mogadiscio. Mogadiscio (Kenya) : Organization of African Unity, p. 19-23.

PONCELET JL, INQUIMBERT JL, BAREILLE S (2007). Maîtrise de la Border Disease (BD) par la vaccination BVD. Un exemple dans un troupeau de grande taille (1400 femelles). In : *Journées nationales GTV 2007*, 23 au 25 mai 2007, Nantes. Paris: SNGTV, p. 699-701.

POTGIETER LN (1995). Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.*, **11**, 501-520.

POUGET C, BLAIN S, NOVELLA C, JAY M, DUQUESNE V, CORBIERE F, DE CREMOUX R (2013). La Border Disease chez les petites ruminants. *L'Essentiel* [en ligne]. <http://www.gds03.fr/pages/BorderDisease.pdf> (consulté le 30/09/2015).

RAMSEY FK, CHIVERS WH (1953). Mucosal disease of cattle. *North American veterinary*, **34**, 629-634.

RICHARDSON C, HEBERT CN, DONE JT (1976a). Experimental Border disease in sheep: dose-response effect. *British Veterinary Journal*, **132**, 202-208.

RICHARDSON C, HEBERT CN, TERLECKI S (1976b). Estimation of the developmental age of the ovine fetus and lamb. *The Veterinary Record*, **99**, 22-26.

RIDPATH JF, NEILL JD, FREY M, LANDGRAF JG (2000). Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Veterinary microbiology*, **77**, 145-155.

RUMENAPF T, UNGER G, STRAUSS JH, THIEL HJ (1993). Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *Journal of virology*, **67**, 3288-3294.

SAWYER MM, SCHORE CE, MENZIES PI & OSBURN BI (1986). Border disease in a flock of sheep: epidemiologic, laboratory, and clinical findings. *J Am Vet Med Assoc*, **189**, 61-65.

SCHERER CFC, FLORES EF, WEIBLEN R, CARON L, IRIGOYEN LF, NEVES JP, MACIEL MN (2001). Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhoea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and foetus. *Veterinary Microbiology*, **79**, 285-299.

SHANNON AD, RICHARDS SG, KIRKLAND PD AND MOYLE A (1991). An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissue of immunotolerant carrier cattle. *J Virol Methods*, **34**, 1-12.

SHAW IG, WINKLER CE, GIBBONS DF, TERLECKI S, HEBERT CN, PATTERSON DSP, DONE JT (1969). Border disease of sheep vaccination of ewes before mating. *Veterinary Record*, **84**, 147-148.

STERZL J, SILVERSTEIN AM (1967). Developmental aspects of immunity. *Advances in immunology*, **6**, 337-459.

SWEASEY D, PATTERSON SP, RICHARDSON C, HARKNESS JW, SHAW IG, WILLIAMS WW (1979). Border disease : a sequential study of surviving lambs and an assessment of its effects on profitability. *The Veterinary Record*, **104**, 447-450.

SZYMANSKI MR, FIEBACH AR, TRATSCHIN JD, GUT M, RAMANUJAM VMS, GOTTIPATI K, PATEL P, YE M, RUGGLI N, CHOI KH (2009). Zinc Binding in Pestivirus N^{pro} Is Required for Interferon Regulatory Factor 3 Interaction and Degradation. *Journal of molecular biology*, **391**, 438-449.

TERLECKI S, FITZPATRICK DF, DONE JT (1973). Morphology of experimental Border disease of lambs. *Res Vet Sci*, **15**, 313-317.

TERPSTRA C (1981). Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res Vet Sci*, **30**, 185-191.

THABTI F, FRONZAROLI L, DLISSI E, GUIBERT JM, HAMMAMI S, PEPIN M & RUSSO P (2002). Experimental model of Border Disease Virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet Res*, **33**, 35-45.

VAAST RR (1986). Les pestiviroses des ovins en Aveyron (1984-1986). In : *Journées nationales de la Société Française de Buiatrie et de son groupe d'étude sur la pathologie des ovins et des caprins (GEPOC)*, 6 et 7 décembre 1986, Paris. Paris : Espinasse J et Savey M, p. 23-31.

VALDAZO-GONZÁLEZ B, VAREZ-MARTÍNEZ M, GREISER-WILKE I (2006). Genetic typing 447 and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain *Vet.Microbiol.*, **117**, 141-153.

VAN REGENMORTEL MHV, FAUQUET CM, BISHOP DHL, CARSTENS EB, ESTES MK, LEMON SM, MANILOFF J, MAYO MA, MCGEOCH DJ, PRINGLE CR, WICKNER RB (2000). Virus taxonomy. In : *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego (USA) : Academic Press, p. 867–872.

VANTSIS JT, BARLOW RM, GARDENER AC, LINKLATER KA (1990). The effects of challenge with homologous strains of border disease virus on ewes with previous experimence of Border disease. *J.Comp.Path.*, **90**, 39-45.

VAUTRAIN G. (2007). *Les pestivirus de l'isard, étude expérimentale de l'infection intra et interspécifique*. Thèse de doctorat vétérinaire, ENVT, 76p.

VILCEK S (1997). Secondary structure of the 5'-noncoding region of border disease virus genome RNAs. *Vet Med (Praha)*, **42**, 125-128.

VILCEK S, URKOVI B, KOLESÁROVÁ M, GREISER-WILKE I, PATON D (2004). Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.*, **35**, 609–615.

VILCEK S & NETTLETON PF (2006). Pestivirus in wild animals. *Veterinary Microbiology*, **116**, 1-12.

WARRENER P & COLLETT MS (1995). Pestivirus NS3 protein possesses RNA helicase activity. *Journal of virology*, **69**, 1720-1726.

WEILAND F, WEILAND E, UNGER G, SAALMULLER A, THIEL HJ (1999). Localization of pestiviral envelope proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles. *Journal of general virology*, **80**, 1157-1165.

ANNEXES

Annexe 1 : Calendrier des actes réalisés au cours de l'expérimentation

N°jours	Jours	Date	Jours gestation	Inoculation	Examen clinique	Surveillance avortement	PS tubes secs	PS tubes EDTA VIRO	PS tubes EDTA HEMATO	Echographie
-6	07-oct	Mardi	46				3 tubes 9ml	2 tubes 4 ml		
-5	08-oct	Mercredi	47			Oui				
-4	09-oct	Jeudi	48			Oui			1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	Oui
-3	10-oct	Vendredi	49		Oui	Oui			1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
-2	11-oct	Samedi	50		Oui	Oui				
-1	12-oct	Dimanche	51		Oui	Oui				
0	13-oct	Lundi	52	IM	Oui	Oui	3 tubes 9ml	2tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
1	14-oct	Mardi	54		Oui	Oui		2 tubes 4 ml		
2	15-oct	Mercredi	55		Oui	Oui	3 tubes 9ml	2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
3	16-oct	Jeudi	56		Oui	Oui		2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
4	17-oct	Vendredi	57		Oui	Oui	3 tubes 9ml	2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
5	18-oct	Samedi	58		Oui	Oui		2 tubes 4 ml		
6	19-oct	Dimanche	59		Oui	Oui		2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
7	20-oct	Lundi	60		Oui	Oui	3 tubes 9ml	2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
8	21-oct	Mardi	61		Oui	Oui				
9	22-oct	Mercredi	62		Oui	Oui		2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
10	23-oct	Jeudi	63		Oui	Oui				
11	24-oct	Vendredi	64		Oui	Oui	3 tubes 9ml	2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
12	25-oct	Samedi	65		Oui	Oui				
13	26-oct	Dimanche	66		Oui	Oui				
14	27-oct	Lundi	67		Oui	Oui	3 tubes 9ml	2 tubes 4 ml	1 tube 4 ml (5 brebis /groupe)	
15	28-oct	Mardi	68		Oui	Oui				
16	29-oct	Mercredi	69		Oui	Oui		2 tubes 4 ml		
17	30-oct	Jeudi	70		Oui	Oui				
18	31-oct	Vendredi	71		Oui	Oui		2 tubes 4 ml		
19	01-nov	Samedi	72		Oui	Oui				
20	02-nov	Dimanche	73		Oui	Oui				

Annexe 2 : Fiche de suivi clinique individuelle pour les brebis

Groupe : N° boucle :	Dates							
Température								
Appétit	0 : normal 1 : diminué 2 : anorexie							
Comportement	0 : normal 1 : abattu 2 : léthargie							
Toux	0 : absence 1 : présence							
Respiration Fréquence	0 : normale 1 : > 60							
Jetage nasal	0 absent 1 : muqueux 2 ; mucopurulent							
Jetage oculaire	0 : absence 1 : présence							
Diarrhée	0 : absence 1 : modérée 2 : marquée							
Ecoulements vulvaires	0 : absents 1 : présents							
Avortement	Présence avortons Nombre avortons							
Autres								

Annexe 3 : Protocole ELISA avec le kit ID Screen BVD p80 Antibody One-StepND (ID Vet, Montpellier)

Mode opératoire

Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C ± 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

» Sérums Individuels et mélanges:

1. Distribuer :

- 50 µl de **Contrôle Positif** dans les cupules A1 et B1.
- 50 µl de **Contrôle Négatif** dans les cupules C1 et D1.
- 50 µl de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes.

La réaction commence seulement lorsque le conjugué est distribué dans les cupules.

2. Préparer le **Conjugué 1X** en diluant le **Conjugué 10X** au 1/10^{ème} en **Tampon de dilution 4**.
3. Distribuer 100 µl de **Conjugué antigène-p80-125-HRP 1X** dans chaque cupule.

4. Incuber **60 min ± 4 min** à 21°C (± 5°C).
5. Vider les plaques. Laver 5 fois chaque cupule avec environ 300 µl de **Solution de lavage**. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
6. Distribuer 100 µl de **Solution de révélation** dans chaque cupule.
7. Incuber **15 min ± 2 min** à 21°C (± 5°C) à l'obscurité.
8. Distribuer 100 µl de **Solution d'arrêt** dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
9. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

Validation

Le test est validé si:

- ✓ la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Négatifs (DO_{CN}) est supérieure à 0.7.

$$DO_{CN} > 0.7$$

- ✓ la valeur moyenne de densité optique de l'échantillon de Contrôle Positif (DO_{CP}) est inférieure à 30 % du DO_{CN}.

$$DO_{CP} / DO_{CN} < 0.3$$

Interprétation

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage de compétition (S/N %).

$$S/N\% = \frac{DO_{\text{échantillon}}}{DO_{CN}} \times 100$$

Pour les sérums individuels:

Les échantillons présentant un S/N%:

- inférieur ou égal à 40 % sont considérés comme positifs.
- supérieur à 40% et inférieur ou égal à 50 % sont considérés comme douteux.
- supérieur à 50% sont considérés comme négatifs.

Résultat	Statut
S/N % ≤ 40%	POSITIF
40 % < S/N % ≤ 50%	DOUTEUX
% compétition > 50 %	NEGATIF

» Pour les mélanges:

Les échantillons présentant un S/N%:

- inférieur ou égal à 60 % sont considérés comme positifs
- supérieur à 60% sont considérés comme négatifs.

Résultat	Statut
S/N % ≤ 60%	POSITIF
S/N % > 60 %	NEGATIF

Corrélation entre le ratio S/N sérums et plasmas de mélanges et la séroprévalence intra-cheptel:

Résultat	Séroprévalence	Interprétation
S/N < 35%	Prévalence en animaux séropositifs P80 probablement supérieure à 50%	Suspicion de circulation virale vraie (infection active ou présence d'IPI) passée ou présente
S/N ≥ 35%	Prévalence en animaux séropositifs P80 probablement inférieure à 50%	Probabilité de circulation virale récente faible

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ARN sanguin avec le kit NucleoSpin RNA bloodND (Macherey-Nagel)

1. Réaliser la lyse des échantillons comme décrit ci-dessous:

	Sang, sérum, plasma	EPC	NCS
Solution de Lyse	600 µL de "RAV1+Carrier"	600 µL de "RAV1+Carrier"	600 µL de "RAV1+Carrier"
Prise d'essai	50 µL d'échantillon	50 µL de "4c - EPC BVD"	135 µL d'eau DNase/RNase-free
IPC	5 µL de "5 - IPC BVD"	5 µL de "5 - IPC BVD"	5 µL de "5 - IPC BVD"
Ajustement	85 µL d'eau DNase/RNase-free	85 µL d'eau DNase/RNase-free	—

2. Vortexer immédiatement pendant 15 secondes.
3. Incuber 10 minutes à température ambiante.
4. Ajouter dans chaque tube 600 µL d'éthanol 96-100% - Vortexer immédiatement pendant 15 sec - Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le lysat de l'échantillon.
5. Prendre une mini-colonne du kit NucleoSpin® RNA Virus (colonne bleue) - Identifier la colonne.
6. A l'aide d'une pipette, transférer 650 µL du lysat de l'échantillon sur la colonne - Boucher - Centrifuger 1 min à 8000 x g - Jeter le tube collecteur - Conserver la colonne.
7. A l'aide d'une pipette, transférer le reste du lysat de l'échantillon sur la même colonne - Boucher - Centrifuger 1 min à 8000 x g - Jeter le tube collecteur - Conserver la colonne.
8. Distribuer 500 µL de buffer RAW dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 min à 8000 x g - Jeter le tube collecteur - Conserver la colonne.
9. Distribuer 600 µL de buffer RAV3 (reconstitué) dans chaque colonne - Boucher - Centrifuger 1 min à 8000 x g - Jeter le tube collecteur - Conserver la colonne.
10. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur de 2 mL - Centrifuger 3 min à 11000 x g (pour sécher la membrane).
11. Placer la colonne dans un microtube de 1,5 mL - Distribuer 50 µL d'eau DNase/RNase-free - Boucher.
12. Incuber 1 minute à température ambiante.
13. Centrifuger 1 minute à 8000 x g pour éluer - Jeter la colonne - Conserver le microtube.

Maintenir les éluats obtenus entre +2°C et +8°C si la PCR est réalisée tout de suite ou les conserver en dessous de -16°C.

Annexe 5 : Protocole d'extraction de l'ARN tissulaire avec le kit RNeasy Mini KitND (Qiagen)

Le début du protocole est exposé dans le texte dans la partie 2.7 Suivi virologique.

5. **Add 1 volume of 70% ethanol* to the cleared lysate, and mix immediately by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 6.**
Note: The volume of lysate may be less than 350 µl or 600 µl due to loss during homogenization and centrifugation in steps 3 and 4.
Note: Precipitates may be visible after addition of ethanol. This does not affect the procedure.
6. **Transfer up to 700 µl of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x g (≥10,000 rpm). Discard the flow-through.[†]**
Reuse the collection tube in step 7.
If the sample volume exceeds 700 µl, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.[†]
Optional: If performing optional on-column DNase digestion (see "Eliminating genomic DNA contamination", page 21), follow steps D1–D4 (page 67) after performing this step.
7. **Add 700 µl Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.***
Reuse the collection tube in step 8.
Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.
Skip this step if performing optional on-column DNase digestion (page 67).
8. **Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.**
Reuse the collection tube in step 9.
Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see "Things to do before starting").
9. **Add 500 µl Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to wash the spin column membrane.**
The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.
Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.
10. **Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Close the lid gently, and centrifuge at full speed for 1 min.**
Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 9.
11. **Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 µl RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at ≥8000 x g (≥10,000 rpm) to elute the RNA.**
12. **If the expected RNA yield is >30 µg, repeat step 11 using another 30–50 µl RNase-free water, or using the eluate from step 11 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 11.**
If using the eluate from step 11, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

Annexe 6 : Protocole PCR avec le kit LSI VetMax BVDV ScreeningND (Life Technologies)

■ Préparation de la RT-PCR temps réel

1. Créer un plan d'analyse pour la distribution des mix et échantillons. Éloigner si possible le contrôle positif (EPC) des autres échantillons.
2. Décongeler le tube "**3 - Mix BVD**" entre +2°C et +8°C, sur **glace** ou sur un portoir réfrigérant.
3. Homogénéiser le tube "**3 - Mix BVD**" par agitation douce, puis centrifuger brièvement.
4. Distribuer **20 µL** de "**3 - Mix BVD**" par puits de la plaque PCR, barrette PCR ou capillaire utilisé.
5. Ajouter les ARN des échantillons et contrôles à chaque mix réactionnel, selon le plan d'analyse prédéfini :

Type d'analyse	Composant	Volume d'échantillon
Echantillon pour analyse	ARN extraits de l'échantillon	5 µL
Contrôle positif d'amplification	ARN extraits à partir de "4c - EPC BVD"	5 µL
Contrôle négatif d'extraction (NCS)	NCS extrait	5 µL
Contrôle négatif d'amplification (NC)	Eau DNase/RNase-free	5 µL

6. Fermer la plaque PCR, les barrettes PCR ou les capillaires avec un film adhésif ou des bouchons adaptés.

■ Amplification par RT-PCR en temps réel

1. Créer les détecteurs suivants sur le thermocycleur :

	Reporter	Quencher
BVD	FAM TM	NFQ (Non-Fluorescent Quecher)
IPC BVD	VIC [®]	TAMRA TM *

Référence passive: ROXTM *

* Les fluorophores TAMRATM et ROXTM sont à renseigner obligatoirement pour l'analyse par RT-PCR temps réel si le thermocycleur est capable de les détecter. Pour les autres thermocycleurs, l'absence de détection de ces fluorophores ne remet pas en cause l'analyse par RT-PCR temps réel.

2. Attribuer pour chaque échantillon le détecteur **BVD** et le détecteur **IPC BVD** dans le puits utilisé pour l'analyse.
3. Créer le programme de RT-PCR suivant pour l'analyse :

Programme 1	Répétitions de l'étape	Température	Durée
Etape 1	X1	45°C	10 minutes (10'00")
Etape 2	X1	95°C	10 minutes (10'00")
Etape 3	X45	95°C	15 secondes (00'15")
		60°C *	1 minute (01'00")

* Collecte des données de fluorescence durant la phase 60°C - 1 minute

NOTE: Un deuxième programme d'amplification a été validé et peut être utilisé avec le kit LSI VetMAX[®] BVDV Screening. Il s'agit du programme suivant :

Programme 2	Répétitions de l'étape	Température	Durée
Etape 1	X1	48°C	30 minutes (30'00")
Etape 2	X1	95°C	10 minutes (10'00")
Etape 3	X45	95°C	15 secondes (00'15")
		60°C *	1 minute (01'00")

* Collecte des données de fluorescence durant la phase 60°C - 1 minute

4. Placer la plaque PCR, les barrettes PCR ou les capillaires dans le thermocycleur et démarrer la RT-PCR temps réel.

Annexe 7 : Tableau récapitulatif des analyses statistiques réalisées sur les températures journalières des brebis de J-3 à J20 (ANOVA à deux variables avec correction de Bonferroni)

	BDV-5	BDV-3	BDV-4	BDV-6	BVDV-1	Sentinelles
BDV-5		J7**,14*	J-3*, -2***, 0*, 1*, 4**, 10*, 11*, 12***, 14***, 15*	J0**, 4*, 11***, 12***, 14***, 18**	J7**	NS
BDV-3	J7**,14*		J4*, 12*	J6**	NS	NS
BDV-4	J-3*, -2***, 0*, 1*, 4**, 10*, 11*, 12***, 14***, 15*	J4*, 12*		NS	J-3*, -2***, 3***, 4***, 9*, 10**, 11**, 12*	J3*
BDV-6	J0**, 4*, 11***, 12***, 14***, 18**	J6**	NS		J3*** J4***, 6**,11***, 12*, 18*	J0*, 3*, 6*
BVDV-1	J7**	NS	J-3*, -2***, 3***, 4***, 9*, 10**, 11** J12*	J3*** J4***, 6**,11***, 12*, 18*		J4*
Sentinelles	NS	NS	J3*	J0*, 3*, 6*	J4*	

JX : jour auquel la différence de température entre deux groupes apparaît significative avec : NS=non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; ***= p<0,005

Annexe 8 : Tableau récapitulatif des analyses statistiques réalisées sur les moyennes des pourcentages des leucocytes ramenées à une ligne de base (moyenne des trois jours précédant l'inoculation) des brebis de J-4 à J14 (ANOVA à deux variables avec correction de Bonferroni)

	BDV-5	BDV-3	BDV-4	BDV-6	BVDV-1	Sentinelles
BDV-5		NS	J9**, 11**, 14***	J14*	J11*, 14*	J3***, 4***, 6**, 7**, 9*, 11*, 14**
BDV-3	NS		J11*	NS	NS	J3***, 4***, 6*
BDV-4	J9**, 11**, 14***	J11*		NS	NS	J4*, 6*
BDV-6	J14*	NS	NS		NS	J3*, 4*, 6**, 7*
BVDV-1	J11*, 14*	NS	NS	NS		J2**, 3***, 4*, 6**
Sentinelles	J3***, 4***, 6**, 7**, 9*, 11*, 14**	J3***, 4***, 6*	J4*, 6*	J3*, 4*, 6**, 7*	J2**, 3***, 4*, 6**	

JX : jour auquel la différence des moyenne des pourcentages des leucocytes entre deux groupes apparaît significative avec : NS=non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; ***= p<0,005

Annexe 9 : Tableau récapitulatif des analyses statistiques réalisées sur les moyennes des pourcentages des lymphocytes ramenées à une ligne de base (moyenne des trois jours précédant l'inoculation) des brebis de J-4 à J14 (ANOVA à deux variables avec correction de Bonferroni)

	BDV-5	BDV-3	BDV-4	BDV-6	BVDV-1	Sentinelles
BDV-5		NS	J3*, 11***, 14**	NS	J11**, 14**	J3***, 4***, 6***, 7***, 14*
BDV-3	NS		J11**	NS	NS	J3**, 4**, 6*, 7*
BDV-4	J3*, 11***, 14**	J11**		J3**	NS	J4**, 6***, 7***
BDV-6	NS	NS	J3**		J7*	J3***, 4***, 6***, 7***
BVDV-1	J11**, 14**	NS	NS	J7*		J2**, 6**
Sentinelles	J3***, 4***, 6***, 7***, 14*	J3**, 4**, 6*, 7*	J4**, 6***, 7***	J3***, 4***, 6***, 7***	J2**, 6**	

JX : jour auquel la différence des moyenne des pourcentages des lymphocytes entre deux groupes apparaît significative avec : NS=non significatif; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ***= $p < 0,005$

Annexe 10 : Tableau récapitulatif des analyses statistiques réalisées sur les moyennes des pourcentages des monocytes ramenées à une ligne de base (moyenne des trois jours précédant l'inoculation) des brebis de J-4 à J14 (ANOVA à deux variables avec correction de Bonferroni)

	BDV-5	BDV-3	BDV-4	BDV-6	BVDV-1	Sentinelles
BDV-5		NS	J6*, 7***, 9***	NS	NS	J9**
BDV-3	NS		J9***	J9*, 11*	NS	J9*
BDV-4	J6*, 7***, 9***	J9***		J9***	J9***	J7*, 9***, 11**
BDV-6	NS	J9*, 11*	J9***		NS	J9***, 11**
BVDV-1	NS	NS	J9***	NS		J9***
Sentinelles	J9**	J9*	J7*, 9***, 11**	J9***, 11**	J9***	

JX : jour auquel la différence des moyenne des pourcentages des monocytes entre deux groupes apparaît significative avec : NS=non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; ***= p<0,005

Annexe 11 : Tableau récapitulatif des analyses statistiques réalisées sur les moyennes des pourcentages des neutrophiles ramenées à une ligne de base (moyenne des trois jours précédant l'inoculation) des brebis de J-4 à J14 (ANOVA à deux variables avec correction de Bonferroni)

	BDV-5	BDV-3	BDV-4	BDV-6	BVDV-1	Sentinelles
BDV-5		NS	NS	NS	NS	NS
BDV-3	NS		NS	NS	NS	NS
BDV-4	NS	NS		NS	NS	NS
BDV-6	NS	NS	NS		NS	NS
BVDV-1	NS	NS	NS	NS		J3**
Sentinelles	NS	NS	NS	NS	J3**	

JX : jour auquel la différence des moyenne des pourcentages des neutrophiles entre deux groupes apparaît significative avec : NS=non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; ***= p<0,005

Annexe 12 : Tableau récapitulatif des analyses statistiques réalisées sur les moyennes des pourcentages des thrombocytes ramenées à une ligne de base (moyenne des trois jours précédant l'inoculation) des brebis de J-4 à J14 (ANOVA à deux variables avec correction de Bonferroni)

	BDV-5	BDV-3	BDV-4	BDV-6	BVDV-1	Sentinelles
BDV-5		NS	J6*	NS	NS	NS
BDV-3	NS		NS	NS	NS	NS
BDV-4	J6*	NS		NS	J6*	NS
BDV-6	NS	NS	NS		NS	NS
BVDV-1	NS	NS	J6*	NS		NS
Sentinelles	NS	NS	NS	NS	NS	

JX : jour auquel la différence des moyenne des pourcentages des thrombocytes entre deux groupes apparaît significative avec : NS=non significatif; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$

Annexe 13 : Fiche de mesures fœtales lors des autopsies

N° loge-N° brebis :

Fœtus 1	
Distances atlas-anus/T1-anus	
Longueur radius	
Longueur tibia	
Observations	

Fœtus 2	
Distances atlas-anus/ T1-anus	
Longueur radius	
Longueur tibia	
Observations	

Annexe 14 : Tableaux synthétiques récapitulant les analyses statistiques réalisées sur les mesures fœtales

Poids		BDV-5		BDV-3	BDV-4		BDV-6	BVDV-1		Sentinelles
		Normaux	Morts		Normaux	Malformés		Normaux	Malformés	
BDV-5	Normaux		NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	***
	Morts	NS		***	***	**	**	*	NS	***
BDV-3		NS	***		NS	NS	NS	NS	NS	NS
BDV-4	Normaux	**	***	NS		*	*	NS	**	NS
	Malformés	NS	**	NS	*		NS	NS	NS	**
BDV-6		NS	**	NS	*	NS		NS	NS	***
BVDV-1	Normaux	NS	*	NS	NS	NS	NS		NS	**
	Malformés	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	***
Sentinelles		***	***	NS	NS	**	***	**	***	

Distance atlas-anus		BDV-5		BDV-3	BDV-4		BDV-6	BVDV-1		Sentinelles
		Normaux	Morts		Normaux	Malformés		Normaux	Malformés	
BDV-5	Normaux		*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
	Morts	*		***	***	***	***	***	NS	***
BDV-3		NS	***		NS	NS	NS	NS	NS	NS
BDV-4	Normaux	NS	***	NS		NS	NS	NS	NS	NS
	Malformés	NS	***	NS	NS		NS	NS	NS	NS
BDV-6		NS	***	NS	NS	NS		NS	NS	**
BVDV-1	Normaux	NS	***	NS	NS	NS	NS		NS	NS
	Malformés	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***
Sentinelles		*	***	NS	NS	NS	**	NS	***	

Résultats analysés avec une analyse de variance à un paramètre (one-way ANOVA) et un T-Test : NS = non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,005

Résultats analysés avec une analyse de variance à un paramètre (one-way ANOVA) et une correction de Bonferroni : NS = non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,005

Longueur tibiale		BDV-5		BDV-3	BDV-4		BDV-6	BVDV-1		Sentinelles
		Normaux	Morts		Normaux	Malformés		Normaux	Malformés	
BDV-5	Normaux		**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Morts	**		**	***	***	**	NS	NS	***
BDV-3		NS	**		NS	NS	NS	NS	NS	NS
BDV-4	Normaux	NS	***	NS		NS	NS	NS	NS	NS
	Malformés	NS	***	NS	NS		NS	NS	NS	NS
BDV-6		NS	**	NS	NS	NS		NS	NS	NS
BVDV-1	Normaux	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS	NS
	Malformés	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		NS
Sentinelles		NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Longueur radiale		BDV-5		BDV-3	BDV-4		BDV-6	BVDV-1		Sentinelles
		Normaux	Morts		Normaux	Malformés		Normaux	Malformés	
BDV-5	Normaux		**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Morts	**		***	***	**	***	***	NS	***
BDV-3		NS	***		NS	NS	NS	NS	NS	NS
BDV-4	Normaux	NS	***	NS		NS	NS	NS	NS	NS
	Malformés	NS	**	NS	NS		NS	NS	NS	NS
BDV-6		NS	***	NS	NS	NS		NS	NS	NS
BVDV-1	Normaux	NS	***	NS	NS	NS	NS		NS	NS
	Malformés	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		*
Sentinelles		NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	*	

Résultats analysés avec une analyse de variance à un paramètre (one-way ANOVA) et un T-Test : NS = non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,005

Résultats analysés avec une analyse de variance à un paramètre (one-way ANOVA) et une correction de Bonferroni : NS = non significatif; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,005

Annexe 15 : Tableaux synthétiques récapitulant les différents résultats des analyses réalisées sur les brebis et les fœtus

Groupe BDV-5

Boucles brebis		161		2320		1634		2524		67319		2749		3345		4448	
PCR		+		+		+		+		+		+		+		-	
Sérologie		+		+		+		+		+		+		+		+	
Fœtus	Statut	Vivant	Vivant	Mort	Vivant	Mort	Mort	Avorton	Avorton	Mort	Mort	Vivant	Mort	Vivant	Vivant	Avorton	Avorton
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ELISA	-	-	-	-	-	-	non testé	non testé	non testé	non testé	-	non testé	-	-	non testé	non testé

Groupe BDV-3

Boucles brebis		2743		1652		2621		119		20046		3373		2321		10766	
PCR		-		+		+		-		+		-		+		+	
Sérologie		+		+		+		+		+		+		+		+	
Fœtus	Statut	Vivant		Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	
	PCR	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ELISA	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	

Groupe BDV-4

Boucles brebis		90038		3195		90044			90094		3079		3151		1368			10258	
PCR		-		-		+			+		+		+		-			-	
Sérologie		+		+		+			+		+		+		+			+	
Fœtus	Statut	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	V	V	V	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	V	V	V	Vivant	Vivant	
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	
	ELISA	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	

* cerveau et rate PCR-négatifs, thymus non testé

Groupe BDV-6

Boucles brebis		20109		90021		90156		90055		10042		1529				20289			1443		160	
PCR		-		+		+		-		-		+				+			+		+	
Sérologie		+		+		+		+		+		+				+			+		+	
Foetus	Statut	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	V	V	V	V	V	V	V	Vivant	Vivant	V	V	
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	non testé	-	-	-	-	

Groupe BVDV-1

Boucles brebis		3185		1248			3156		2398		11728		3344		4547		4369	
PCR		+		+			+		+		+		+		+		+	
Sérologie		+		+			+		+		+		+		+		+	
Foetus	Statut	Vivant	Vivant	V	V	V	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Vivant	Avorton		Mort	Vivant
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
	ELISA	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	non testé		non testé	-

PCR brebis : + quand PCR positif au moins un jour

PCR foetus : + quand PCR positif pour au moins un organe

: Foetus malformés

NOM : BETHUNE

PRENOM : MARIE-ANNE

TITRE : INFLUENCE DU GENOTYPE VIRAL SUR L'INFECTION FŒTALE PAR LE VIRUS DE LA MALADIE DE LA FRONTIERE (BORDER DISEASE)

RESUME :

La Maladie de la Frontière (Border Disease) est une maladie ovine, due à un pestivirus, ayant une répartition mondiale. La région Aveyronnaise, à cause de sa forte concentration en brebis laitières, est particulièrement touchée en France. La lutte contre cette maladie repose sur des mesures sanitaires et vaccinales, visant à empêcher l'infection du fœtus et l'apparition d'agneaux infectés permanents immunotolérants (IPI). Toutefois peu de données existent sur l'infection fœtale par le BDV chez la brebis gestante et sur l'efficacité de la protection fœtale par les vaccins hétérologues. Dans cette étude nous avons infecté expérimentalement des brebis à 52 jours de gestation avec 4 souches BDV de génotypes différents : BDV-5, BDV-4, BDV-6 et BDV-3. L'ensemble des souches a montré la même capacité à infecter des brebis gestantes et à passer la barrière transplacentaire pour infecter le fœtus. Toutefois, les capacités des souches à entraîner de la mortalité fœtale, des avortements ou encore des retards de croissance et des malformations se sont révélées hétérogènes. Dans l'objectif d'utiliser ce modèle d'infection pour réaliser un test d'efficacité vaccinal (protection fœtale et prévention des IPI) sur des brebis gestantes, les souches BDV-3 et BDV-6 se sont montrées les plus prometteuses.

MOTS CLES : MOUTONS, BORDER DISEASE VIRUS, PESTIVIRUS, INFECTES PERMANENTS IMMUNOTOLERANTS, GENOTYPE, FŒTUS

.....
TITLE: EFFECTS OF VIRAL GENOTYPES ON OVINE FETAL INFECTION BY BORDER DISEASE VIRUS

ABSTRACT:

Border Disease is a sheep disease caused by Border Disease Virus (BDV, a pestivirus) and spread worldwide. Aveyron area is particularly affected in France because of its high dairy sheep density. Sanitary and vaccine measures are currently used to control Border Disease. They aim at preventing fetal infection and production of permanent infected lambs (PI). However few data are available on fetal infection by BDV as well as on the efficacy of currently used heterologous BVD vaccines to prevent BDV fetal infection. In this study, we experimentally infected pregnant ewes at 52 days of gestation with 4 BDV strains of different genotypes: BDV-5, BDV-4, BDV-6 and BDV-3. All of the strains show the same ability to infect pregnant ewes and pass through the placenta to infect fetuses. However, differences were observed between genotypes in their ability to induce abortions, fetal death, fetal malformation or growth retardation. For efficacy studies of vaccines (fetal protection and prevention of PI), the BDV-3 and BDV-6 strains seem to be the most promising.

KEYWORDS: SHEEPS, BORDER DISEASE VIRUS, PESTIVIRUS, PERSISTENTLY INFECTED IMMUNO-TOLERANT, GENOTYPE, FETUS