



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 : 19714](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 19714)

To cite this version :

Combes, Mickaël. *Protection foetale contre le virus de la maladie de la frontière induite par les vaccins contre la diarrhée virale bovine : étude d'efficacité chez les ovins*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 111 p.

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

PROTECTION FŒTALE CONTRE LE VIRUS DE LA MALADIE DE LA FRONTIERE INDUITE PAR LES VACCINS CONTRE LA DIARRHEE VIRALE BOVINE : ETUDE D'EFFICACITE CHEZ LES OVINS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

COMBES Mickaël
Né, le 02/04/1992 à TULLE (19)

Directeur de thèse : M. Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
M. Gilles MEYER
M. Fabien CORBIERE

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

MEMBRE INVITE :
M. Hervé CASARD

Ingénieur de Recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

PROTECTION FŒTALE CONTRE LE VIRUS DE LA MALADIE DE LA FRONTIERE INDUITE PAR LES VACCINS CONTRE LA DIARRHEE VIRALE BOVINE : ETUDE D'EFFICACITE CHEZ LES OVINS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

COMBES Mickaël
Né, le 02/04/1992 à TULLE (19)

Directeur de thèse : M. Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :
M. Gilles MEYER
M. Fabien CORBIERE

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

MEMBRE INVITE :
M. Hervé CASARD

Ingénieur de Recherche à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 03/11/2017

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉRINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, PR M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, PR Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR M. GAIDE Nicolas, AERC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Héléne, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE. :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

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 Docteur Fabien Corbière

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de
Toulouse
Pathologie des Ruminants

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

A Monsieur le Docteur 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 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 Cécile Caubet, Charlotte Foret et Angélique Teillaud

*Pour leur travail de fourmis, colossal, au laboratoire.
Sincères remerciements.*

**A Amandine, Aymeric, Dimitri, Louis, Maëlys, Pierre, Rémi, Thomas
B., Thomas V., Tristan et les autres.**

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

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLES DES ILLUSTRATIONS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION	9
Première partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1. LES PESTIVIRUS	13
1.1. Historique	13
1.2. Classification	13
1.3. Organisation structurale et génomique (Figure 1)	14
1.3.1. Génome.....	14
1.3.2. Protéines virales.....	14
1.3.2.1. Protéines structurales	15
1.3.2.2. Protéines non structurales	15
1.4. Diversité des pestivirus	16
1.4.1. Spectre d'hôte	16
1.4.2. Diversité biologique et notion de biotype.....	16
1.4.3. Diversité du tropisme cellulaire et tissulaire	17
1.4.4. Diversité génétique et virulence	18
1.4.4.1. Au sein des pestivirus	18
1.4.4.2. Au sein des BVDV.....	20
1.4.4.3. Au sein du BDV	20
1.4.5. Diversité antigénique	22
1.4.5.1. Au sein des pestivirus	22
1.4.5.2. Au sein des BVDV.....	23
1.4.5.3. Au sein des BDV	23
1.5. Réponse du système immunitaire	24
1.5.1. Lors de la mise en place de l'infection transitoire.....	24
1.5.1.1. Réponse immunitaire innée.....	24
1.5.1.2. Réponse immunitaire acquise	26
1.5.2. Lors de la mise en place de l'infection persistante.....	27
2. LA MALADIE DE LA FRONTIÈRE (BORDER DISEASE)	28
2.1. Historique et importance	28

2.2. Mécanismes de transmission	28
2.2.1. Sources animales	28
2.2.2. Matières virulentes	29
2.2.3. Transmission.....	29
2.2.3.1. Transmission horizontale	29
2.2.3.2. Transmission verticale	30
2.3. Pathogénie et expression clinique	20
2.3.1. Infection transitoire.....	30
2.3.2. Infection fœtale.....	30
2.3.3. Infection permanente	32
2.4. Diagnostic	36
2.4.1. Diagnostic différentiel	36
2.4.2. Diagnostic clinique et nécropsique.....	38
2.4.3. Diagnostic de laboratoire.....	38
2.4.3.1. Détection virale	38
2.4.3.1.1. Isolement viral en culture cellulaire	38
2.4.3.1.2. Immunohistochimie.....	39
2.4.3.1.3. ELISA antigène	39
2.4.3.1.4. RT-PCR.....	40
2.4.3.2. Détection des anticorps	41
2.4.3.2.1. Test de séroneutralisation.....	41
2.4.3.2.2. ELISA indirect	41
2.4.3.2.3. ELISA compétition	42
2.4.3.3. Utilisation pratique des résultats.....	42
3. MESURES DE LUTTE	43
3.1. Prophylaxie sanitaire	43
3.1.1. Contrôle à l'introduction de nouveaux animaux	43
3.1.2. Biosécurité	43
3.1.3. Détection et élimination des IPI	44
3.2. Prophylaxie médicale : la vaccination	44
3.2.1. Vaccination chez les bovins	44
3.2.2. Vaccination chez les ovins	46
4. LE CAS DU BASSIN DE ROQUEFORT	48
4.1. Epidémiologie depuis 1988	48
4.2. Plan d'épidémiologie actuel	49
4.2.1. Un double dépistage sérologique.....	49
4.2.2. Résultats des sérologies sur sérum	50
4.2.3. Résultats des sérologies sur lait de tank	51
4.3. Mesures de lutte	51

Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE	55
1. OBJECTIFS.....	57
2. MATERIELS ET METHODES	58
2.1. Cultures cellulaires	58
2.2. Virus et titrage.....	58
2.3. Vaccination et infection	59
2.3.1. Animaux	59
2.3.2. Vaccination expérimentale	60
2.3.3. Infection expérimentale	60
2.3.4. Autopsie.....	61
2.4. Suivi expérimental	62
2.4.1. Suivi clinique.....	62
2.4.2. Suivi hématologique	62
2.4.3. Suivi sérologique	62
2.4.4. Suivi virologique	64
2.5. Statistiques.....	65
3. RESULTATS	66
3.1. Infection expérimentale et suivi des mères	66
3.1.1. Suivi clinique.....	66
3.1.2. Suivi hématologique	66
3.1.3. Suivi sérologique	71
3.1.4. Suivi virologique par RT-PCR	74
3.2. Suivi de l'infection fœtale	75
3.2.1. Suivi des avortements.....	75
3.2.2. Analyse des fœtus	75
3.2.3. Sérologie des fœtus.....	77
3.2.4. Virologie des fœtus.....	78
4. DISCUSSION	79
4.1. Analyse des fœtus	79
4.1.1. Anomalies et retards de croissance.....	79
4.1.2. Sérologie et virologie.....	80
4.2. Suivi expérimental des brebis	81
4.2.1. Suivi clinique.....	81
4.2.2. Suivi hématologique	82
4.2.3. Suivi sérologique	83

4.2.4. Suivi virologique	85
4.3. Discussion par rapport à la méthodologie utilisée	86
4.3.1. Souche	86
4.3.2. Voie et dose	86
4.3.3. Période d'inoculation.....	87
4.4. Discussion et perspectives sur la vaccination BDV	88
4.4.1. Vaccins	88
4.4.2. Protocole vaccinal.....	89
CONCLUSION.....	91
BIBLIOGRAPHIE	93
ANNEXES.....	99
Annexe 1 : Lots expérimentaux	100
Annexe 2 : Calendrier des prélèvements.....	101
Annexe 3 : Protocole kit ELISA ID Screen® BVD p80 Antibody One-Step.....	102
Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ARN du sang à partir du kit NucleoSpin RNA blood® (Macherey-Nagel).....	103
Annexe 5 : Protocole d'extraction de l'ARN des tissus à partir du kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen).....	104
Annexe 6 : Protocole RT-PCR en temps réel à partir du kit ID Gene® BVD/BD Triplex	105
Annexe 7 : Protocole RT-qPCR à partir du kit LSI VetMax BVDV Screening® (Life Technologies)	108
Annexe 8 : Analyses statistiques des températures moyennes (GraphPad (La Jolla, USA) par two-way ANOVA avec mesures répétées et correction de Bonferroni. ns : non significatif, * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001, **** : p<0,0001.	109
Annexe 9 : Analyses statistiques des variations significatives des lignées cellulaires par rapport à une ligne de base calculée à partir des mesures effectuées à J-3, J-1 et J0 par one-way ANOVA (GraphPad, La Jolla, USA) * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001, **** : p<0,0001.	110
Annexe 10 : Analyses statistiques des pourcentages de monocytes ramenés à une ligne de base (GraphPad (La Jolla, USA) par two-way ANOVA avec mesures répétées et correction de Bonferroni. ns : non significatif, * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001, **** : p<0,0001.	111

TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Organisation structurale et génomique des pestivirus (Schelcher <i>et al.</i> , 2016).....	14
Figure 2 : Phylogénie et classification des pestivirus : arbre A mi enraciné et arbre B sans racine. Les séquences servant de références sont surlignées en vert. Les nouvelles espèces proposées dans l'étude sont en bleu (TSV et BVDV-3) et en rouge (Antelope et Bungowannah) (Liu <i>et al.</i> , 2009)	19
Figure 3 : Arbre phylogénétique des souches BDV isolées en France entre 1985 et 2006 à partir de la comparaison des séquences N ^{pro} (Dubois <i>et al.</i> , 2008).....	21
Figure 4 : Les anomalies du squelette sont caractérisées par de l'arthrogrypose avec de la raideur (a) ou des déviations latérales des articulations, par de la brachygnathie (c) ou par de la prognathie (d) (García-Pérez <i>et al.</i> , 2009a).....	34
Figure 5 : Hydranencéphalie (Ferrer <i>et al.</i> , 2013).....	35
Figure 6 : Laine hirsute (Ferrer <i>et al.</i> , 2013).....	35
Figure 7 : Schématisation de l'ELISA antigène (Meyer, séminaire ENVT 2007).....	40
Figure 8 : Schématisation de l'ELISA indirecte (Meyer, séminaire ENVT 2007).....	41
Figure 9 : Schématisation de l'ELISA compétition (Meyer, séminaire ENVT 2007).....	42
Figure 10 : Relation entre la séroprévalence estimée et le pourcentage d'inhibition sur lait de tank, n= 157 mesures (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016)	49
Figure 11 : Prévalences et incidences sérologiques du BDV sur les 7 dernières années, dans le bassin de Roquefort (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016).....	50
Figure 12 : Comparaison des séroprévalences du BDV en fonction de l'atelier sur les 7 dernières années, dans le bassin de Roquefort (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016).....	51
Figure 13 : Classification des élevages en fonction du dépistage sur lait lors des 6 dernières saisons, dans le bassin de Roquefort (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016)..	51
Figure 14 : Frise chronologique de l'expérimentation	61
Figure 15 : Moyennes des températures rectales entre J1 et J14.....	66
Figure 16 : Moyennes des pourcentages du nombre de leucocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de leucocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.....	67
Figure 17 : Moyennes des pourcentages du nombre de lymphocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de lymphocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.....	68
Figure 18 : Moyennes des pourcentages du nombre de monocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de monocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.	70
Figure 19 : Moyennes des pourcentages du nombre de thrombocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de thrombocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.....	70
Figure 20 : Evolution du pourcentage de compétition au cours de l'expérimentation.....	72

Figure 21 : Résultats de séroneutralisation en $\text{Log}_2 \text{ED}_{50}/\text{mL}$ à J0 et J66.....	74
Figure 22 : (a) Atrophie cérébrale observée chez un fœtus issu d'une mère vaccinée avec le vaccin Bovela®, (b) Cerveau normal de fœtus (photographies personnelles).....	76
Figure 23 : Poids moyens et écart-types des fœtus dans les différents groupes.....	76
Figure 24 : Longueurs moyennes et écart-types des fœtus pour les longueurs atlas - anus, première vertèbre thoracique (VT1) - anus, du radius et du tibia dans les différents groupes.	77
Figure 25 : Charges virales moyennes et écart-types, dans les organes des fœtus des différents groupes (Log_{10} copies d'ARN pour 100mg)	78

Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des biotypes ncp et cp ("L'observatoire de la BVD").....	17
Tableau 2 : Conséquences de l'infection en fonction du stade de gestation.....	32
Tableau 3 : Diagnostic différentiel des avortements chez les petits ruminants	37
Tableau 4 : Vaccins disponibles en France	45
Tableau 5 : Caractéristiques des vaccins utilisés	60
Tableau 6 : Analyses statistiques des pourcentages de leucocytes ramenés à une ligne de base (GraphPad (La Jolla, USA) par two-way ANOVA avec mesures répétées et correction de Bonferroni. ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$..	67
Tableau 7 : Analyses statistiques des pourcentages de lymphocytes ramenés à une ligne de base (GraphPad (La Jolla, USA) par two-way ANOVA avec mesures répétées et correction de Bonferroni. ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$	69
Tableau 8 : Pourcentage de brebis séropositives dans les différents lots en fonction du temps (nombre brebis/effectif).....	72
Tableau 9 : Proliféricités et moyennes (+/- écart-type) des poids (en kg) et des longueurs (en cm) atlas - anus, première vertèbre thoracique (VT1) - anus, du radius et du tibia dans les différents groupes.....	77

LISTE DES ABREVIATIONS

AANE : Acide Aminé Non Essentiel
ANOVA : Analyse de Variance
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AOM : Anticorps d'Origine Maternelle
ARN : Acide Ribonucléique
BDV : Virus de la Border Disease
BVDV : Virus de la Diarrhée Virale Bovine
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CP : Cytopathogène
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CSFV : Virus de la Peste Porcine Classique
Ct : Cycle threshold = valeur de cycle correspondant au signal seuil
CTL : Lymphocyte T Cytotoxique
DAMP : Motifs Moléculaires Associés aux Altérations Cellulaires
DICC₅₀ : Dose Infectieuse 50% en Culture Cellulaire
ED₅₀ : Dose Médiane Efficace
ELISA : Enzym Linked Immuno-Sorbent Assay
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
FCS : Sérum Foetal de veau
FODSA : Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron
GDS : Groupement de Défense Sanitaire
HS : Sérum équin
IA : Insémination Artificielle
IFN : Interféron
IPI : Infecté Permanent-Immunotolérant
IRF : Facteur de Régulation de l'Interferon
Kb : Kilo base
LB : Lymphocyte B
LT : Lymphocyte T
MD : Maladie des Muqueuses
MDBK : Madin-Darby Bovine Kidney cells
MEM : Milieu Essentiel Minimum
NCP : Non Cytopathogène
NTPase : Nucléoside Tri-Phosphatase
OIE : Office International des Epizooties
ORF : Cadre Ouvert de Lecture
PAMP : Motifs Associés aux Pathogènes
PRR : Récepteur de Reconnaissance des Pathogènes
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
TSV : Tunisian Sheep Virus
UTR : Untranslated Region
VD : Diarrhée Virale
VT1 : 1^{ère} Vertèbre Thoracique

INTRODUCTION

Depuis sa découverte en Grande Bretagne, au milieu du XX^{ème} siècle, la maladie de la frontière ou border disease a été retrouvée dans le monde entier. Cette maladie, touchant les ovins, est causée par le BDV (Virus de la Border Disease), un pestivirus de la famille des flaviviridae. Le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et le virus de la peste porcine classique (CSFV) font également partie de cette famille.

En France, dans les années 1980, une épizootie de border disease avait entraîné une morbidité et une mortalité importante dans les élevages ovins aveyronnais. Actuellement, la maladie est toujours présente, notamment dans les grandes régions d'élevages ovins, le bassin de Roquefort et le Pays-Basque. Cette maladie entraîne des pertes économiques importantes. En effet, elle est responsable de troubles de la reproduction chez les femelles (infertilité, avortements, malformations...), de retards de croissances et de pathologies néonatales chez les nouveau-nés. L'infection verticale de la mère au fœtus pendant la gestation entraîne la naissance d'agneaux IPI (Infecté Permanent Immunotolérant). Ces agneaux sont des éléments épidémiologiques majeurs puisqu'ils excrètent le virus en grande quantité sans forcément présenter de signes cliniques. Le contrôle de la maladie est donc un élément primordial à la rentabilité des élevages ovins.

Un plan d'épidémiosurveillance a été mis en place en Aveyron, depuis l'apparition de la maladie. Ce plan repose sur le dépistage de la maladie et sur des mesures de lutte visant à l'éliminer. Les mesures de lutte s'appuient sur deux axes majeurs, d'une part, la détection et l'élimination des IPI dans les élevages, d'autre part, la vaccination des femelles reproductrices. La vaccination a pour but d'éviter l'infection fœtale et donc la naissance d'IPI. Cependant, aucun vaccin composé de souche de BDV n'est disponible sur le marché, en France. La vaccination est donc réalisée avec des vaccins contenant des souches de BVDV, à AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour les bovins. L'efficacité de cette vaccination n'a, à l'heure actuelle, pas été prouvée.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la protection vaccinale permise par trois vaccins BVD du commerce, à AMM pour les bovins, possédant une indication pour la protection fœtale. Ainsi, les vaccins vivants atténués Bovela® et Mucosiffa® et le vaccin inactivé Bovilis BVD® ont été mis à l'épreuve par l'inoculation de la souche BDV-6 6390.

Après une partie bibliographique sur les pestivirus et la maladie de la frontière, nous présenterons et discuterons les résultats de notre étude.

Première partie :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES PESTIVIRUS

Le genre pestivirus, de la famille des flaviviridae, comprend 4 espèces reconnues : le virus de la peste porcine classique (CSFV), les virus de la diarrhée virale bovine de type 1 (BVDV-1) et de type 2 (BVDV-2) et le virus de la maladie de la frontière (BDV) (Becher *et al.*, 1999).

1.1. Historique

Dans les années 1830, la peste porcine classique a été découverte aux Etats Unis mais ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que son étiologie virale a été prouvée. Le CSFV (Classical Swine Fever Virus) est alors le premier pestivirus mis en évidence (Center for History and New Media).

Par la suite, dans les années 1940, une maladie inconnue affectant les jeunes bovins mais aussi les adultes est apparue au Canada. Cette maladie se traduisait par une multitude de signes cliniques, dont la plupart étaient digestifs. En 1946, les chercheurs de Cornell University, aux Etats Unis, ont observé le même type de maladie dont ils ont montré l'origine virale et qu'ils ont nommé VD (Virus Diarrhea). Dans les années 1950, une maladie virale assez similaire mais avec des signes cliniques et des lésions légèrement différents a été prénommée MD (Mucosal Disease). Ces virus ont, quelques années plus tard, été reconnus comme un seul et même pestivirus, aujourd'hui connu sous le nom de BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus) (Goens, 2002).

Au même moment, dans les années 1940, une maladie émergente, se traduisant par des agneaux qui tremblent avec une laine hirsute, a été observée à la frontière entre le Pays de Galles et l'Angleterre. En 1959, Hugues *et al.* ont, pour la première fois, décrit la maladie et l'ont appelée Border Disease (BD). Ce n'est qu'en 1972 que l'étiologie virale de la maladie a été mise en évidence (Gardiner *et al.*, 1972), au moment où la maladie commençait sa propagation mondiale. Des caractéristiques similaires ont alors permis de relier ce virus avec le CSFV et surtout le BVDV et de l'intégrer dans le genre pestivirus (Loken, 1995).

1.2. Classification

Initialement classés dans la famille des Togaviridae, les pestivirus ont, par la suite, été reclassés dans la famille des Flaviviridae, en raison de différences essentielles entre les genres togavirus et flavivirus (Westaway *et al.*, 1985). La famille des Flaviviridae comprend, aujourd'hui, quatre genres de virus : les genres flavivirus, hépacivirus, pegivirus et pestivirus. Cette famille regroupe des virus avec des caractéristiques génétiques et structurales similaires : ce sont des virus sphériques d'environ 40-60 nm de diamètre, constitués d'une enveloppe lipidique, d'une nucléocapside icosaédrique et d'un génome constitué d'une molécule d'ARN de polarité positive.

Le genre flavivirus est constitué par 53 espèces dont le virus de la fièvre jaune, le virus de la dengue, le virus de l'encéphalite japonaise, le virus du West Nile et plus récemment le virus

Zika. Le virus de l'hépatite C est le seul représentant du genre hépacivirus. Le genre pegivirus est, quant à lui, composé des pegivirus A et B ("Virus Taxonomy: 2015 Release," 2015). Contrairement aux autres genres de la famille des Flaviviridae, les pestivirus touchent exclusivement les animaux.

1.3. Organisation structurale et génomique (Figure 1)

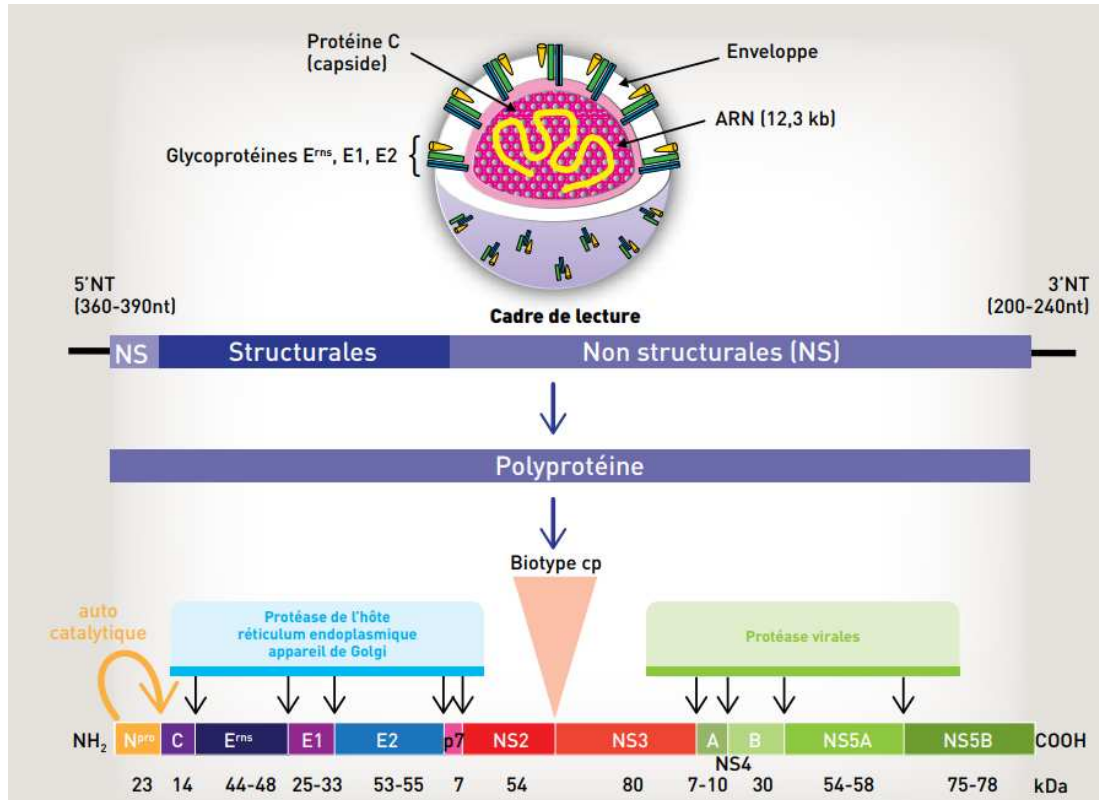


Figure 1 : Organisation structurale et génomique des pestivirus (Schelcher *et al.*, 2016)

1.3.1. Génome

Le génome des pestivirus est constitué d'une molécule d'ARN simple brin, de polarité positive. Cet ARN, d'environ 12 kb de longueur, comprend deux extrémités 3' et 5' non transcrites ou UTRs (Untranslated Region) et un cadre unique de lecture ou ORF (Open Reading Frame). Les UTRs se replient pour former des structures secondaires qui interagissent avec les protéines cellulaires et virales pour réguler la transcription et la réplication de l'ORF (Neill, 2013).

1.3.2. Protéines virales

La transcription et la traduction de l'ORF permettent la synthèse d'une polyprotéine de 4000 acides aminés. Cette polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales et cellulaires en douze protéines dont quatre protéines structurales et huit protéines non-structurales.

1.3.2.1. Protéines structurales

Les quatre protéines structurales sont la protéine C de la nucléocapside et les glycoprotéines E^{ms} ou E0, E1 et E2 de l'enveloppe.

La protéine C constitue la capside, elle englobe et protège le génome viral, à l'intérieur de la particule virale, par des interactions entre l'ARN et des acides aminés chargés qui la constituent (Neill, 2013). Elle aurait également un rôle dans la régulation de la transcription ainsi que dans la virulence de l'infection par le CSFV (Gladue *et al.*, 2014).

La glycoprotéine E^{ms} est reliée au virus, sous forme d'homo-dimères, par des interactions faibles car elle n'est pas directement intégrée dans la membrane. Cette protéine peut donc également être sécrétée par la cellule infectée, dans le milieu extracellulaire. Des anticorps neutralisants sont produits contre cette glycoprotéine (Neill, 2013). Son activité ribonucléase lui permet de limiter la réponse immunitaire innée de l'individu, en bloquant la synthèse de l'interféron de type I. E^{ms} joue également un rôle dans l'attachement du virus à la cellule et donc dans son entrée dans la cellule (Wang *et al.*, 2015).

Les glycoprotéines E1 et E2 sont insérées dans la membrane du virus par l'intermédiaire d'acides aminés hydrophobes sous forme d'homo-dimères E2 ou d'hétéro-dimères entre E1 et E2. Cet hétéro-dimère joue un rôle dans l'entrée du virus dans la cellule. En effet, E2 possède une séquence aminoacide qui permet la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte via le récepteur cellulaire CD46 notamment (Maurer *et al.*, 2004). E2 est également la glycoprotéine qui induit la grande majorité de la production d'anticorps neutralisants et donc une inhibition de l'infection par la réponse immunitaire à médiation humorale. Cependant, la réponse mise en place est relativement spécifique du fait de la grande diversité génétique de E2 (Neill, 2013).

1.3.2.2. Protéines non structurales

Les huit protéines non-structurales sont les protéines N^{pro}, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a et NS5b. Dans la polyprotéine, les quatre glycoprotéines structurales sont situées entre la protéine N^{pro} et les autres protéines non structurales (Figure 1).

La protéine N^{pro} est une autoprotéase, elle se détache elle-même de la polyprotéine. Elle bloque la production de l'interféron de type 1, en dégradant le facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF-3), et permet donc, comme la protéine E^{ms}, d'échapper à la réponse immunitaire innée de l'hôte (Chen *et al.*, 2007).

La protéine p7 est une viroporine qui peut être retrouvée sous forme libre ou sous forme d'hétéro-dimère p7-E2, dans les cellules infectées. Les viroporines sont des protéines dont l'activité des canaux ioniques altère la perméabilité des membranes, ce qui facilite l'entrée des virus dans les cellules et leur passage d'une cellule à l'autre. La protéine p7 jouerait également un rôle dans la morphogénèse et la maturation des virions (Largo *et al.*, 2016).

Les protéines NS2 et NS3 ne vont pas être retrouvées sous la même forme en fonction du biotype du virus (cf 1.4.2.). En effet, dans les souches cytopathiques (cp), on retrouve ces deux protéines séparées l'une de l'autre. Alors que dans les souches non cytopathiques (ncp),

les protéines NS2 et NS3 restent très majoritairement liées. Un clivage minimal de ces deux protéines semble néanmoins nécessaire à la réplication en tout début d'infection y compris chez les souches ncp. Ce clivage est réalisé par l'activité protéase de NS2. NS2 joue également un rôle dans la translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique de la cellule.

La protéine NS3 possède, quant à elle, trois activités enzymatiques. Son activité sérine protéase lui permet de réaliser le clivage de nombreuses protéines, à partir de la polyprotéine. Son activité ARN hélicase permet le déroulement de la molécule d'ARN et ainsi la mise en place de la transcription (Neill, 2013). Enfin, cette protéine, quand elle est produite en grande quantité (souches cp), possède également une activité nucléoside triphosphatase (NTPase) qui, associée à une ARN hélicase, active la cytotoxicité (Tamura *et al.*, 1993). Cette protéine est également immunogène mais n'entraîne pas la production d'anticorps neutralisants.

La protéine NS4a agit comme un cofacteur de l'activité sérine protéase de la protéine NS3.

La protéine NS4b, incluse dans la membrane de l'appareil de Golgi, permet la réplication de l'ARN viral ainsi que le réarrangement des membranes cellulaires dans les cellules infectées.

Les protéines NS5a et NS5b peuvent être retrouvées liées ou clivées et joueraient un rôle dans la réplication de l'ARN mais leur rôle est mal connu (Neill, 2013).

1.4. Diversité des pestivirus

1.4.1. Spectre d'hôte

La classification initiale des pestivirus reposait, en premier lieu, sur le spectre d'hôte de chacun de ces virus. Le CSFV infecte exclusivement les suidés domestiques et sauvages. Les virus BVDV et BDV ont été isolés chez les bovins et les ovins respectivement.

En fait, les pestivirus, et notamment le BVDV, se caractérisent par la présence d'un large spectre d'hôtes.

Différentes études ont montré la présence d'anticorps anti-BVDV chez environ une cinquantaine d'espèces de mammifères, de l'ordre des artiodactyles parmi les Camelidae, les Cervidae, les Antilocapridae, les Giraffidae, les Bovidae, les Suidae et les Tragulidae. Des anticorps anti-BVDV ont également été retrouvés chez deux wallabys à cou rouges (*Macropus rufogriseus*) et chez des lapins de garennes (*Oryctolagus cuniculus*). Cependant, l'isolement du virus n'a pas été réalisé chez toutes ces espèces (Passler & Walz, 2010).

Le BDV a, quant à lui, été isolé chez les bovins, les chèvres et les porcins (Becher *et al.*, 1999, Terpstra, 1981). Certains petits ruminants sauvages comme les chamois sont aussi touchés par le BDV. La première épidémie importante de BDV chez les isards pyrénéens a été décrite en 2000-2001, dans la réserve catalane d'Alt Pallars-Aran (Marco *et al.*, 2008), et continue à sévir sur une grande partie du massif pyrénéen.

1.4.2. Diversité biologique et notion de biotype

Comme évoqué précédemment (cf 1.3.2.2.), il existe deux biotypes de pestivirus : les non cytopathiques (ncp) et les cytopathiques (cp). Les souches cp se propagent au sein du tapis

cellulaire en provoquant des lésions alors que les souches ncp n'en provoquent pas. Mais, il s'agit de caractéristiques observées lors de la mise en culture *in vitro* qui ne reflètent pas le pouvoir pathogène de la souche *in vivo*. D'ailleurs, la plupart des souches virulentes, *in vivo*, sont des souches ncp. Les souches ncp et cp présentent des caractéristiques différentes qui permettent d'expliquer l'importance épidémiologique de la souche ncp. En effet, les transmissions horizontales et verticales sont assurées en majorité par la souche ncp. Les souches cp entraînent une distribution tissulaire réduite et une virémie rare, elles ne provoquent donc ni transmission verticale ni infection permanente (Tableau 1).

Depuis quelques années, il a été montré que les souches cp émergent soit par des modifications du génome viral d'une souche ncp présente chez des individus infectés permanents immunotolérants (IPI, cf 2.2.3.2 pour la définition) soit par une surinfection chez un individu IPI, avec une souche cp, proche génétiquement de la souche ncp présente chez l'animal (Peterhans & Schweizer, 2010). Ces modifications sont dues à des mutations ponctuelles et/ou à des recombinaisons non-homologues entre les ARN génomiques, se traduisant par des insertions de séquences virales ou cellulaires dans le génome viral. Fréquemment, mais pas exclusivement, ces modifications se traduisent par l'insertion d'un gène cellulaire de type ubiquitine associée ou non à la duplication d'une séquence virale contenant le gène NS3. Une autre modification possible est l'insertion de l'ARN du gène Jiv (J domain protein interacting with viral protein) ou une partie de celui-ci dans la séquence NS2 ou N^{pro}. Enfin, l'insertion d'une séquence d'ARN viral, contenant le gène NS3 dans la séquence NS2 ou N^{pro}, peut également être l'une de ces modifications. Les conséquences de ces modifications sont le clivage du complexe NS2-3 et l'accumulation de NS3 qui va permettre une augmentation du taux de réplication de l'ARN viral mais aussi l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Ces souches cp, lorsqu'elles infectent des veaux IPI, induisent un ensemble de signes cliniques responsable de la maladie des muqueuses (Peterhans *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Caractéristiques des biotypes ncp et cp ("L'observatoire de la BVD")

Biotypes	ncp	cp
Transmission horizontale	+++	+
Transmission verticale	+++	-
Clinique	Signes très variables	Signes minimales
Réponse humorale	Apparition précoce (14 jours) Titres élevés Persistance longue	Apparition tardive (25 jours) Titres faibles Persistance courte
Distribution tissulaire	Large	Réduite
Virémie	Fréquente	Rare

1.4.3. Diversité du tropisme cellulaire et tissulaire

Les biotypes ncp et cp diffèrent également par leur tropisme cellulaire. Alors que les souches ncp sont préférentiellement retrouvées dans les leucocytes, les organes lymphoïdes, le

système nerveux, le foie ou encore dans le tractus respiratoire. Les souches cp sont plutôt dans les cellules du tractus digestif (Hamers *et al.*, 2001).

Les pestivirus, et notamment le BDV, possèdent un tropisme pour le système nerveux qui entraîne des troubles nerveux. Ils peuvent être retrouvés dans les neurones, les cellules gliales, les cellules épendymaires, les cellules endothéliales vasculaires et dans les fibrocytes (Jeffrey *et al.*, 1990). Anderson *et al.* (1987) ont mis en évidence que le pourcentage de cellules infectées reste néanmoins assez faible avec un pourcentage inférieur à 1% y compris lors d'une infection permanente.

Une étude a montré que le BVDV pouvait, en fait, avoir un grand nombre de localisations différentes chez les veaux. Les organes lymphoïdes (nœuds lymphatiques, plaques de Peyer, thymus, rate) contiennent très fréquemment des antigènes viraux. La moelle épinière, les épithéliums squameux (tonsilles et rumen), les poumons ainsi que la thèque interne des ovaires peuvent également héberger le virus (Marshall *et al.*, 1996; Archambault *et al.*, 2000). Des antigènes de BDV ont également été détectés dans une grande variété de tissus, chez des agneaux infectés, au cours de la gestation (Terpstra, 1981).

1.4.4. Diversité génétique et virulence

La diversité génétique des pestivirus repose sur la diversité des séquences ARN des différentes souches. En effet, les virus à ARN possèdent une forte variabilité génétique avec une fréquence de mutation d'environ 10^{-4} substitutions par nucléotide (soit une erreur tous les 10 kb pour la réplication d'un génome de 12 kb) lors de la réplication du génome par l'ARN polymérase ARN-dépendante. De plus, les recombinaisons non-homologues (cf 1.4.2.) jouent également un rôle dans cette diversité génétique. On considère, actuellement, que les pestivirus possèdent une grande diversité génétique avec des régions variables (gène E2 notamment) et des régions mieux conservées (gène NS2-3 et N^{pro} par exemple).

1.4.4.1. Au sein des pestivirus

Il existe actuellement quatre espèces reconnues de pestivirus : les BVDV-1 et BVDV-2, le BDV et le CSFV.

Il existe également quatre groupes de pestivirus atypiques non reconnus.

- Le premier est constitué par une souche isolée sur une girafe, au Kenya.
- Le second groupe, nommé BVDV-3, contient des pestivirus d'origine bovine, isolés à partir de sérum fœtal de veaux, en laboratoire, ou à partir de bovins naturellement infectés en Asie, en Amérique du Sud et récemment en Italie.
- Le troisième groupe, Antelope/Bungowannah, est formé par deux pestivirus, l'un isolé sur un pronghorn aux Etats-Unis et l'autre sur des porcs en Australie.
- Le dernier groupe, TSV, est constitué par des virus phylogénétiquement plus proches du CSFV que du BDV, mais isolés sur des moutons, en Tunisie.

La phylogénie et la classification des pestivirus sont en permanente reconstruction. En 2009, par une approche probabiliste Bayésienne, Liu *et al.* (2009) ont réalisé un arbre

phylogénétique à partir de l'analyse des données moléculaires obtenues sur 56 échantillons de pestivirus et 2089 caractères, comprenant un gène de fusion des régions 5'UTR, N^{pro} et E2.

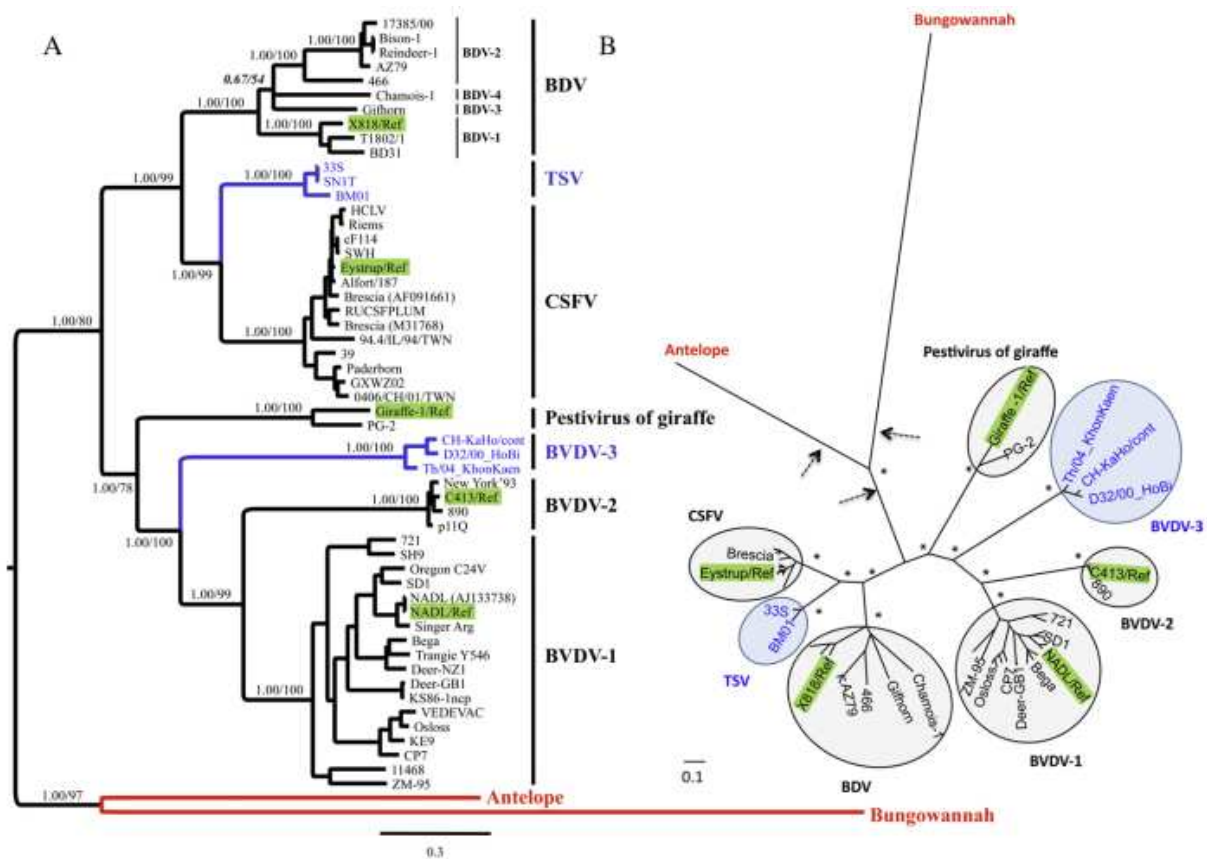


Figure 2 : Phylogénie et classification des pestivirus : arbre A mi enraciné et arbre B sans racine. Les séquences servant de références sont surlignées en vert. Les nouvelles espèces proposées dans l'étude sont en bleu (TSV et BVDV-3) et en rouge (Antelope et Bungowannah) (Liu *et al.*, 2009)

On peut voir sur l'arbre phylogénétique que les séquences nucléotidiques des BDV sont plus proches des séquences CSFV que des séquences BVDV. D'autres études ont montré que la séquence génomique de la souche référence de BDV (BD-31) présentait environ 71% de similitude avec les souches de BVDV contre 78% avec les souches de CSFV (Nettleton *et al.*, 1998).

Une approche probabiliste a permis d'estimer une évolution historique du virus. La première séparation des pestivirus aurait eu lieu à la fin du XV^{ème} siècle pour donner deux entités, les pestivirus de bovins et de la girafe d'un côté et les pestivirus d'origines ovine et porcine (BDV, CSFV et TSV) de l'autre côté. Le pestivirus de la girafe se serait séparé des pestivirus bovins au début du XVII^{ème} siècle en Afrique, puis des souches de BVDV-3 en Afrique du Sud et en Asie vers les années 1680. Le dernier événement serait la séparation entre le BVDV-1 et le BVDV-2 vers les années 1740 quand le BVDV-2 évolua indépendamment en Amérique du Nord. La diversification du BVDV-1 en sous-groupes génétiques aurait débuté au début du XIX^{ème} siècle, environ 150 ans avant la première description de la maladie. De l'autre côté, les pestivirus d'origine ovine et porcine se seraient séparés dans les années 1630, au moment de leur spécification envers leur hôte respectif. Le BDV s'est alors diversifié dans

les années 1750, environ 210 ans avant la première description de la maladie (Liu *et al.*, 2009).

1.4.4.2. Au sein des BVDV

Au sein des virus BVD, il existe de très nombreux génotypes, plus de 400 reconnus et identifiés à ce jour. Au moins 16 sous-groupes ont été identifiés pour le génotype 1 (BVDV-1a à BVDV-1p), et quatre pour le génotype 2 (BVDV-2a à BVDV-2d). Un troisième génotype (BVDV-3), non reconnu officiellement, regrouperait des souches atypiques isolées. Au fur et à mesure des investigations, d'autres sous-groupes peuvent être découverts, comme récemment en Suisse. Parmi les trois génotypes, le BVDV-1 et le BVDV-2 sont plus proches d'un point de vue génétique (Figure 2). Les deux génotypes présentent une répartition géographique différente, les souches de BVDV-2 étant plus fréquemment isolées en Amérique du Nord qu'en Europe. Toutefois, ce déséquilibre pourrait être lié à un biais d'échantillonnage ou de diagnostic. Concernant les espèces BVDV-1 et BVDV-2, la variabilité génomique des séquences 5'UTR est respectivement comprise entre 76 et 99% et entre 81 et 99% (Vilcek *et al.*, 2004).

Le BVDV-3, plus distant génétiquement des deux premiers, est constitué par quatre souches virales atypiques : les souches D32/00_HoBi, Brzbuf 9, CH-KaHo/cont et Th/04_Khon-Kaen (Liu *et al.*, 2009).

1.4.4.3. Au sein du BDV

Les études phylogénétiques classifient l'espèce BDV en sept sous-types génétiques. Le premier sous-type, BDV-1, contient, aujourd'hui, la souche référence des BDV. Il comprend les principales souches prélevées en Grande-Bretagne, aux Etats-Unis, en Australie et en Nouvelle-Zélande. Le BDV-2 contient, quant à lui, une souche isolée sur un renne ainsi que des souches isolées sur des ovins en Allemagne. La grande diversité au sein de ces deux premiers sous-types a conduit à la division de ces groupes en deux avec le BDV-1a et BDV-1b d'une part et le BDV-2a et le BDV-2b d'autre part. Des souches, isolées sur des ovins, en Allemagne, ont mené à la formation du sous-type BDV-3. D'autres souches, isolées sur des ovins en Suisse et en Autriche mais aussi sur des bovins en Autriche, se sont, par la suite, ajoutées à ce sous-type (Satyanarayana *et al.*, 2012).

En 2008, Dubois *et al.* ont mené une étude sur la diversité des BDV à partir de l'analyse de 23 séquences 5'UTR et N^{pro} extraites d'échantillons collectés entre 1985 et 2006, en France. Un quatrième groupe a alors été créé en 2004, après la découverte d'un pestivirus qui infectait les isards. Ce virus fut, par la suite, détecté sur des ovins, en Espagne. Pendant cette étude, deux nouveaux groupes, que les séquençages ne permettaient pas de rapprocher des groupes existants, furent créés : les groupes BDV-5 et BDV-6. La souche Aveyronite, isolée pour la première fois en Aveyron, en 1984, est la souche référence du groupe BDV-5. Les séquences 5'UTR des souches qui composent le groupe BDV-5 présentaient des similitudes avec les souches isolées sur des ovins en Espagne et sur des isards mais les séquences N^{pro} ne présentaient que peu de similitudes. La majorité des pestivirus, analysés lors de l'étude

française de Dubois *et al.*, sont classés dans les groupes BDV-3 et BDV-6 qui présentaient des séquences non ressemblantes mais qui avaient pour autant été retrouvés dans les mêmes régions, à la même période (Figure 3).

Enfin, le sous-type BDV-7 a été créé en Italie, à partir d'une souche isolée sur une chèvre, initialement placée dans un nouveau sous-groupe de pestivirus, et de souches isolées sur des ovins (Giammarioli *et al.*, 2011).

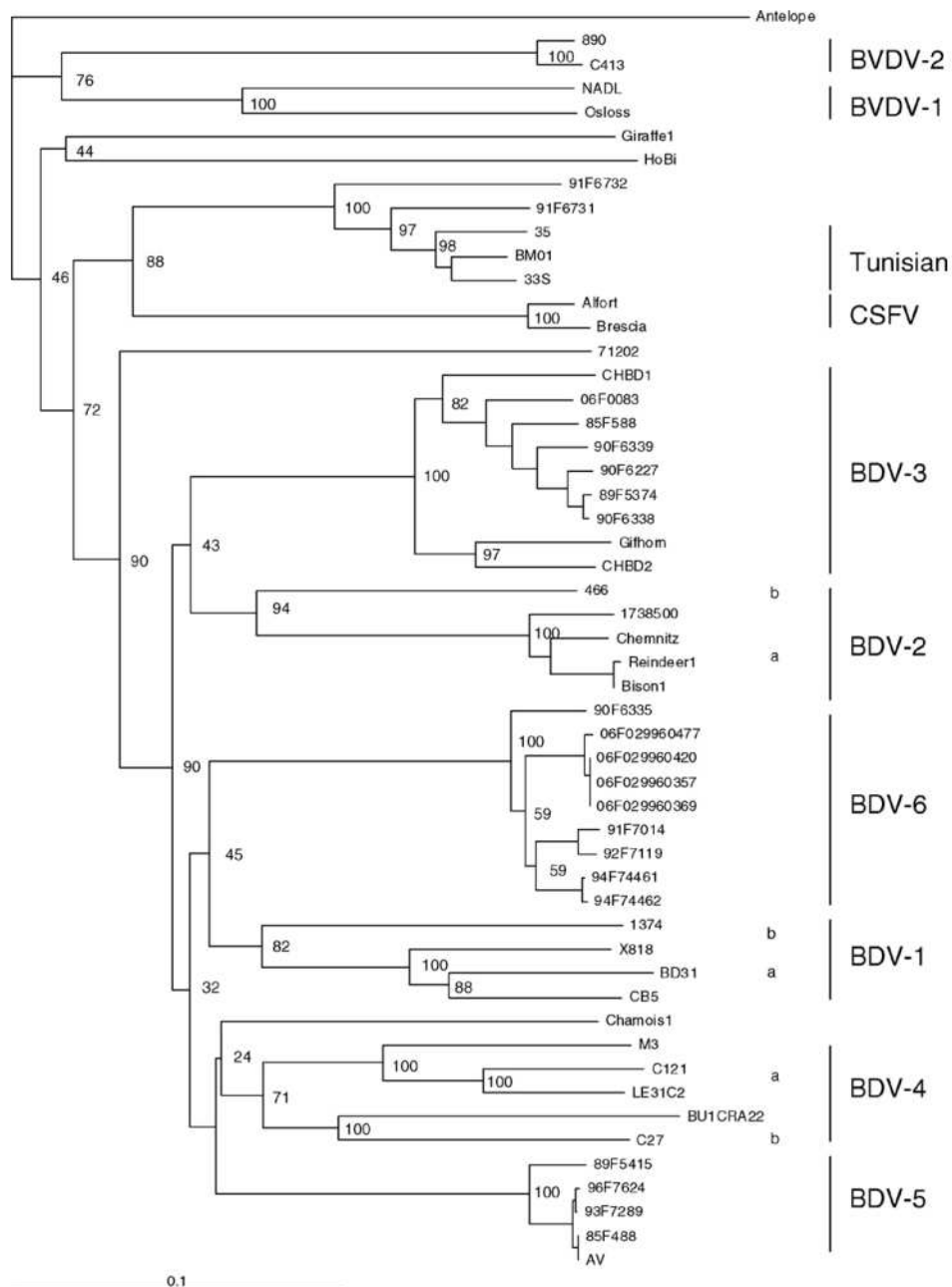


Figure 3 : Arbre phylogénétique des souches BDV isolées en France entre 1985 et 2006 à partir de la comparaison des séquences N^{pro} (Dubois *et al.*, 2008).

Actuellement en France, les épizooties récentes de BDV, en Aveyron, étaient dues à des souches de génotypes 3 et 6 alors que les souches circulantes sur le massif pyrénéen sont principalement de génotype 4 (Anne, 2012).

1.4.5. Diversité antigénique

1.4.5.1. Au sein des pestivirus

Comme on a pu le voir, les pestivirus sont constitués de protéines conservées (NS2-3 et N^{pro} par exemple) et de protéines variables (E2 notamment). La diversité antigénique des pestivirus repose, essentiellement, sur la variabilité de la séquence N-terminale du gène de la glycoprotéine E2, sur laquelle se situe la plupart des épitopes du virus. De plus, ces déterminants antigéniques vont jouer le rôle le plus important dans la mise en place de l'immunité à médiation humorale puisque ce sont ces épitopes qui sont à l'origine de la production de la majorité des anticorps neutralisants (Neill, 2013). Une étude (Paton *et al.*, 1992) a permis de montrer que le gène E2 possédait une séquence antigénique conservée et l'autre non conservée permettant la différenciation des souches. L'analyse de cette diversité antigénique est importante pour le diagnostic, pour les études épidémiologiques et pour l'utilisation de vaccin.

En 1989, Cay *et al.*, ont montré qu'il existait une réaction croisée entre les anticorps monoclonaux anti-BVDV et anti-BDV et les souches de BVDV, BDV et CSFV. En effet, en faisant réagir des anticorps monoclonaux anti-BVDV, anti-BDV et anti-CSFV avec des souches de chacun de ces virus, ils se sont rendu compte que les anticorps anti-CSFV ne réagissaient qu'avec les souches de CSFV. Parmi les autres anticorps (anti-BVDV et anti-BDV), certains réagissaient uniquement avec l'espèce de virus contre laquelle ils étaient dirigés mais d'autres réagissaient avec deux voire les trois espèces de pestivirus. On peut donc en conclure qu'il existe des épitopes communs entre les différentes espèces de pestivirus mais aussi des épitopes spécifiques de chaque espèce. D'autres études (Edwards *et al.*, 1988; Shannon *et al.*, 1991), ont montré que les anticorps monoclonaux permettaient de différencier certaines espèces de pestivirus. Cependant, ces études n'ont pas permis la mise en évidence d'anticorps spécifiques du BDV, c'est-à-dire que les anticorps anti-BDV réagissaient avec au moins une autre espèce de virus.

Plus récemment, en 2013, Decaro *et al.* ont examiné la réaction croisée entre une souche de BVDV et la souche atypique HoBi like en immunisant des ovins avec une préparation inactivée. Le titre en anticorps était significativement inférieur quand les souches immunisantes et inoculées étaient différentes. La protection croisée est, ici, incomplète, ce qui montre la nécessité de produire un vaccin spécifique contre la souche HoBi like.

Ces différentes études ont donc montré qu'il existe des protections croisées entre certaines souches de génotypes différents voire d'espèces différentes. Cependant, la réaction hétérologue ne semble que partiellement protectrice par rapport aux infections homologues.

1.4.5.2. Au sein des BVDV

Parmi les BVDV, la diversité antigénique est visible à différents niveaux. On la retrouve principalement entre les deux espèces de BVDV. Ainsi, en 2008, Bachofen *et al.* ont montré que le coefficient de similarités antigéniques, exprimé à partir des résultats de séroneutralisation entre les deux souches, variait de 2 à 6% entre une souche de BVDV-2 et trois souches de BVDV-1. Ensuite, parmi six sous-groupes de BVDV-1, les variations de ce coefficient allaient de 17 à 50%. Enfin, entre deux souches de BVDV-1a, le coefficient était de 65%. Or, on considère que les différences antigéniques sont significatives lorsque le coefficient est inférieur à 25%. On peut donc émettre l'hypothèse que les différences sont significatives entre les deux espèces de BVDV, peuvent l'être entre les différents sous-groupes de chaque espèce mais les souches d'un même sous-groupe ne présentent pas de différences significatives.

L'intérêt d'étudier les similarités antigéniques est de constater si la protection croisée, suite à la vaccination, est possible à ces différents niveaux. Une étude (Cortese *et al.*, 1998) montre que la vaccination avec une souche vivante atténuée de BVDV-1 entraîne la production d'anticorps neutralisants contre le BVDV-2 mais à des taux inférieurs d'un log par rapport à ceux produits contre le BVDV-1. Or, de tels taux semblent insuffisants pour protéger correctement les veaux contre les signes cliniques provoqués par les souches, les plus virulentes, de BVDV-2, bien qu'ils permettent une diminution de la mortalité et de la morbidité dans l'élevage. La protection croisée entre les deux espèces de BVDV est donc bien réelle mais pas toujours suffisante. Cette protection croisée, incomplète, pourrait être à l'origine de l'épidémie provoquée par le BVDV-2, dans les années 1990, aux Etats-Unis.

La protection croisée est également variable entre les différents sous-groupes du BVDV-1. En effet, un sérum avec des anticorps contre le BVDV-1k neutralise faiblement les autres sous-groupes de BVDV-1 alors que les sérums possédant des anticorps contre ces autres sous-groupes neutralisent plus efficacement le BVDV-1k. Cependant, la protection croisée entre les différents sous-groupes semble plus efficace qu'entre les différentes espèces puisqu'elle permet la protection contre les infections *in vivo* (Bachofen *et al.*, 2008).

1.4.5.3. Au sein des BDV

Au sein des BDV, le coefficient de similarité antigénique a été calculé entre des souches isolées sur des moutons, au Royaume-Uni, entre 1976 et 1988. Le coefficient varie entre 42 et 10% et entre 19 et 49% entre des souches respectivement proches de la souche Moredun et de la souche Weybridge mais dont on ne connaît pas les génotypes. Cependant, entre les souches de ces deux différents sous-groupes, le coefficient est, majoritairement, largement inférieur à 25% et peut atteindre 2%. Comme entre les différents sous-groupes de BVDV, les différences antigéniques sont significatives entre certaines souches mais pas entre toutes les souches.

Dans cette étude, la protection croisée a également été observée par séroneutralisation entre différentes souches (10 souches de BDV dont le génotype n'était pas précisé et 1 souche BVDV). Suite à l'infection intra-nasale d'un couple d'agneaux pour chaque souche de virus, le sérum de ces agneaux a été analysé. Les sérums contenaient tous des anticorps neutralisants

contre toutes les souches inoculées mais à des titres différents. L'étude n'indique pas si les différents taux observés sont suffisants pour assurer la protection clinique des agneaux (Nettleton *et al.*, 1998).

Une autre étude a permis de montrer que la vaccination de brebis avec une souche inactivée de BVDV-1 permettait la production d'anticorps contre des souches de BVDV-1, de BDV-3 et de BDV-5. La production d'anticorps était quantitativement plus importante mais moins persistante dans le temps pour les souches BDV comparées à la souche de BVDV-1 (Anne, 2012).

1.5. Réponse du système immunitaire

Pour persister chez leurs hôtes, les virus peuvent utiliser deux stratégies différentes. La première « hit and run » concerne des virus avec une efficacité de transmission importante dans des populations où la densité et la dynamique entraînent des contacts relativement fréquents. La seconde « infect and persist » implique des virus avec une efficacité de transmission moindre mais ces virus sont capables de persister dans l'organisme de leurs hôtes. Cette seconde stratégie suppose que le virus possède la capacité de déjouer le système immunitaire. Les pestivirus utilisent les deux stratégies avec le plus fréquemment des infections d'animaux naïfs qui peuvent être très virulentes et très contagieuses et plus rarement des infections persistantes, en particulier chez les ruminants. Ces infections persistantes surviennent à un certain moment de la gestation (cf 2.3.2) lorsque le virus passe la barrière placentaire et infecte le fœtus dont le système immunitaire n'est pas encore totalement fonctionnel. Le fœtus va alors reconnaître les antigènes du virus comme des antigènes du soi. Il sera à la naissance un animal IPI (Infecté Permanent Immunotolérant) multipliant le virus (source d'infection) sans faire de réponse immunitaire contre la souche infectante (Peterhans & Schweizer, 2010).

1.5.1. Lors de la mise en place de l'infection transitoire

1.5.1.1. Réponse immunitaire innée

La voie du complément est la première partie de la réponse immunitaire innée. C'est un ensemble de molécules qui s'activent en cascade suite à la rencontre d'un antigène. Cette voie fait intervenir trois catégories de molécules. Celles qui ont une action d'opsonisation se fixent sur l'antigène et favorisent la phagocytose de celui-ci. D'autres molécules ont un chimiotactisme qui va favoriser le recrutement des effecteurs du système immunitaire. Enfin la dernière catégorie de molécules lyse la cellule sur laquelle s'est fixé le complément.

Les facteurs chimiotactiques produits par le complément permettent notamment l'arrivée des neutrophiles dans les tissus infectés, par diapédèse des vaisseaux sanguins. Les neutrophiles ont également un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire innée en phagocytant les antigènes et ou les cellules apoptotiques. La phagocytose permet l'activation des neutrophiles qui vont produire des cytokines et des chémokines qui vont amplifier le

recrutement, déjà présent, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), c'est-à-dire les macrophages et les cellules dendritiques.

La voie des interférons représente la voie la plus efficace de l'immunité innée antivirale. Les cellules présentatrices d'antigènes ainsi que les cellules épithéliales reconnaissent des signaux de danger : les PAMPS (motifs moléculaires associés aux pathogènes) spécifiques d'une ou plusieurs classes d'agents infectieux et DAMPS (motifs moléculaires associés aux altérations cellulaires). Ces signaux se fixent sur les PRR (récepteurs de reconnaissance des pathogènes) présents à la surface ou dans le cytoplasme des cellules. Lors d'une infection par un virus à ARN, les PRR majeurs, TLR-3, -7 et -8 vont reconnaître les acides nucléiques simples brins et doubles brins du virus. La fixation des PAMP sur les PRR entraîne la production d'interférons de type 1 (IFN-1) et ceux quelque soit le type de cellules concernées. Les IFN-1 produits vont alors se fixer sur les récepteurs qui leur sont dédiés, présents sur la cellule productrice ou sur les cellules voisines, ce qui provoque la libération de nombreuses protéines antivirales. Ces protéines antivirales entraînent le blocage de la production de protéines virales, de polymérase virales et la dégradation de l'ARN. La réplication virale est alors bloquée. Mais, les protéines antivirales vont aussi cibler des molécules appartenant à la cellule, entraînant ainsi l'apoptose de la cellule (Peterhans *et al.*, 2010; Peterhans & Schweizer, 2013).

Pour déjouer la réponse immunitaire innée, (Ellis *et al.*, 1988) le BDV contre la réponse des neutrophiles en inhibant la capacité phagocytaire de ces derniers (Hussin & Woldehiwet, 1994). Le BDV permet ainsi de freiner la phagocytose mais aussi de ralentir le recrutement des CPA, essentiel à la mise en place de la réponse immunitaire acquise. Le recrutement des CPA est également ralenti par la diminution de production des facteurs chimiotactiques. De plus, une infection par un pestivirus entraîne une diminution de l'expression des récepteurs du complément (Chase *et al.*, 2004). Ces stratégies de contournement permettent au pestivirus de s'installer et de se multiplier.

Le mécanisme principal reste, cependant, l'inhibition de la réponse aux interférons de type I par les souches ncp. Pour cela, les souches ncp, responsables de l'infection persistante, empêchent les cellules de prévenir le système immunitaire de la présence de l'ARN viral en inhibant la production d'IFN-1. Le BVDV contourne la réponse aux interférons de trois manières différentes : il évite l'induction de la production d'interférons au moment de l'infection, ensuite il résiste à son action mais il n'interfère pas lors de l'action des interférons contre d'autres virus, ce qui permet aux animaux de se défendre contre d'autres infections et donc de survivre pour excréter le virus plus longtemps (Peterhans & Schweizer, 2013).

Les protéines N^{pro} et E^{ns} des souches ncp seraient responsable de cette inhibition (Peterhans and Schweizer, 2010). Meyers *et al.* (2007) ont montré que des délétions sur les séquences des protéines N^{pro} et/ou E^{ns} entraînaient la production d'IFN-1 dans le sérum d'animaux infectés par une souche ncp de BVDV-2. Cette production d'IFN-I est également retrouvée dans le sérum des animaux infectés par une souche cp de BVDV-2 alors qu'elle est absente chez ceux infectés par la souche ncp sauvages de BVDV-2.

La stratégie de la protéine N^{pro} est d'induire la dégradation du facteur de transcription IRF-3 ce qui bloque la transcription du gène de l'IFN-β dans les cellules infectées uniquement. N^{pro} cible également d'autres protéines, ce qui permet l'inhibition de la transcription d'autres gènes d'interférons et l'inhibition de l'apoptose induite par les ARN doubles brins. La protéine E^{ms}, par son activité RNase, détruit les ARN viraux en particulier les doubles brins, or ces ARN sont les PAMPS essentiels qui permettent l'activation de la réponse par les interférons. Cette protéine permet par son action extracellulaire de diminuer la production d'interférons dans les cellules non infectées (Peterhans & Schweizer, 2013).

1.5.1.2. Réponse immunitaire acquise

La réponse immunitaire acquise est plus longue à se mettre en place, il faut que les antigènes viraux pénètrent dans l'organisme. Les CPA reconnaissent l'antigène viral et migrent dans un nœud lymphatique où elles expriment des CMH (complexes majeurs d'histocompatibilité) de classe 2, à leur surface. Les lymphocytes T naïfs reconnaissent l'antigène viral présenté sur le CMH et deviennent alors des lymphocytes T auxiliaires ou lymphocytes T CD4⁺ (LT_{CD4+}).

Les LT_{CD4+} vont alors induire la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ (LT_{CD8+}) en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui seront les effecteurs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les CTL vont reconnaître des cellules présentant à leur surface des CMH I associés à des antigènes viraux et entraîner leur destruction par apoptose.

Les LT_{CD4+} permettent également la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes, qui seront les effecteurs de la réponse immunitaire à médiation humorale par leur production d'anticorps. Les lymphocytes B peuvent aussi se différencier en lymphocytes B mémoires, qui permettront une activation précoce de la réponse immunitaire acquise en cas de nouvelle infection par le virus. Le rôle principal des anticorps est la neutralisation du virus libre mais ils peuvent également bloquer des étapes de la réplication virale.

Les pestivirus ont trouvé différents procédés pour contourner la réponse immunitaire acquise. Les BVDV, par exemple, vont entraîner la diminution du nombre de LT_{CD4+}, de LT_{CD8+}, de LB et de neutrophiles, dans les organes lymphoïdes, qui sont des précurseurs essentiels de la mise en place des réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale (Ellis *et al.*, 1988). Cependant, il semblerait que le BDV n'entraîne qu'une diminution des LT_{CD4+} et des LB mais pas de diminution significative des LT_{CD8+} ni des neutrophiles (Hussin & Woldehiwet, 1994; ANNE, 2012). Archambault *et al.* (2000) ont également montré une diminution de l'expression des molécules CMH II à la surface des CPA lors d'une infection par le BVDV chez des veaux, freinant ainsi la différenciation des lymphocytes T naïfs.

Ce contournement du système immunitaire entraîne également une immunosuppression qui favorise la co-infection par de nombreux pathogènes. En effet, Chase *et al.* (2004) ont montré qu'une infection par les pestivirus provoque une diminution de la phagocytose par les macrophages alvéolaires, une diminution de l'activité microbicide contre *Escherichia coli* et *Candida albicans* entre autres mais également une diminution de l'expression des récepteurs

aux portions Fc des immunoglobulines qui permettent notamment le transfert des immunoglobulines d'origine maternelle à travers la barrière intestinale. Les pestiviroses des ruminants sont alors souvent associées à d'autres pathogènes digestifs ou respiratoires voire à des septicémies notamment chez les jeunes.

1.5.2. Lors de la mise en place de l'infection persistante

Lors de la mise en place d'une infection persistante, *in utero*, la réponse immunitaire acquise de l'embryon n'est pas encore fonctionnelle. Les pestivirus vont alors entraîner une immunotolérance au cours de cette période qui permettra de déjouer la réponse immunitaire acquise après sa mise en place. Cette persistance repose sur la tolérance des LT_{CD4+} à une certaine période de la gestation qui est très spécifique et ne pourra donc pas être effective lors d'une infection par une autre souche de pestivirus (Chase *et al.*, 2004). Pour cela, dans le cas des souches ncp, l'interférence avec le système de réponse aux interférons de type I de la mère permet leur diffusion rapide et leur passage rapide dans le fœtus. Le même mécanisme pourrait exister pour limiter la réponse fœtale aux interférons de type I, déjà limitée. On retrouve, *in vivo*, un manque d'IFN-1 chez les fœtus pendant la période de mise en place de l'infection persistante qui pourrait expliquer le contournement du système immunitaire. Cependant, une fois l'infection installée, le virus est résistant à l'IFN-1 et l'injection de l'interféron ne permet pas de l'éliminer.

Le biotype cp se caractérise par une réplication très importante de l'ARN viral qui activerait alors de manière extrêmement importante le système interféron de type I en dépassant les capacités d'inhibition de E0 et de E^{rns}. La réponse interféron participerait alors à limiter la diffusion de ces souches cp laissant le temps au système immunitaire de les éliminer avant de passer la barrière placentaire et de réaliser une infection persistante du fœtus.

2. LA MALADIE DE LA FRONTIERE (BORDER DISEASE)

2.1. Historique et importance

La maladie de la frontière ou border disease a été décrite, pour la première fois, en 1959, par Hugues *et al.*. Cette maladie était endémique, depuis plusieurs dizaines d'années, à la frontière entre l'Angleterre et le Pays de Galles. Elle se traduisait par une toison anormale, des os longs anormalement fins et une démarche parfois tremblante voire titubante chez des agneaux, nés de jeunes brebis de races Clun Forest et Kerry Hill. Avant de mettre en évidence une étiologie virale, on associait ce syndrome à une étiologie génétique car il ne touchait que ces deux races ovines assez proches (Barlow & Patterson, 1982).

Par la suite, cette maladie a été retrouvée dans différents pays d'Europe, aux Etats-Unis, en Australie et en Nouvelle-Zélande, sous des formes variables. La maladie se manifeste par de l'infertilité, des avortements, des agneaux mort-nés ou des agneaux faibles présentant des tremblements des anomalies du squelette et une toison hirsute. La maladie a alors connu plusieurs dénominations : agneaux trembleurs, agneaux crépus, maladie du tremblement congénitale, maladie du tremblement avec hirsutisme, hypomyélogénèse congénitale (Mondoly & Pouget, 1998).

En France, elle a été décrite pour la première fois en 1984 mais elle était déjà connue sous le nom d'entérite-leucopénie ovine ou d'agneaux bourrus ou trembleurs. Une forme particulièrement grave, dénommée « petega ovina » ou « aveyronite », a été observée dans le bassin de Roquefort, dans les années 1980. Les élevages touchés enregistraient respectivement des taux de morbidité et de mortalité de 25% et 7% chez les adultes et des taux de mortalité chez les agneaux variables de 15 à 90%.

Aujourd'hui, le virus est réparti mondialement. En 1998, Nettleton *et al.*, ont montré que la prévalence de la maladie chez les moutons variait de 5 à 50% d'un pays à l'autre mais aussi d'une région à l'autre, à l'intérieur d'un même pays. La persistance de la maladie au sein des élevages est principalement due aux animaux infectés permanents immunotolérants (IPI, cf 2.2) qui constituent le réservoir principal du virus.

La maladie de la frontière a également un impact économique important sur les élevages se traduisant par de l'infertilité, des avortements et des retards de croissance chez les agneaux atteints. Selon (Sharp & Rawson, 1986), l'introduction de la maladie de la frontière dans un élevage pourrait diminuer les bénéfices de plus de 20%. Il est donc important de trouver des stratégies pour contrôler cette maladie.

2.2. Mécanismes de transmission

2.2.1. Sources animales

La principale source animale de virus est constituée par les ovins IPI qui excrètent le virus tout au long de leur vie. Ces animaux sont encore plus importants dans le cycle de transmission

du virus quand ils sont asymptomatiques puisque le seul moyen de les détecter repose sur des analyses virologiques systématiques.

Les ovins infectés transitoires sont également une source de virus pendant la phase de virémie lors de laquelle l'excrétion est possible mais avec une intensité plus faible.

Les autres ruminants peuvent également excréter du virus et donc être une source de contamination.

La vitesse de propagation de l'infection dépend du mode d'élevage, elle est beaucoup plus rapide dans les élevages intensifs où les contacts étroits sont fréquents que dans les élevages extensifs en extérieur dans lesquels elle peut prendre plusieurs années. On peut alors observer des épidémies importantes de la maladie de la frontière dans les élevages intensifs au moment des agnelages (Nettleton *et al.*, 1998).

2.2.2. Matières virulentes

La présence d'antigènes viraux dans les écouillons nasaux et buccaux, dans les urines et dans les fèces en lien avec la présence de ces antigènes dans les glandes parotides, les muqueuses respiratoires, digestives et urinaires montre que les sécrétions oro-nasales, l'urine et les selles sont des matières virulentes (Terpstra, 1981).

De plus, le moment de l'avortement, de la mise bas ou de la délivrance semble être des périodes à risques pour la transmission du virus. En effet, le fœtus, les membranes fœtales et le liquide amniotique contiennent du virus (Terpstra, 1981).

Les pestivirus peuvent également contaminer les vaccins avec des virus vivants atténués. La contamination se fait via les cultures cellulaires ou le sérum de veau fœtal, utilisés pour multiplier le virus vaccinal atténué. Des émergences de la maladie ont été associées à l'utilisation de vaccins contre l'ecthyma contagieux ou la variole ovine chez le mouton mais aussi chez la chèvre (Nettleton & Entrican, 1995).

2.2.3. Transmission

2.2.3.1. Transmission horizontale

La transmission horizontale correspond à la pénétration du virus dans l'organisme de l'animal, par voie oro-nasale principalement. Cette transmission peut avoir lieu à tout moment de la vie de l'animal, suite à un contact direct ou indirect par l'intermédiaire de matières virulentes, citées ci-dessus. Cette transmission est responsable de la mise en place d'une infection transitoire qui se caractérise par une virémie de quelques jours, d'une intensité faible à modérée. L'excrétion est superposable à la durée de la virémie et son intensité est également faible à modérée. L'animal va alors subir une séroconversion et l'expression clinique de la maladie sera très souvent asymptomatique ou pourra prendre une symptomatologie très variée.

2.2.3.2. Transmission verticale

La transmission verticale se caractérise par la transmission du virus de la mère au fœtus, à travers le placenta, pendant la gestation, lors de l'infection transitoire de la mère. L'impact de cette transmission verticale dépend du moment de la gestation où elle a lieu. Dans les stades précoces, le virus est éliminé avant de traverser la barrière placentaire. Entre 15 et 60 jours, le fœtus n'est pas immunocompétent, son infection par le BDV va aboutir à la naissance d'agneaux infectés permanents immunotolérants (IPI) qui seront séronégatifs mais viropositifs tout au long de leur vie, avec des charges virales dans le sang globalement plus fortes que lors d'une infection transitoire. L'excrétion virale sera alors, elle aussi, permanente avec une intensité élevée, ce qui explique le rôle épidémiologique important des animaux IPI.

2.3. Pathogénie et expression clinique

2.3.1. Infection transitoire

Lors d'une infection transitoire, le virus (souche ncp) pénètre par voie respiratoire, et plus particulièrement, au niveau de la muqueuse des cavités nasales. Il rejoint alors les organes lymphoïdes comme les tonsilles pharyngiennes où il se multiplie avant d'atteindre la circulation sanguine qui lui permet de se propager dans l'organisme. Lors de cette phase virémique, les virions sont localisés dans les cellules mononuclées du sang ou circulent librement dans le plasma. La virémie peut durer de deux à quinze jours (García-Pérez *et al.*, 2009a) pendant lesquels la distribution tissulaire est large et l'excrétion virale est possible. Par la suite, les anticorps neutralisants mettent fin à cette phase de virémie.

L'infection transitoire peut survenir chez les ovins adultes comme chez les jeunes. Les animaux en bonne santé sont généralement asymptomatiques ou peuvent présenter des signes cliniques discrets. On peut alors observer une légère hyperthermie ainsi qu'une diminution du nombre de leucocytes circulants dans le sang, pendant la phase de virémie. Certaines souches plus virulentes, comme la souche responsable de l'épidémie aveyronnaise en 1984 ou encore la souche qui avait contaminé un vaccin vivant contre le CSFV, sont à l'origine de signes cliniques plus sévères. Ils se caractérisent par une hyperthermie plus marquée, une leucopénie plus intense et plus longue, une thrombocytopénie à l'origine d'un syndrome hémorragique, de l'anorexie, de la conjonctivite, des écoulements nasaux, de la dyspnée et de la diarrhée avec des taux de mortalité pouvant être élevés (jusqu'à 50%) chez les jeunes agneaux (Nettleton *et al.*, 1998).

2.3.2. Infection fœtale

L'infection, pendant la gestation, a un fort impact sur la fonction de reproduction. Les conséquences de l'infection lors de la gestation dépendent de nombreux paramètres, notamment du moment de l'infection, de la charge virale reçue, de la virulence de la souche, du statut immunitaire de la brebis et des infections intercurrentes. Par exemple, l'infection par

Anaplasma phagocytophilum transmis par les tiques, fréquente au Pays basque, favoriserait l'apparition d'avortement (García-Pérez *et al.*, 2009a).

L'infection du fœtus à travers le placenta a des répercussions différentes en fonction de la maturité du système immunitaire de celui-ci au moment de l'infection (Tableau 2).

Infection avant 15 jours de gestation :

Pendant les quinze premiers jours de gestation, l'embryon n'est pas encore implanté dans l'utérus. Chez les ovins, l'implantation se déroule entre le 15^{ème} et le 28^{ème} jour de gestation, le virus ne peut donc pas atteindre le fœtus avant le 28^{ème} jour qui correspond à l'union du trophoblaste avec les caroncules et donc à la mise en place de communications entre le fœtus et la mère. Avant le 15^{ème} jour, la réponse immunitaire de la mère se met en place et permet l'élimination du virus avant l'implantation de ces communications. Il n'y donc pas d'infection du fœtus dans les quinze premiers jours de la gestation mais l'infection de la brebis peut se traduire par des anomalies du fonctionnement ovarien entraînant de la mortalité embryonnaire qui peuvent être interprétées comme de l'infécondité ou de l'infertilité de la mère.

Infection entre 15 et 60 jours de gestation :

A partir du 15^{ème} jour de gestation environ, la brebis n'a pas le temps d'éliminer l'infection avant la mise en place des communications avec le fœtus. Le virus atteint alors le fœtus où il va se multiplier de façon abondante car les effecteurs de la réponse immunitaire de la mère ne peuvent pas l'atteindre. Pendant cette période, le système immunitaire du fœtus est non compétent, le virus n'est donc pas reconnu comme un élément exogène mais comme faisant parti du soi. Il n'y aura donc pas de réponse immunitaire spécifique dirigée contre le virus qui sera présent pendant toute la vie de l'animal. Ces animaux sont qualifiés d'IPI puisqu'ils excrètent en permanence et ne produisent pas d'anticorps contre le virus.

Cette période d'infection est également à l'origine d'avortements ou de mortalité embryonnaire. Les avortements s'expliquent par la présence de lésions microscopiques dans les placentomes des brebis infectées. Caffrey *et al.* (1997) ont montré la présence de thrombose, de nécrose des petits vaisseaux et du stroma des cellules du placenta dès 14 jours après l'infection.

Infection entre 60 et 85 jours de gestation :

Le système immunitaire adaptatif devient fonctionnel entre le 64^{ème} et le 82^{ème} jour de gestation chez les moutons (Fahey & Morris, 1978). La variabilité, quant au moment exact du fonctionnement de la réponse immunitaire, rend le devenir des agneaux difficile à prévoir. Certains vont naître IPI et d'autres élimineront le virus grâce à leur réponse immunitaire et naîtront donc séropositifs. Cette période d'infection peut engendrer des avortements, même si elle est globalement moins à risques, et peut également entraîner des anomalies congénitales. Ces anomalies congénitales se présentent sous forme d'hypoplasie ou de dysplasie cérébrale,

d'hydranencéphalie et de porencéphalie causées par de l'inflammation nécrotique. Cette inflammation serait d'origine immunitaire, ces anomalies sont, en effet, retrouvées chez des agneaux avec un fort taux d'anticorps dans le sang (Nettleton *et al.*, 1998).

Infection après 85 jours de gestation :

Après 85 jours, le statut immunitaire du fœtus est correctement fonctionnel et une infection pendant cette période s'apparente à une infection transitoire avec la naissance d'agneaux normaux en bonne santé même si certains de ces agneaux peuvent être mort-nés ou faibles à la naissance voire mourir dans les premiers jours de vie (Nettleton *et al.*, 1998).

Tableau 2 : Conséquences de l'infection en fonction du stade de gestation.

	Nombre de jours de gestation			
	Avant 15 jours	Entre 15 et 60 jours	Entre 60 et 85 jours	Après 85 jours
Système immunitaire	Non fonctionnel	Non fonctionnel	Acquisition	Fonctionnel
Virus	-	+	+/-	-
Anticorps	-	-	+/-	+
Conséquences	Mortalité embryonnaire Elimination du virus par la mère	Avortements Agneaux IPI	Avortements Agneaux IPI Agneaux non IPI avec ou sans signes cliniques Malformations congénitales	Avortements Agneaux non IPI avec ou sans signes cliniques

Les conséquences observées lors d'une infection fœtale sont dépendantes du génotype de la souche infectieuse. En effet, Bethune (2012) a montré que les souches BDV-5 et BVDV-1 induisaient des taux de mortalité et d'avortement plus importants. Les souches BDV-3, BDV-4 et BDV-6 ont induit des malformations et la souche BVDV-1 a entraîné des malformations associées à des retards de croissance.

2.3.3. Infection permanente

Comme on a pu le voir précédemment, une infection, principalement entre 15 et 60 jours, peut entraîner la naissance d'agneaux IPI. Pendant cette période, la réponse immunitaire acquise n'étant pas encore fonctionnelle, seule la réponse immunitaire innée, fonctionnelle dès le 17^{ème} jour, va pouvoir défendre l'organisme. Or, les souches ncp de BDV peuvent contourner

cette réponse immunitaire (cf 1.5.2) permettant ainsi l'acceptation du virus comme un élément du soi. Seules les souches ncp peuvent utiliser cette méthode de détournement, c'est pourquoi une infection par une souche cp, y compris dans la période entre 15 et 85 jours, ne conduira pas à la genèse d'agneaux IPI.

Lorsque les agneaux sont infectés avant la mise en place du système immunitaire fonctionnel, la réplication virale est non-contrôlée ce qui peut entraîner une mortalité atteignant jusqu'à 50% des fœtus. Les agneaux survivants à cette infection sont des animaux infectés permanents immunotolérants (IPI) (Nettleton *et al.*, 1998).

Ces animaux ont donc une virémie persistante toute leur vie mais ne produisent pas d'anticorps contre le virus. On peut, cependant, retrouver des anticorps d'origine maternelle dans le sérum des agneaux IPI, suite à la prise colostrale, dans les mois suivant la naissance. La diversité antigénique des pestivirus peut également expliquer la présence d'anticorps neutralisants dans le sang des animaux IPI s'ils ont été infectés par une autre souche de pestivirus. La présence de ces anticorps peut, éventuellement, masquer la présence des antigènes dans le sang (Nettleton *et al.*, 1998).

Le système immunitaire n'étant pas actif contre le BDV chez les IPI, il n'y a donc pas de réaction inflammatoire. Les seules modifications que l'on peut observer chez ces animaux sont une déficience en myéline à tous les étages du système nerveux central et une augmentation de taille des follicules laineux à l'origine d'anomalies de la toison (Nettleton *et al.*, 1998).

Les animaux IPI qui arrivent à l'âge adulte peuvent être mis à la reproduction. Les femelles donneront obligatoirement naissance à des agneaux IPI et les mâles posséderont un sperme de faible qualité fortement infecté qui réduira leur fertilité (Nettleton *et al.*, 1998).

Il arrive que des IPI développent spontanément des diarrhées incoercibles, de l'amaigrissement, des écoulements oculaires et nasaux parfois associés à une détresse respiratoire. A l'autopsie, ces animaux présentent une hyperplasie des parois de l'iléon distal, du colon et du caecum. Cela serait dû à des mutations d'une souche ncp entraînant un phénotype cp qui serait responsable des signes cliniques observés. Ce phénomène se rapproche de ce qui est observé chez les bovins infectés par le BVDV lors de l'apparition de la maladie des muqueuses (Nettleton *et al.*, 1998).

A la naissance, on observe une augmentation du nombre de mort-nés momifiés ou non, jusqu'à 49% dans certaines études, mais également du nombre d'agneaux qui meurent au cours de leur développement, avant ou autour du sevrage. Les agneaux sont souvent prématurés et ont un poids inférieur par rapport à ceux nés de brebis saines à cause des retards de croissance intra-utérins. Les agneaux nés de mères infectées peuvent être asymptomatiques ou peuvent présenter une diversité de signes cliniques importante, en fonction de la souche utilisée même si une souche peut être à l'origine de tableaux symptomatiques différents.

La plupart des agneaux ont une toison anormalement hirsute (Figure 6) principalement sur le dos et le cou, plus ou moins évidente à observer en fonction de la race. Ces anomalies de la toison peuvent également se caractériser par des pigmentations sombres (Nettleton *et al.*, 1998).

Certains agneaux sont faibles avec des difficultés à se tenir debout et des anomalies de posture telles que de l'hyperextension ou de l'hyperflexion des articulations des membres. Ils peuvent également montrer des anomalies du squelette avec de l'arthrogrypose, du prognathisme ou du brachygnathisme (Figure 4) (García-Pérez *et al.*, 2009a).

Ils peuvent également présenter des signes neurologiques avec de l'incoordination et des tremblements. Ces tremblements peuvent se caractériser par de violentes contractions rythmiques des membres mais aussi par de légers frissonnements à peine détectable de la tête, des oreilles et de la queue. Ces signes cliniques s'estompent lentement et peuvent même disparaître après 3 mois mais sont susceptibles de réapparaître pendant une période de stress (Nettleton *et al.*, 1998). L'intensité de ces signes neurologiques est étroitement liée à l'intensité de l'hypomyélinisation présente dans le système nerveux central (Anderson *et al.*, 1987).

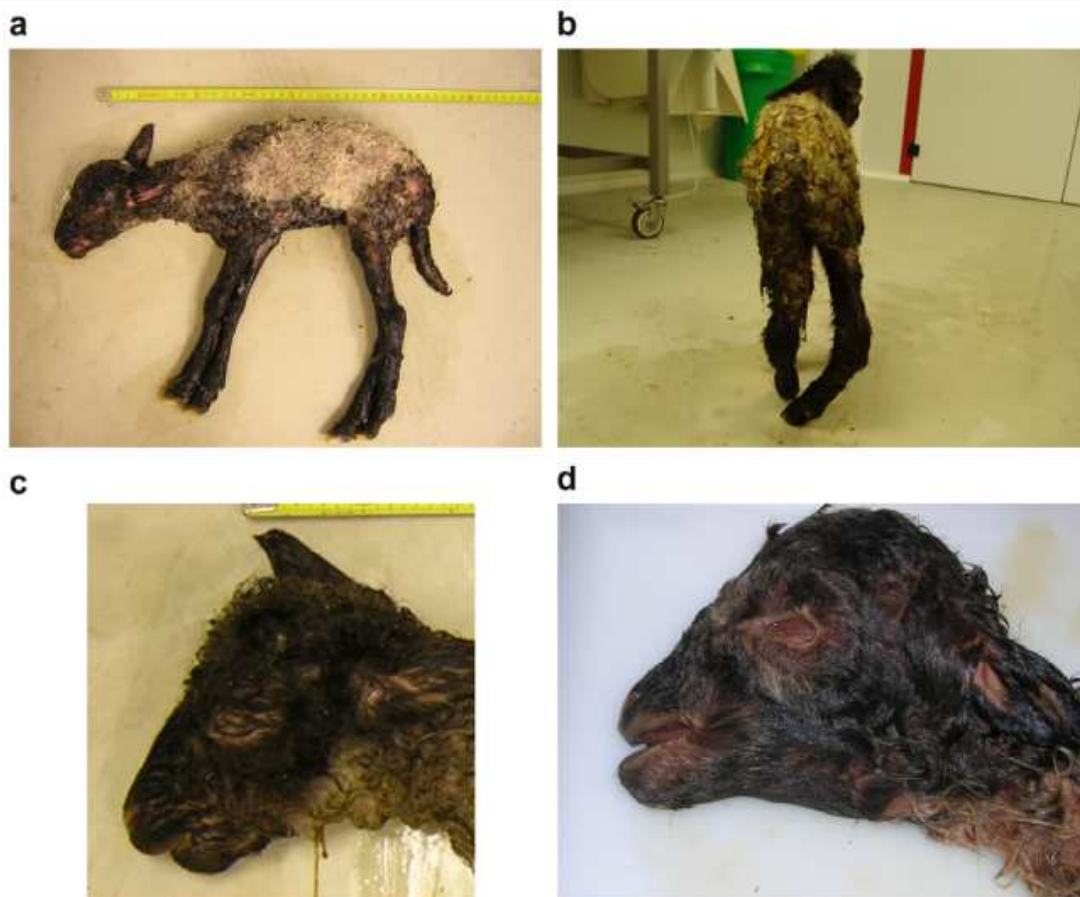


Figure 4 : Les anomalies du squelette sont caractérisées par de l'arthrogrypose avec de la raideur (a) ou des déviations latérales des articulations, par de la brachygnathie (c) ou par de la prognathie (d) (García-Pérez *et al.*, 2009a).

On retrouve, suite à l'infection fœtale, des lésions du système nerveux central. Ces lésions se présentent, le plus souvent, sous forme de lésions focales, symétriques, bilatérales, translucides qui peuvent être des zones molles ou des cavités de 1 à 10 mm de profondeur, dans le lobe temporal (Plant *et al.*, 1983).

Les agneaux IPI, qui survivent plusieurs mois, peuvent présenter des inflammations systémiques chroniques de type néphrite, myocardite ou pneumonie (Nettleton *et al.*, 1992). D'autres anomalies, plus anecdotiques, sont également observées : des kystes dans le septum pellucidum, de l'hydranencéphalie (Figure 5), de l'hypoplasie cérébelleuse, de l'ictère, de l'hydronéphrose, de l'anasarque...(García-Pérez *et al.*, 2009a)

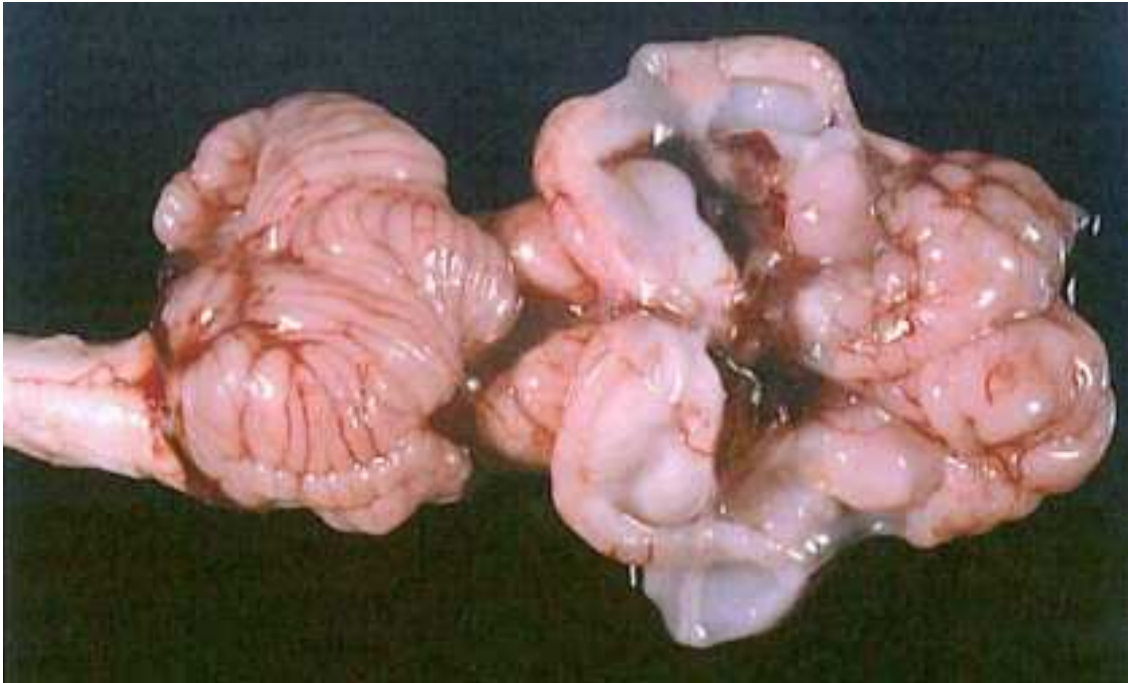


Figure 5 : Hydranencéphalie (Ferrer *et al.*, 2013)



Figure 6 : Laine hirsute (Ferrer *et al.*, 2013)

De plus, une sévère leucopénie est observée chez 73% des agneaux à la naissance, ce qui implique une immunosuppression, prédisposant les agneaux aux pathologies néonatales telles que les pneumonies ou les entérites (Nettleton *et al.*, 1992; García-Pérez *et al.*, 2009a). Cette leucopénie prédispose également à la survenue de cas d'ecthyma contagieux.

Les agneaux ont également des retards de croissance intra-utérins importants, avec des os longs et une colonne vertébrale de taille diminuée. Ses retards de croissance pourraient s'expliquer à partir de trois hypothèses : soit par la sous-nutrition du fœtus due à l'insuffisance placentaire, soit par la persistance de l'infection au niveau de la thyroïde et des autres organes endocrines du fœtus ou encore par l'inhibition de la mitose dans les cellules infectées (Caffrey *et al.*, 1997). Les retards de croissance sont également observés du vivant de l'animal et sont parfois les seuls signes observables en l'absence d'autres signes cliniques (Nettleton *et al.*, 1998).

Comme chez les bovins, les agneaux IPI peuvent être surinfectés avec une souche cp entraînant une maladie similaire à la maladie des muqueuses. Les agneaux meurent en 2 à 4 semaines et présentent des diarrhées incoercibles parfois hémorragiques associées à un syndrome de dépérissement chronique, un jetage oculaire et nasal abondant (Nettleton *et al.*, 1992).

2.4. Diagnostic

2.4.1. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel de la maladie de la frontière doit être ordonné en fonction du tableau clinique observé.

Dans le cas d'avortements, le diagnostic différentiel doit être fait avec deux maladies zoonotiques : la brucellose et la fièvre Q (*Coxiella burnetii*). En première intention, on peut également faire la différence avec la toxoplasmose, la chlamydie et la salmonellose à *Salmonella abortusovis*.

En seconde intention, on peut suspecter la campylobactériose, la listériose, la yersiniose, l'anaplasmose, la mycoplasmosse, les virus de schmallerberg et de la fièvre catarrhale ovine, la néosporose et l'aspergillose.

Il faut également éliminer les causes non infectieuses notamment les avortements d'origine accidentelle, traumatique, médicamenteuse, alimentaire, toxique ou liés au stress (De Crémoux *et al.*, 2013).

Tableau 3 : Diagnostic différentiel des avortements chez les petits ruminants

	Infectieuse			Non Infectieuse
	Réglémentée	1 ^{ère} Intention	2 ^{nde} Intention	
Bactéries	Brucellose	Fièvre Q Chlamydieuse Salmonellose	Campylobactériose Listériose Yersiniose Anaplasmosse Mycoplasmosse	Accident Traumatisme Médicament Alimentaire Toxique Stress
Virus		Border disease	Schmallenberg Fièvre catarrhale ovine	
Parasites		Toxoplasmose	Néosporose	
Agents mycosiques			Aspergillose	

Bien qu'il n'existe pas de signe pathognomonique permettant de différencier les différentes étiologies des avortements, il existe néanmoins des éléments d'orientation. Sur le plan lésionnel, l'existence de foyers nécrotiques, liés à l'envahissement des villosités chorales par des tachyzoïtes, oriente le diagnostic vers la toxoplasmose mais ce signe n'est pas observé systématiquement. La présence de fœtus momifiés conduit également à suspecter la toxoplasmose mais on peut également en retrouver dans des cas de chlamydieuse ou de fièvre Q. Lors d'infections bactériennes, les lésions sont localisées au hile des placentomes dans un premier temps. La chlamydieuse entraîne généralement des placentites sévères. Les placentites suppurées sont généralement attribuées à la fièvre Q mais peuvent également être retrouvées dans des cas de chlamydieuse. Sur un plan lésionnel, on voit bien qu'il est difficile de différencier les différentes étiologies infectieuses des avortements. Cette différenciation est d'autant plus difficile que le tableau clinique de mortinatalité, de naissance d'agneaux chétifs et d'infertilité est lui aussi retrouvé dans la majorité de ces infections. Néanmoins, dans les cas de salmonelloses, on observe généralement une altération de l'état général des adultes avec de l'hyperthermie, des métrites voire de la mortalité (De Crémoux *et al.*, 2013).

Dans le cas de la maladie de la frontière, on remarque l'augmentation de la prévalence des maladies intercurrentes chez les agneaux. Le diagnostic différentiel est donc assez large puisque le tableau clinique propre à la border disease et le tableau clinique des affections intercurrentes se recoupent. En ce qui concerne le tableau clinique spécifique de la maladie chez les agneaux, on peut considérer les pathologies responsables de troubles neurologiques, de malformations congénitales et d'anomalies la toison.

Les troubles neurologiques chez des agneaux nouveau-nés peuvent également se retrouver lors d'ataxie enzootique qui a pour origine une carence en cuivre, de méningo-encéphalite bactérienne, d'infection par le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) mais aussi lors d'affections congénitales génétiques ou liées à une intoxication pendant la gestation.

Concernant les malformations congénitales, on peut suspecter les virus de schmallenberg (SBV) et de la FCO également responsable d'hydranencéphalie. L'arthrogrypose peut, quant à

elle, être observée dans des cas d'anomalie génétique, d'intoxication pendant la gestation et, là aussi, dans des cas d'infection par le virus SBV.

Les anomalies de la toison de type laine décolorée et cassante sont également observées dans les cas d'ataxie enzootique.

2.4.2. Diagnostic clinique et nécropsique

Le diagnostic différentiel (cf 2.4.1) de la maladie de la frontière montre que les éléments cliniques et nécropsiques observés ne permettent pas de conclure avec certitude, à une infection par le BDV. En effet, il n'existe ni de signe, ni de lésion pathognomonique que ce soit lors de l'atteinte des agneaux ou lors de l'infection des adultes, la plupart du temps asymptomatique ou se résumant à des avortements. Les signes et les lésions sont uniquement des éléments d'orientation qui ont une influence sur le diagnostic, d'autant plus importante qu'ils sont combinés. Le tableau clinique le plus spécifique est le trembleur hirsute. L'augmentation de la prévalence des maladies intercurrentes chez les agneaux est également un élément d'orientation majeur.

A l'autopsie, les seules lésions observables chez les femelles gestantes sont des lésions utérines notamment au niveau des caroncules ou du placenta (hémorragies, nécrose, œdème...). Chez les agneaux, on peut remarquer d'éventuelles anomalies congénitales ainsi qu'un épaissement des parois iléales, coliques et/ou caecales dans le cas de l'infection par une souche cp.

2.4.3. Diagnostic de laboratoire

2.4.3.1. Détection virale

2.4.3.1.1. Isolement viral en culture cellulaire

L'isolement viral repose sur la mise en culture d'un échantillon, sur des cellules ou une lignée cellulaire. Les cellules ovines utilisées sont généralement des cellules, primaires ou secondaires, de poumons, de reins ou de testicules. On peut également utiliser des lignées cellulaires issues de muscles de fœtus ou de plexus choroïde d'ovins mais la susceptibilité de ces lignées, vis-à-vis du BDV, est variable. Dans le cas où l'on suspecte une infection par du BDV d'origine bovine, il est possible d'employer un système utilisant des cellules ovines et des cellules bovines. On utilise généralement les cellules testiculaires ou les cellules embryonnaires de trachées ou de cornets olfactifs ou encore des lignées cellulaires continues de reins de bovins. Cependant, les cellules bovines ne sont pas toujours assez sensibles pour isoler certaines souches de BDV, il est donc important d'associer les deux types de cellules (OIE, 2008).

On a vu que la contamination était possible par l'intermédiaire de vaccins contaminés par les pestivirus (cf 2.3.2). En effet, ce sont des contaminants fréquents des cultures cellulaires et des sérums. Il est donc important de vérifier, avant la mise en culture, que les cellules ou les

lignées cellulaires utilisées ne contiennent ni le virus ni d'anticorps dirigés contre celui-ci (Nettleton *et al.*, 1998).

L'isolement du virus est possible à partir de sang total ou du sperme, du vivant de l'animal, ou à partir de différents organes, après la mort de l'animal. En raison de la cytotoxicité du sperme et pour obtenir des résultats plus exacts, il est préférable d'utiliser le sang du bélier. Si le sang n'est pas utilisable, il est recommandé de diluer, à au moins 1/10^{ème}, le sperme dans le milieu de culture cellulaire. Les organes, à partir desquels l'isolement est le plus simple, sont la rate, la thyroïde, les reins, l'encéphale, les nœuds lymphatiques et les intestins (Nettleton *et al.*, 1998).

Il existe de nombreuses variantes d'isolement du BDV. Ces variantes doivent être optimisées pour obtenir une sensibilité maximale, en utilisant une préparation virale de référence et des isolats de BDV récents, provenant du terrain.

Le virus est, ensuite, mis en évidence grâce à des techniques immunologiques (immunofluorescence, immunoperoxydase) pour les souches ncp et par leur pouvoir cytopathique pour les souches cp. Cette technique permet la détection des IPI mais est déconseillée chez les animaux de deux mois, en raison de la possible présence d'anticorps d'origine maternelle.

Cette technique est très spécifique mais longue, onéreuse et peu sensible en présence d'autolyse (García-Pérez *et al.*, 2009b).

2.4.3.1.2. Immunohistochimie

L'immunohistochimie consiste à appliquer des anticorps spécifiques, sur des coupes de tissus congelées et fixées à l'acétone. Les antigènes viraux peuvent ainsi être détectés dans l'encéphale, la glande thyroïde, la muqueuse buccale et la peau.

2.4.3.1.3. ELISA antigène

Il s'agit d'un ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de capture, entre 2 anticorps monoclonaux. L'un des anticorps tapisse le fond des puits et va ainsi fixer les antigènes. Puis le second anticorps, couplé à la peroxydase, va servir de révélateurs. La peroxydase permet l'émission d'un signal chromogène, à partir d'un substrat, dont la densité optique est proportionnelle à la quantité d'antigène (Figure 7). Il n'existe pas de kit spécifique du BDV. Les anticorps utilisés ciblent généralement les antigènes NS2/3 qui sont relativement conservés parmi les pestivirus et permettent ainsi l'utilisation de kit ciblant le BVDV pour la recherche de BDV. Des kits ciblant les glycoprotéines E0 et E2 peuvent également être utilisés mais la variabilité de ces protéines ne permet pas forcément une détection croisée.

Cette méthode permet la détection du virus, dans les leucocytes, à partir du sang d'animaux IPI mais n'est, généralement, pas assez sensible pour détecter le virus dans les leucocytes lors d'infections aiguës, durant lesquelles la charge virale est trop faible (García-Pérez *et al.*, 2009a). Cette méthode permet également la détection du virus dans des suspensions d'organe,

par exemple dans des suspensions de rate de mouton IPI. Elle peut également être une alternative à la révélation des cultures cellulaires.

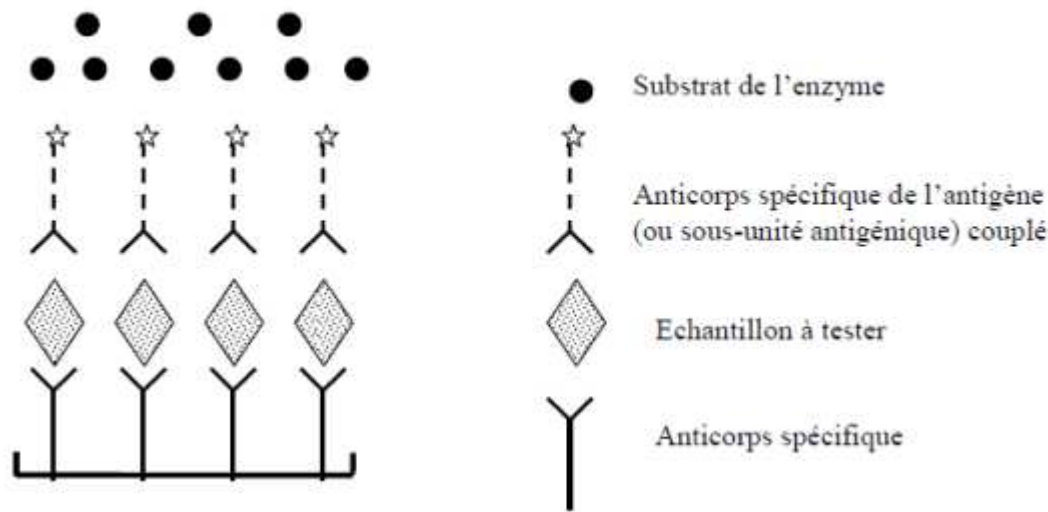


Figure 7 : Schématisation de l'ELISA antigène (Meyer, séminaire ENVT 2007)

La sensibilité de cette méthode est proche de celle de l'isolement viral, et est même plus efficace, en présence d'anticorps maternels mais le risque de faux négatifs sur les agneaux de moins de 2 mois persiste (OIE, 2008). C'est une méthode rapide, simple et peu onéreuse.

2.4.3.1.4. RT-PCR

La RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymérase Chain Reaction) consiste à mettre en évidence le matériel génétique du virus, à partir d'un prélèvement. Les prélèvements utilisables sont le sang total, le sérum, le plasma, le lait ou des organes. Après extraction de l'ARN, la reverse transcriptase permet l'obtention de l'ADN complémentaire (ADNc) qui va être amplifié.

Des kits commerciaux, utilisant deux ou trois couples d'amorces, sont disponibles pour détecter le génome des différentes souches de pestivirus. L'utilisation d'une sonde Taqman, spécifique de la souche, pour la révélation, permet d'éviter les réactions croisées entre les différentes espèces de pestivirus (Vilcek & Paton, 2000).

La RT-PCR est la méthode de mise en évidence du virus, la plus sensible y compris en présence d'anticorps d'origine maternelle. Cependant, en cas d'autolyse, l'ELISA antigène est plus performant mais la RT-PCR présente une sensibilité supérieure sur les prélèvements de sang. Parmi les organes, la détection sur les nœuds lymphatiques, les glandes thyroïdes et le rein est la plus sensible. Pour les prélèvements du système nerveux central, la RT-PCR sur le cervelet montre les meilleurs résultats (García-Pérez *et al.*, 2009b).

Cette technique est plus coûteuse et nécessite plus de matériel mais des analyses sur mélange de sang ou de lait sont possibles. Il faut, néanmoins, faire attention car la RT-PCR est sensible aux contaminations extérieures.

2.4.3.2. Détection des anticorps

2.4.3.2.1. Test de séroneutralisation

Le test de séroneutralisation est une méthode quantitative, permettant d'évaluer le titre d'anticorps neutralisants, du sérum.

Pour cela, différentes dilutions du sérum sont réalisées et chacune de ces dilutions est mise à incuber avec une suspension virale, de concentration connue. Ces solutions sont alors inoculées à des cultures cellulaires. En l'absence d'anticorps, le virus est 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. Le titre de neutralisation virale est exprimé par la dernière dilution, à laquelle le virus a été neutralisé dans 50 % des puits. Le titre en anticorps, du sérum testé, est, par la suite, obtenu grâce à la formule statistique de Spearman-Kärber (OIE, 2008).

C'est une méthode de référence car sensible et spécifique, cependant, elle est longue (5 à 7 jours) et fastidieuse.

2.4.3.2.2. ELISA indirect

Cette technique consiste à déposer le sérum, sur un tapis d'antigènes, composés d'une protéine spécifique (NS2/3) ou de la totalité des protéines virales, dans le cas de la détection des anticorps totaux. Il existe un kit spécifique du BDV pour la détection des anticorps totaux. Les anticorps spécifiques de ce tapis se fixent aux antigènes présents au fond des puits. Ils sont, ensuite, révélés par des anti-globulines, spécifiques d'espèce, conjuguées à une peroxydase. Cette enzyme, en contact avec un substrat chromogène, émet un signal lumineux, mesuré par densité optique, qui est proportionnel à la quantité d'anticorps présents, dans l'échantillon (Figure 8).

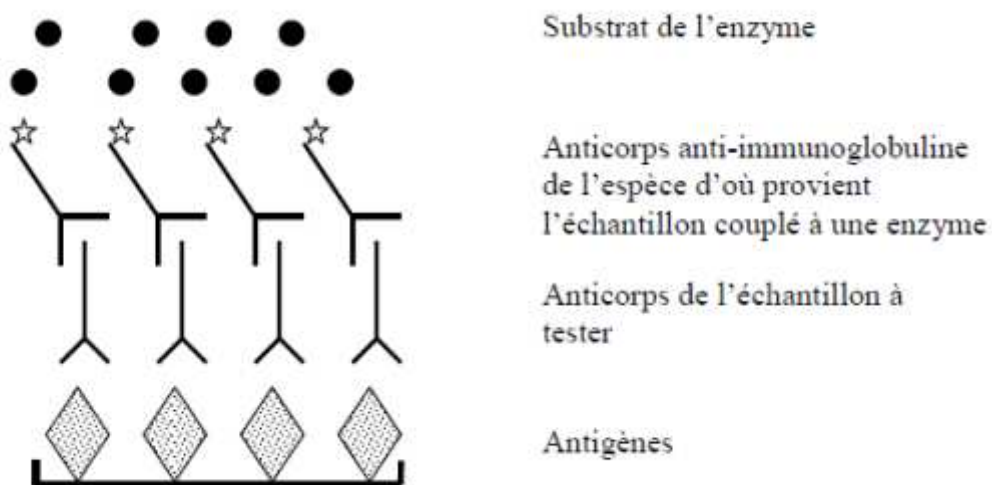


Figure 8 : Schématisation de l'ELISA indirecte (Meyer, séminaire ENVT 2007)

2.4.3.2.3. ELISA compétition

Dans l'ELISA compétition, les anticorps du sérum sont mis en compétition avec des anticorps anti-NS2/3 marqués à la peroxydase. Dans un premier temps, le sérum est déposé dans des puits, au fond desquels se trouve l'antigène NS2/3. Dans un second temps, les anticorps anti-NS2/3 sont déposés dans les puits. En l'absence d'anticorps dans le sérum, la peroxydase, en présence d'un substrat, émet un signal dont la densité optique est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents, dans l'échantillon (Figure 9).

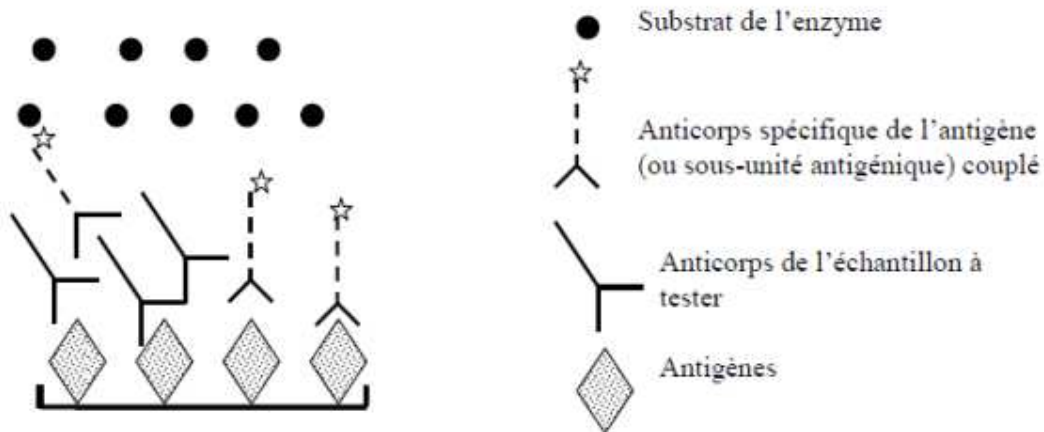


Figure 9 : Schématisation de l'ELISA compétition (Meyer, séminaire ENVT 2007)

Ces techniques ELISA sont rapides automatisables et peu coûteuses. Elles peuvent être réalisées sur sérum ou lait de mélange.

2.4.3.3. Utilisation pratique des résultats

Un animal virémique est un IPI s'il n'a pas produit d'anticorps, un mois après la détection du virus dans le sang.

Un animal non virémique n'est, généralement, ni infecté permanent, ni infecté transitoire donc non excréteur, mais il peut avoir été infecté antérieurement. Cependant, un infecté transitoire peut être non virémique en tout début d'infection et un IPI peut être non virémique si les anticorps d'origine maternelle (AOM) masquent la virémie.

Un animal séropositif est immunocompétent s'il est positif au test de séroneutralisation. La séropositivité est le témoin d'une infection, d'une vaccination ou de la présence d'AOM. Un individu IPI, généralement séronégatif, peut être séropositif s'il a ingéré des AOM ou s'il a été infecté par une autre souche de pestivirus. Dans le cas d'une coinfection, les anticorps produits seront dirigés contre la protéine E2 qui est variable entre les différentes souches.

Un animal séronégatif est soit un animal qui n'a pas été en contact avec le virus depuis plusieurs mois, soit un IPI, soit un infecté transitoire en cours de séroconversion.

3. MESURES DE LUTTE

Les mesures de lutte reposent sur deux objectifs essentiels : la prophylaxie sanitaire, qui vise à détecter et éliminer les IPI, et la prophylaxie vaccinale, qui a pour but d'éviter la contamination des brebis gestantes, notamment lors de la première moitié de la gestation, période de développement des IPI (Nettleton *et al.*, 1998). Globalement, les plans d'action et de maîtrise de la pestivirus ovine reposent sur le réseau de dépistage et les mesures de lutte qui incluent les mesures sanitaires (élimination des IPI et application de la biosécurité) et la vaccination.

3.1. Prophylaxie sanitaire

3.1.1. Contrôle à l'introduction de nouveaux animaux

Pour prévenir l'introduction du BDV dans un élevage, il est préférable de favoriser l'auto-renouvellement des brebis. Lors d'introduction dans un élevage ovin, les animaux introduits doivent subir une RT-PCR sur sang, pour éviter d'introduire un infecté transitoire ou un IPI. En effet, l'introduction d'animaux contaminés, dans un élevage indemne, au moment des gestations, peut entraîner une vague d'avortements ou la production d'animaux IPI. Dans le cas de l'introduction d'une brebis gravide, il est également nécessaire de réaliser une analyse sérologique pour s'assurer que la brebis n'a pas été infectée pendant sa gestation et ne va pas donner naissance à un IPI. Si les animaux introduits ont moins de six mois, il est préférable de les garder à l'écart du reste du troupeau, jusqu'à l'âge de six mois, et de les tester à nouveau, avant de les introduire dans le reste du cheptel. En effet, avant six mois, les anticorps d'origine maternelle peuvent masquer la présence du virus dans le sang des animaux. Lorsque l'animal est virémique, on peut différencier une infection transitoire d'une infection persistante en faisant une sérologie, un mois après la virologie. En présence d'anticorps, l'animal n'est pas un IPI.

3.1.2. Biosécurité

Il est aussi important de respecter quelques règles de biosécurité, entre les élevages. Il est nécessaire d'éviter les contacts entre les animaux, de cheptels ayant des statuts différents, lors des rassemblements d'animaux ou encore au niveau des séparations des pâtures voisines. La transhumance est l'une des périodes à risque, notamment lors de mélange de troupeaux de statuts différents, mais également par la promiscuité avec la faune sauvage ; les isards peuvent être porteurs du BDV-4 (Dubois *et al.*, 2008).

La transmission du virus étant possible entre les bovins et les ovins, il est conseillé, dans les élevages mixtes, d'éviter les contacts avec des bovins susceptibles d'être infectés par le BVDV, voire le BDV.

3.1.3. Détection et élimination des IPI

Lors d'une suspicion d'émergence de la maladie de la frontière, dans un élevage, il est primordial de détecter et d'éliminer les IPI qui sont la principale source de virus. Pour cela, il est possible, dans un premier temps, de réaliser des sérologies sur les adultes, afin d'identifier les animaux qui ont été en contact avec le virus. Les agneaux des brebis séropositives sont testés en RT-PCR, sur mélange de sang, et en sérologie. Les potentiels IPI, positifs en RT-PCR et séronégatifs, sont contrôlés, à nouveau 3 semaines après, pour les différencier des animaux infectés transitoires, en cours de séroconversion. Les animaux positifs, en RT-PCR, et séronégatifs, aux deux contrôles, sont euthanasiés ou envoyés à l'abattoir. Il faut, tout de même, faire attention aux introductions d'IPI adultes, récentes, qui n'ont pas permis la séroconversion des brebis.

Cependant, il faut être vigilant aux cas particuliers, décrits précédemment. En effet, la présence d'anticorps d'origine maternelle rend les IPI séropositifs et peut parfois masquer la présence du virus. De plus, certains IPI produisent un faible taux d'anticorps, au bout de plusieurs années de vie, qui peut également masquer la présence du virus.

3.2. Prophylaxie médicale : la vaccination

3.2.1. Vaccination chez les bovins

Dans un premier temps, les objectifs de la vaccination étaient de réduire l'apparition des signes cliniques, liés à la maladie, lors d'infection transitoire. Aujourd'hui, la vaccination a pour objectifs d'éviter l'apparition de formes cliniques, d'empêcher, ou à défaut de limiter, la naissance d'agneaux infectés permanents immunotolérants (IPI), en protégeant le fœtus contre une infection transplacentaire, et de réduire l'excrétion virale, consécutive aux infections transitoires ou permanentes.

Différents aspects de cette vaccination sont problématiques. Tout d'abord, la prévention de l'infection fœtale est primordiale puisque les IPI jouent un rôle majeur, dans la transmission de la maladie. Pour qu'un vaccin possède l'indication pour la protection fœtale, il faut qu'il assure une protection de 100% des veaux, contrairement aux autres indications qui consistent seulement à une réduction des signes cliniques et de l'excrétion. Tout veau vivant ou mort-né ou avorton, infecté, remet en cause cette protection. De plus, les essais pour être validés doivent avoir permis l'infection de 100% des fœtus, dans le groupe non vacciné.

La seconde problématique, de la vaccination des bovins contre le BVDV, réside dans la diversité des souches virales (cf 1.4.5.2). En effet, une partie de la réponse vaccinale repose sur la production d'anticorps neutralisants le virus. Or, la majorité des anticorps neutralisants, dirigés contre le BVDV, cible la glycoprotéine E2 qui est une protéine relativement variable d'un génotype à l'autre. La réussite vaccinale repose sur les similitudes entre les protéines E2 de la souche vaccinale et la souche infectieuse qui permettent une protection croisée.

Enfin, dans le cadre de la protection fœtale, il faut que la durée de l'immunité soit suffisamment longue pour pouvoir vacciner un lot, au même moment, sans se soucier des performances de reproduction qui suivent.

Le premier vaccin contre le BVDV, développé par (Coggins *et al.*, 1961), était un vaccin vivant modifié, dirigé contre la souche Oregon C24 cp. Depuis, de nombreux vaccins, inactivés ou vivants modifiés, contre les différentes souches de BVDV, ont vu le jour. En France, des vaccins, vivants modifiés et inactivés, sont disponibles, avec ou sans l'indication pour la protection contre l'infection transplacentaire. Trois vaccins possèdent cette indication : un vaccin inactivé (Bovilis-BVD®) et deux vaccins vivants modifiés (Bovela® et Mucosiffa®). Parmi ces vaccins, seul le vaccin Bovela® permet l'immunisation contre l'infection transplacentaire du fœtus par les virus BVDV-1 et BVDV-2, les autres ne protègent que contre les souches BVDV-1, selon les autorisations de mise sur le marché (AMM) (Tableau 4).

Tableau 4 : Vaccins disponibles en France

Nom déposé (Laboratoire)	Bovela® (Boehringer Ingelheim)	Mucosiffa® (CEVA)	Bovilis-BVD® (MSD Santé Animale)	Rispoval 3® (RS/PI3/BVD) (Zoetis)	Rispoval BVD® et RS-BVD® (Zoetis)
Type	Vivant modifié	Vivant modifié	Inactivé	Inactivé	Vivant modifié
Souche	BVDV-1 KE-9 ncp BVDV-2 NY-93 ncp	BVDV-1 Oregon C24 cp	BVDV-1 C86 cp	BVDV-1 5960 cp et 6309 ncp	BVDV-1 RIT 4350
Indication protection foetale	Oui	Oui	Oui	Non	Non
Contre-indications gestation	Non	Non	Non	Oui	Oui
Primo-vaccination	1 injection	- Bovins < 6 mois : 2 injections - Bovins ≥ 6 mois : 1 injection	2 injections	2 injections	2 injections
Rappel	Annuel	Annuel	Annuel	Bisannuel	Annuel

Les deux types de vaccins présentent des avantages et des inconvénients. Les vaccins inactivés sont globalement moins efficaces et moins rapides que les vaccins vivants modifiés et nécessitent ainsi deux injections de primo-vaccination. En effet, le virus inactivé ne se multiplie pas, il faut donc lui associer des adjuvants qui permettent d'augmenter la réponse humorale. L'absence de répllication virale est un avantage pour deux aspects. Elle permet une

innocuité satisfaisante ; les vaccins sont plus sûrs d'utilisation. La réponse immunitaire induite par le vaccin, ne permet pas la production d'anticorps dirigés contre la protéine NS2-3 qui est une protéine non structurale et non accessible en l'absence de réplication virale. Ce qui permet de différencier les individus vaccinés des individus infectés.

Les vaccins inactivés, plus efficaces, présentent, quant à eux, des soucis d'innocuité. Les vaccins, préparés à partir de sérum de veau fœtal, peuvent être accidentellement contaminés par le virus BVD. De plus, la réplication des virus chez les animaux gravides pose la question de l'innocuité pour le fœtus. Le vaccin Mucosiffa® était, dans un premier temps, déconseillé pendant la gestation. Des études ayant montré leur innocuité, les vaccins Mucosiffa® et Bovela® peuvent être utilisés à tout moment de la gestation. Enfin, les souches vaccinales cp, utilisées chez les veaux IPI, pourraient déclencher la maladie des muqueuses.

En pratique, le vaccin Bovela® semble le plus complet. Il permet l'immunisation contre les deux principaux génotypes de BVDV (BVDV-1 et BVDV-2) avec l'indication protection fœtale, en une injection annuelle et à tout moment de la gestation (Vandaele & Maillard, 2004).

3.2.2. Vaccination chez les ovins

Actuellement, il n'existe pas de vaccins avec AMM pour les ovins puisque qu'aucun vaccin, présent dans le commerce, ne possède de souches de BDV et d'indication contre ce virus. Cependant, dans le cadre de la cascade, les vaccins, avec AMM pour les bovins, sont utilisés sur le terrain, principalement pour éviter l'infection transplacentaire et la naissance d'agneaux IPI mais aussi pour diminuer l'intensité des signes cliniques et l'excrétion liées à une infection transitoire.

Les vaccins utilisés sont les trois vaccins possédant l'indication contre l'infection transplacentaire (cf 2.3.1.). Les deux vaccins vivants modifiés (Mucosiffa® et Bovela®) posent des problèmes de détection sérologique puisqu'ils entraînent la production d'anticorps NS2-3, utilisée pour différencier les individus vaccinés des individus non vaccinés. Le vaccin inactivé Bovilis BVD n'induit théoriquement pas de production d'anticorps NS2-3 mais des données récentes de terrain laissent suggérer la présence d'anticorps NS2-3 chez une partie, non négligeable, des ovins vaccinés.

Le recours à un vaccin, destiné à une autre espèce, soulève plusieurs questions concernant la population cible à vacciner, la durée d'un plan vaccinal, la dose à utiliser et surtout l'efficacité des vaccins BVDV vis-à-vis des souches hétérologues de BDV. L'utilisation de ces vaccins chez les ovins n'a, en effet, pas fait, à l'heure actuelle, l'objet d'essais permettant de vérifier leur efficacité, après inoculation d'épreuve, que ce soit en termes de protection vis-à-vis d'une infection transitoire horizontale ou d'une infection fœtale. Seules, deux études indirectes sont disponibles. La première étude (Mondoly & Pouget, 1998) souligne l'effet positif d'un programme de vaccination (vaccin inactivé Bovilis BVD®) sur un troupeau de 1 400 ovins Lacaune quand il est combiné à un programme de dépistage/élimination des IPI et à l'absence d'introduction d'animaux d'origine extérieure. Dans la deuxième étude (Anne, 2012), des brebis ont été vaccinées deux fois, à trois semaines d'intervalle, avec le vaccin inactivé Bovilis BVD®, à demi ou quart de dose, ou une fois, avec le vaccin atténué Mucosiffa, à

demi-dose (Anne 2012). Ces animaux ont été suivis, sérologiquement, pendant six mois, pour évaluer la capacité des anticorps à neutraliser des souches du BDV, de génotypes différents (BDV3, BDV-6, BDV5), anciennes ou récemment isolées en Aveyron. L'utilisation du quart de la dose, avec le vaccin inactivé, s'est révélée insuffisante pour induire une réponse neutralisante, chez tous les moutons du groupe. Les deux vaccins, inactivé et atténué, utilisés à demi-dose, ont été capables d'induire, chez tous les moutons, des anticorps (entre 28 et 56 jours après vaccination) qui neutralisaient, avec la même efficacité, les trois souches de BDV3, BDV4 et BDV5. Toutefois, on observait une variabilité individuelle importante dans chaque groupe testé. De plus, la réponse neutralisante hétérologue (contre les souches de BDV) décroissait dès trois mois post-vaccination alors que la réponse homologue (contre une souche de BVDV) restait stable sur les six mois de l'étude, quel que soit le vaccin utilisé à demi-dose.

L'efficacité de ces vaccins, chez les ovins, n'a pas été démontrée, la durée de protection, si elle existe, est inconnue et les protocoles vaccinaux restent indéterminés. Sur le terrain, les vaccins sont utilisés à demi-dose, voire à quart de dose, pour des raisons économiques.

La vaccination naturelle, par l'introduction d'agneaux IPI, dans les cheptels de reproductrices, avant la mise à la reproduction, avait également été envisagée chez les ovins, à la fin des années 1990. Les faibles taux de séroconversion, au sein des troupeaux, avaient conduit à ne pas recommander ce type de protection (Berriatua *et al.*, 2004).

4. LE CAS DU BASSIN DE ROQUEFORT

4.1. Epidémiologie depuis 1988

Compte tenu de la sévérité de la crise de la « Petega ovina », en Aveyron, entre 1983 et 1986, responsable de mortalité et de morbidité importante y compris chez les adultes, un réseau d'épidémiologie à pestivirus, organisé par la FODSA (Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron) et les GDS du bassin de Roquefort (Aveyron, Tarn, Lozère, Hérault), a été mis en place, dès 1986, dans tous les élevages sélectionneurs et les cheptels fournisseurs d'agneaux d'engraissement. Le dépistage collectif avait pour objectif de repérer les cheptels infectés et de leur proposer un plan d'action et de gestion de la maladie. Il a aussi permis, aux engraisseurs d'agneaux, d'allouer les animaux, en fonction du statut de l'élevage d'origine, des agneaux, et ceci, afin de ne pas contaminer des animaux sains.

Entre 1988 et 2005, ce plan reposait sur des analyses sérologiques annuelles des cheptels sélectionneurs et des cheptels fournisseurs d'agneaux d'engraissement. Grâce à ce réseau et aux mesures de lutte, engagées en parallèle, le nombre de cheptels séropositifs a progressivement diminué, passant de 20% en 1998 à 4% en 2005.

En 2006, la filière a alors décidé d'alléger le système de surveillance avec des prélèvements (6 mélanges de 5 sérums par élevage) dans les élevages, par alternance tous les quatre ans (c'est-à-dire qu'un quart des cheptels est testé chaque année), sauf pour les cheptels sélectionneurs, les cheptels positifs à la prophylaxie de l'année précédente et certains cheptels à risque (liste fournie par les opérateurs commerciaux acheteurs d'agneaux d'engraissement). Entre 2006 et 2008, la prévalence est passée de 5,1% à 8%. Fin 2008, une reprise de la circulation du BDV, avec des incidences cliniques importantes, a été suspectée et confirmée début 2009.

Les acteurs de la filière ont alors consécutivement engagé différentes actions pour renforcer le dispositif de surveillance et relancer les mesures de gestion. Le dépistage sérologique a ainsi été étendu à la moitié des cheptels ovins de plus de 50 ovins (augmentant le nombre d'animaux testés à 9 mélanges de 5 sérums), tout en continuant de tester les cheptels positifs de l'année précédente et les cheptels sélectionneurs. En 2010, sur 1 723 cheptels testés (1 335 cheptels laitiers, 373 cheptels allaitants et 13 cheptels mixtes), la séroprévalence moyenne était de 9,3%, avec une différence significative entre cheptels laitiers (6% de séropositifs) et allaitants (22% de séropositifs) (Loubière, 2012). Les souches, isolées à partir d'agneaux potentiellement IPI, de 8 foyers identifiés, appartenaient aux BDV-3 et BDV-6 (Anne, 2012). Sur 1 200 cheptels testés à la fois en 2009 et en 2010, l'incidence moyenne était de 2,6% (2% dans les cheptels laitiers et 9% dans les cheptels allaitants). Entre 2009 et 2013, 13% des cheptels aveyronnais testés ont présenté, au moins une année, un résultat sérologique positif.

Par ailleurs, l'Aveyron a renforcé son dispositif de dépistage en validant, en 2009, un test de détection des anticorps anti-NS3 sur lait de grand mélange (Bernardin, 2011; Loubière, 2012) puis en l'intégrant en 2011 à son dispositif d'épidémiosurveillance.

Ce dépistage a permis le triage des agneaux, en fonction du statut sérologique du troupeau, au moment du départ vers les centres d'engraissement, pour organiser les tournées de ramassage et l'allotement.

4.2. Plan d'épidémiosurveillance actuel

4.2.1. Un double dépistage sérologique

Actuellement, le schéma de surveillance repose sur un double dépistage sérologique.

Un premier dépistage annuel, sur sérum, a lieu au cours des prophylaxies annuelles, dans tous les cheptels de plus de 50 brebis, dans les cheptels fournissant les engraisseurs et dans les cheptels sélectionneurs. Les prises de sang sont effectuées sur 35 animaux par cheptel (analysées en 7 mélanges de 5 sérums) qui sont des antenaises de 6-12 mois si le statut du cheptel est connu positif et des animaux prélevés aléatoirement dans les cheptels séronégatifs, idéalement avant la mise à la lutte (printemps, été).

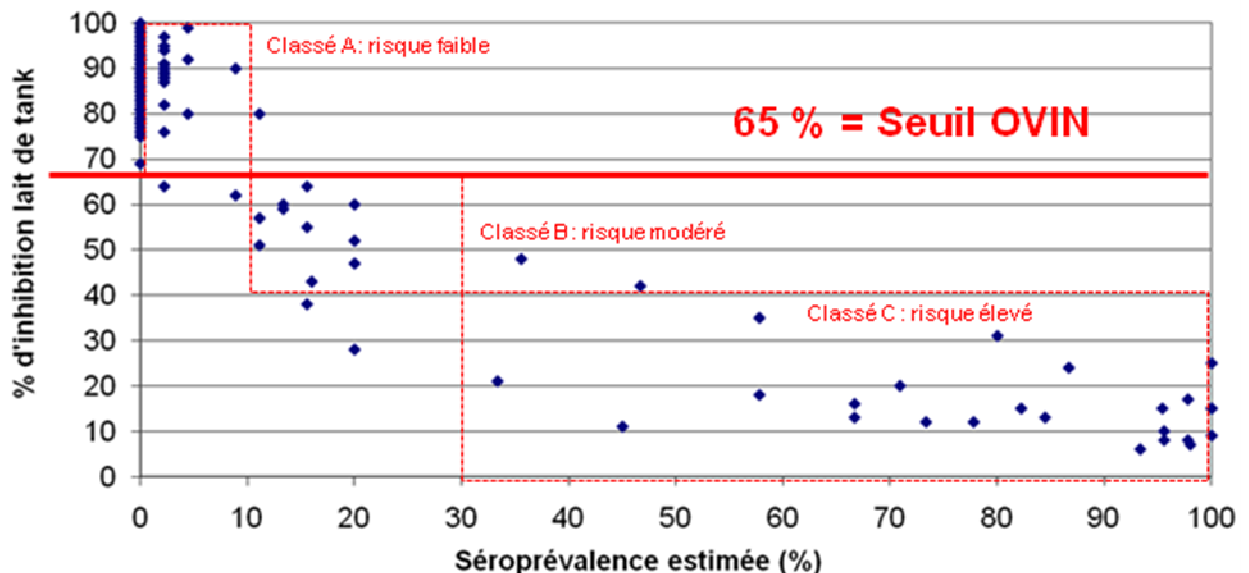


Figure 10 : Relation entre la séroprévalence estimée et le pourcentage d'inhibition sur lait de tank, n= 157 mesures (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016)

Un second dépistage sur lait de tank est réalisé en automne ou hiver, après la période de pâturage et avant le départ des agneaux vers les centres d'engraissement. Ce dépistage permet la gestion de l'engraissement, comme vu précédemment, mais également de choisir les élevages sélectionneurs (élevages séronégatifs exclusivement) et de prévoir la mise en place

d'un éventuel plan de vaccination dans les élevages avant la prochaine saison de lutte. Ce test permet de mettre en relation le pourcentage d'inhibition du lait de tank et la séroprévalence au sein de l'élevage.

Les élevages sont alors regroupés en 3 classes (Figure 10) :

- Classe A : risque faible ; prévalence estimée inférieure à 10%
- Classe B : risque modéré ; prévalence estimée entre 10% et 30%
- Classe C : risque élevé ; prévalence estimée supérieure à 30%

4.2.2. Résultats des sérologies sur sérum

En 2016, 1373 ateliers laitiers et 531 ateliers allaitants ont été testés pendant les prophylaxies annuelles.

On observe une diminution de la prévalence des élevages séropositifs de 9,1% en 2010 à 4,8% en 2016, et de l'incidence des élevages séropositifs de 2,9% en 2010 à 0,5% en 2016 (Figure 11). Ces diminutions pourraient être expliquées, d'une part, par la sensibilisation des éleveurs et la mise en place de mesures de lutte sur le terrain, et d'autre part, par des aspects incontrôlables liés à l'épidémiologie de la maladie.

De plus, on peut également noter que la prévalence dans les ateliers allaitants est nettement supérieure à celle dans les ateliers laitiers malgré une tendance à la diminution équivalente. En 2010, 21,7% des ateliers allaitants étaient séropositifs contre seulement 5,9% des ateliers laitiers. En 2016, 10% des ateliers allaitants étaient séropositifs contre seulement 2,8% des ateliers laitiers (Figure 12). Cette différence est à relier avec un nombre d'introduction souvent plus conséquent dans les élevages allaitants.

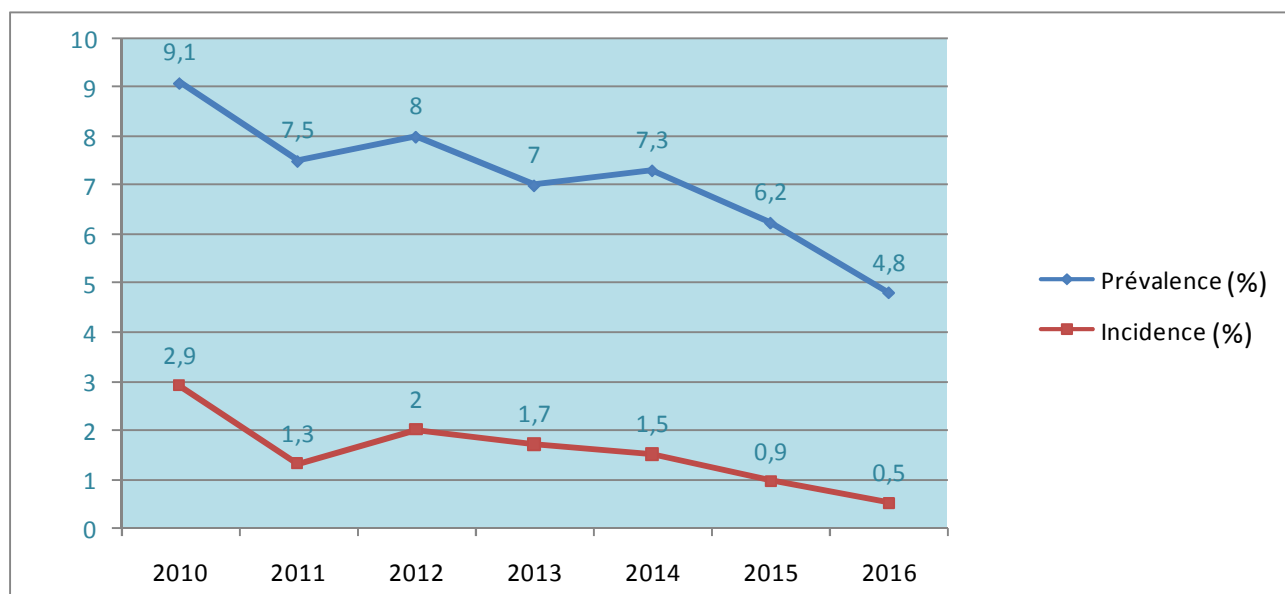


Figure 11 : Prévalences et incidences sérologiques du BDV sur les 7 dernières années, dans le bassin de Roquefort (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016)

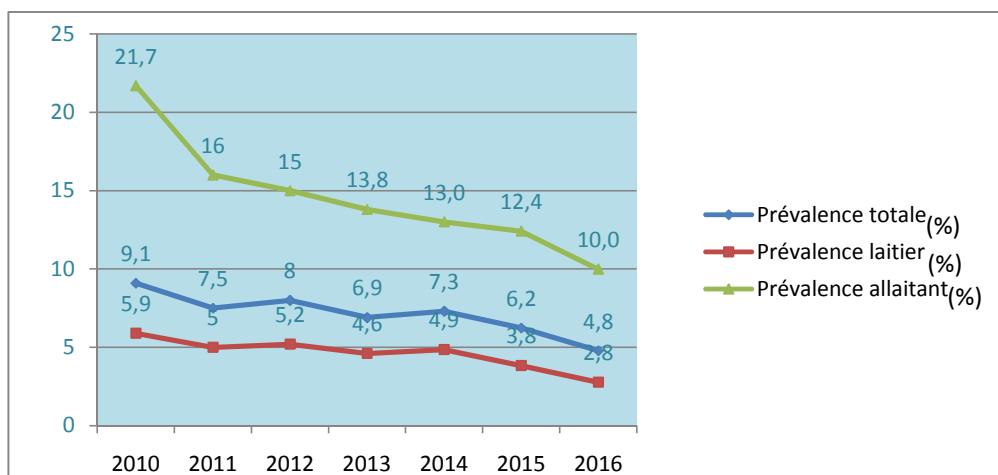


Figure 12 : Comparaison des séroprévalences du BDV en fonction de l’atelier sur les 7 dernières années, dans le bassin de Roquefort (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016)

4.2.3. Résultats des sérologies sur lait de tank

Depuis 2010, environ 50% des cheptels laitiers ont été dépistés (sur la campagne 2015/2016 44% des cheptels ont réalisé un prélèvement). On remarque que le nombre d’élevages classés B et C a fortement diminué depuis 2010 (Figure 13).

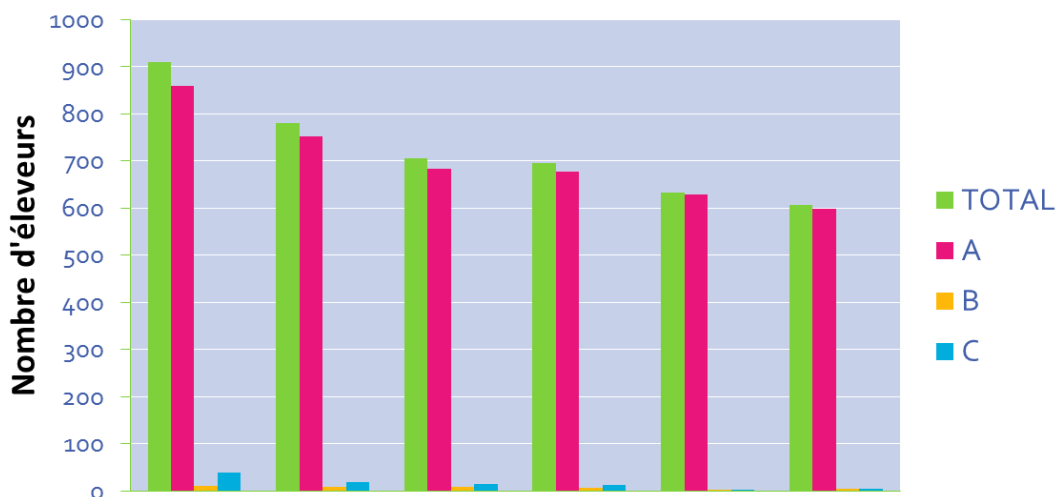


Figure 13 : Classification des élevages en fonction du dépistage sur lait lors des 6 dernières saisons, dans le bassin de Roquefort (FODSA-GDS 12, commission ovine du 13.12.2016)

4.3. Mesures de lutte

Parallèlement au dépistage, la FODSA propose des plans d’action et de maîtrise de la pestivirose ovine qui reposent sur la vaccination et l’application de mesures de biosécurité.

Des mesures de biosécurité sont systématiquement mises en place, souvent en complément de la vaccination, lors de plans de contrôle de la pestivirus. Elles visent à éviter l'introduction du virus dans les cheptels sains et la diffusion externe à partir des cheptels dits infectés (analyses sérologiques positives sur des animaux non vaccinés). Les contrôles à l'introduction ne sont absolument pas systématiques et se font à la demande de l'acheteur. Cependant, l'attribution de statut à chaque élevage, dans le bassin de Roquefort uniquement, permet aux acheteurs de se fournir dans des élevages indemnes. De plus, les sélectionneurs doivent détenir le statut indemne pour être considérés comme tels.

Dans les élevages séronégatifs, l'accent est mis sur la biosécurité à l'introduction d'ovins contaminés et sur le voisinage. Dans les élevages naisseurs-engraisseurs séronégatifs, l'accent est mis, en plus, sur la possibilité d'introduire la pestivirus lors de l'introduction d'agneaux de statuts inconnus dans les unités d'engraissement ; il est alors conseillé d'introduire des agneaux issus de cheptels naisseurs négatifs. Pour les élevages infectés, les mesures de biosécurité visent à empêcher la contamination (information des engraisseurs, des voisins, engraissement sur site, restriction des mouvements...).

En Aveyron, la détection/élimination précoce des IPI dans les élevages infectés n'est pas systématiquement réalisée alors que c'est une mesure phare des plans de contrôle BVD chez les bovins. Elle est seulement préconisée au cas par cas, en fonction de la situation épidémiologique, pour diminuer au plus vite l'incidence de la maladie au sein du troupeau. La raison en est essentiellement économique, du fait des coûts (pris en charge par la FODSA) du dépistage par RT-qPCR individuelle ou de mélange (gestion collective). De plus, les résultats sont souvent décevants. En effet, la détection des IPI est parfois difficile même par RT-PCR.

La vaccination est utilisée dans certains élevages atteints ou dans des élevages sélectionneurs, en préventif. Il est cependant difficile de savoir quelle part des cheptels utilise cette vaccination et quels protocoles de vaccination sont utilisés. De plus, la différenciation des individus séropositifs, suite à la vaccination ou suite à une infection, n'est pas toujours possible, y compris avec les vaccins inactivés.

La part d'amélioration attribuable à chacune de ces mesures est compliquée à mettre en évidence. D'autant plus que les variations d'incidence et de prévalence de la maladie pourraient simplement être attribuées à l'épidémiologie de la maladie.

Deuxième partie :
ETUDE EXPERIMENTALE

1. OBJECTIFS

La maladie de la frontière a été décrite pour la première fois, en France, en 1983, dans le bassin de Roquefort, sous le nom de Petega Ovina. Entraînant de la mortalité chez les brebis et les agneaux, cette épizootie incita l'instauration d'un réseau d'épidémiosurveillance, en 1986, organisé par la FODSA (Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron). Ce réseau a permis la diminution de la circulation virale jusqu'en 2009 où une reprise de la circulation du BDV avec des incidences cliniques sévères a été observée. Les mesures de lutte, alors mises en place, reposent sur un dépistage sérologique annuel voire bisannuel pour les élevages laitiers, des mesures de biosécurité, la détection et l'élimination des IPI ainsi que la vaccination avec des vaccins dirigés contre le BVDV, à AMM pour les bovins.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de la protection contre l'infection transplacentaire par le BDV, de trois vaccins du commerce, composés de souches de BVDV. Cette pratique vaccinale est couramment utilisée sur le terrain, dans les plans de contrôle de la maladie, pour procéder à l'élimination du virus, dans les élevages infectés, ou pour prévenir l'émergence de la maladie, dans les élevages indemnes. L'efficacité de cette vaccination chez les ovins n'a, à l'heure actuelle, pas été vérifiée, que ce soit pour protéger d'une infection horizontale ou d'une infection transplacentaire.

Nous avons, pour cela, vacciné des brebis mises, par la suite, à la reproduction, par insémination artificielle. Les vaccins utilisés sont trois vaccins commercialisés pour leur indication de protection fœtale, chez les bovins. Le protocole de vaccination était celui indiqué par le fabricant, à l'exception de la dose qui était divisée par deux pour correspondre aux posologies utilisées sur le terrain. Les brebis ont été inoculées avec une souche de BDV de génotype 6 (récemment isolée en Aveyron), à 52 jours de gestation, c'est-à-dire pendant la période critique de conception des agneaux IPI. Les brebis ont été suivies tout au long de l'expérimentation. Les statuts virologiques et sérologiques des fœtus ont été testés suite à l'autopsie des brebis gestantes. Des analyses morphologiques des fœtus ont également été réalisées.

Cette étude a été réalisée en partenariat avec la Fédération Régionale des Groupements de Défense Sanitaire (FRGDS) et plus particulièrement la Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron (FODSA).

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Cultures cellulaires

Les cultures cellulaires ont été réalisées à partir de cellules MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney cells, ATCC CCL22). Ces cellules rénales bovines, en lignée continue, ont été 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 (100 µg/mL). Pour l'entretien des cellules, on a ajouté du sérum de veau fœtal (FCS) à 10%, ne contenant pas d'anticorps anti-pestivirus, ni de pestivirus (vérification au laboratoire par ELISA et RT-PCR en temps réel). Pour les séroneutralisations, le FCS a été remplacé par du sérum de cheval (HS) à 5%.

2.2. Virus et titrage

Le choix de la souche virale utilisée pour l'inoculation épreuve repose sur les résultats obtenus lors de l'étude de Bethune M.A. (2015), durant laquelle un panel de 4 souches de génotypes différents de BDV et une souche de BVDV avaient été inoculées à des brebis gravides. La souche retenue est la souche BDV-6390 de génotype 6, isolée à l'ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) en 2010, à partir d'un agneau IPI, et dont l'inoculation, à des brebis gestantes de 52 jours, avait abouti à la naissance de 100% d'agneaux IPI.

La souche de BDV-6 a été conservée à -80°C après 6 passages en cellules MDBK. Juste avant inoculation, la solution virale a été diluée dans du milieu MEM + pénicilline-streptomycine pour avoir un titre final de 4.10⁴ DICC₅₀/mL (Dose Infectant 50% des Cultures Cellulaires). Suite à l'inoculation, un titrage viral de l'inoculum est réalisé par la technique de titrage en DICC₅₀ selon la formule de Spearman-Kärber. La souche utilisée étant non-cytopathique, la révélation a été réalisée par immunohistochimie.

L'immunohistochimie repose sur la fixation des cellules MDBK infectées, avec de l'acétone dilué au 9/10 (90% d'acétone pour 10% d'eau distillée) pendant 15 minutes. Un anticorps monoclonal spécifique des pestivirus de ruminants WB 103/105 (1/100^{ème}, réf RAE 0801 Veterinary Laboratories Agency, Weybridge UK), permet alors de révéler la présence d'antigène de BDV. Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les immunoglobulines de souris et marqué à la peroxydase de raifort (1/500^{ème}, réf P0260 Dako Cytomation Glostrup, Danemark) sert d'anticorps secondaire. Le complexe anticorps-antigène est alors révélé par un chromogène, l'aminéthylcarbazole (réf 101 AEC chromogène Kit Sigma St Louis, USA). En présence de virus, le cytoplasme des cellules se colore en brun rouge.

2.3. Vaccination et infection

2.3.1. Animaux

Les 52 brebis Lacaune, de réforme, provenaient de deux élevages aveyronnais dont les statuts virologique, et sérologique, vis-à-vis du BDV avaient été testés préalablement à l'expérimentation. En effet, des sérologies par ELISA NS2-3 (ID Screen BVD p80 Antibody One-Step® , ID Vet, Montpellier) et séroneutralisation du BVDV-1 sur des prélèvements de sang réalisés en élevage, avant vaccination, et des virologies par RT-PCR quantitative (test BVD Taqvet, pan pestivirus, Lsi, France) sur des prélèvements de sang réalisés en élevage, le jour de l'insémination artificielle (IA), se sont révélées négatives. Les brebis ont été inséminées le 12.08.2016 et confirmées gestantes, par échographie, le 20.09.2016 (39 jours après insémination) dans leurs élevages respectifs. L'un des élevages a fourni onze brebis vaccinées Bovilis® BVD et dix-neuf brebis non vaccinées et l'autre élevage a fourni onze brebis vaccinées Mucosiffa® et onze brebis vaccinées Bovela®. Les brebis sont arrivées le 21.09.2016, à l'ENVT, soit 12 jours avant l'inoculation, et ont été réparties en trois lots (Figure 14).

Deux lots de 17 brebis et un lot 18 brebis (Annexe 1) :

- Lot 1 : 11 brebis gestantes infectées et vaccinées Mucosiffa®, 6 brebis gestantes infectées non vaccinées
- Lot 2 : 11 brebis gestantes infectées et vaccinées Bovela®, 6 brebis gestantes infectées non vaccinées
- Lot 3 : 11 brebis gestantes infectées et vaccinées Bovilis® BVD, 7 brebis gestantes infectées non vaccinées

Chaque lot était logé dans une bergerie individuelle, de niveau expérimental A1, de l'ENVT, à partir de J-12 avant inoculation et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Les loges étaient physiquement séparées, empêchant tout contact avec un autre lot de la même espèce ou avec d'autres espèces de ruminants et de porcins.

Les bergeries étaient équipées de leur propre matériel (thermomètre, portes-tubes, tubes de prélèvements...) ainsi que de surchausses et de combinaisons portées lors de chaque intervention et changées entre chaque lot.

Les brebis étaient alimentées avec du foin à volonté et des concentrés (200 g/brebis/jour) et entretenues selon conditions réglementaires des normes de la Directive Européenne (2010/63/CEE).

Pour la suite de la thèse et pour la compréhension du rapport, l'ensemble des animaux sera divisé en 4 groupes : 3 groupes d'animaux vaccinés chacun avec un des 3 vaccins et un groupe rassemblant l'ensemble des animaux non vaccinés de chaque lot.

2.3.2. Vaccination expérimentale

Les vaccins testés sont des vaccins, utilisés chez les bovins, pour protéger contre le BVDV et notamment contre l'infection transplacentaire. Les vaccins (Tableau 5) sont utilisés selon le protocole vaccinal recommandé dans le cadre de l'AMM, pour l'espèce bovine, mais en utilisant une demi-dose vaccinale. Les vaccins ont été conservés entre +2 et +8°C et utilisés immédiatement après reconstitution. Les brebis vaccinées avec le vaccin inactivé Bovilis BVD® (MSD Santé Animale) ont reçu deux injections de 1 mL en intramusculaire, à 4 semaines d'intervalle, soit à 119 jours et 91 jours avant l'inoculation d'épreuve (J-119 et J-91). Le jour de la seconde injection (J-91), les brebis de deux lots, séparés physiquement, ont reçu une injection de 1 mL en intramusculaire, des vaccins Bovela® (Boehringer Ingelheim) ou Mucosiffa® (CEVA) dans le second élevage (Figure 14).

Tableau 5 : Caractéristiques des vaccins utilisés

Lot	Vaccins (Laboratoire)	Type	Souches	Nombre d'injection	Date conseillée	Dose
1	Mucosiffa® (CEVA)	Vivant modifié	BVDV-1 Oregon C24 cp	1 injection	au plus tard 1 mois avant l'IA	1 mL
2	Bovela® (Boehringer Ingelheim)	Vivant modifié	BVDV-1 K-9 ncp BVDV-2 NY-93 ncp	1 injection	au plus tard 3 semaines avant l'IA	1 mL
3	Bovilis® BVD (MSD Santé Animale)	Inactivé	BVDV-1 C86 cp	2 injections à 4 semaines d'intervalle	deuxième injection au plus tard 1 mois avant l'IA	1 mL

2.3.3. Infection expérimentale

Le protocole d'infection expérimentale a été validé par le comité d'éthique nationale, sous la référence n° APAFIS#6343—2016080817133467 v33.

Les brebis ont été inoculées le 03.10.2016 (J0) par voie intramusculaire dans l'encolure, à 52 jours de gestation, avec la souche BDV-6 6390 (Figure 14). Chaque brebis a reçu une charge virale de 2.10^5 DICC₅₀/brebis, soit une dose de 5 mL d'une solution virale à 4.10^4 DICC₅₀/mL.

Le virus a été titré juste après l'inoculation, pour vérifier la perte de pouvoir infectieux. Les résultats ont montré une perte de moins d'un Log (titre de 10^4 DICC₅₀/mL).

Un calendrier des prélèvements, pour le suivi virologique, hématologique et sérologique, est fourni en annexe (Annexe 2).

2.3.4. Autopsie

Les brebis ont été euthanasiées sur trois jours, environ deux mois après l'inoculation d'épreuve et à environ 110 jours de gestation. Les brebis du lot 1 (Mucosiffa®) ont été euthanasiées le 07.12.2016, soit 65 jours après inoculation. Celles du lot 2 (Bovela®) ont été euthanasiées le 08.12.2016, soit 66 jours après inoculation. Enfin, celles du lot 3 (Bovilis® BVD) ont été euthanasiées le 12.12.2016, soit 70 jours après inoculation (Figure 14). Dans le but de faciliter la compréhension de la suite de cette thèse, le jour de l'autopsie sera considéré comme J66 pour tous les lots.

Les autopsies étaient organisées en deux équipes : une équipe « sale » chargée de l'euthanasie, de l'extraction des fœtus et des prélèvements sur les brebis et une équipe « propre » chargée de la mesure, de l'autopsie et des prélèvements des fœtus.

Les brebis ont été euthanasiées par injection intraveineuse de 10 à 20 mL de T61® (embutramide, mébézonium et tétracaïne), après prélèvement sanguin de deux tubes secs et d'un tube EDTA. Elles étaient, par la suite, suspendues et saignées. Suite à l'ouverture de la cavité abdominale, le liquide amniotique des utérus et une portion de placenta étaient prélevés avant l'extraction des fœtus. Une fois les fœtus retirés, les prosecteurs prélevaient un échantillon de rate et de nœud lymphatique médiastinal, sur chaque brebis.

Les fœtus étaient, ensuite, transmis à l'équipe « propre » qui procédait rapidement, avant coagulation, au prélèvement en intracardiaque du sang fœtal, réparti dans un tube sec et un tube EDTA. La distance entre l'atlas et l'anus, entre la première vertèbre thoracique et l'anus ainsi que la longueur du radius et du tibia ont été mesurées à la règle graduée, sur chaque fœtus. Les éventuelles anomalies congénitales étaient relevées et prises en photo. Enfin, des échantillons de cerveau, thymus, foie, rein, rate, de nœud lymphatique préscapulaire et de cartilage auriculaire ont été prélevés sur chaque fœtus.

Chaque tissu prélevé était aliquoté en trois échantillons, deux conservés à -80°C pour des analyses virologiques et un dans du formol à 10% pour une éventuelle analyse histologique. Tous les échantillons prélevés n'ont pas été analysés dans cette étude.

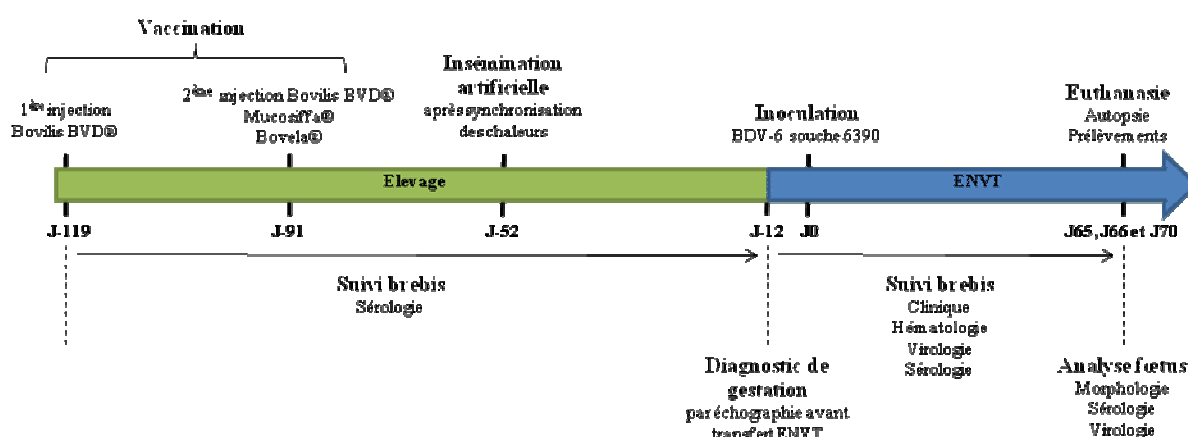


Figure 14 : Frise chronologique de l'expérimentation

2.4. Suivi expérimental

2.4.1. Suivi clinique

Un examen clinique complet a été réalisé quotidiennement, pendant les 14 jours suivant l'inoculation. Il consistait en l'observation de l'état général de la brebis (respiration, appétit, selles...), une prise de température rectale et la vérification de l'absence de signe d'avortement (avortons sur le sol, présence de matières fœtales ou de souillures à la vulve, efforts expulsifs des brebis...). Par la suite, une surveillance quotidienne (observation uniquement) a été réalisée jusqu'à la fin de l'expérimentation, notamment afin de détecter d'éventuels signes d'avortements.

2.4.2. Suivi hématologique

Un suivi hématologique a été réalisé sur 7 brebis vaccinées et 3 brebis non vaccinées dans chaque lot. Des prélèvements de sang sur tubes EDTA ont été effectués à J-3, de J-1 à J4, de J6 à J8, J10, J11 et J14. Le jour de l'inoculation (J0), les prélèvements ont été faits avant l'inoculation (Annexe 2). La numération des cellules sanguines a été réalisée sur un automate (*Melet Schlæsing Laboratories*) calibré pour les ovins, au laboratoire d'analyses biologiques de l'ENVT. Des comptages en leucocytes, lymphocytes, monocytes et thrombocytes ont été réalisés.

Pour chaque animal et pour chaque population de cellules, une ligne de base est calculée comme la moyenne des données obtenues sur les 3 mesures qui précèdent l'inoculation virale (J-3, J-1 et J0). Pour chaque population de cellules, les données individuelles ont été transformées en pourcentage de chaque population cellulaire ramené à la ligne de base ($(X/\text{ligne de base})/100$) puis les analyses statistiques ont été effectuées sur les données transformées.

2.4.3. Suivi sérologique

Un suivi sérologique des brebis a également été effectué avec des prélèvements sur tubes secs, réalisés lors de chaque vaccination (J-119 et J-91), suite à la vaccination sur le terrain (J-77, J-70, J-61, J-52, J-31), à l'arrivée à l'ENVT (J-12), puis toutes les semaines entre J0 et J42, à J56 et le jour de l'autopsie (Annexe 2). Des prélèvements de sang intracardiaque sur tubes secs ont également été réalisés sur les fœtus, le jour des autopsies.

Les tubes secs étaient laissés 24h à l'étuve à 20°C puis centrifugés le lendemain pour récupérer le sérum. Le sérum était aliquoté dans deux eppendorfs, conservés à -20°C.

ELISA anticorps NS2-3

Des tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ont été réalisés pour suivre la réponse en anticorps NS2-3 chez les brebis et pour évaluer la réponse immunitaire des fœtus. La réponse a été testée à l'aide d'un ELISA de compétition avec le kit ID Screen BVD p80

Antibody One-Step® (ID Vet, Montpellier). Ce kit destiné à la mise en évidence d'anticorps, spécifiques de la protéine NS2-3 (p80-125) du BVDV, dans le sérum, peut également être utilisé pour la mise en évidence d'anticorps spécifiques de la protéine NS2-3 du BDV en raison de la forte conservation de cette protéine. Le kit consiste à mettre en place une compétition entre les anticorps spécifiques de la protéine NS2-3 placés au fond des cupules du kit et les anticorps présents dans l'échantillon en présence de l'antigène NS2-3 couplé à une peroxydase. En présence d'anticorps, spécifiques de la protéine NS2-3, dans l'échantillon, l'antigène se fixe préférentiellement aux anticorps de l'échantillon et les complexes antigène-anticorps sont éliminés suite aux lavages. En l'absence d'anticorps spécifiques de la protéine NS2-3 dans l'échantillon, l'antigène se fixe aux anticorps présents au fond des cupules et les complexes antigène-anticorps ne sont pas éliminés au cours des lavages. La peroxydase entraîne une coloration en présence du substrat qui permet la lecture de l'échantillon (Annexe 3).

Séroneutralisations

Les tests de séroneutralisation ont été réalisés pour détecter la présence d'anticorps neutralisants, dans le sérum des brebis. Ils ont été effectués sur les sérums des brebis, prélevés avant la vaccination (J-91), le jour de l'inoculation d'épreuve (J0), soit 91 jours après la vaccination, et le jour de l'autopsie, soit environ 66 jours après l'inoculation d'épreuve.

La technique utilisée était le test de séroneutralisation en microplaque à quantité de virus constante (Hamers *et al.*, 2002). Des dilutions de facteur 2, allant de 1/2 à 1/2048, des sérums ont été incubées 1 heure à 37°C, en présence de la souche virale, de manière à avoir au final entre 150 à 200 DIC₅₀ par puits (100 µL avec 50 µL de sérum dilué et 50 µL de suspension virale) de plaques à 96 puits. Les sérums sont ensuite déposés sur cellules MDBK confluentes à 95% (cellules MDBK, ATCCC CCL-22), en plaques 96 puits, pendant 2h à 37°C. Les puits sont vidés. Trois lavages en milieu MEM sont réalisés et les cellules sont ensuite incubées en milieu MEM base avec 5% de HS. Les plaques sont mises en étuve à 5% de CO₂, pour une incubation à 37°C pendant 4-5 jours. Les titres ont été évalués comme l'inverse de la dilution de sérum protégeant 50% des puits de cultures cellulaires. Ils sont exprimés en Log₂ ED₅₀/mL selon la méthode de Spearman-Kärber.

La souche cytopathique BVDV-1 NADL était utilisée pour tester la capacité des anticorps à neutraliser le BVDV. L'effet cytopathique de la souche utilisée permettait la lecture des puits de cellules infectées. Il est prévu de réaliser ces tests sur la souche BDV-6 6390, utilisée pour l'inoculation, afin de tester la capacité des anticorps à neutraliser cette souche de BDV. La souche BDV-6 6390 n'étant pas cytopathique, l'infection des cultures cellulaires sera validée par technique d'immunoperoxydase (IPMA) ou par détection de l'antigène NS2 dans les puits de cultures cellulaires.

2.4.4. Suivi virologique

Un suivi virologique des brebis a été effectué par RT-PCR en temps réel, sur sang prélevé dans un tube EDTA (Éthylène Diamine Tétracétique). Trois prélèvements ont été réalisés avant inoculation : le jour de l'insémination (J-52), à J-7 et le jour de l'inoculation (J0). Ensuite, l'infection a été suivie de J1 à J10 puis à J12 et J14 (Annexe 2). Des écouvillons nasaux ont été prélevés un jour sur deux entre J0 et J8 et conservés à -20°C, dans le but d'évaluer l'excrétion virale par RT-PCR, suite à l'inoculation d'épreuve, mais les analyses n'ont, à ce jour, pas été effectuées. Des RT-PCR ont également été effectuées sur les cerveaux et thymus des fœtus.

Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN, à partir du sang prélevé sur tube EDTA, a été réalisée, immédiatement après le prélèvement, au moyen du kit NucleoSpin RNA blood® (Macherey-Nagel) selon le mode opératoire recommandé (Annexe 4).

L'extraction d'ARN, à partir des tissus, a été effectuée à l'aide du kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen). Un échantillon de cerveau d'un avorton testé BDV positif (Ct de 18) par le Laboratoire Vétérinaire Départemental du Tarn-et-Garonne constituait le contrôle positif. Le témoin négatif d'extraction était de l'eau. Le protocole du kit (Annexe 5) a été légèrement modifié afin d'obtenir un échantillon plus homogène. Ainsi, 100 mg de tissus ont été ajoutés à 800 µL de tampon puis mélangés à 6000 g, pendant une minute. Ensuite, 350 µL de la solution mélangée étaient mélangés à 350 µL d'éthanol à 70% puis le mode opératoire recommandé était repris (étape 5).

RT-PCR

Les virologies, sur sang ou sur organe, ont été réalisées par RT-PCR en temps réel, à l'aide du kit ID Gene® BVD/BD Triplex, selon les recommandations du fabricant (Annexe 6). Ce kit permet d'amplifier une séquence cible du génome des virus BVDV et BDV. Il s'agit d'un système triplex qualitatif qui permet, pour chaque échantillon, l'amplification simultanée de l'ARN du virus, d'un témoin interne endogène et d'un témoin interne exogène. Les témoins ont été extraits de la même manière, ce qui permet d'évaluer l'efficacité de l'extraction et de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel du thermocycleur LC96®. L'interprétation des résultats est faite sur les valeurs de Cq de chaque échantillon.

Pour confirmer les résultats obtenus sur les fœtus, deux essais par RT-qPCR ont été réalisés. Les échantillons de cerveau et de thymus ont été envoyés au laboratoire IdVet pour des analyses indépendantes en utilisant deux cibles ARN différentes du BVDV (extraction et RT-qPCR indépendantes).

De plus, 40 ARN extraits des prélèvements de cerveau et de thymus ont été testés à nouveau avec le kit RT-qPCR LSI VetMax BVDV Screening® (Life Technologies) selon les

recommandations du fabricant (Annexe 7) et à l'aide thermocycleur LC96®. Le contrôle positif de la PCR était un échantillon de BDV-6 utilisé pour l'inoculation des brebis. Le contrôle négatif de la PCR était de l'eau. Les charges virales sont exprimées en nombre de copies (Log10) par mL pour les sangs et par 100 mg pour les tissus.

2.5. Statistiques

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

Pour les analyses de données sans cinétique (mesure des fœtus, PCR fœtus), une analyse de variance à un paramètre (one-way ANOVA) était utilisée avec une correction de Bonferroni (Bonferroni test between contrast), en considérant l'ensemble des groupes.

Une ANOVA à deux paramètres avec mesures répétées (two-way ANOVA) été utilisée pour les analyses cinétiques par groupe (Hématologie, PCR des brebis, températures et séroneutralisations). La correction de Bonferroni était appliquée quand les effets jours et paramètres étaient significatifs (significant among interactions), pour effectuer une comparaison des groupes sur chaque jour.

3. RESULTATS

3.1. Infection expérimentale et suivi des mères

3.1.1. Suivi clinique

Le suivi clinique n'a pas permis la mise en évidence de signes cliniques majeurs, chez les brebis, que ce soit suite à la vaccination ou suite à l'inoculation d'épreuve. Aucun signe d'abattement, ni de baisse d'état corporel ou de baisse de l'appétit n'a été observé, au cours de l'expérimentation.

La température rectale a été mesurée quotidiennement, sur toutes les brebis, durant les 14 jours suivants l'inoculation (Figure 15). Globalement, il n'y avait pas de différence significative entre les 4 groupes. Cependant, des différences ponctuelles peuvent être observées entre les différents groupes mais aucune tendance logique ne semble pouvoir en être extraite.

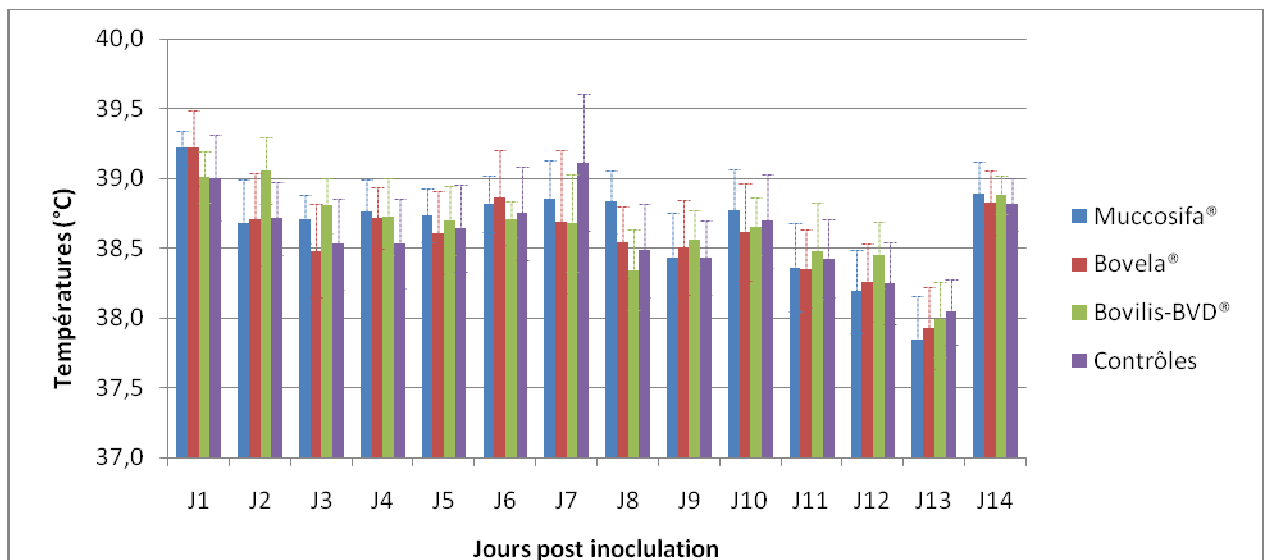


Figure 15 : Moyennes des températures rectales entre J1 et J14

3.1.2. Suivi hématologique

Les résultats du suivi hématologique 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 avant inoculation à J-3, J-1 et J0. 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. Un tableau des variations significatives par rapport au niveau de base est présenté en annexe (Annexe 9).

Leucocytes

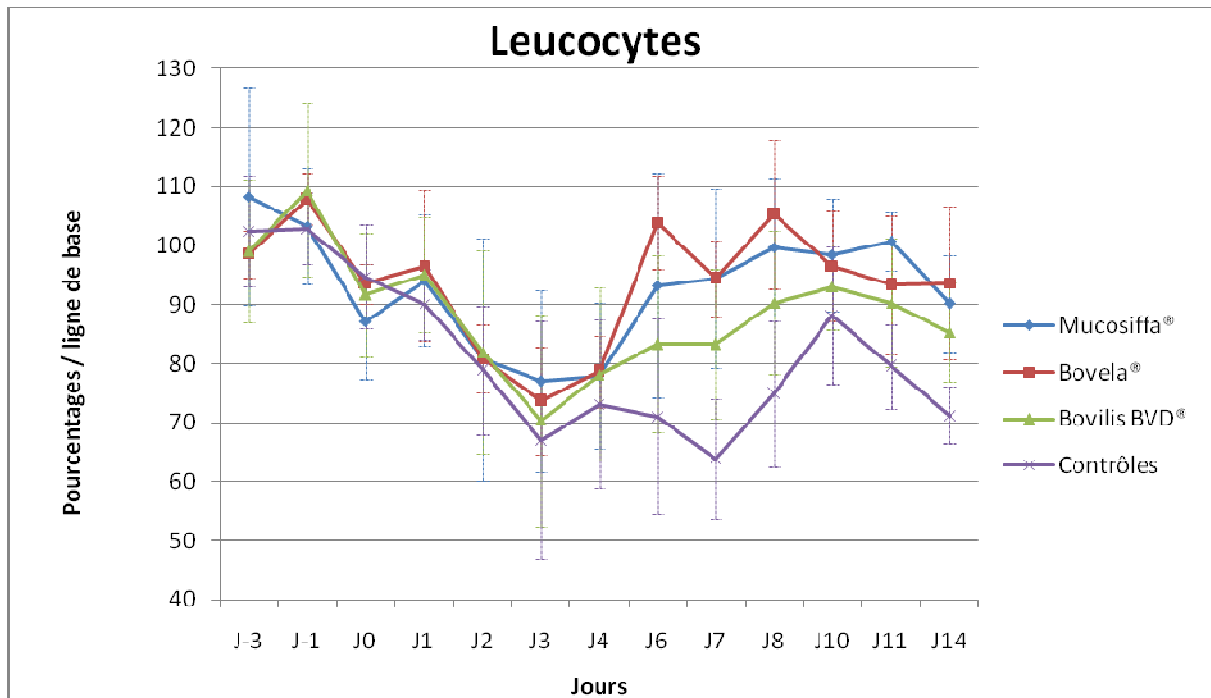


Figure 16 : Moyennes des pourcentages du nombre de leucocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de leucocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.

Tableau 6 : Analyses statistiques des pourcentages de leucocytes ramenés à une ligne de base (GraphPad (La Jolla, USA). ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$.

Jours	Mucosiffa® / Bovela®	Mucosiffa® / Bovilis BVD®	Mucosiffa® / Contrôles	Bovela® / Bovilis BVD®	Bovela® / Contrôles	Bovilis BVD® / Contrôles
J-3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J0	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J6	ns	ns	**	**	****	ns
J7	ns	ns	****	ns	****	**
J8	ns	ns	***	ns	****	ns
J10	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J11	ns	ns	**	ns	ns	ns
J14	ns	ns	**	ns	**	ns

Une leucopénie a été observée entre J2 et J4, pour l'ensemble des groupes, avec une diminution maximale variant entre 23 et 33% des leucocytes, à J3, selon les groupes. La leucopénie a persisté jusqu'à J14, avec une remontée à J10 dans le groupe contrôle. Dans les lots vaccinés Mucosiffa® et Bovela®, le nombre de leucocytes est rapidement remonté au

niveau de base à partir de J6. Dans le lot vacciné Bovilis BVD®, la remontée a été plus progressive pour atteindre le niveau de base à J8 (Figure 16).

A J3, au moment de la diminution du nombre de leucocytes la plus importante, aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes. Dans le groupe Mucosiffa®, le pourcentage de leucocytes est significativement plus élevé que dans le groupe contrôle, entre J6 et J14, excepté à J10. Dans le groupe Bovela®, les mêmes différences sont observées, excepté à J11. La seule différence significative entre le groupe vacciné Bovilis BVD® et le groupe contrôle se produit à J7 avec une diminution du pourcentage plus importante dans le groupe contrôle.

A J6, on peut remarquer un pourcentage significativement plus faible dans le groupe vacciné Bovilis BVD® que dans le groupe vacciné Bovela® (Tableau 6).

Lymphocytes

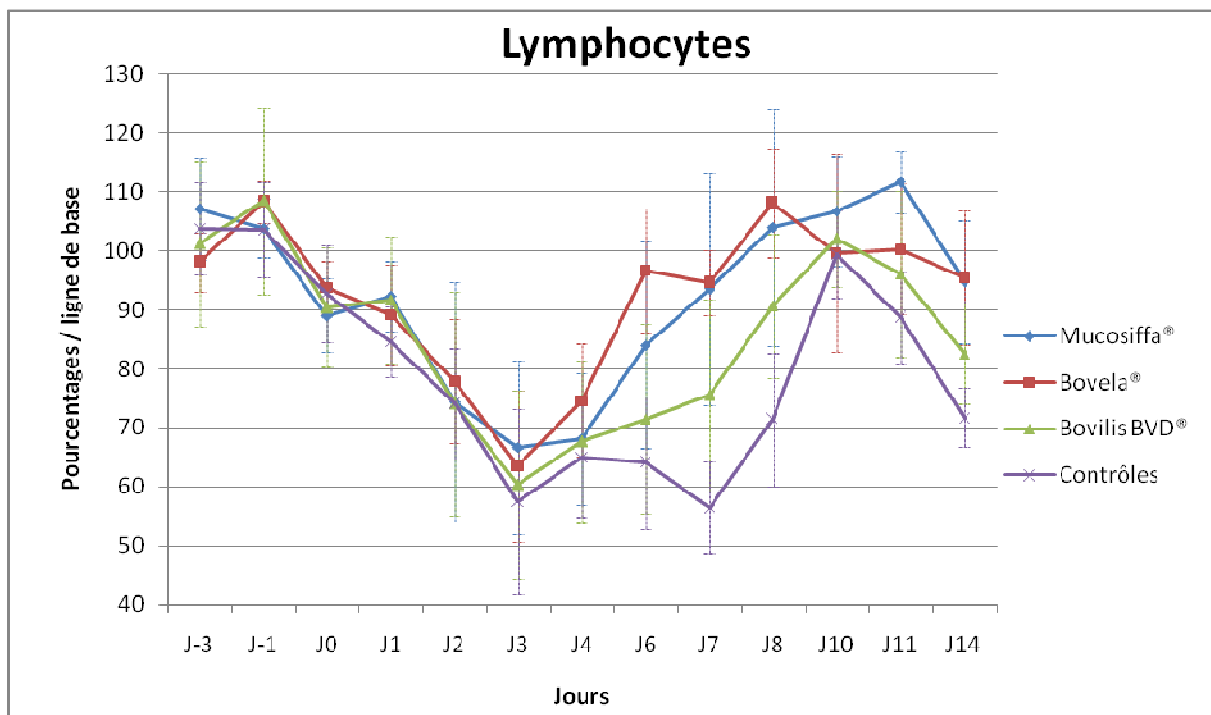


Figure 17 : Moyennes des pourcentages du nombre de lymphocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de lymphocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.

La leucopénie s'explique principalement par une lymphopénie significative entre J2 et J4 pour tous les groupes. La diminution moyenne, du nombre de lymphocytes, est la plus importante à J3 pour tous les groupes, avec des baisses de -32% à -43% par rapport aux niveaux de base. Là encore, la remontée de la population lymphocytaire est plus rapide dans les lots vaccinés Mucosiffa® et Bovela®, qui atteignent le niveau de base dès J6, alors que dans le groupe vacciné Bovilis BVD®, il faut attendre J8. Dans le groupe contrôle, la lymphopénie débute dès J1 et persiste, comme pour les leucocytes, jusqu'à J14 avec une exception à J10 (Figure 17).

Tableau 7 : Analyses statistiques des pourcentages de lymphocytes ramenés à une ligne de base (GraphPad (La Jolla, USA). ns : non significatif, * : p<0,05, ** : p<0,01, * : p<0,001, **** : p<0,0001.**

Jours	Mucosiffa® / Bovela®	Mucosiffa® / Bovilis BVD®	Mucosiffa® / Contrôles	Bovela® / Bovilis BVD®	Bovela® / Contrôles	Bovilis BVD® / Contrôles
J-3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J0	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J6	ns	ns	**	***	****	ns
J7	ns	*	****	*	****	**
J8	ns	ns	****	*	****	**
J10	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J11	ns	ns	***	ns	ns	ns
J14	ns	ns	***	ns	***	ns

On retrouve pour les lymphocytes, entre les groupes vaccinés et le groupe contrôle, des différences significatives de probabilités supérieures ou identiques, aux mêmes jours que pour les leucocytes. Entre le groupe vacciné Bovilis BVD® et le groupe contrôle s'ajoute une différence significative, non retrouvée pour les leucocytes, à J8.

Si on compare les vaccins, une différence significative est observée pour les lymphocytes, entre le vaccin Bovilis BVD® et le vaccin Bovela® entre J6 et J8. Dans le groupe vacciné Bovilis BVD, le pourcentage est significativement inférieur au groupe vacciné Mucosiffa à J7. Par ailleurs, aucune différence significative n'est observée entre les deux vaccins vivants atténués (Mucosiffa® et Bovela®) (Tableau 7).

Monocytes

On observe une augmentation du pourcentage de monocytes par rapport à la ligne de base entre J6 et J8 pour tous les groupes. Cette monocytose commence même à J4 pour le groupe vacciné Bovela® et s'étend jusqu'à J10 pour le groupe contrôle. Le pic de monocytose est d'environ 250% pour les 4 groupes mais les groupes vaccinés Mucosiffa® et Bovela® l'atteignent à J6 alors que les groupes vaccinés Bovilis BVD® et contrôle l'atteignent à J8 (Figure 18).

Les différences significatives sont présentées dans l'Annexe 10 et sont essentiellement présentes au moment des pics (J6 et J8) et à J10 où la monocytose est plus persistante pour le groupe contrôle.

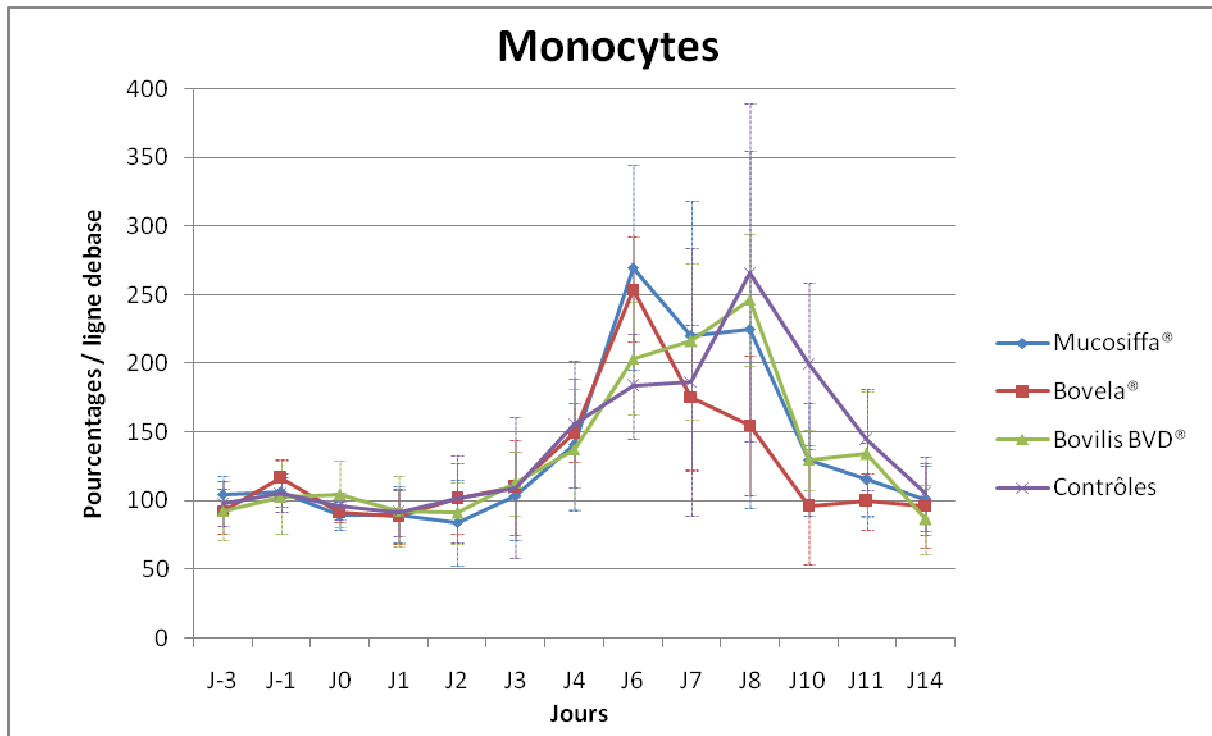


Figure 18 : Moyennes des pourcentages du nombre de monocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de monocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.

Thrombocytes

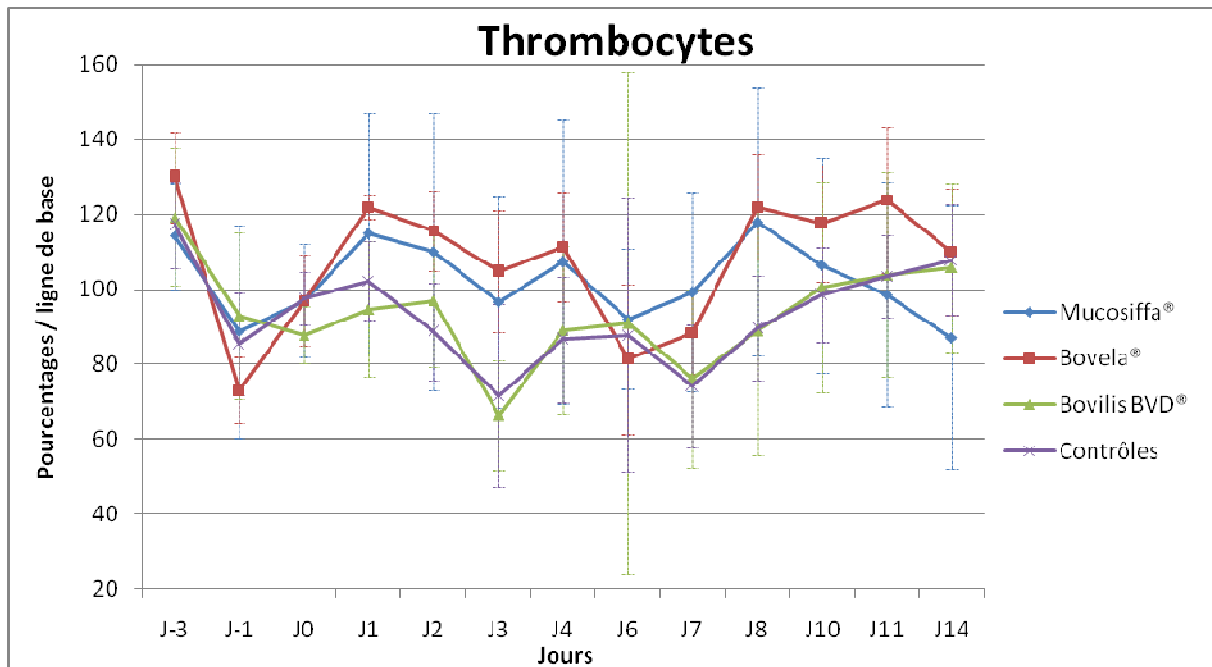


Figure 19 : Moyennes des pourcentages du nombre de thrombocytes par rapport à un référentiel constitué de la moyenne du nombre de thrombocytes à J-3, J-1 et J0 avant inoculation.

Les pourcentages des thrombocytes par rapport à la ligne de base sont très hétérogènes au sein des mêmes groupes. Il est assez difficile de conclure à une cinétique particulière car les trois moyennes utilisées, pour déterminer la ligne de base, sont elles aussi, assez hétérogènes. Une diminution significative est observée dans le groupe contrôle, à J3 et J7.

Il semble, néanmoins, possible d'extraire deux tendances de ces mesures. En effet, les pourcentages des groupes vaccinés Mucosiffa® et Bovela® suivent la même tendance et semblent globalement plus élevés que les pourcentages des deux autres groupes qui suivent eux aussi une tendance similaire (Figure 19). Ces différences sont significatives entre le groupe vacciné Bovela® et les groupes vaccinés Bovilis BVD® et contrôle, à J3 et J8 ($p < 0,05$).

3.1.3. Suivi sérologique

ELISA anticorps NS2-3

Le suivi sérologique a été réalisé avant et après inoculation, dans un premier temps, par recherche des anticorps dirigés contre la protéine NS2-3 (Annexe 2).

Avant la vaccination (J-91), les brebis étaient toutes séronégatives. Les brebis non vaccinées ainsi que les brebis vaccinées Bovilis BVD® sont restées séronégatives jusqu'à l'inoculation (J0). La séroconversion des brebis vaccinées, avec un vaccin vivant atténué, a respectivement été observée entre J-61 et J-12 (30 et 79 jours après la vaccination) et entre J-52 et J-12 (39 et 79 jours après la vaccination) pour les vaccins Mucosiffa® et Bovela®.

A J0, avant inoculation, 8 brebis étaient séropositives parmi les 11 brebis vaccinées Mucosiffa® et 7 brebis étaient séropositives parmi les 11 brebis vaccinées Bovela®, soit respectivement 73% et 64% de brebis séropositives. Les pourcentages de compétition étaient compris entre 8% et 38% (seuil de positivité < 40%). Parmi les 3 brebis non séropositives du lot vacciné Mucosiffa®, une brebis était douteuse à J0 mais séropositive à J-12. Les autres brebis non séropositives, des deux lots, étaient toutes séronégatives.

Après inoculation d'épreuve, les deux brebis séronégatives, du lot de brebis vaccinées Mucosiffa®, ont séroconverti entre J7 et J14 et la brebis douteuse a séroconverti entre J35 et J42. Les 4 brebis séronégatives, du lot de brebis vaccinées Bovela®, ont séroconverti entre J7 et J14. Dans le lot vacciné Bovilis BVD®, 7 brebis étaient séropositives à J14 puis 10 brebis à J35 mais une brebis est restée séronégative jusqu'à la fin de l'expérimentation. La séroconversion des brebis non vaccinées a eu lieu plus tardivement entre J14 et J42. A J42, 17 brebis sur 19 étaient séropositives et les deux autres brebis non séropositives ont été testées séropositives à J28 pour l'une et J35 pour l'autre (Tableau 8).

Tableau 8 : Pourcentage de brebis séropositives dans les différents lots en fonction du temps (nombre brebis/effectif)

Vaccin	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Mucosiffa®	73% (8/11)	73% (8/11)	91% (10/11)	91% (10/11)	91% (10/11)	91% (10/11)	100% (11/11)
Bovela®	64% (7/11)	64% (7/11)	100% (11/11)	91% (10/11)	82% (9/11)	100% (11/11)	91% (10/11)
Bovilis BVD®	0% (0/11)	18% (2/11)	64% (7/11)	73% (8/11)	82% (9/11)	91% (10/11)	82% (9/11)
Témoin	0% (0/19)	0% (0/19)	0% (0/19)	16% (3/19)	63% (12/19)	68% (13/19)	89% (17/19)

Les pourcentages de compétition permettent d'évaluer la réponse en anticorps mais ne reflètent pas un titrage réel de la quantité d'anticorps. A J0, les moyennes des pourcentages de compétition étaient de 36%, 44%, 92% et 103% respectivement pour les brebis vaccinées des lots 1, 2 et 3 et pour les contrôles. Le vaccin inactivé n'entraîne pas de séroconversion. A J42, les différences sont beaucoup moins importantes, les pourcentages sont respectivement de 16%, 15%, 24% et 28% (Figure 20).

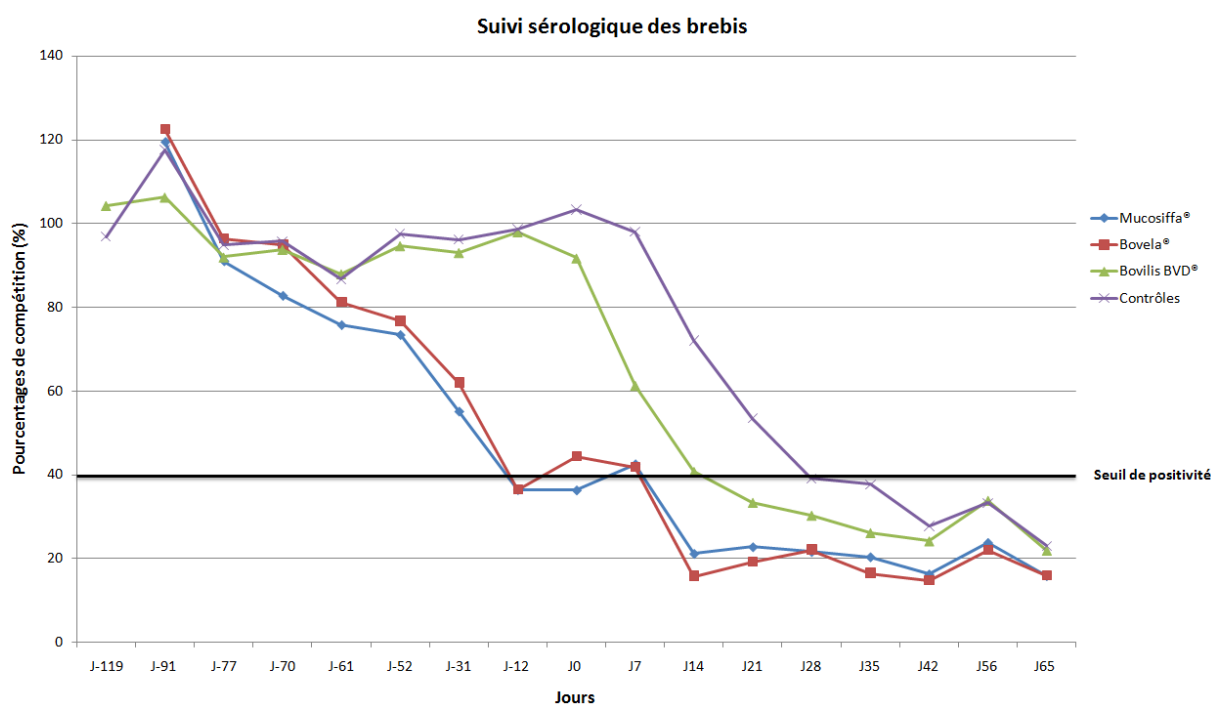


Figure 20 : Evolution du pourcentage de compétition au cours de l'expérimentation

Pour conclure, les vaccins vivants modifiés entraînent une séroconversion de plus de la moitié des brebis, 73% pour le Mucosiffa® et 64% pour le Bovela®, 91 jours après la vaccination. Le vaccin inactivé n'a pas permis la séroconversion des brebis mais induit une réponse immunitaire, dans la mesure où la séroconversion après inoculation d'épreuve est plus précoce que celle observée pour les brebis non vaccinées. On observe une séroconversion de

plus de la moitié des brebis à J14 (64%) pour les brebis vaccinées Bovilis BVD® et il faut attendre J28 pour les brebis non vaccinées (63%). Enfin, la réponse immunitaire est variable au sein d'un même groupe que ce soit du point de vue de la rapidité de la réponse ou de sa persistance. En effet, dans le lot vacciné Bovilis BVD®, une brebis est restée séronégative tout au long de l'expérimentation et 3 brebis ont eu un statut variable après la séroconversion. Dans les lots vaccinés Mucosiffa® et Bovela®, 2 brebis ont également un statut variable et dans le groupe témoin, 7 brebis sont apparues séronégatives par intermittence.

Séroneutralisations

Les séroneutralisations ont été réalisées avec la souche de BVDV-1 NADL cytopathique pour tester l'efficacité de la vaccination contre le BVDV. Seuls les sérums prélevés le jour de la vaccination (J-91), le jour de l'inoculation (J0) et le jour des autopsies (J65, J66 et J70) ont été testés. Les séroneutralisations avec la souche de l'inoculation d'épreuve (BDV-6 6390) doivent être effectuées pour tester la réponse neutralisante de la vaccination envers cette souche. Les résultats ne seront pas présentés dans cette thèse.

Le jour de la vaccination (J-91), toutes les brebis étaient séronégatives. Les 19 brebis non vaccinées sont restées séronégatives jusqu'à l'inoculation d'épreuve. Elles ont, par la suite, séroconverti pour atteindre un titre en anticorps neutralisants moyen de $9,4 \pm 1,4 \text{ Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{mL}$, à la fin de l'expérimentation.

Deux mois après la vaccination et avant l'inoculation d'épreuve (J0), les brebis vaccinées Mucosiffa®, Bovela® et Bovilis BVD® présentaient respectivement des titres moyens de $7,3 \pm 3,8$, de $7,8 \pm 1,5$ et de $6,1 \pm 3,3 \text{ Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{mL}$. Parmi les brebis vaccinées Mucosiffa® et Bovilis BVD®, 2 brebis sur 11 étaient négatives le jour de l'inoculation, ce qui explique les écart-types calculés pour ces deux groupes. Par ailleurs, dans les groupes vaccinés Bovela® et Bovilis BVD®, 2 brebis sur 11, dans chaque groupe, présentaient des titres en anticorps neutralisants très faibles, à la limite du seuil de détection. Les différences observées entre les différents vaccins étaient non significatives mais la différence avec le groupe contrôle était significative ($p < 0,0001$).

Le jour de l'autopsie, soit environ 66 jours après l'inoculation, les titres en anticorps neutralisants avaient significativement augmenté et étaient respectivement de $13,0 \pm 2,1$, de $13,5 \pm 0,9$ et de $13,3 \pm 0,9 \text{ Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{mL}$. Ces titres étaient significativement ($p < 0,0001$) supérieurs au titre moyen, de $9,4 \pm 1,4 \text{ Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{mL}$, des brebis non vaccinées. Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence dans les différents groupes de vaccin (Figure 21).

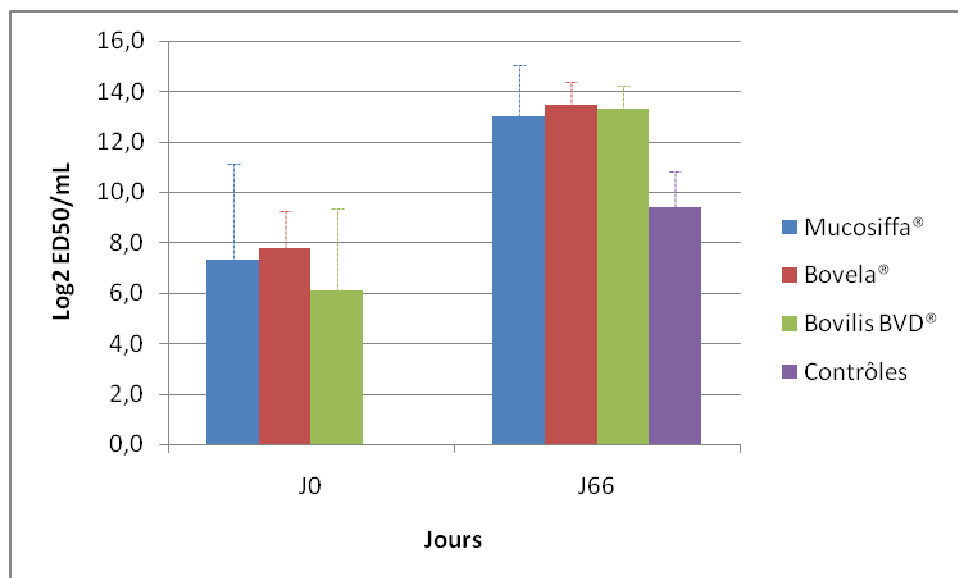


Figure 21 : Résultats de séroneutralisation en $\text{Log}_2 \text{ED}_{50}/\text{mL}$ à J0 et J66.

Les brebis séronégatives à J0, dans le groupe vacciné Mucosiffa®, ont séroconverti à J66 mais avec des titres similaires à ceux observés pour les brebis contrôle. Dans les groupes vaccinés Bovela® et Bovilis BVD®, les brebis séronégatives ou présentant un titre en anticorps très faible, à J0, ont séroconverti à des taux comparables à ceux de leur groupe (absence de différence significative) et significativement différents de ceux du groupe contrôle (respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,0001$).

Comparaison du test ELISA NS2-3 et du test de séroneutralisation

Les brebis vaccinées Mucosiffa®, séronégatives à J0, par ELISA NS2-3, l'étaient également en séroneutralisation.

A J0, deux brebis vaccinés Bovela®, séronégatives en ELISA, présentaient des taux d'anticorps neutralisants très faibles alors que deux autres brebis séronégatives (ELISA) possédaient des taux d'anticorps neutralisants corrects. A J66, toutes les brebis sont séropositives dans les deux tests.

Les brebis vaccinées Bovilis BVD® sont toutes séronégatives en ELISA NS2-3, à J0, alors que 82% (9/11) des brebis sont positives en séroneutralisation, le même jour. A J66, la brebis, n'ayant jamais séroconverti en ELISA, est positive en séroneutralisation. Toutes les autres brebis sont séropositives dans les deux tests.

Les résultats sont comparables, pour les deux tests, dans le groupe contrôle.

3.1.4. Suivi virologique par RT-PCR

Sept jours avant l'inoculation et à J0, toutes les brebis étaient négatives en RT-PCR. La virémie a été suivie chez les brebis, après infection expérimentale par RT-qPCR. Le BDV-6 6390 a pu être détecté dans le sang, des brebis des 4 lots, sur respectivement 9, 8, 11 et 18 brebis des groupes Mucosiffa, Bovela, Bovilis et contrôle. La détection était fugace (entre 1 et

2 jours par brebis), quel que soit le groupe, entre J3 et J9 et avec des Ct entre 21,5 et 36,8. Compte tenu de la grande disparité des résultats, il ne se dégage pas de différences majeures entre les différents lots. Les analyses PCR sont en cours de revalidation pour confirmer ces résultats.

3.2. Suivi de l'infection fœtale

3.2.1. Suivi des avortements

Aucun avortement n'a été observé au cours de l'expérimentation. Cependant, les autopsies ont révélé la présence d'une brebis non gravide (L2-182) parmi les brebis non vaccinées qui étaient présentes dans le lot 2 (Bovela®). La présence d'annexes fœtales dans l'utérus de la brebis confirme l'avortement, dans les jours précédents l'autopsie. Cette brebis n'étant pas vaccinée, ce résultat n'a pas d'influence sur l'évaluation de la protection fœtale par les vaccins. Des analyses à partir des annexes fœtales prélevées pourront être réalisées pour tester les principaux agents responsables des avortements chez les ovins par PCR (*Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila abortus*, *Brucella abortus*, *Salmonella abortus*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* et bien sûr le BDV).

3.2.2. Analyse des fœtus

Les autopsies ont été réalisées respectivement à 65, 66 et 70 jours de gestation dans les lots 1 (Mucosiffa®), 2 (Bovela®) et 3 (Bovilis BVD®). Elles ont permis l'extraction de 104 fœtus, avec entre 1 et 4 fœtus par brebis. Les brebis vaccinées Mucosiffa®, Bovela® et Bovilis BVD® ont respectivement produit 20, 22 et 21 fœtus pour une prolificité moyenne de 1,8, 2,0 et 1,9. Les brebis non vaccinées, de tous les lots, ont produit 41 fœtus pour une prolificité de 2,3 (Tableau 9). Aucune différence significative de prolificité n'a été mise en évidence entre les différents groupes.

Viabilité et malformations

La majorité des fœtus étaient vivants, sauf deux fœtus vaccinés Bovilis BVD® retrouvés morts. L'un des fœtus pesait 0,62 kg et avait un jumeau vivant de 1,69 kg. L'autre fœtus pesait 1,11 kg et était issu d'une gestation simple.

Un seul fœtus malformé a été observé sur une brebis vaccinée Bovela® (brebis n°139). Le fœtus était vivant et présentait une atrophie cérébrale avec des circonvolutions peu développées, non retrouvée chez son jumeau (Figure 22).

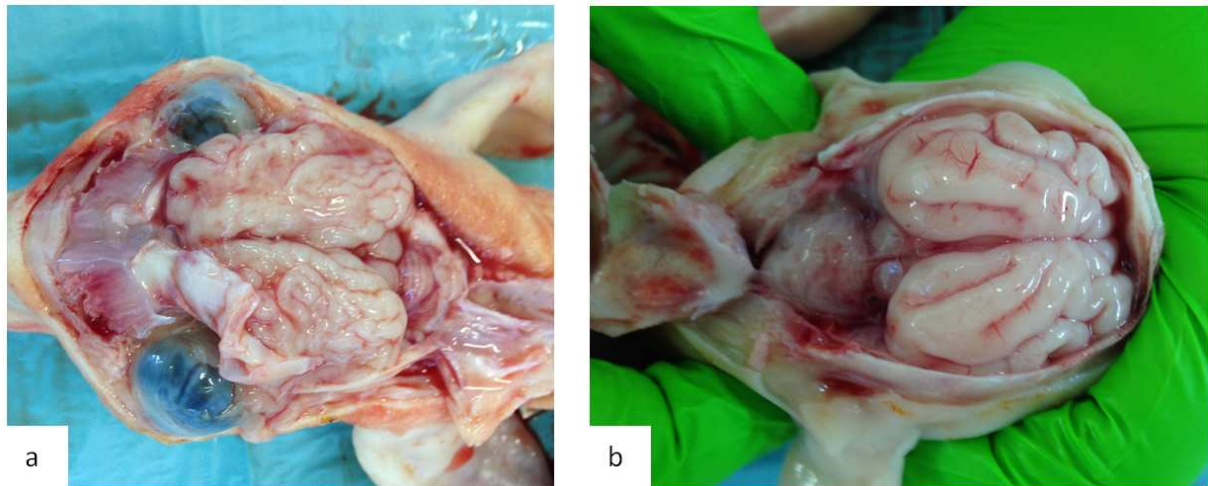


Figure 22 : (a) Atrophie cérébrale observée chez un fœtus issu d'une mère vaccinée avec le vaccin Bovela®, (b) Cerveau normal de fœtus (photographies personnelles)

Poids et longueurs

Les fœtus ont été pesés et les longueurs atlas - anus, première vertèbre thoracique (VT1) - anus, du radius et du tibia ont été mesurées. Les deux fœtus morts n'ont pas été pris en compte dans les mesures suivantes.

Les poids moyens des fœtus étaient respectivement 1,49 +/- 0,23 kg, 1,64 +/- 0,3 kg, 1,72 +/- 0,23 kg et 1,60 +/- 0,26 kg pour les groupes vaccinés Mucosiffa®, Bovela® et Bovilis BVD et le groupe contrôle (Tableau 9). On peut remarquer que les poids sont assez homogènes dans chaque groupe. Aucune différence significative de poids n'a été observée entre les différents groupes.

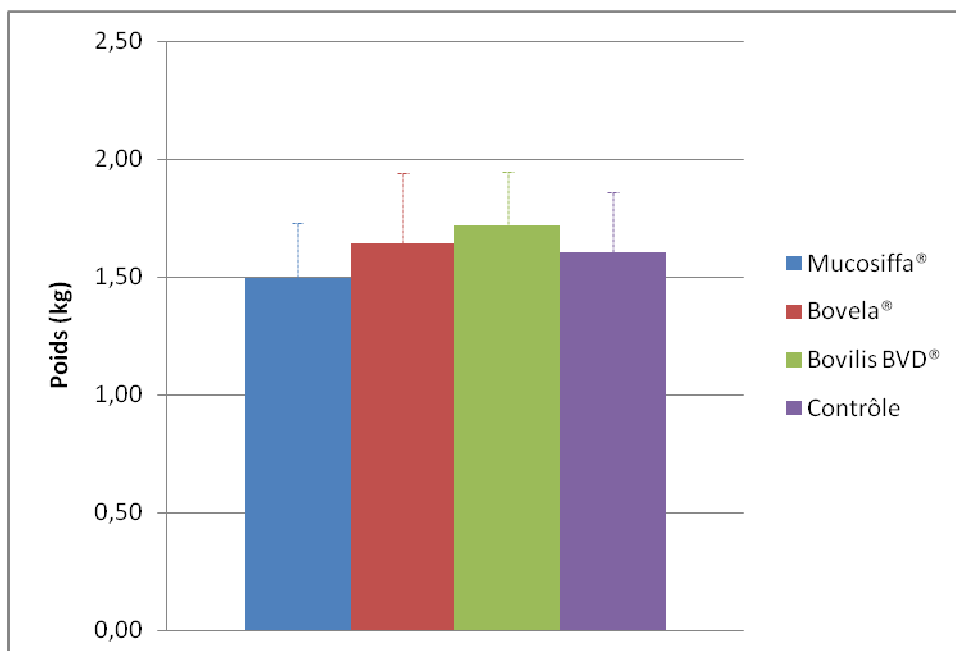


Figure 23 : Poids moyens et écart-types des fœtus dans les différents groupes.

Les moyennes et écart-types des longueurs sont donnés dans le Tableau 9. Là encore, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents groupes (Figure 24).

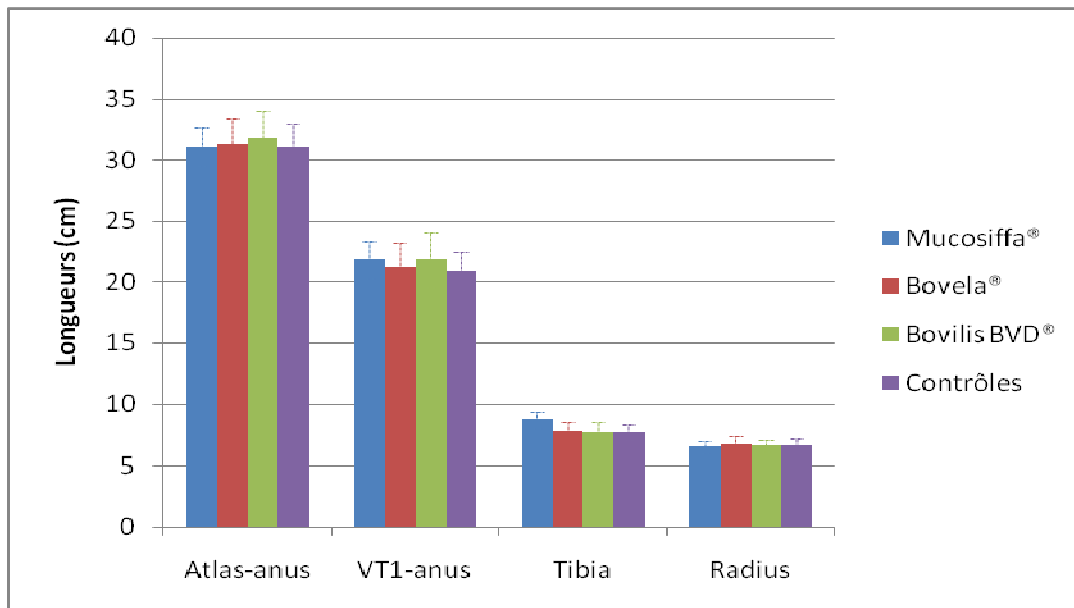


Figure 24 : Longueurs moyennes et écart-types des fœtus pour les longueurs atlas - anus, première vertèbre thoracique (VT1) - anus, du radius et du tibia dans les différents groupes.

Tableau 9 : Prolifictés et moyennes (+/- écart-type) des poids (en kg) et des longueurs (en cm) atlas - anus, première vertèbre thoracique (VT1) - anus, du radius et du tibia dans les différents groupes.

Groupe	Prolificté	Poids (kg)	Atlas-anus (cm)	VT1-anus (cm)	Tibia (cm)	Radius (cm)
Mucosiffa®	1,8	1,49 +/- 0,23	31,1 +/- 1,6	21,8 +/- 1,5	8,7 +/- 0,7	6,5 +/- 0,5
Bovela®	2	1,64 +/- 0,3	31,3 +/- 2,1	21,2 +/- 2,0	7,8 +/- 0,7	6,7 +/- 0,7
Bovilis BVD®	1,9	1,72 +/- 0,23	31,8 +/- 2,2	21,8 +/- 2,3	7,7 +/- 0,8	6,6 +/- 0,5
Contrôles	2,3	1,6 +/- 0,26	31,1 +/- 1,9	20,9 +/- 1,6	7,7 +/- 0,6	6,6 +/- 0,6

Le fœtus malformé présentait des valeurs toujours dans les valeurs basses avec un poids de 1,08 kg, une longueur atlas –anus de 29,5 cm, une longueur atlas – VT1 de 19 cm, une longueur de tibia de 7,5 cm et une longueur de radius de 6 cm.

3.2.3. Sérologie des fœtus

Les sérologies réalisées sur le sang des fœtus, prélevé en intra cardiaque, ont montré que tous les fœtus étaient séronégatifs (pourcentage de compétition compris entre 75% et 179%) à l'exception d'un fœtus issu d'une mère vaccinée Bovela® (brebis n°139). Le fœtus présentait un pourcentage de compétition de 37% (seuil de positivité < 40%) alors que son jumeau était séronégatif (94%). Il s'agit du même fœtus qui présentait l'atrophie cérébrale.

3.2.4. Virologie des fœtus

Les RT-qPCR, réalisées sur un échantillon de cerveau et un échantillon de thymus, pour chaque fœtus, ont montré que tous les fœtus séronégatifs étaient viropositifs au BVDV ou au BDV, pour les deux échantillons. Le fœtus séropositif était lui négatif en RT-qPCR dans les deux échantillons. Tous les contrôles négatifs d'extraction et de RT-qPCR étaient bien négatifs. Les Ct des échantillons positifs étaient compris entre 22,5 et 30,6.

Les charges virales moyennes dans le cerveau étaient respectivement de 3,9 +/- 0,3 Log₁₀, 4,1 +/- 0,4 Log₁₀, 4,4 +/- 0,5 Log₁₀ et 4,1 +/- 0,4 Log₁₀ copies d'ARN pour 100mg pour les groupes vaccinés Mucosiffa®, Bovela®, Bovilis BVD® et contrôle. Dans le thymus, les charges étaient plus faibles avec respectivement de 3,8 +/- 0,4 Log₁₀, 3,5 +/- 0,4 Log₁₀, 3,1 +/- 0,6 Log₁₀ et 3,3 +/- 0,5 Log₁₀ copies d'ARN pour 100mg pour les groupes vaccinés Mucosiffa®, Bovela®, Bovilis BVD® et contrôle (Figure 25).

Aucune différence significative de charges virales concernant les différents groupes n'a été observée pour les deux organes.

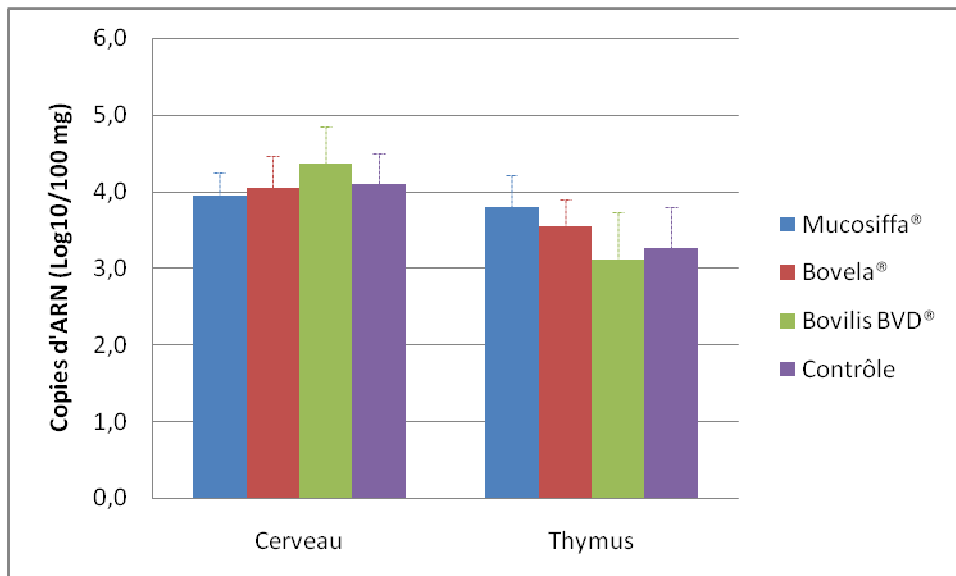


Figure 25 : Charges virales moyennes et écart-types, dans les organes des fœtus des différents groupes (Log₁₀ copies d'ARN pour 100mg)

Par ailleurs deux analyses ont été réalisées pour confirmer ces résultats.

Les mêmes échantillons tissulaires ont été envoyés au laboratoire IdVet pour des analyses indépendantes (extraction de l'ARN à partir des tissus et RT-qPCR indépendantes). En utilisant deux cibles ARN différentes du BVDV, le laboratoire a confirmé l'ensemble des résultats.

Un échantillonnage (n=40) des ARN extraits des prélèvements de cerveau et de thymus a été testé en utilisant un second kit RT-qPCR d'un autre fabricant (Taqvet BVD, Lsi, Life technology). Là encore les résultats ont été totalement validés.

4. DISCUSSION

4.1. Analyse des fœtus

4.1.1. Anomalies et retards de croissance

Dans cette étude, l'impact de la souche BDV-6 6390 sur la vitalité, la croissance et la présence d'éventuelles malformations a été quasi-nul. Cette souche n'a entraîné des anomalies congénitales que sur un seul fœtus parmi les 104 fœtus prélevés. Ces résultats sont cependant conformes à ceux de Bethune (2015) qui ont montré que, seulement deux fœtus (2/20) présentaient des congestions diffuses et modérées du cerveau suite à l'inoculation de la même souche, dans les mêmes conditions expérimentales. Pour les brebis vaccinées, la vaccination pourrait avoir diminué l'apparition de ces anomalies mais la seule anomalie observée était sur le fœtus d'une brebis vaccinée Bovela® et aucune malformation n'a été observée dans le groupe contrôle. Le passage viral de BDV sur ce fœtus est évident, comme en témoigne la présence d'anticorps. Il aurait, cependant, été intéressant de tester les autres agents tératogènes des ovins (virus de Schmallerberg et virus de la Fièvre Catarrhale Ovine) pour vérifier que cette anomalie ne soit pas due à l'un d'entre eux. De même, les mesures de poids et des longueurs atlas – anus, VT1 – anus, du tibia et du radius n'ont révélé aucune différence significative entre les groupes vaccinés et contrôle. La différence de prolificité n'étant pas significative entre les groupes, les analyses statistiques de ces différents paramètres n'ont pas été pondérées par le nombre de fœtus. Ces mesures ont été réalisées pour caractériser d'éventuels retards de croissance liés à l'infection par le BDV. En effet, la maladie de la frontière a, depuis sa découverte, été associée à des agneaux chétifs qui ont subi des retards de croissance intra-utérins. Le mécanisme des retards de croissance n'est pas bien connu. Selon Caffrey *et al.* (1997), ces retards pourraient être dus à une sous-nutrition fœtale liée à l'insuffisance placentaire, à la persistance de l'infection dans les organes endocrines ou encore à l'inhibition de la mitose dans les cellules infectées. Barlow & Patterson (1982) et Richardson *et al.* (1976) décrivent le poids, la longueur atlas - anus et la longueur des os longs comme de bons indicateurs des retards de croissance liés au BDV. Des différences de poids, de longueur crâne – anus, de longueur de tibia et de radius ont également été mise en évidence dans l'étude de García-Pérez *et al.* (2009a) suite à l'inoculation d'une souche de BDV-4. L'absence de différences significatives peut être interprétée comme une absence de retards de croissance chez les fœtus ou comme un retard de croissance homogène dans tous les groupes. L'étude de Bethune (2015) a consisté à comparer l'effet de différents génotypes de BDV, sur le fœtus. Comme dans notre étude, elle a obtenu peu d'avortements et ou malformations congénitales avec la souche BDV-6 6390, alors que d'autres souches de BDV-5 et BDV-4 entraînaient respectivement des avortements et des malformations congénitales. Ces résultats avec la souche 6390 du BDV-6 sont d'ailleurs observés sur le terrain où les agneaux IPI détectés, ne présentent aucune malformation. Dans cette même étude, l'inoculation du BDV-6 6390, sur des brebis Lacaune, avait entraîné des différences significatives de poids et de longueur atlas – anus (respectivement $p < 0,001$ et $p < 0,01$) par rapport à des fœtus sentinelles

(brebis non infectées) mais aucune différence significative n'avait été observée pour les longueurs des tibias et radius. Dans des conditions similaires, les brebis infectées avec du BDV-6 par Bethune (2015) avaient donné des fœtus d'environ 1,5 kg pour une longueur atlas – anus d'environ 31 cm en moyenne alors que les fœtus des sentinelles étaient d'environ 2,2 kg pour une longueur de 35 cm en moyenne (lecture graphique). Dans notre étude, les poids moyens des fœtus étaient respectivement de 1,49 +/- 0,23 kg, 1,64 +/- 0,3 kg, 1,72 +/- 0,23 kg et 1,60 +/- 0,26 kg et les longueurs atlas – anus étaient respectivement de 31,1 +/- 1,6 cm, 31,3 +/- 2,1 cm, 31,8 +/- 2,2 cm et 31,1 +/- 1,9 cm pour les groupes vaccinés Mucosiffa®, Bovela® et Bovilis BVD et le groupe contrôle. Cette comparaison permet d'orienter l'hypothèse vers un retard de croissance homogène dans tous les groupes qui n'a pu être empêché par la protection vaccinale. D'autant plus que le poids est un témoin très fiable de ces retards de croissance puisque des différences significatives ont été observées avec le groupe de sentinelles, pour les 4 souches de BDV et la souche de BVDV étudiées, dans l'étude de Bethune (2015).

Cependant, pour confirmer ces résultats, il serait intéressant, dans une même étude, de comparer des individus vaccinés et infectés et des individus vaccinés non infectés. En effet, ces différences pourraient également être expliquées par l'effet élevage d'origine des brebis. Dans notre étude, cet effet semble négligeable puisque les brebis du premier élevage (Bovilis BVD® et contrôle) ont donné des fœtus de 1,57 +/- 0,28 kg pour une distance atlas – anus de 31,2 +/- 1,9 cm et les fœtus des brebis du second élevage (Mucosiffa® et Bovela®) faisaient 1,64 +/- 0,24 kg pour une distance atlas – anus de 31,3 +/- 2,0 cm.

4.1.2. Sérologie et virologie

A l'exception d'un fœtus, tous les fœtus prélevés dans cette expérimentation étaient séronégatifs et viropositifs. On retrouve les résultats de l'expérience de Bethune (2015) avec la genèse de quasiment 100% d'agneaux IPI, suite à l'inoculation par la souche BDV-6 6390. En effet, la présence de virus BVDV ou BDV, détectée par RT-PCR, dans le cerveau et le thymus des fœtus, issus des brebis vaccinées montre que la vaccination BVDV, à demi-dose, ne permet pas de protéger les brebis contre une infection fœtale provoquée par la souche inoculée. Il serait, toutefois, intéressant d'isoler et de séquencer le virus présent dans les échantillons pour vérifier son caractère infectieux et qu'il s'agisse bien de la souche inoculée.

La recherche du virus a été effectuée dans le cerveau et le thymus en raison du tropisme préférentiel des souches de BDV ncp pour le système nerveux et les tissus lymphoïdes. Les résultats sont similaires à ceux observés précédemment (Bethune, 2015), où le BDV-6 avait été détecté dans 95% des cerveaux et 100% des thymus des fœtus IPI contre seulement 65% des rates. Les charges virales moyennes, observées lors de cette étude, étaient respectivement d'environ 5 et 3,8 Log₁₀ copies d'ARN pour 100mg, pour le cerveau et le thymus (lecture graphique). Les différences par rapport à nos résultats peuvent s'expliquer par la méthodologie différente utilisée, voir un léger effet vaccination qui limiterait l'infection

fœtale. Cependant nous n'avons pas observé de différence de charges entre groupes vaccinés et contrôle dans notre étude.

Un des fœtus issus d'une mère vaccinée Bovela®, était quant à lui, séropositif et négatif en RT-PCR alors que son jumeau était un IPI. Ce fœtus présentait également une atrophie cérébrale qui pourrait être liée au BDV. En effet, Nettleton *et al.* (1998) a montré que les anomalies congénitales du système nerveux seraient dues à une inflammation, liée à la réponse immunitaire. La présence de cette malformation et d'anticorps dirigés contre la protéine NS2-3 dans le sérum de l'agneau témoignent d'une infection par le BDV et donc d'une absence de protection vaccinale. Ce résultat est surprenant compte tenu de l'infection à 52 jours. On pourrait, cependant, envisager qu'à 52 jours de gestation une minorité de fœtus serait immunocompétente. Ou alors, ce cas particulier pourrait s'expliquer par une virémie prolongée chez la mère, jusqu'à 15 jours comme dans l'étude de García-Pérez *et al.* (2009a). En effet, pour une inoculation à 52 jours de gestation, le fœtus aurait été en contact avec le virus à 67 jours de gestation. Or, à 67 jours de gestation, on se trouve dans la période qui provoque à la fois des infections transitoires et des infections permanentes en fonction de la variabilité individuelle de vitesse de développement du système immunitaire.

4.2. Suivi expérimental des brebis

4.2.1. Suivi clinique

L'absence de signes cliniques majeurs, après l'inoculation expérimentale de brebis avec du BDV, est fréquemment rapportée dans les données de la littérature (Anderson *et al.*, 1987; García-Pérez *et al.*, 2009a ; Anne, 2012). De plus, pour les souches circulant actuellement sur le terrain, en France, l'infection transitoire passe le plus souvent inaperçue sur les adultes. Ce phénomène est, d'ailleurs, problématique puisqu'il ne permet pas de repérer les brebis qui pourraient potentiellement donner naissance à des agneaux IPI. Il n'est donc pas étonnant de retrouver une absence de signes cliniques suite à l'inoculation des brebis avec la souche de BDV-6.

Concernant les températures rectales, une hyperthermie modérée est souvent observée dans les jours suivant l'infection. García-Pérez *et al.*, (2009a) ont observé une légère hyperthermie (< 40,5°C) sur plus de la moitié des brebis, entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour suivant l'inoculation d'une souche de BDV-4. Pour la souche BDV-6 6390, une augmentation de température significative avait été observée par rapport aux brebis non infectées (Bethune, 2015). Anne (2012), quant à elle, n'avait observé aucune différence de température entre des brebis infectées avec une souche de BDV-3 et des brebis non infectées. Dans cette étude, le vaccin Bovilis BVD® était déjà mis à l'épreuve à un quart de dose et une demi dose, mais là encore pas de différence de température entre les individus vaccinés et les individus non vaccinés.

Ici, il aurait été intéressant de réaliser au moins trois mesures avant l'inoculation d'épreuve afin de calculer une moyenne qui aurait servi de ligne de base, comme pour l'analyse hématologique. Ainsi, l'observation d'une modification de température, liée à l'infection,

aurait été plus facilement interprétable. Cependant, l'absence de ces mesures n'empêche pas l'atteinte de l'objectif principal de l'étude qui est d'observer une différence entre les lots vaccinés et le lot non vacciné. Il est, donc, difficile de conclure à une quelconque efficacité du vaccin dans la mesure où l'augmentation de température est souvent minime et aléatoire et que la différence globale entre les groupes n'est pas significative.

4.2.2. Suivi hématologique

Les infections expérimentales par une souche de BDV ont montré, à plusieurs reprises, qu'elles étaient à l'origine d'une diminution du nombre de leucocytes, attribuée à une diminution du nombre lymphocytes (Hussin & Woldehiwet, 1994; García-Pérez *et al.*, 2009b; Anne, 2012). Cette diminution du nombre de lymphocytes permet au virus de contourner la réponse immunitaire acquise. En effet, les lymphocytes T naïfs reconnaissent l'antigène viral présenté sur le CMH et deviennent alors des lymphocytes T auxiliaires ou lymphocytes T CD4⁺ (LT_{CD4+}). Les LT_{CD4+} vont alors induire la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ (LT_{CD8+}) en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui vont reconnaître des cellules présentant à leur surface des CMH I associés à des antigènes viraux et entraîner leur destruction par apoptose. Les LT_{CD4+} permettent également la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes, qui seront les effecteurs de la réponse immunitaire à médiation humorale par leur production d'anticorps. Hussin & Woldehiwet, (1994) ont montré que la diminution du nombre de lymphocytes était liée à une diminution des lymphocytes LT_{CD4+} entre 3 et 10 jours post inoculation, ce qui permet d'impacter la réponse à médiation cellulaire et la réponse à médiation humorale.

L'intérêt du suivi hématologique dans cette étude est, d'une part, de confirmer l'infection par le BDV. La diminution de 32% à 43% selon les groupes (43% correspondant au groupe contrôle) du pourcentage de lymphocytes à J3, par rapport à la ligne de base calculée avant inoculation permet de valider l'infection par le BDV. Ces données sont cohérentes avec la diminution de 48% observée à J3, pour la souche 6390 de BDV-6, lors de l'étude de Bethune (2015). Néanmoins, la lymphopénie observée dans l'étude de Bethune s'étend entre 2 et 7 jours après l'inoculation alors que dans l'étude présentée ici, elle s'étend jusqu'à J14 pour le groupe contrôle.

Le deuxième intérêt de ce suivi est d'évaluer la protection permise par les différents vaccins vis-à-vis de la lymphopénie responsable d'une immunodépression. Il semblerait que la vaccination ne permette pas de contrer la diminution du nombre de lymphocytes et notamment son intensité puisque aucune différence entre les différents groupes, n'est observée à J3, au moment où la diminution est la plus importante. Cependant, la vaccination permettrait de diminuer la durée de la lymphopénie, les taux de lymphocytes des individus vaccinés Mucosiffa® ou Bovela®, se rapprochent de la ligne de base à J6, les taux des individus vaccinés Bovilis BVD® à J8 alors que la lymphopénie est toujours effective à J14 pour le groupe contrôle. Les différences significatives respectivement de J6 à J8 et à J7 montrent que le vaccin inactivé (Bovilis BVD®) est moins rapide pour rétablir le taux de

lymphocytes que les vaccins vivants atténués Mucosiffa® et Bovela®. Dans l'étude de Anne (2012), la vaccination Bovilis BVD®, à quart de dose et à demi dose, permettait une diminution de l'intensité de la lymphopénie, au moment où la diminution était la plus forte (à J4). Cependant, la souche de BDV-3 utilisée entraînait une lymphopénie de 66% contre 43% pour le BDV-6. Au final, suite à la vaccination Bovilis BVD®, la lymphopénie était respectivement de 38% et de 40% dans les études BDV-3 et BDV-6.

García-Pérez *et al.*, (2009a) ont observé une diminution du nombre de leucocytes, significative entre 2 et 5 jours, post inoculation d'une souche de BDV-4. Dans notre étude, la diminution dans le groupe contrôle s'étend entre 2 et 14 jours au moins (arrêt des mesures). La durée et l'intensité de la leucopénie semble donc dépendre de la souche inoculée. Cette restriction de la lymphopénie permise par la vaccination, bien qu'incomplète, permet de réduire la période d'immunodépression et donc la fenêtre de sensibilité aux infections intercurrentes. Cependant, dans l'étude de Roux (2009, Meyer *et al.*, 2012), l'utilisation du vaccin Mucosiffa® chez les bovins permet de prévenir totalement la diminution du nombre de leucocytes et de lymphocytes observée chez les individus non vaccinés, suite à l'inoculation d'épreuve. Cela montre bien que la vaccination avec le vaccin Mucosiffa® n'entraîne pas une protection équivalente chez les bovins et les ovins concernant l'infection transitoire.

4.2.3. Suivi sérologique

Les sérologies négatives, par ELISA NS2-3 et séroneutralisation, des brebis non vaccinées montrent l'absence d'infection naturelle avant l'inoculation épreuve.

Les sérologies post inoculation permettent également de confirmer l'efficacité de l'inoculation d'épreuve dans la mesure où toutes les brebis non vaccinées des trois lots ont séroconverti en ELISA NS2-3 et en séroneutralisation de la souche NADL du BVDV-1.

D'autre part, la présence d'anticorps neutralisant la souche NADL du BVDV-1, dans le sérum des brebis vaccinées, montre la capacité des trois vaccins à induire une réponse humorale contre le BVDV-1. La réponse humorale, induite par la vaccination, permet alors la mise en place d'une immunité mémoire. Cette immunité permet, suite à l'inoculation de la souche 6390 du BDV-6, une production d'anticorps neutralisant la souche NADL du BVDV-1 d'intensité supérieure comme le montre les résultats de séroneutralisation sur les sérums prélevés le jour de l'autopsie. L'immunité mémoire permet également la mise en place d'une réponse immunitaire plus précoce, suite à l'inoculation. En effet, on observe une séroconversion en anticorps NS2-3 plus rapide dans le groupe vacciné Bovilis BVD®, entre 0 et 14 jours, alors que les brebis, du groupe contrôle, séroconvertissent entre 14 et 35 jours. Bethune (2015) avait trouvé des résultats équivalents avec une séroconversion en anticorps NS2-3 entre 21 et 36 jours après l'infection, suite à l'inoculation du BDV6-6390. Dans l'étude de García-Pérez *et al.*, (2009a), la séroconversion a lieu entre 11 et 35 jours suite à l'inoculation par une souche de BDV-4. La précocité de cette réponse ne peut être évaluée, pour les vaccins vivants atténués, dans la mesure où la séroconversion en anticorps NS2-3 était déjà effective avant inoculation.

Cependant, les anticorps NS2-3 ne sont pas des anticorps neutralisants. En effet, les anticorps neutralisants sont principalement dirigés contre la protéine structurale E2. Au contraire de NS2-3, E2 est une protéine très variable au sein des pestivirus.

Dans la mesure où les brebis ont toutes été vaccinées avec des souches vaccinales de BVDV-1, il apparaît logique qu'à J0 on retrouve des anticorps neutralisant la souche BVDV-1 NADL chez les brebis. Concernant la vaccination Bovilis BVD®, 112 jours après la première injection de vaccination, le taux d'anticorps, neutralisant le BVDV-1 NADL, moyen contenu dans le sérum des brebis vaccinées, à demi dose, était d'environ 8 Log₂ ED₅₀/mL à 112 jours post-vaccination dans l'étude de Anne (2012) alors que dans notre étude, le titre moyen était de 6,1 +/- 3,3 Log₂ ED₅₀/mL, à 119 jours après la vaccination. Cette différence s'explique par le fait que deux brebis sur 11 étaient séronégatives alors que les 6 brebis de l'étude de 2012 avaient séroconverti. En effet, en enlevant les deux brebis séronégatives, le taux moyen remonte à 7,4 +/- 1,4 Log₂ ED₅₀/mL. L'absence d'anticorps neutralisants chez ces deux brebis est difficilement explicable dans la mesure où les taux d'anticorps observés à J66 sont équivalents à ceux du reste du groupe. Dans le groupe vacciné Mucosiffa®, deux brebis présentent également des taux d'anticorps neutralisants nuls, à J0. Si l'hypothèse d'un échec de vaccination pourrait être validée, ici, par les taux observés à J66 et par l'absence d'anticorps NS2-3 à J0, elle n'expliquerait pas la séroconversion précoce en anticorps NS2-3, de ces brebis, entre J7 et J14. Dans l'étude de Roux (Roux, 2009 ; Meyer *et al.*, 2012), un taux d'anticorps neutralisants moyen de 7,9 +/- 0,7 Log₂ ED₅₀/mL suite à la vaccination Mucosiffa® sur des bovins avait permis une protection fœtale parfaite. On peut donc supposer, dans le cadre de notre étude que les brebis ayant séroconverti, auraient probablement été protégées contre une infection fœtale par une souche de BVDV-1.

Pour savoir si les vaccins induisent une protection croisée humorale contre la souche d'inoculation BDV-6, il est nécessaire de réaliser des essais de séroneutralisation contre cette souche. Ce test est en cours de validation, la méthode utilisée de détection classique des souches ncp ne fonctionnant pas avec le BDV-6. Dans l'attente des résultats, on peut formuler deux hypothèses. L'absence de neutralisation de la souche BDV-6 démontrerait l'absence d'efficacité de protection (humorale) croisée des vaccins. En l'absence de séroneutralisation pour cette souche, une nouvelle étude pourrait être réalisée pour vérifier si l'absence de protection neutralisante croisée est valable avec d'autres souches de BDV de génotypes différents, notamment les souches isolées récemment en France. Dans l'hypothèse qu'une réaction croisée existe entre le BVDV-1 et le BDV-6, la réponse en anticorps neutralisant le BDV-6, produite, aurait été insuffisante pour protéger les fœtus, dans nos conditions expérimentales.

Dans l'étude de Anne (2015), des séroneutralisations avaient également été effectuées contre une souche de BDV-5 et la souche de BDV-3 de l'inoculation. De 112 à 140 jours, après la vaccination avec Bovilis BVD®, les taux d'anticorps neutralisants dans le sérum des brebis vaccinées à demi-dose étaient respectivement compris entre 5 et 6,5 Log₂ ED₅₀/mL et entre 8

et 9,5 Log₂ ED₅₀/mL pour les génotypes BDV-5 et BDV-3 (lecture graphique). Cette étude montre qu'il existe une protection croisée partielle entre la souche C86 cp de BVDV-1 du vaccin Bovilis BVD® et les souches de BDV-5 et de BDV-3 utilisées, entre 112 et 140 jours après vaccination, ce qui correspond à la fenêtre d'infection de notre étude (119 jours). On peut voir que les taux d'anticorps sont variables d'un génotype à l'autre avec des taux relativement plus faibles pour la souche de BDV-5 que pour la souche BDV-3. De plus, Vantsis *et al.*, (1980a) ont également montré que l'inoculation par la souche de BDV Moredun entraînait la production d'un taux d'anticorps neutralisant la souche BVDV-1 NADL nettement supérieur au taux produit lors de l'inoculation d'une souche de BDV isolée sur le terrain. Les protections croisées sont donc relativement variables d'une souche à l'autre de BDV. Il est donc important de vérifier qu'il existe bien une protection croisée pour la souche BDV-6 6390.

Finalement, la relation entre le taux d'anticorps neutralisants et la protection permise est soumise à controverse. Howard *et al.* (1989) montre que le taux d'anticorps, lié au transfert de l'immunité passive, semble directement liée à la protection contre une infection respiratoire par le BVDV notamment en empêchant la virémie 6 jours après l'inoculation. Or, on a vu que la virémie, suite à l'inoculation de pestivirus, est transitoire et intermittente. On ne peut donc pas certifier l'absence totale de virémie, en observant un seul résultat négatif, 6 jours après inoculation.

De plus, aucune donnée actuelle ne permet d'associer un titre en anticorps neutralisants à une protection clinique et encore plus à une protection contre l'infection transplacentaire. Il serait intéressant de réaliser une étude pour observer le lien entre la virémie, le taux d'anticorps neutralisants et la protection fœtale. Cependant, la réponse en anticorps et la virémie sont fortement dépendants de nombreux autres facteurs et notamment des protocoles vaccinaux et d'inoculation.

Enfin, la réponse en anticorps neutralisants ne permet d'étudier qu'une partie de la réponse immunitaire, la réponse à médiation humorale. En effet, la réponse immunitaire antivirale est principalement une réponse à médiation cellulaire faisant intervenir les Lymphocytes T Cytotoxiques (CTL).

4.2.4. Suivi virologique

L'absence de virus dans les prélèvements de sang des brebis, 7 jours avant l'inoculation et le jour de l'inoculation, montre l'absence de circulation virale avant inoculation. L'interprétation des analyses virologiques par RT-PCR, suite à l'inoculation d'épreuve, est une autre manière de confirmer l'infection par le BDV. Dans notre étude, le virus a été détecté dans tous les groupes vaccinés et contrôles mais sur des cinétiques courtes (1 à 2 jours) et avec des charges variables. En l'état des travaux, il ne semble pas y avoir de différences significatives entre les différents groupes. Ces résultats semblent aussi similaires à ceux observés par Bethune (2015) pour le BDV-6 6390 et dans les mêmes conditions expérimentales.

Une comparaison plus fine entre les groupes vaccinés et le groupe non vacciné permettra d'évaluer une hypothétique prévention de la virémie, même incomplète, par la vaccination. En effet, la vaccination avec le vaccin Mucosiffa®, chez les bovins, empêche la mise en place de la virémie qui est observée chez les génisses non vaccinées entre le 6^{ème} jour et 14^{ème} jour après l'inoculation d'épreuve (Roux, 2009 ; Meyer *et al.*, 2012). Cependant, les résultats des RT-PCR sur les organes des fœtus ne sont pas en faveur d'une protection de la virémie par la vaccination.

4.3. Discussion par rapport à la méthodologie utilisée

En bilan, notre étude indique une absence de protection fœtale à BDV-6 6390 par les trois vaccins BVDV testés. Outre les hypothèses biologiques discutées plus haut, il faut envisager les éventuels biais liés à la méthodologie utilisée.

4.3.1. Souche

Le but de cette étude était de vérifier la protection contre l'infection transplacentaire et notamment la genèse d'IPI, permise par la vaccination, utilisée en Aveyron. Or, la souche 6390 de BDV-6, isolée en Aveyron en 2012, est une souche responsable de troubles cliniques ces dernières années dans le bassin de Roquefort. De plus, dans l'étude de Bethune (2015), cette souche n'entraînait ni avortement, ni mortalité in utero et était responsable de la conception de 100% d'agneaux IPI vivants. Or, dans une étude de protection fœtale, le but est de comparer le pourcentage de fœtus IPI entre le groupe vacciné et le groupe contrôle. Dans ce cas, les avortons ou les fœtus morts ne peuvent rentrer dans la comparaison et réduisent les effectifs. L'utilisation de la souche BDV-6 6390 qui circulait en Aveyron récemment, permettait donc une vérification optimale de la protection fœtale.

La souche de BDV-3 (ENVT-10405) étudiée dans l'étude de Bethune (2015) aurait également pu être utilisée. En effet, elle a récemment été isolée dans le bassin de Roquefort et a permis la conception de 100% de fœtus IPI sans mortalité ni avortement mais les pourcentages de tissus fœtaux infectés étaient supérieurs pour la souche de BDV-6.

4.3.2. Voie et dose

On peut également essayer d'expliquer l'échec vaccinal par la voie et la dose d'inoculation. L'inoculation d'épreuve a été effectuée avec une dose infectieuse de 2.10^5 DICC₅₀ par brebis, injectée par voie intramusculaire. Le choix de ce protocole d'infection repose sur les résultats obtenus lors d'études antérieures, des doses de 2.10^5 DICC₅₀ par brebis et de 10^6 DICC₅₀ par brebis, en intramusculaire, avaient respectivement été utilisées par Bethune (2015) et par García-Pérez *et al.* (2009a). Ces doses avaient entraîné, sur des brebis gestantes, une infection permettant la naissance d'agneaux IPI. Ce protocole était donc adapté à l'étude de la protection fœtale. De plus, l'utilisation du même protocole que pour l'étude de Bethune (2015) nous permettait de comparer les deux études, d'autant plus que la souche de BDV-6 6390 était utilisée dans les deux études.

Cependant, ce mode d'infection ne reflète par forcément le mode d'infection naturelle. En effet, la dose minimale infectieuse en conditions naturelles est inconnue et la voie d'infection naturelle est la voie intra-nasale. On peut alors émettre l'hypothèse que la voie et/ou la dose utilisées aient entraîné une virémie plus importante que celle observée dans les conditions naturelles. La capacité des anticorps neutralisants serait alors saturée, ce qui empêcherait la protection vaccinale. D'après Richardson *et al.* (1976), la dose de l'inoculum est directement reliée à la sévérité de la maladie. D'autre part, dans les études antérieures sur le BDV, des charges de 2.10^2 DICC₅₀ en sous-cutanée (Nettleton *et al.*, 1992) jusqu'à 10^6 DICC₅₀ en intramusculaire (García-Pérez *et al.*, 2009a) avaient permis la naissance d'agneaux IPI.

Dans plusieurs études, la virémie semble dépendante de la dose administrée. Il serait alors intéressant de comparer la virémie induite par différentes charges en condition expérimentale, à la virémie induite par une infection naturelle pour se rapprocher le plus possible des conditions de terrain. De plus, le virus circule dans le sang, sous forme libre ou sous forme intracellulaire. La capacité du virus à infecter le fœtus pourrait dépendre de la fraction de virus libre. Pour cela, il serait intéressant de comparer les virémies sur sang total et sur plasma.

Concernant la voie d'inoculation, Nettleton *et al.*, (1992) ont montré l'absence de différence significative dans l'expression des signes cliniques entre une inoculation par injection sous cutanée et une inoculation par voie naturelle (brebis mise en présence d'agneaux IPI). De plus, la voie parentérale a été mise en cause dans l'émergence de la maladie de la frontière suite à l'injection de vaccins contaminés par le BDV. Néanmoins, une absence de virémie avait été détectée suite à l'inoculation d'une dose de BDV-3 à 5.10^5 DICC₅₀ en intra-nasale (Anne, 2012) alors qu'une virémie avait été détectée sur 5 brebis sur 8 après l'inoculation de la même souche en intramusculaire à 2.10^5 DICC₅₀ (Bethune, 2015). Là encore, une comparaison de la virémie induite par différentes voies, en conditions expérimentales, et de la virémie observée en conditions naturelles, pourrait être intéressante pour les futures études.

Pour se rapprocher des conditions naturelles, l'infection aurait également pu être effectuée par un contact avec un individu IPI, entre 50 et 60 jours de gestation (Nettleton *et al.*, 1992). Dans cette étude, les brebis mises en présence d'agneaux IPI entre 50 et 60 jours de gestation, avaient donné naissance à des agneaux IPI.

4.3.3. Période d'inoculation

L'objectif de l'étude était de montrer une éventuelle protection contre l'infection fœtale et, plus particulièrement, une protection qui empêcherait la genèse d'agneaux IPI. Il était donc important d'inoculer le virus à une période de la gestation, pendant laquelle la mise en place de l'infection permanente était possible. Une infection entre 15 et 60 jours permet la mise en place de l'infection permanente chez les fœtus. La période entre 60 et 85 est une période de transition durant laquelle l'infection peut rester transitoire ou devenir permanente en fonction

de la variabilité individuelle de la vitesse de développement du système immunitaire du fœtus. Là encore, des études antérieures ont permis de montrer que des infections à 52 jours (Terpstra, 1981; Bethune, 2015), à 55 jours (García-Pérez *et al.*, 2009a) et entre 50 et 54 jours (Nettleton *et al.*, 1992) de gestation permettaient la formation d'agneaux IPI.

D'autre part, la réponse en anticorps neutralisant les souches BDV-3 et BDV-5 est maximale entre 28 et 140 jours après la première injection de vaccination Bovilis BVD® (Anne, 2012). Suite à une infection par le BDV, la virémie chez la brebis peut durer jusqu'à 15 jours (García-Pérez *et al.*, 2009a). En inoculant 119 jours après la première injection de vaccination, la période de virémie hypothétique de la brebis, qui s'étendait de 119 jours à 134 jours, était bien incluse dans la période de protection maximale. La fenêtre d'infection transplacentaire entraînant la naissance d'IPI se situe entre 15 et 85 jours de gestation. Sur le terrain, l'infection pouvant intervenir à tout moment, il faut donc avoir une protection maximale pendant les 85 premiers jours de la gestation. Pour cela, la vaccination, entre 28 et 55 jours avant l'IA, permet d'inclure la période à risque dans la période de protection maximale.

4.4. Discussion et perspectives sur la vaccination BDV

4.4.1. Vaccins

Les vaccins utilisés sont des vaccins commercialisés, pour la protection des bovins, contre le BVDV. Actuellement en France, il n'existe pas de vaccin contenant des souches de BDV. Les trois vaccins possèdent une indication pour la prévention de l'infection transplacentaire du virus. La maladie de la frontière, chez les ovins, est majoritairement liée au BDV mais peut également être liée au BVDV. En 1997, Vilcek *et al.* a mis en évidence 13 BVDV-1 et 4 BVDV-2 parmi 42 pestivirus, isolés sur des petits ruminants. Cependant, les souches circulant, aujourd'hui, en France, sont principalement des souches de BDV avec les génotypes BDV-3 et BDV-6 dans le bassin de Roquefort et le génotype BDV-4 au Pays basque.

L'objectif de l'étude était de mettre en évidence une protection croisée entre les souches de BVDV présentes dans les vaccins et les souches de BDV responsables de la maladie. Des essais d'immunisation des brebis avaient déjà été mis en œuvre en 1980(a), par Vantsis *et al.*. Dans cette étude, des brebis, qui avaient subi un épisode de la maladie de la frontière, certaines expérimentalement avec la souche de BDV Moredun, et d'autres naturellement avec une souche de BDV, lors d'une épizootie en Ecosse, ont été inoculées avec la souche homologue et la souche hétérologue. L'inoculation avec la souche homologue entraînait la naissance de 100% d'agneaux normaux pour les deux souches. Alors que les brebis, inoculées avec la souche hétérologue, donnaient respectivement naissance à 92% et 50% d'agneaux anormaux pour les souches de BDV Moredun et isolée du terrain. La conclusion de cette étude portait sur l'importance d'intégrer plusieurs souches différentes de virus dans les vaccins pour assurer une bonne protection. Cependant, la qualification des agneaux comme « normaux » reposait uniquement sur des critères cliniques, or les individus IPI peuvent tout à

fait être cliniquement normaux et pour autant être virémiques ou séropositifs. De plus, la souche Moredun utilisée était une souche cp qui ne peut donc pas passer la barrière transplacentaire.

Parmi les trois vaccins utilisés, deux vaccins étaient des vaccins vivants modifiés et un vaccin était inactivé. On aurait pu s'attendre à observer une réponse immunitaire moins importante notamment des taux d'anticorps neutralisants plus faibles lors de la vaccination avec le Bovilis BVD®. En effet, les vaccins inactivés, ne pouvant se multiplier dans l'organisme, sont souvent à l'origine de réponses moins intenses, moins rapides et plus courtes. Or, aucune différence, dans la quantité d'anticorps neutralisants produite, n'a été observée entre les deux types de vaccins. La rapidité et la durabilité de la réponse n'ont pas été explorées, dans cette étude. Vantsis *et al.* (1980b) avait également mis en évidence une absence de différence dans la quantité d'anticorps produite entre deux préparations vaccinales inactivées et une préparation vaccinale vivante. La seule différence significative observée, entre les deux types de vaccins, concerne la prévention de la lymphopénie. Si, tous les vaccins semblent diminuer la durée de cette dernière, le vaccin Bovilis BVD® est moins efficace avec un retour à la normale constaté 8 jours après l'inoculation contre 6 jours pour les vaccins vivants modifiés. Il serait également intéressant de comparer les virémies des brebis pour ces deux types de vaccins même si les charges virales dans les organes des fœtus sont équivalentes.

4.4.2. Protocole vaccinal

Le protocole vaccinal consistait à vacciner les brebis avec la moitié de la dose bovine recommandée dans l'AMM, 91 jours avant l'inoculation d'épreuve. Le choix d'une demi-dose reposait sur les modalités pratiques d'utilisation sur le terrain mais pourrait être à l'origine de la mise en place d'une réponse immunitaire insuffisante. En effet, des études antérieures ont mis en évidence des différences dans la réponse immunitaire en fonction de la dose de vaccin administrée. L'étude de Anne (2012) montre des taux d'anticorps neutralisant les génotypes BVDV-1, BDV-3 et BDV-6 plus faibles et moins durables dans le temps, en utilisant le vaccin Bovilis BVD® à quart de dose plutôt qu'à demi-dose. Le taux d'anticorps neutralisants produit est également affecté par la dilution d'une préparation vaccinale par 3, 10, 33 et 100, dans l'étude de Vantsis *et al.*, (1980b). Si, la vaccination à demi-dose semble ne pas permettre la protection fœtale, il serait intéressant de reproduire le même type d'expérience avec les doses recommandées par le fabricant. Dans l'hypothèse que les doses recommandées permettent une protection fœtale, il sera nécessaire de réévaluer l'aspect rentabilité de la vaccination dans les élevages ovins.

De même, il est possible que l'immunité induite 91 jours après la vaccination soit insuffisante. Une étude (Anne, 2012) a montré que la réponse en anticorps neutralisant le BDV (génotype 3 et 5), suite à la vaccination Bovilis BVD®, était transitoire, entre 3 et 6 mois, contrairement à la capacité de neutralisation du BVDV-1 (souche NADL). Cependant, comme on a pu le voir dans la discussion concernant la période d'inoculation, une première injection de Bovilis BVD® 67 jours avant l'insémination et une inoculation à 52 jours de gestation permettent

d'inclure la période à risque dans la période de production d'anticorps neutralisants maximale pour les souches BDV-5 et BDV-3. Cette concordance reste à être étudiée pour la souche de BDV-6 et pour les vaccins vivants atténués.

CONCLUSION

Cette étude avait pour but d'évaluer la protection fœtale permise par les vaccins BVD, à AMM pour les bovins, chez les ovins. Les vaccins vivants atténués Mucosiffa® et Bovela® ainsi que le vaccin inactivés Bovilis BVD® n'ont pas permis, dans notre modèle d'étude, cette protection. En effet, la quasi-totalité des fœtus issus des mères vaccinées était des IPI. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet échec vaccinal.

La principale hypothèse est l'absence de protection croisée entre les souches de BVDV contenues dans les vaccins et la souche de BDV inoculée. Pour cela, des séroneutralisations de la souche inoculée devront être effectuées sur le sérum des brebis, prélevé avant inoculation.

La seconde hypothèse concerne la dose vaccinale utilisée. La demi-dose n'est pas la dose recommandée par le fabricant. La dose complète pourrait permettre la protection transplacentaire recherchée dans cette étude. Cependant, la question de la rentabilité d'une vaccination à dose entière se pose chez les ovins.

Enfin, la dernière hypothèse repose sur une méthodologie d'inoculation non adaptée. La voie et la dose d'inoculation ne représentent pas les conditions naturelles. Pour se rapprocher de ces conditions, des études devront être réalisées pour étudier différentes voies et différentes doses par rapport à une infection naturelle. Une autre possibilité est de réaliser l'infection par contact avec un individu IPI, plutôt que par inoculation.

La lutte contre la maladie de la frontière est un sujet encore peu documenté. Il est important d'explorer les différentes hypothèses émises, ci-dessus, avant de déconseiller la vaccination dans les élevages. La détection des animaux IPI sur le terrain étant difficile, il convient d'axer les mesures de lutte sur le dépistage et la biosécurité.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON CA, SAWYER M, HIGGINS RJ, EAST N, OSBURN BI (1987). Experimentally induced ovine border disease: extensive hypomyelination with minimal viral antigen in neonatal spinal cord. *American Journal of Veterinary Research*, **48**, 499–503.
- ANNE S (2012). *Vaccination contre la maladie des frontières (Border disease) chez le mouton : premiers essais d'efficacité du vaccin inactivé Bovilis-BVD*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ENVT, 94 p.
- ARCHAMBAULT D, BELIVEAU C, COUTURE Y, CARMAN S (2000). Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Research*, **31**, 215–227.
- 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 R, PATTERSON D (1982). *Border disease of sheep: a virus-induced teratogenic disorder ; a collaborative review*. Parey, Berlin u.a, 90 pp.
- BECHER P, ORLICH M, KOSMIDOU A, KONIG M, BAROTH M, THIEL H-J (1999). Genetic Diversity of Pestiviruses: Identification of Novel Groups and Implications for Classification. *Virology*, **262**, 64–71.
- 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*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ENVT, 93 p.
- BERRIATUA E, BARANDIKA J, ADURIZ G, ATXAERANDIO R, GARRIDO J, GARCÍA-PÉREZ 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.
- BETHUNE M-A (2015). *Influence du génotype viral sur l'infection fœtale par le virus de la maladie de la frontière (border disease)*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ENVT, 129 p.
- CAFFREY JF, DUDGEON AM, DONNELLY WJ, 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.

- CAY B, CHAPPUIS G, COULIBALY C et al. (1989). Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: Report of an international workshop. *Veterinary Microbiology*, **20**, 123–129.
- CHASE CC., ELMOWALID G, YOUSIF AA. (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **20**, 95–114.
- CHEN Z, RIJNBAND R, JANGRA RK et al. (2007). Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **366**, 277–292.
- COGGINS L, GILLESPIE JH, ROBSON DS, THOMPSON JD, PHILLIPS WV, WAGNER WC, BAKER JA (1961). Attenuation of virus diarrhoea virus (strain Oregon C24V) for vaccine purposes. *The Cornell Veterinarian*, **51**, 539–545.
- CORTESE V, WHITTAKER R, ELLIS J, RIDPATH J, BOLIN S (1998). Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea. *American Journal of Veterinary Research*, **59**, 848–850.
- DE CREMOUX R, CORBIERES F, NOUVEL X et al. (2013). Démarche harmonisée de diagnostic différentiel des avortements chez les petits ruminants. *Bulletin des GTV, Avortements Tome 1*, 93–104.
- DECARO N, MARI V, SCIARRETTA R et al. (2013). Comparison of the cross-antibody response induced in sheep by inactivated bovine viral diarrhoea virus 1 and Hobi-like pestivirus. *Research in Veterinary Science*, **94**, 806–808.
- DUBOIS E, RUSSO P, PRIGENT M, THIÉRY R (2008). Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006. *Veterinary Microbiology*, **130**, 69–79.
- EDWARDS S, SANDS J, HARKNESS J (1988). The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Archives of Virology*, **102**, 197–206.
- ELLIS JA, DAVIS WC, BELDEN EL, PRATT DL (1988). Flow cytometric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Pathology*, **25**, 231–236.
- FAHEY KJ, MORRIS B (1978). Humoral immune responses in foetal sheep. *Immunology*, **35**, 651–661.
- FERRER LM, GARCIA DE JALON JA, HERAS GUILLAM M (2013). *Atlas of ovine pathology*.

- GARCÍA-PÉREZ AL, MINGUIJÓN E, ESTÉVEZ L, BARANDIKA JF, ADURIZ G, JUSTE RA, HURTADO A (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.
- GARCÍA-PÉREZ AL, MINGUIJÓN E, BARANDIKA JF, ADURIZ G, POVEDANO I, JUSTE RA, HURTADO A (2009b). Detection of Border Disease Virus in Fetuses, Stillbirths, and Newborn Lambs from Natural and Experimental Infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **21**, 331–337.
- GARDINER A, BARLOW R, RENNIE J, KEIR W (1972). Experiments in border disease. V. Preliminary investigation on the nature of the agent. *Journal of Comparative Pathology*, **82**, 159–161.
- GIAMMARIOLI M, LA ROCCA SA, STEINBACH F, CASCIARI C, DE MIA GM (2011). Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. *Veterinary Microbiology*, **147**, 231–236.
- GLADUE D, O'DONNELL V, FERNANDEZ-SAINZ I et al. (2014). Interaction of structural core protein of classical swine fever virus with endoplasmic reticulum-associated degradation pathway protein OS9. *Virology*, **460–461**, 173–179.
- GOENS SD (2002). The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. *Can Vet J*, **43**.
- HAMERS C, DEHAN P, COUVREUR B, LETELLIER C, KERKHOFS P, PASTORET P-P (2001). Diversity Among Bovine Pestiviruses. *The Veterinary Journal*, **161**, 112–122.
- HOWARD C, CLARKE M, BROWNLIE J (1989). Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Veterinary Microbiology*, **19**, 195–203.
- HUGUES LE, KERSHAW GF, SHAW IG (1959). “B” or Border disease: an undescribed disease of sheep. *Veterinary Record*, **71**, 313–316.
- HUSSIN AA, WOLDEHIWET Z (1994). Effects of experimental infection with border disease virus on lymphocyte subpopulations in the peripheral blood of lambs. *Research in Veterinary Science*, **56**, 201–207.
- JEFFREY M, WELLS GAH, BRIDGES AW, SANDS JJ (1990) Immunocytochemical localization of Border Disease virus in the spinal cord of fetal and newborn lambs. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **16**, 501–510.
- LARGO E, VERDIA-BAGUENA C, AGUILELLA VM, NIEVA JL, ALCARAZ A (2016). Ion channel activity of the CSFV p7 viroporin in surrogates of the ER lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1858**, 30–37.
- LIU L, XIA H, WAHLBERG N, BELÁK S, BAULE C (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, **385**, 351–357.

L'observatoire de la BVD. Disponible sur <http://www.bvdobservatoire.fr/Pages/etiologie.aspx>

LOKEN T (1995). Border disease in sheep. *Veterinary clinics of north America : Food animal practice*, Vol. 11.

LOUBIERE A (2012). *La border disease en Aveyron: analyse de la situation épidémiologique entre 2006-2010*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ENVT, 176 p.

MARCO I, ROSELL R, CABEZON O et al. (2008). Epidemiological study of border disease virus infection in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) after an outbreak of disease in the Pyrenees (NE Spain). *Veterinary Microbiology*, **127**, 29–38.

Marshall DJ, Moxley RA, Kelling CL (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Pathology*, **33**, 311–318.

MAURER K, KREY T, MOENNIG V, THIEL H-J, RUMENAPF T (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virology*, **78**, 1792–1799.

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. *Vet. Journal*, **192**, 242-245.

MEYERS G, EGE A, FETZER C ET AL. (2007). Bovine Viral Diarrhoea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting Erns RNase and Npro Protease. *Journal of Virology*, **81**, 3327–3338.

MONDOLY P, POUGET C (1998) La border disease. *Société Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires*.

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

NETTLETON PF, ENTRICAN G (1995). Ruminant pestiviruses. *British Veterinary Journal*, **151**, 615–642.

NETTLETON P, GILMOUR J, HERRING J, SINCLAIR J (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.

OIE (2008) Maladie de la frontière “Border disease.” In: *Manuel terrestre de l’OIE*.

- PASSLER T, WALZ PH (2010). Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. *Animal Health Research Reviews*, **11**, 191–205.
- PATON D, LOWINGS J, BARRETT A (1992). Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, **190**, 763–772.
- PETERHANS E, SCHWEIZER M (2010). Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. *Veterinary Microbiology*, **142**, 18–25.
- PETERHANS E, SCHWEIZER M (2013). BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. *Biologicals*, **41**, 39–51.
- PETERHANS E, BACHOFEN C, STALDER H, SCHWEIZER M (2010). Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. *Veterinary Research*, **41**, 44.
- 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.
- RICHARDSON C, NANCY HEBERT C, DONE J (1976). Experimental Border Disease in Sheep: Dose-Response Effect. *British Veterinary Journal*, **132**, 202–208.
- ROUX D (2009). *Infection expérimentale par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) : évaluation de la protection fœtale induite par un vaccin vivant atténué*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, ENVT, 81 pp.
- SATYANARAYANA T, JOHRI BN, PRAKASH A (2012). Genetic and Antigenic Diversity of Ruminants Pestiviruses. In: *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*, Springer Science & Business Media edn, p. 163.
- SCHELCHER F, CASSARD H, CORBIERE F et al. (2016). Les infections par le virus Bovine Viral Diarrhoea (BVD) : du virus à la pathogénèse. *Bulletin des GTV 2016*, **81**, 19–30.
- SHANNON A, RICHARDS S, KIRKLAND P, MOYLE A (1991). An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *Journal of Virological Methods*, **34**, 1–12.
- SHARP M, RAWSON B (1986). The cost of Border disease infection in a commercial flock. *Veterinary Record*, **119**, 128–130.
- TAMURA JK, WARRENER P, COLLETT MS (1993). RNA-Stimulated NTPase Activity Associated with the p80 Protein of the Pestivirus Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Virology*, **193**, 1–10.
- TERPSTRA C (1981). Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. *Research in Veterinary Science*, **30**, 185–191.

- VANDAELE E, MAILLARD R (2004). Des vaccins BVD-MD protègent contre l'infection fœtale. *Le Point Vétérinaire*, **249**, 24-29.
- VANTSIS J, BARLOW R, GARDINER A, LINKLATER K (1980a). The effects of challenge with homologous and heterologous strains of Border disease virus on ewes with previous experience of the disease. *Journal of Comparative Pathology*, **90**, 39–45.
- VANTSIS J, RENNIE J, GARDINER A, WELLS P, BARLOW R, MARTIN W (1980b). Immunization against Border Disease. *Journal of Comparative Pathology*, **90**, 349–354.
- VILCEK S, PATON DJ (2000). A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. *Veterinary Research*, **31**, 437–445.
- VILCEK S, DURKOVIC B, KOLESAROVA 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. *Veterinary Research*, **35**, 609–615.
- Virus Taxonomy: 2015 Release (2015) *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponible sur http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20152499
- WANG F-I, DENG M-C, HUANG Y-L, CHANG C-Y (2015). Structures and Functions of Pestivirus Glycoproteins: Not Simply Surface Matters. *Viruses*, 3506–3529.
- WESTAWAY E, BRINTON M, GAIDAMOVICH S et al. (1985). Flaviviridae. In: *Intervirology*, Vol. 24, pp. 183–192.

ANNEXES

Annexe 1 : Lots expérimentaux

Lot 1 : Vaccin Mucosiffa®

Vaccinées	Non vaccinées
119	197
196	781
235	890
346	2296
528	7204
933	9168
2159	
3106	
3116	
4160	
5120	

Lot 2 : Vaccin Bovela®

Vaccinées	Non vaccinées
0139	0104
249	0155
262	182
404	880
445	976
535	1177
939	
1105	
4129	
5124	
4495	

Lot 3 : vaccin Bovilis BVD®

Vaccinées	Non vaccinées
019	046
180	172
251	312
334	943
367	2107
391	3216
997	4112
1173	
3255	
5255	
9198	

Annexe 2 : Calendrier des prélèvements

Date	Jour	Événement	Sérologie	Hématologie	PCR sang	Ecouvillons nasaux
06/06/2016	J-119	Vaccination	x			
04/07/2016	J-91	Vaccination	x			
18/07/2016	J-77		x			
25/07/2016	J-70		x			
03/08/2016	J-61		x			
12/08/2016	J-52	IA	x		x	
02/09/2016	J-31		x			
21/09/2016	J-12	Arrivée ENVT	x			
26/09/2016	J-7				x	
30/09/2016	J-3			x		
02/10/2016	J-1			x		
03/10/2016	J0	Inoculation	x	x	x	x
04/10/2016	J1			x	x	
05/10/2016	J2			x	x	x
06/10/2016	J3			x	x	
07/10/2016	J4			x	x	x
08/10/2016	J5				x	
09/10/2016	J6			x	x	x
10/10/2016	J7		x	x	x	
11/10/2016	J8			x	x	x
12/10/2016	J9				x	
13/10/2016	J10			x	x	
14/10/2016	J11			x		
15/10/2016	J12				x	
17/10/2016	J14		x	x	x	
24/10/2016	J21		x			
31/10/2016	J28		x			
07/11/2016	J35		x			
14/11/2016	J42		x			
28/11/2016	J56		x			
07/12/2016	J65	Autopsie Loge 1	x		x	
08/12/2016	J66	Autopsie Loge 2	x		x	
10/12/2016	J70	Autopsie Loge 3	x		x	

Annexe 3 : Protocole kit ELISA ID Screen® BVD p80 Antibody One-Step

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 400 µL de **Solution de lavage**. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages. Après le dernier lavage, il est recommandé de vider la plaque par retournement et de sécher les puits en tapant la plaque sur un papier absorbant ou sur un linge sec.
- 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 inférieur à 30% du DO_{CN} : **DO_{CP} / DO_{CN} < 0,3**

Interprétation

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

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

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ARN du sang à partir du kit NucleoSpin RNA blood® (Macherey-Nagel)

RNA isolation from 200 µL blood

1) Lyse blood

- Provide **200 µL whole blood** in a collection tube (2 mL, with lid)
- Add **200 µL Lysis Buffer DL** to the tube and close the lid. Mix. If necessary, shortly spin to clean the lid.
- Add **5 µL Liquid Proteinase K** and close the lid.
- Incubate **3-5 min at room temperature** (18-25°C) vigorously shaking the tube on a shaker (e.g., Eppendorf Thermoshaker, 1,400 rpm)
- Centrifuge briefly to clean the lid (~ **1 s at ~ 2,000 x g**). Short spin only!

2) Adjust RNA binding conditions

- Add **200 µL 70% ethanol** to the tube and mix vigorously.

Note: It is important thoroughly mix the ethanol with the lysate. Recommended: Place tubes in a rack with lid. Close the rack lid and strongly shake the assembly. Alternatively, pipette the solution up and down ~ 5 times.

- Centrifuge briefly to clean the lid (~ **1 s at ~ 2,000 x g**). Short spin only!

3) Bind RNA

- Adjust pipette to **610 µL** and transfer lysate into a **NucleoSpin® RNA Blood Column** placed in a collection tube.

Note: Do not pipette more than 610 µL into the spin column, this will cause the column to overflow! Avoid formation of foam and aerosols! Avoid wetting the rim (edge) of the column.

- Centrifuge **30 s at 11,000 x g**. discard flow-through and collection tube. Place the column in a new collection tube (2 mL).

4) Desalt silica membrane

- Add **350 µL MDB** (membrane Desalting Buffer) onto the column and centrifuge **30 s at 11,000 x g**.

Note: after centrifugation, the column can remain in the collection tube including the flow-through! The flow-through might be slightly brown. The flow-through can remain in the tube without disturbing DNA digestion.

5) Digest DNA

- Add **95 µL rDNA** onto the column. Incubate at **room temperature** for 15 min.

Note: centrifugation after incubation is not necessary.

6) Wash and dry silica membrane

1st wash: Add **200 µL Buffer RB2** to the NucleoSpin® RNA Blood Column. Centrifuge for **30 s at 11,000 x g**. Discard flow-through and collection tube and place the column into a new collection tube (2 mL).

Buffer RB2 will inactivate the rDNase.

2nd wash: Add **600 µL Buffer RB3** to the NucleoSpin® RNA Blood Column. Centrifuge for **30 s at 11,000 x g**. Discard flow-through and collection tube and place the column into a new collection tube (2 mL; provided).

Note: make sure that residual buffer from the previous steps is washed away with Buffer RB3, especially if the lysate has been in contact with the inner rim of the column during loading of the lysate onto the column. For efficient washing of the inner rim flush it with Buffer RB3.

3rd wash: Add **250 µL Buffer RB3** to the NucleoSpin® RNA Blood Column. Centrifuge for **2 min at 11,000 x g**. in this step, ethanol is removed from the column.

Place the column into a nuclease-free collection tube (1,5 mL) and discard the collection tube with the flow-through from the previous step.

If for any reason the liquid level in the collection tube has reached the NucleoSpin® Blood Column after centrifugation, discard flow-through, and centrifuge again.

7) Elute RNA

Add **60 µL RNase-free H₂O** onto the column and centrifuge **30 s at 11,000 x g**. The RNA is eluted into the collection tube.

Annexe 5 : Protocole d'extraction de l'ARN des tissus à partir du kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen)

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 μ l or 600 μ l 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 μ l 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 $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Discard the flow-through.[†]**

Reuse the collection tube in step 7.

If the sample volume exceeds 700 μ l, 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 μ l Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ 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 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ 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 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ 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 μ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to elute the RNA.**

12. **If the expected RNA yield is >30 μ g, repeat step 11 using another 30–50 μ l 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 RT-PCR en temps réel à partir du kit ID Gene® BVD/BD Triplex

Informations générales

• **Caractéristiques**

Le kit ID Gene™ BVD/BD Triplex (IDBVD) est un kit de détection par RT-PCR en temps réel qui permet d'amplifier une séquence cible du génome des Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVD) et Border Disease (BD).

Il s'agit d'un **système triplex qualitatif** qui permet, pour chaque échantillon, l'amplification simultanée de l'ARN des virus BVD et BD, d'un témoin interne endogène et d'un témoin interne exogène.

Le kit IDBVD contient les témoins positifs cible (TPC-BVD) et non cible exogène (NTPC-BVD) qui doivent être extraits de la même manière que les échantillons. Ils permettent ainsi d'évaluer l'efficacité de l'extraction et de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR.

Un témoin positif cible adapté aux échantillons de biopsies auriculaires (TPC-EN-BVD) est disponible, contactez genetics@id-vet.com pour plus d'informations.

Ce kit est utilisable sur sérum, sang total prélevé sur EDTA, lait et sur échantillons solides tels que les rates et biopsies auriculaires de ruminants, testés individuellement ou en mélange.

• **Composition du kit et conditions de stockage**

Le kit IDBVD contient les réactifs présentés dans le tableau ci-dessous.

Référence	Composant	Volume	Description
TPC-BVD	Témoin Positif Cible	550 µl 1 flacon	Sang total positif BVD lyophilisé et calibré entre 10 et 100 fois la limite de détection de la méthode (LD ₅₀). Pastille lyophilisée à reprendre dans 550 µl d'eau distillée ou Nuclease-free.
NTPC-BVD	Témoin Positif Non Cible	2200 µl 1 flacon	Souche virale non pathogène inactivée. Pastille lyophilisée à reprendre dans 2200 µl d'eau distillée ou Nuclease-free.
ARM-BVD	Mélange Réactionnel d'Amplification	400 µl 1 / 2 tubes (bouchon blanc)	Mélange Réactionnel contenant la Reverse Transcriptase, la Taq Polymérase et les oligonucléotides pour la détection des virus BVD/BD ainsi que les témoins positifs non cibles endogène et exogène.

Tous ces composants sont à conserver à ≤ -16°C. Il est recommandé de préparer des aliquotes (minimum 100 µl) afin de respecter 3 cycles de décongélation maximum.

• **Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit**

Le matériel utilisé doit être de qualité adaptée à la biologie moléculaire.

Instrument d'amplification :

Thermocycleur Temps Réel permettant de lire les longueurs d'ondes suivantes : 525 nm (FAM), 548 nm (Yakima Yellow, idem VIC) et 650 nm (Cy5).

Exemples de thermocycleurs compatibles : CFX96, Chromo4 Biorad, LC480 I, LC480 II, LC96 Roche, 7500 AB, Rotorgen Qiagen. Veuillez nous contacter pour l'utilisation d'autres thermocycleurs.

Consommables :

- Pipettes de précision capables de délivrer des volumes de 1 µl à 1000 µl avec pointes Nuclease-free à filtres
- Tubes 1,5 ml
- Plaques PCR 96 puits, barrettes ou microtubes PCR de qualité optique compatibles avec le thermocycleur utilisé et films adhésifs ou bouchons adaptés

Réactifs :

- Eau distillée ou Nuclease-free
- Témoin Positif Cible pour biopsies auriculaires (TPC-EN-BVD), contactez genetics@id-vet.com pour plus d'informations.

Remarques et précautions d'emploi

Le matériel utilisé contenant moins de 0.1% de substances dangereuses ou cancérigènes, les fiches de données de sécurité (FDS) ne sont pas exigées. Cependant, il est recommandé de prendre les précautions appropriées avec tout produit biochimique et de porter des équipements adaptés.

Contrôles d'extraction et d'amplification

• **Témoins positifs**

Le kit d'amplification IDBVD contient les témoins positifs suivants:

- Témoin Positif Non Cible exogène (NTPC-BVD) :

Il s'agit d'une souche virale non pathogène, inactivée, faisant office de mime de la cible.

Ce témoin permet d'évaluer l'efficacité de l'extraction d'un échantillon et de mettre en évidence la présence d'inhibiteurs de l'étape d'amplification. Il est ajouté à tous les échantillons, y compris les témoins, avant extraction.

- Témoin Positif Cible (TPC-BVD) :

Il s'agit d'un échantillon positif contenant la cible, calibré entre 10 et 100 fois la limite de détection de la méthode. Il permet de valider l'extraction et l'amplification de la cible.

Ce témoin est préparé et extrait de la même manière que les échantillons à tester.

- Témoin Positif Non Cible endogène (NTPCen) :

Ce témoin est présent de manière constitutionnelle dans les cellules de l'échantillon testé. Il permet de valider la lyse cellulaire et l'amplification du gène non cible. Il permet également de valider la présence de cellules et donne une indication sur l'état du prélèvement.

• Témoins négatifs

Il est recommandé d'inclure les témoins négatifs suivants :

- Témoin négatif d'extraction (NEC)

Il est conseillé d'inclure un témoin négatif d'extraction NEC à chaque cycle d'analyse.

Ce témoin est préparé et extrait de la même manière que les échantillons à tester mais il ne contient pas d'échantillon. Le volume occupé par l'échantillon peut être remplacé par une matrice négative ou de l'eau Nuclease-free.

- Témoin négatif d'amplification (NAC)

Ce témoin correspond au dépôt de 8 µl de mélange réactionnel d'amplification (ARM-BVD) et 2 ou 5 µl d'eau Nuclease-free. Il est inclus dans chaque cycle d'analyse et permet de contrôler l'absence de contaminant aérosol.

Mode opératoire

• Extraction de l'ARN viral

L'ARN viral doit être extrait des échantillons avant d'être amplifié par RT-PCR en temps réel.

Pour cela, IDVet Genetics recommande, au choix, une gamme de kits d'extraction validés selon la norme NF U47-600 :

Description	Nom du produit	Code produit
Système d'extraction en billes magnétiques	ID Gene™ Mag Universal Extraction Kit	MAG192/MAG384
	ID Gene™ Mag Fast Extraction Kit	MAGFAST384
Système d'extraction en colonnes	ID Gene™ Spin Universal Extraction Kit	SPIN50/SPIN250
Système de lyse directe pour biopsies auriculaires	ID Gene™ Direct lysis of Ear Notch Samples	ENEZPREP

Note : Veuillez nous consulter si d'autres systèmes d'extraction non validés selon la norme NF U47-600 sont utilisés.

• Extraction des témoins

Les volumes de prise d'essai pour l'extraction des témoins sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Important : - Les volumes indiqués sont valables quel que soit le système d'extraction utilisé.

- Les témoins doivent être extraits en même temps que les échantillons à tester.

Témoin	Volume
TPC-BVD	50 µl
NTPC-BVD	20 µl à ajouter au TPC-BVD, au NEC et à chaque échantillon

Note : Si le NEC est préparé avec une matrice négative solide nécessitant un prétraitement, se reporter à la notice du kit d'extraction correspondant pour la préparation de ce témoin.

• Préparation de la réaction d'amplification par RT-PCR en temps réel

- Préparer un plan d'analyse des échantillons et contrôles, en prenant soin si possible d'éloigner le contrôle positif (TPC-BVD) des autres échantillons.
- Décongeler le kit IDBVD idéalement à +5°C (+/- 3°C) (portoir adapté réfrigéré ou autre), ou à température ambiante (+21°C ± 5°C) s'il est utilisé dès que la décongélation est complète.
- Homogénéiser le tube ARM-BVD (vortex) et le centrifuger brièvement.
- Distribuer 8 µl d'ARM-BVD par puits (barrette ou microplaque adaptée au thermocycleur utilisé)
- Ajouter dans le mix réactionnel* :
 - 2 ou 5 µl d'ARN extrait de chaque échantillon à analyser
 - 2 ou 5 µl d'ARN extrait de TPC-BVD
 - 2 ou 5 µl d'extrait de NEC
 - 2 ou 5 µl d'eau Nuclease-free (NAC)

* Possibilité de choisir le volume de prise d'essai : 2 µl ou 5 µl.
- Couvrir la plaque ou les barrettes avec un film adhésif ou des bouchons adaptés.

• Programmation de la phase d'amplification

- Programmer sur le thermocycleur la lecture des détecteurs suivants pour chacun des puits à analyser:

Cible	Fluorophore	λ (nm)	Quencher
BVD	FAM	495-525	non fluorescent
NTPC	Cy5	649	non fluorescent
NTPCen	VIC / Yakima Yellow	426-548	non fluorescent (compatible VIC/HEX)

Note : Pour les appareils nécessitant une référence interne, le mélange réactionnel d'amplification IDBVD contient du ROX.

2. Choisir parmi les 2 programmes d'amplification validés par IDvet Genetics :
- Un programme classique qui permet de réaliser les PCR de différents fournisseurs lors d'une même séance.
 - Un programme rapide

Les étapes pour chaque programme sont décrites dans le tableau ci-dessous :

	Programme d'amplification classique	Programme d'amplification rapide	Nombre de cycles
(1) Reverse transcription	10 min 45°C	10 min 45°C	1
(2) Activation de la polymérase	10 min à 95°C	2 min à 95°C	1
(3) Dénaturation de l'ADN / Elongation	15 secondes 95°C	10 secondes 95°C	40
	60 secondes 60°C	30 secondes 60°C*	

Note : La lecture de la fluorescence est faite à la fin de la phase d'élongation à 60°C.

3. Sélectionner un volume final de **10 ou 13 µl par PCR**.
Si différents volumes sont combinés lors d'une même séance, indiquer au thermocycleur le plus grand volume de la plaque.
4. Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme.

Validation et interprétation des résultats

• **Validation de l'essai**

L'interprétation des résultats est faite sur la valeur des Cq de chaque échantillon obtenue pour chacun des détecteurs.

Le test est validé selon les critères suivants : **si l'un des critères n'est pas accepté, l'analyse ne peut pas être interprétée de manière fiable.**

Témoïn	Résultat attendu	Critère d'acceptabilité
TPC-BVD	Détecté en FAM	Se référer à la valeur de Cq donnée dans la fiche de contrôle qualité du lot correspondant
NTPC-BVD	Détecté dans chaque échantillon en Cy5	+ 3 Cq par rapport à la valeur de Cq du NEC
NTPCen	Détecté dans chaque échantillon en VIC	Présence d'une courbe caractéristique
NEC	Détecté en Cy5 uniquement si utilisation d'eau	+ 3 Cq par rapport à la valeur de Cq donnée dans la fiche de contrôle qualité du lot correspondant
	Détecté en Cy5 et VIC si utilisation d'une matrice négative	Présence d'une courbe caractéristique
NAC	Aucune détection	Absence totale de courbe caractéristique

Note : Le TPC-BVD peut être utilisé comme sentinelle du laboratoire car il s'agit d'un témoin calibré en limite de détection.

• **Proposition d'interprétation des résultats**

Pour chaque échantillon analysé, les résultats peuvent être interprétés selon les propositions suivantes :

Echantillon	Signal BVD	Signal NTPC-BVD	Interprétation
Individuel	Détecté	Détecté ou Non détecté	Animal positif en BVD ou BD Confirmation du statut IPI après recontrôle au bout de 3 semaines
	Non détecté	Non détecté ou Cq _{NTPC-BVD} > Cq _{NEC} + 3	Réaction PCR inhibée
	Non détecté	Détecté	Animal négatif en BVD ou BD
Mélange	Détecté	Détecté ou Non détecté	Au moins 1 animal du mélange est positif en BVD ou BD Nécessité de tester dans un second temps chaque animal individuellement.
	Non détecté	Non détecté ou Cq _{NTPC-BVD} > Cq _{NEC} + 3	Réaction PCR inhibée
	Non détecté	Détecté	Mélange d'animaux négatifs

Echantillons non valides:

- Si le NTPCen n'est pas détecté, un problème est survenu lors du dépôt ou de l'extraction de l'échantillon. Dans ce cas, répéter l'analyse à partir de la phase d'extraction de l'échantillon.

- Si le NTPC-BVD n'est pas détecté mais que l'échantillon présente un signal BVD, dans ce cas l'échantillon est considéré comme positif.

- Si Cq_{NTPC-BVD} > Cq_{NEC} + 3 et que l'échantillon ne présente pas de signal BVD, la réaction est inhibée. Dans ce cas, l'échantillon doit être testé de nouveau en suivant la procédure ci-dessous.

Procédure à suivre en cas de réaction PCR inhibée:

1. Diluer l'extrait d'ARN au 10^{ème} dans de l'eau Nuclease-free.
2. Répéter la réaction d'amplification sur 2 µl ou 5 µl d'ARN dilué.
3. Si le NTPC-BVD est détecté, le résultat peut être interprété selon le tableau ci-dessus.
4. Si le NTPC-BVD n'est pas détecté, l'échantillon est à extraire de nouveau, ou le résultat est rendu ininterprétable.

Support technique et documentation

Pour toutes questions ou support technique, veuillez nous contacter à l'adresse suivante: genetics@id-vet.com

Pour toutes autres informations, visiter le site www.id-vet.com

Annexe 7 : Protocole RT-qPCR à partir du kit LSI VetMax BVDV Screening® (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™	NFQ (Non-Fluorescent Quencher)
IPC BVD	VIC®	TAMRA™ *

Référence passive: ROX™ *

* Les fluorophores TAMRA™ et ROX™ 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 8 : Analyses statistiques des températures moyennes (GraphPad (La Jolla, USA) par two-way ANOVA avec mesures répétées et correction de Bonferroni. ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$.

Jours	Mucosiffa® / Bovela®	Mucosiffa® / Bovilis BVD®	Mucosiffa® / Contrôles	Bovela® / Bovilis BVD®	Bovela® / Contrôles	Bovilis BVD® / Contrôles
J1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J2	ns	*	ns	*	ns	*
J3	ns	ns	ns	*	ns	ns
J4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J6	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J7	ns	ns	ns	ns	***	***
J8	ns	***	**	ns	ns	ns
J9	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J10	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J11	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J12	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J13	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J14	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Annexe 9 : Analyses statistiques des variations significatives des lignées cellulaires par rapport à une ligne de base calculée à partir des mesures effectuées à J-3, J-1 et J0 par one-way ANOVA (GraphPad, La Jolla, USA) * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001, **** : p<0,0001.

		Leucocytes	Lymphocytes	Monocytes	Thrombocytes
Mucosiffa®	*	J2			
	**	J3, J4			
	***		J2		
	****		J3, J4	J6, J7, J8	
Bovela®	*				J11
	**			J4, J8	

	****	J2, J3, J4	J2, J3, J4	J6, J7	
Bovilis BVD®	*	J2, J6, J7	J14		
	**	J4	J7		
	***		J2, J6		
	****	J3	J3, J4	J6, J7, J8	
Contrôles	*		J11		
	**				J7
	***		J1	J6, J7	J3
	****	J2, J3, J4, J6, J7, J8, J11, J14	J2, J3, J4, J6, J7, J8, J14	J8, J10	


Annexe 10 : Analyses statistiques des pourcentages de monocytes ramenés à une ligne de base (GraphPad (La Jolla, USA) par two-way ANOVA avec mesures répétées et correction de Bonferroni. ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$, **** : $p < 0,0001$.

Jours	Mucosiffa® / Bovela®	Mucosiffa® / Bovilis BVD®	Mucosiffa® / Contrôles	Bovela® / Bovilis BVD®	Bovela® / Contrôles	Bovilis BVD® / Contrôles
J-3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J0	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J1	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J6	ns	*	**	ns	*	ns
J7	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J8	*	ns	ns	**	****	ns
J10	ns	ns	*	ns	****	*
J11	ns	ns	ns	ns	ns	ns
J14	ns	ns	ns	ns	ns	ns

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 Mickaël COMBES intitulée « **Protection fœtale contre le BDV induite par les vaccins BVD : étude d'efficacité** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 19 octobre 2017
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 Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRÉ-OBRECHT



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

NOM : COMBES

PRENOM : MICKAEL

TITRE : PROTECTION FŒTALE CONTRE LE VIRUS DE LA MALADIE DE LA FRONTIERE INDUITE PAR LES VACCINS CONTRE LA DIARRHEE VIRALE BOVINE : ETUDE D'EFFICACITE CHEZ LES OVINS

RESUME :

La maladie de la frontière (border disease) est une maladie virale des ovins due à un pestivirus de la famille des Flaviviridae. Ce genre regroupe le virus de la fièvre porcine classique (CSFV), les virus de la diarrhée virale bovine de type 1 et 2 (BVDV) et le virus de la border disease (BDV). En France, la reprise de la circulation virale du BDV, observée dans le bassin de Roquefort, depuis 2009, est responsable de pertes économiques importantes dans les élevages ovins. Le contrôle de la maladie repose sur un plan d'épidémiosurveillance ainsi que des mesures de biosécurité, de prophylaxie et d'assainissement. La prophylaxie passe par la vaccination des femelles reproductrices dans le but de protéger les fœtus pendant la gestation et d'éviter la naissance d'agneaux IPI (Infectés Permanents Immunotolérants) qui représentent le réservoir majeur du virus. En l'absence de vaccin à AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour les ovins, la vaccination est réalisée avec des vaccins bovins dirigés contre le BVDV. Cependant, actuellement, aucune étude n'a permis d'évaluer l'efficacité de cette vaccination. Le but de cette étude est donc de tester la protection fœtale permise par l'administration de trois vaccins du commerce (Bovela®, Bovilis-BVD® et Mucosiffa®), utilisés à demi-dose chez les ovins. Les fœtus prélevés sur les brebis vaccinées puis infectées expérimentalement avec une souche de BDV de génotype 6 n'ont pas été protégés puisqu'ils sont quasiment tous IPI. Ces résultats sont discutés par rapport aux données scientifiques existantes et par rapport à la méthodologie utilisée.

MOTS CLES : OVINS, BORDER DISEASE VIRUS, PESTIVIRUS, INFECTES PERMANENTS IMMUNOTOLERANTS, VACCINATION, FŒTUS

.....

TITLE: FETAL PROTECTION AGAINST BORDER DISEASE VIRUS WITH BOVINE VIRAL DIARRHEA VACCINES: EFFICACY ASSESSMENT ON SHEEP

ABSTRACT:

Border disease is a viral disease caused by a pestivirus of the Flaviviridae family. This genus includes classical swine fever virus (CSFV), bovine viral diarrhoea viruses type 1 and 2 (BVDV) and border disease virus (BDV). In France, the resumption of BDV circulation, documented in the Roquefort basin, is responsible for significant economic losses in sheep farms. Disease control is based on epidemiological surveillance as well as biosafety, preventive and sanitation measures. Prophylaxis implies the vaccination of reproductive females in order to protect fetus during gestation and to avoid the birth of PI (persistently infected) lambs which represent the major virus reservoir. As no vaccine with ovine AMM (marketing authorization) exist, vaccination is carried out using bovine vaccines against BVDV. However, at present, no study has assessed the efficacy of this vaccination protocol. The aim of this study is to test the foetal protection of sheep provided by the injection of three commercial vaccines (Bovela®, Bovilis-BVD and Mucosiffa®) at half doses. Fetuses extracted in vaccinated then infected ewes, with a BDV-6 strain, have not been protected from infection since all of them except one are PI. Results are discussed in relation to existing scientific data and to the method used.

KEYWORDS: SHEEP, BORDER DISEASE VIRUS, PESTIVIRUS, PERSISTENTLY INFECTED, VACCINATION, FETUS