



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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 27306

To cite this version:

Mindeguia, Marie . *Protection fœtale croisée entre pestivirus des ruminants : rôle de la réponse post-vaccinale en anticorps neutralisants*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 103 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

PROTECTION FŒTALE CROISEE ENTRE *PESTIVIRUS* DES RUMINANTS : ROLE DE LA REponse POST- VACCINALE EN ANTICORPS NEUTRALISANTS

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

MINDEGUIA Marie
Née, le 19/09/1994 à BAYONNE (64)

Directeur de thèse : M. Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :

M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Gilles MEYER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Renaud MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur: Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE
EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°
CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2°
CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT
AGRICOLE**

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

**MAITRES DE CONFERENCES HORS
CLASSE**

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe
normale)**

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

**ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES
VETERINAIRES**

Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET

Professeur des Universités
Praticien Hospitalier au CHU de Toulouse
Virologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Hommages respectueux.

A Monsieur le docteur Gilles MEYER

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Pathologie des ruminants

Qui m'a guidée tout au long de ce travail avec une disponibilité sans réserve.

Sincères remerciements.

A Monsieur le docteur Renaud Maillard

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Pathologie des ruminants

Qui a aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Sincères remerciements.

TABLE DES MATIÈRES

Table des illustrations.....	9
Liste des tableaux.....	10
INTRODUCTION.....	12
Première partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. Les Pestivirus chez les ruminants	14
1.1. Historique	14
1.2. Classification	14
1.2.1. Au sein des Pestivirus	14
1.2.2. Au sein des BVDV	17
1.2.3. Au sein du BDV	17
1.3. Organisation structurale et génomique	18
1.3.1. Génome	18
1.3.2. Protéines virales.....	18
1.4. Diversité des pestivirus.....	22
1.4.1. Spectre d'hôtes	22
1.4.2. Diversité biologique et notion de biotype	22
2. La maladie de la frontière	24
2.1. Historique et importance	24
2.2. Mécanismes de transmission	25
2.2.1. Sources animales	25
2.2.2. Matières virulentes	25
2.3. Transmission	26
2.3.1. Transmission horizontale.....	26
2.3.2. Transmission verticale	26
2.4. Pathogénie et expression clinique.....	26
2.4.1. Infection transitoire.....	26
2.4.2. Infection fœtale.....	27
2.4.3. Cas particulier des IPI.....	29
2.5. Diagnostic.....	30
2.5.1. Diagnostic Différentiel	30
2.5.2. Diagnostic lésionnel	31
2.5.3. Diagnostic de laboratoire	32
2.6. Contrôle de la maladie	40
2.6.1. Prophylaxie Sanitaire et biosécurité.....	40
2.6.2. Un seul cas de gestion intégrée de la pestivirose Ovine : l'Aveyron.....	41

2.6.3.	Suivi sérologique	43
3.	Réponse immunitaire et protection vaccinale	43
3.1.	Réponse immunitaire humorale : le rôle des anticorps	43
3.2.	Réponse immunitaire cellulaire	45
3.2.1.	Réponse innée.....	45
3.2.2.	Réponse cellulaire spécifique lymphocytaire.....	48
4.	Vaccins et protection contre le BVDV	50
4.1.	Objectifs : Protection transitoire et fœtale	50
4.2.	Vaccins disponibles en France.....	50
4.3.	Efficacités des Vaccins sur le Marché	53
4.3.1.	Efficacité globale.....	53
4.3.2.	Efficacité croisée BVDV-1/ BVDV-2	54
4.4.	Vaccins BVDV et protection croisée contre le BDV	55
4.4.1.	La pratique de terrain.....	55
4.4.2.	Les Données préliminaires.....	58
4.4.3.	Etude de protection fœtale en conditions expérimentales menée à l'ENVT en 2016 (thèse de M. Combes).....	58
Deuxième partie : PARTIE EXPÉRIMENTALE.....		65
1.	Objectif :	66
2.	Matériel et Méthodes.....	66
2.1.	Cultures cellulaires	66
2.2.	Réalisation de plaques de cellules.....	67
2.3.	Virus et titrage	67
2.4.	Anticorps disponibles	68
2.5.	Coloration disponible	68
2.6.	Sérums étudiés.....	68
2.7.	Protocole de séroneutralisation.....	69
3.	Résultats.....	72
3.1.	Première mise au point de la méthode IPMA de détection du BDV en cultures cellulaires MDBK et choix des paramètres	72
3.1.1.	Infection par les différents virus	72
3.1.2.	Choix des anticorps primaires et secondaires	74
3.1.3.	Méthode de fixation-Perméabilisation-coloration des cellules infectées.....	75
3.1.4.	Principaux résultats obtenus lors de la mise au point du protocole d'IPMA	76
3.2.	Mise au point de la technique IPMA	77
3.2.1.	Protocole	78

3.2.2. Principaux résultats obtenus lors de la mise au point du protocole d'IPMA	80
3.3. Protocole définitif.....	81
3.4. Résultats de la séroneutralisation vis-à-vis du BDV-6.....	83
3.4.1. Résultats obtenus par loge	83
- Loge 1 : Vaccination par Mucosiffa® (vaccin atténué BVDV-1)	83
- Loge 2 : vaccination par Bovela® (vaccin atténué BVDV-1 et BVDV-2).....	84
- Loge 3 : Vaccination par Bovilis-BVD ® (vaccin inactivé BVDV-1)	85
3.4.2. Résultats par groupes pour la séroneutralisation vis-à-vis du BDV-6.....	86
3.4.3 Résultats comparés des titres neutralisant le BDV-6 et le BVDV-1 (souche NADL).....	87
3.4.5 Analyses statistiques et analyses des résultats	88
4. Discussion	89
4.1. Mise au point de la technique IPMA	90
4.2. Réponse humorale neutralisante et protection fœtale hétérologue	91
CONCLUSION.....	95

Table des illustrations

Figure 1: Classement phylogénétiques des Pestivirus selon (Smith et al., 2017).....	16
Figure 2 : Organisation du génome pestiviral et formation de la polyprotéine (ANON., 2020)	18
Figure 3 : Schématisation de l'ELISA antigène (Meyer, séminaire ENVT 2007)	35
Figure 4 : Schématisation de l'ELISA indirecte (Meyer, séminaire ENVT 2007).....	39
Figure 5 : Schématisation de l'ELISA compétition (Meyer, séminaire ENVT 2007).....	39
Figure 6: Frise chronologique expérimentation Mickael Combes (thèse ENVT, M. Combes).....	60
Figure 7 : Exemple : Première ligne des cônes à dilution	70
Figure 8 : Exemple 2 : Première ligne des cônes à dilution	70
Figure 9 : Exemple 3 : Première ligne des cônes à dilution	71
Figure 10 : Répartition des sérums au sein des plaques	71
Figure 11: Protocole d'infection virale.....	73
Figure 12: Plans de plaques lors de l'infection virale	73
Figure 13 : Mise en place de l'anticorps primaire	74
Figure 14 : Mise en place de l'anticorps secondaire	74
Figure 15 : Plans de plaques finaux	75
Figure 16 : Protocole final : Plan de plaque lors d'infection virale.....	78
Figure 17 : Protocole final : Mise en place de l'anticorps primaire.....	79
Figure 18 : Protocole final : Mise en place de l'anticorps secondaire	79
Figure 19 : Protocole final: Plan de plaque obtenu	80
Figure 20 : Exemples de lecture de puits positifs	81
Figure 21 : Valeur et représentation graphique des titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 obtenus chez les brebis vaccinées par Mucosiffa ® et non vaccinées le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérimentation (J66).....	83
Figure 22: Valeur et représentation graphique des titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 obtenus chez les brebis vaccinées par Bovela ® et non vaccinées le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérimentation (J66).....	84
Figure 23 : Valeur et représentation graphique des titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 obtenus chez les brebis vaccinées par Bovilis-BVD ® et non vaccinées le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérimentation (J66)	85

Figure 24: Titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 chez les brebis vaccinées par Mucosiffa® (en vert), Bovela® (en orange), Bovilis BVD® (en violet) ou non vaccinées (en gris), le jour de la vaccination (J-119), le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérimentation (J66).86

Figure 25 : Titres en anticorps séroneutralisant le BDV-6 (souche 6390) ou le BVDV-1 (souche NADL) chez les brebis vaccinées par Mucosiffa® (en vert), Bovela® (en orange), Bovilis BVD® (en violet) ou non vaccinées (en gris) le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérimentation (J66).87

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques des souches cp et ncp selon l'observatoire de la BVD.....	23
Tableau 2 : Conséquences de l'infection en fonction du stade de gestation.....	28
Tableau 3 : Diagnostic différentiel des avortements chez les petits ruminants	30
Tableau 4 : Vaccins disponibles sur le marché français	52
Tableau 5 : Pourcentage de brebis séropositives dans les différents lots en fonction du temps (nombre brebis/effectif	62
Tableau 6: Identification des brebis étudiées.....	69
Tableau 7 : Comparaison des deux méthodes utilisées	76
Tableau 8: Protocole définitif pour l'infection	82
Tableau 9 : Protocole définitif pour la manipulation	82
Tableau 10 : Tests statistiques (ANOVA) de comparaison entre les groupes de brebis et les deux types de séroneutralisation (BDV-6 et BVDV-1) pour le jour J0 (juste avant l'inoculation d'épreuve et 119 jours après la première injection du vaccin Bovilis BVD®). ns : non significatif ; * : p<0,05 ; ** p<0,005 ; *** p<0,001 ; **** p< 0,0001	88

LISTE DES ABREVIATIONS

AAANE : Acide Aminé Non Essentiel
ANOVA : Analyse de Variance
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique
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
kDa : Kilo Dalton
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

INTRODUCTION

Depuis la mise en évidence de cette maladie à la frontière entre l'Angleterre et le Pays de Galles en 1959, la Border disease est actuellement présente dans le monde entier avec une forte prévalence au sein des élevages ovins. Ses répercussions sont importantes, notamment du fait des troubles de la reproduction induits chez les ovins adultes, de la mortalité chez les agneaux et par conséquent des pertes économiques majeures qui en découlent.

Cette maladie est sur plusieurs points semblable à une autre pestivirus, la diarrhée virale bovine (BVDV). Leurs gestions sont similaires, en effet, l'accent est mis sur l'identification et l'élimination des agneaux infectés permanents immunotolérants, la mise en place de mesures de biosécurité et enfin la vaccination pour une protection des fœtus lors de l'infection des brebis gestantes. Actuellement, il n'existe pas de vaccins mis sur le marché pour la border disease par conséquent ce sont des vaccins commercialisés pour le BVDV qui sont utilisés par les éleveurs hors AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) selon le principe de la cascade à demi voire quart de dose. L'utilisation de ces vaccins n'avait pas été prouvée scientifiquement et ne reposait que sur l'hypothèse d'une protection croisée entre ces deux pestivirus. Or, une étude menée en 2016 par Mickael Combes a permis de montrer l'absence de protection fœtale après vaccination avec 3 vaccins utilisés pour le BVDV (Bovela®, Bovilis-BVD® et Mucosiffa®) et challenge viral avec une souche BDV-6 6390.

L'objectif de cette étude était de mettre en place un protocole visant à déterminer un titre en anticorps séroneutralisant le BVDV et le BDV, induit par les trois vaccins présentés ci-dessus et de déterminer si l'absence d'efficacité des vaccins BVDV est due à un défaut de réponse immunitaire humorale croisée entre les deux pestivirus.

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

Première partie :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Pestivirus chez les ruminants

1.1. Historique

Le genre pestivirus de la famille des flaviviridae comprend 11 espèces principales dont 4 historiques et considérées comme majeures : 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).

La fièvre classique porcine aussi connue sous le nom de choléra porcine a été le premier pestivirus identifié en Ohio en 1833. Le virus aurait émergé à ce moment-là d'un saut d'espèce par une mutation génétique au sein d'un autre pestivirus chez une autre espèce hôte.

Très tôt dans le 20^{ème} siècle, comme la production intensive de porc était croissante, la fièvre porcine classique est alors devenue la maladie la plus importante dans cette espèce dans les pays développés. Les programmes d'éradication ont été tellement efficaces qu'aujourd'hui, un grand nombre de pays développés sont indemnes de cette maladie. La réintroduction du virus, par des porcs sauvages infectés, représente actuellement la principale menace pour les troupeaux domestiques (ANON., 2017).

Olafson *et al.* ont été les premiers à décrire le virus de la diarrhée virale bovine dans l'état de New-York en 1946. La maladie des muqueuses (MD), une autre entité clinique causée par le même virus, mais avec une sévérité et une incidence différente au sein du troupeau, a été décrite en 1953. Ce n'est qu'en 1957 que l'étiologie a été identifiée, le même virus BVD étant reconnu responsable des deux maladies (Schweizer, Peterhans, 2014).

Enfin, la Border disease a été décrite au départ en 1959 chez les moutons dans la région frontalière entre le Pays de Galles et l'Angleterre, d'où le nom de Border, et l'infection est encore à l'heure actuelle commune au sein des systèmes de production intensifs dans le monde entier. (ANON., 2017)

1.2. Classification

1.2.1. Au sein des Pestivirus

Au départ, les pestivirus ont été classés au sein de la famille des Togoviridae, et ce n'est seulement à partir de 1991 qu'ils ont été réassignés à la famille des Flaviviridae. (Schweizer, Peterhans, 2014)

Cette famille regroupe quatre genres : les genres Flavivirus (virus de la fièvre jaune, virus de la Dengue, virus de l'encéphalite japonaise, virus du West Nile, Virus de la méningo-encéphalite à tiques, ..), Hépacivirus (virus de l'hépatite, ..), Pegivirus et Pestivirus. Ces derniers, contrairement aux autres genres de la famille des Flaviviridae touchent exclusivement les animaux. (Smith *et al.*, 2017)

Les pestivirus contiennent 11 espèces dont 4 initiales et considérées comme principales: *Bovine viral diarrhea virus-1* (BVDV-1), *Bovine viral diarrhea virus-2* (BVDV-2), *Classical swine fever virus* (CSFV), et le virus de la *Border disease* (BDV).

Traditionnellement, les pestivirus sont nommés en fonction de l'espèce hôte et de la maladie causée.

Les virus BVDV-1, BVDV-2 infectent principalement les bovins et le virus BDV les moutons, toutefois des virus sont capables d'infecter un large nombre d'espèces au sein des artiodactyles (ANON., 2017). A l'inverse, l'hôte naturel du virus de la peste porcine classique est restreint aux porcs et aux suidés sauvages.

La classification des pestivirus prend aussi en compte la relation entre les virus d'une même espèce. Ils peuvent être différenciés suivant leurs réactions de neutralisation croisées vis à vis de réactifs sérologiques connus comme par exemple des essais avec des anticorps monoclonaux et des anticorps polyclonaux. (Becher et al., 2003)

Toutefois, la classification actuelle repose principalement sur l'analyse comparative des génomes viraux. Les pestivirus ont été attribués à 11 espèces différentes en se basant sur des analyses phylogénétiques des séquences d'acides aminés conservés dans les régions 189–418, 1,547–2,321, 2,397–2,688 and 3,312– 3,837 (les nombres correspondent au premier acide aminé de la poly protéine si BVDV-1 Sd-1, M96751). (Smith et al., 2017)

Récemment, un groupe d'étude, « *the Flaviviridae Study Group of the International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV)* », a proposé la création de 7 nouvelles espèces dans le genre pestivirus (de la famille des Flavivirus) en plus des 4 espèces actuellement existantes. Les espèces ont été nommées de telle manière à ce qu'elles soient hôte indépendant en utilisant le format pestivirus X. Seulement le nom des espèces virales a été modifié et non le nom des isolats viraux (Simmonds et al., 2017).

Les pestivirus sont alors nommés en tenant compte du format pestivirus A, pestivirus B, etc ... ce qui remplace les précédents noms : *pestivirus A* remplace *Bovine viral diarrhea virus 1 BVDV 1*, *pestivirus B* remplace *Bovine viral diarrhea virus 2(BVDV 2)*, *pestivirus C* remplace *Classical swine fever virus (CFSV)* et *pestivirus D* remplace *Border disease virus (BDV)*. Les espèces supplémentaires sont composées du genre *pestivirus E* (pronghorn antelope virus), *pestivirus F* (porcine pestivirus, Bungowannah virus), *pestivirus G* (giraffe pestivirus), *pestivirus H* (Hobi-like pestivirus, atypical ruminant pestivirus), *pestivirus I* (Aydin-like pestivirus, sheep pestivirus), *pestivirus J* (rat pestivirus) et enfin *pestivirus K* (atypical porcine pestivirus). Enfin, un virus dérivé des chauves souris et des pestivirus dérivés des moutons et des chèvres (Tunisian sheep pestiviruses), manquant de séquences complètes de virus ont été positionnés en tant que groupe additionnel. (Smith et al., 2017)

Cependant pour certaines des espèces proposées, les dénominations sont basées sur les relations entre les séquences virales pour lesquelles les maladies ou conséquences vétérinaires sont largement inconnues. Par conséquent, de plus amples travaux seraient nécessaires afin de décrire le virome de ce grand réservoir d'espèces hôtes et d'identifier ces pestivirus supplémentaires. Les 4 espèces courantes de pestivirus incluent des virus qui sont importants pour le domaine vétérinaire. Par conséquent, on pourrait s'interroger sur l'utilité de rajouter des espèces Pestivirales supplémentaires en l'absence d'information sur leur biologie et pathogénicité.

De plus, la révision du genre Pestivirus en 11 espèces ne reflète pas actuellement la hiérarchie des relations entre les séquences observées au sein du genre. En effet, les membres des espèces Pestivirus J et K sont plus divergents avec les autres espèces et entres eux que les membres des espèces Pestivirus A, B, C, D entre eux. La classification actuelle n'incluse pas de sous catégories cela est du au souhait de ne pas engendrer une trop grande division. Les 11

espèces proposées partagent une organisation génomique commune, des similitudes en terme de protéines et quand cela est connu des organisations virales et de pathogénicité. (Simmonds et al., 2017)

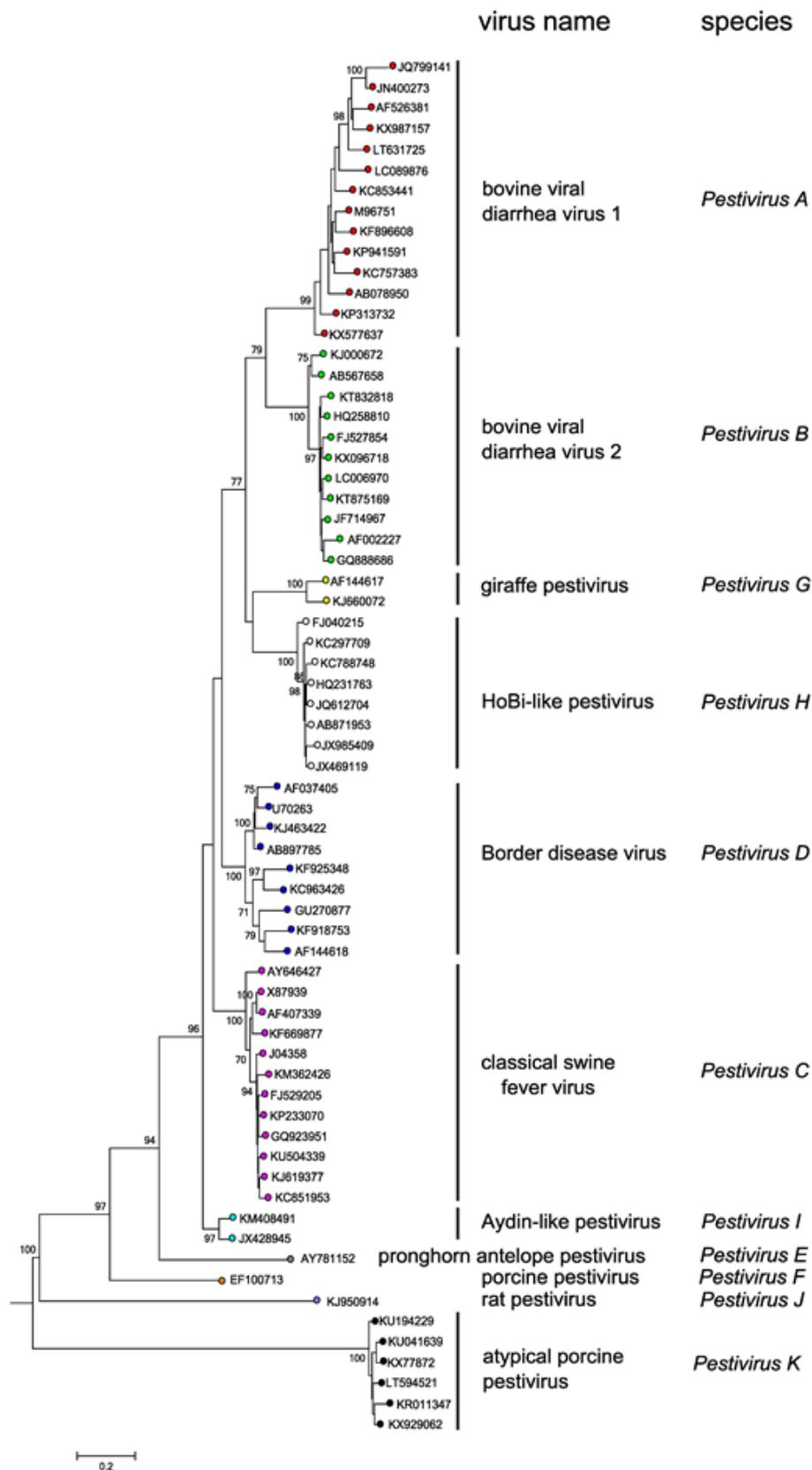


Figure 1: Classement phylogénétique des pestivirus selon (Smith et al., 2017)

1.2.2. Au sein des BVDV

La crise fatale aux Etats unis et au Canada durant les années 1980 a mené à l'identification de BVDV-2. Par conséquent, le BVDV existant jusqu'alors a été renommé en tant que BVDV-1. Les deux virus sont considérés comme deux espèces séparées au sein du genre des pestivirus (Mishra, 2012). Les deux causent des infections aiguës et persistantes et montrent des profils similaires au niveau de la maladie déclenchée.

BVDV-1 est le groupe de Pestivirus majoritaire circulant en Europe au sein des troupeaux Bovins. La souche BVDV-2 a été la première à être identifiée en Amérique du Nord et était alors associée à un très haut taux de mortalité avant d'être introduite sur le continent Européen. Aujourd'hui, cette souche est présente dans plusieurs Pays : Italie, Allemagne et l'Autriche. Il est important de noter que certaines souches de BVDV-2 ont été reliées à une maladie hémorragique sévère, la maladie des muqueuses (MD). (Miroslaw, Polak, 2019)

Les virus présentent des variations similaires au niveau de la séquence 5' UTR, permettant une classification plus aisée en groupes et sous groupes par PCR. Jusqu'alors 21 sous-groupes de BVDV-1 (BVDV-1a à BVDV-1u) et 4 sous-groupes de BVDV-2 (BVDV-2a à BVDV-2d) ont été décrits. De plus, les virus de types Hobi-like, aussi décrit comme diarrhée virale bovine 3 (BVDV-3) ou Pestivirus atypiques ont été proposés comme étant une nouvelle espèce de Pestivirus bovins (Factor et al., 2016). Depuis longtemps les infections à BVDV-3 en Europe n'ont été identifiées qu'en Italie. Il semblerait que le virus ait été introduit sur le continent Européen par l'intermédiaire de Vaccins ou autres produits contenant du sérum de bovin contaminé. (Miroslaw, Polak, 2019)

1.2.3. Au sein du BDV

Il a été montré que la diversité génétique de BDV est plus importante en comparaison avec les autres pestivirus. Selon de récentes publications, les isolats de BDV peuvent être séparés en 7 groupes phylogénétiques. BDV-1 a été détecté chez un mouton aux Etats Unis, au Royaume Uni, en Australie et en Nouvelle Zélande; BDV-2 chez des ruminants en Allemagne; BDV-3 en Suisse et Autriche; BDV-4 en Espagne et BDV-5 et BDV-6 en France. (Giammarioli et al., 2011)

Des isolats provenant de Tunisie et de Turquie anciennement rattaché au groupe des virus de la border disease sont actuellement plus rattaché au CSFV et vont très probablement former un nouveau groupe qui nécessitera d'être pleinement caractérisé (Giammarioli et al., 2015). BDV-3 et BDV-5 sont les sous groupes majoritaires en France. 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)

Il est important de souligner que dans les dernières années, la classification BDV n'avait pas été très claire. Le génotype BDV-4 avait été assigné à deux groupes de virus aux zones géographiques et aux hôtes d'origine différents tels que l'isolat du chamois des Pyrénées (Arnal et al., 2004) et les isolats Tunisiens ovins (Thabti et al., 2005). Certains groupes d'études ont émis l'hypothèse que les isolats des chamois représentaient BDV-4 et que les isolats Tunisiens formaient un groupe un peu en retrait par rapport aux autres. (Giammarioli et al., 2011)

1.3. Organisation structurale et génomique

1.3.1. Génome

Les pestivirus sont composés d'un unique génome ARN simple brin de polarité positive non poly-adénylée habituellement d'une longueur d'environ 12,3 kb (Becher et al., 2014).

Le génome à ARN contient un grand cadre de lecture unique (ORF : Open Reading Frame) encodant une polyprotéine encadré par les extrémités non transcrites 3' et 5' (UTRs : untranslated regions). Les UTRs se replient pour former des structures secondaires qui vont interagir avec les protéines cellulaires et virales pour réguler la transcription et la réplication de l'ORF (Tautz et al., 2015 ; ANON., 2020).

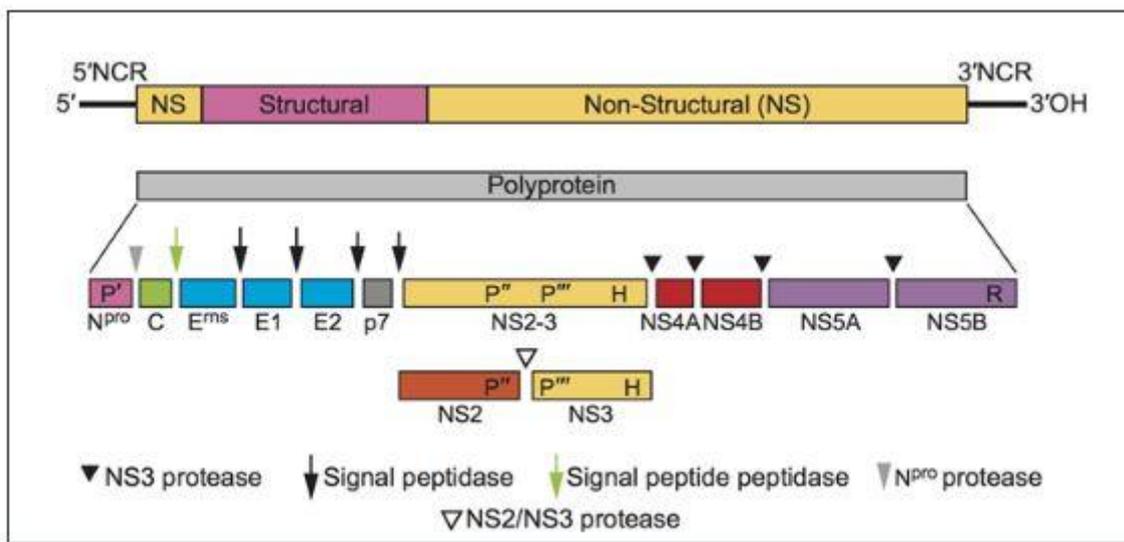


Figure 2 : Organisation du génome pestiviral et formation de la polyprotéine (ANON., 2020)

1.3.2. Protéines virales

Dans la polyprotéine virale encodée, 12 protéines sont rangées dans l'ordre suivant (de l'extrémité N à l'extrémité C terminale) : N^{pro}, protéine C, protéines de l'enveloppe (E^{ns}, E1 et E2) ; p7, et protéines non structurales NS2-3, (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.

L'abréviation N^{pro} fait référence à une activité auto-protéase au niveau de l'extrémité N-terminale et E^{ns} (ribonucléase sécrétée), à une glycoprotéine et enfin à une activité ribonucléasique.

Les quatre protéines structurales sont représentées par la protéine de la capsid C et 3 protéines de l'enveloppe (E^{ns}, E1 et E2). Les autres protéines sont non structurales (Tautz et al., 2015).

1.3.2.1. Protéines structurales

1.3.2.1.1. Protéine C

La **protéine C** de la capsid est la première protéine structurale dans la poly protéine. Elle enferme et protège le génome viral. La protéine C du virus BVD a été montrée comme étant une protéine qui s'attache à la molécule d'ARN viral avec peu d'affinité et de spécificité. La taille minimale de ce lien est de 14 nucléotides par molécule de capsid. Des études ont montré que le gène codant pour la protéine C au sein du virus CSF pouvait être supprimé, mettant en évidence que la protéine est superflue pour la propagation virale. Cependant pour ces mutants, les virions étaient 30 à 50 fois moins contagieux et semblaient atténués chez ces animaux (Riedel et al., 2010). Cette protéine aurait donc une influence sur la propagation virale et la virulence. Toutefois, il est à noter que des mutations au niveau de du gène C sont compensées par des mutations au niveau du gène NS3. (Tautz et al., 2015)

1.3.2.1.2. Protéine Erns

Erns est la première glycoprotéine de l'enveloppe et montre certaines particularités notamment son activité *structurale et son activité ribonucléasique*. La protéine Erns est présente sur la particule virale mais est aussi sécrétée et donc détectable dans le surnageant de culture mais aussi le sérum. La membrane joue un rôle crucial dans l'équilibre entre sécrétion de protéines virales et incorporation au sein de la particule. C'est une des cibles des anticorps neutralisants, elle est toutefois moins immunogène que la protéine E2.

Un des faits les plus intéressants est son activité ribonucléasique sur les doubles et les simples brins d'ARN avec une préférence pour ces derniers (Krey et al., 2012). Elle possède la faculté de se lier aux ARN doubles brins, et ainsi d'interférer avec la réponse interféron de type I de son hôte. Les protéines Erns forment des homodimères au niveau membranaire (Meyers et al., 2007).

De nouvelles recherches ont montré que l'entrée au sein de la particule était permise par des clathrines endocytoses dépendantes (Tautz et al., 2015).

1.3.2.1.3. Protéine E1

La **protéine E1** est toujours en attente d'une caractérisation détaillée. C'est la seule protéine de l'enveloppe pour laquelle ni la structure ni la fonction ne sont connues. Les animaux infectés ne développent pas d'anticorps contre E1. C'est une protéine de 25-33kDA (fonction de l'espèce virale) avec un ancrage transmembranaire. Les protéines E1 et E2 sont nécessaires pour l'entrée du virus et forment des hétéro dimères avec un pont disulfure (Tautz et al., 2015).

Comme la protéine E2 ne possède pas de protéine de fusion, il semblerait que la protéine E1 la contienne, probablement localisée dans la région aminoacide hydrophobe (en position 57-85) comme candidat le plus plausible (Tautz et al., 2015).

1.3.2.1.4. Protéine E2

La **protéine E2** dispose d'une taille d'environ 53-55 kDa. Elle est responsable de la liaison au récepteur cellulaire et du tropisme d'espèce des Pestivirus. Cette protéine semblerait être très stable entre les espèces de pestivirus mais l'expression d'un ou plusieurs épitopes seraient spécifique de l'espèce hôte (Vilcek et al., 1997).

Par ailleurs, c'est la cible principale des anticorps neutralisants, ce qui explique son importance pour le diagnostic mais aussi la protection vaccinale. De plus, la possibilité d'utiliser un large nombre d'anticorps monoclonaux a conduit à la mise en place d'efforts considérables pour caractériser la protéine et cartographier les sites d'attache et les régions antigéniques dans le but d'avoir des informations sur ces structures (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2. Protéines non structurales

La réplication des pestivirus est réalisée en position cytoplasmique au contact des membranes intracellulaires. Toutefois et contrairement aux autres membres de la famille des Flavivirus, un réarrangement des membranes intracellulaires n'a pas été mis en évidence au sein des cellules infectées par des Pestivirus.

La plupart des protéines virales nécessaires à la réplication sont directement ou indirectement associée avec les membranes intracellulaires via des interactions avec des protéines liantes.

La réplication de l'ARN viral nécessite à minima les protéines **NS3-NS5B**. Ces protéines sont aussi impliquées dans la morphogénèse du virion comme il a été prouvé pour d'autres membres de la famille des Flavivirus (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2.1. Protéine p7

Du fait de ses caractéristiques en tant que petite protéine membranaire hydrophobe avec un domaine central chargé, il a été suggéré que la **protéine p7** était une viroporine fonctionnant dans les cellules infectées comme une chaîne d'ions, sous forme d'hétérodimère p7-E2. Cette activité entrainerait l'activation de cytokines pro-inflammatoires par les cellules mononuclées. Par analogie avec le virus de l'hépatite C, la protéine p7 pourrait aussi montrer un rôle dans la morphogénèse du virion probablement via des interactions avec des protéines cellulaires. Pour la protéine p7 du virus CSF, une étude rapprochée de régions mutées a montré que l'aptitude virale et la virulence étaient altérées in vivo.

Des travaux sur le rôle de la protéine p7 chez les Pestivirus ou au sein du virus de l'hépatite C ont montré un rôle important de la protéine p7 dans les dernières étapes de l'assemblage des virions lors du cycle de réplication (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2.2. NS2

La **protéine NS2** est constituée d'environ 450 acides aminés. D'anciennes études ont montré que son activité protéasique permettait le clivage de NS2-3 en cis. Toutefois, le clivage de NS2-3 en NS2 et NS3 est différent selon le biotype non cytopathique (production

de NS2-3>> NS2 ou NS3) ou cytopathique (clivage efficace avec NS3>>> NS2-3) du virus (cf 1.4.2) (Klemens et al., 2015).

La protéine NS2-3 des pestivirus de biotype non cytopathique nécessite une interaction stable avec une protéine cellulaire chaperonne de la famille des Hsp40 pour son activité protéasique. De plus, la protéine NS2-3 non clivée possède un rôle essentiel mais non entièrement caractérisé dans la morphologie du virion (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2.3. NS3

NS3 est une protéine multifonctionnelle dont la taille est d'environ 80 kDa. C'est la protéine la mieux conservée au sein des pestivirus. Elle est aussi très immunogène mais les anticorps formés ne sont pas neutralisants. Au sein du domaine N-terminal se trouve un domaine protéase sérine chymotrypsin-like tandis qu'à l'extrémité C terminale résident un domaine hélicase et un domaine Nucleoside-triphosphatase (NTPase). Pour avoir une activité complète, la protéase serine NS3 nécessite une interaction stable avec le domaine central de son cofacteur NS4A (Tautz et al., 2015).

Son activité **protéasique** est responsable de la plupart des sites de clivages à l'exception faite de la jonction NS2-NS3 au cœur de la polyprotéine. De son côté, son activité **hélicase** est extrêmement importante pour pouvoir dérouler des régions hautement structurées du génome à ARN durant différentes phases de la réplication (Tortorici et al., 2015). Enfin pour finir, la protéine **NTPase** possède une activité cytotoxique forte à l'origine des effets cytopathiques.

Récemment, un rôle nouveau et plutôt innatendu a été décrit pour l'extrémité C terminale du virus CSF. Il semblerait qu'une délétion partielle voire complète de la protéine C soit en partie compensée par un second site de mutation au niveau de la protéine NS3 (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2.4. Npro

Npro représente la première protéine codée par le génome viral. Elle possède une longueur de 168 acides aminés. Du fait de sa séquence unique ainsi que du nouveau classement des résidus catalytiques, Npro a été classée au sein d'une nouvelle famille nommée C53. La séquence du site de clivage à l'extrémité C-terminale est hautement conservée au sein des Pestivirus. Npro est une protéine intéressante de par ses fonctions lors de l'infection virale. Elle bloque la production des interférons de type 1, en dégradant le facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF-3), et permet donc, comme la protéine Erns, d'échapper à la réponse immunitaire innée de l'hôte. Des mutants viables de Npro au sein du virus BVD et CSF ont été isolés (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2.5. NS4A

NS4A possède une taille d'environ 10 kDa et contient une membrane hydrophobe à l'extrémité N terminale ainsi qu'un domaine cytosolique à l'extrémité C terminale. Il s'agit principalement d'un cofacteur pour la protéase NS3 (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2.6. NS4B

NS4B est une protéine hydrophobe d'environ 35 kDa avec une topologie inconnue exerçant une fonction essentielle mais non caractérisée dans la réplication de l'ARN viral. **NS4B** serait localisée au niveau des membranes intracellulaires (Tautz et al., 2015).

1.3.2.2.7. NS5A

NS5A possède une taille d'environ 58 kDa et a été montrée comme étant phosphorylée par les kinases cellulaires. De plus amples études seraient nécessaires pour comprendre son rôle exact dans la réplication virale des pestivirus. (Tautz et al., 2015)

1.3.2.2.8. NS5B

La dernière protéine de la polyprotéine virale est **NS5B** avec une taille d'environ 77 kDa. Cette protéine possède les caractéristiques d'une ARN polymérase ARN dépendante. La réplication du génome viral nécessite l'action conjointe de NS3 et NS5B pour la synthèse d'ARN viral. En plus de ses fonctions enzymatiques, NS5B a été montrée comme participant la morphogénèse des virions (Tautz et al., 2015)

1.4. Diversité des pestivirus

1.4.1. Spectre d'hôtes

Les infections à pestivirus ont pendant longtemps été attribuées uniquement aux artiodactyles. Cependant, il semble important de noter que des articles récents ont montré la présence de pestivirus notamment chez les rats (Firth et al., 2014), mais aussi chez les chauves souris (Wu et al., 2012). Deux autres articles, ont montré la présence de pestivirus chez une mouche (Liu et al., 2019) mais aussi chez le nématode du soja (Bekal et al., 2014).

Les différentes espèces de pestivirus peuvent être divisées en deux groupes majeurs appelés pestivirus des suidés et pestivirus des ruminants comme par exemple vache, mouton, chèvre et une large variété de ruminants sauvages. La transmission des pestivirus isolés chez une espèce de ruminants à une autre espèce de ruminant est fréquente. De plus, les pestivirus de ruminants sont très souvent retrouvés chez les porcs, cependant il n'y a pas de preuve pour la réplication de CSFV chez les ruminants.

CSFV a adapté avec succès sa propagation chez les lapins ce qui a conduit à une atténuation du virus chez les porcs. Chez les ruminants, l'adaptation à une plus petite espèce n'a pas été décrite. (Tautz et al., 2015)

1.4.2. Diversité biologique et notion de biotype

Un point commun à tous les Pestivirus est la coexistence de deux biotypes différents dans les cultures cellulaires, nommé variant cytopathique (cp) entraînant la mort des cellules infectées et virus non cytopathique (ncp) se répliquant au sein de la cellule hôte sans dommage détectable ou de réduction considérable de la viabilité de la cellule ou encore de réduction du taux de croissance.

C'est ainsi que de la même manière que pour le BVDV, les espèces de BDV peuvent exister en tant que biotypes cp et ncp selon leur effet sur les cultures cellulaires (Becher et al., 1996).

Le biotype non cytopathique peut être transmis horizontalement ou verticalement et il est isolé beaucoup plus fréquemment que le biotype cytopathique (Schweizer, Peterhans, 2014). De plus, il peut établir des infections durables. (Braun et al., 2019)

Cette distinction est basée sur la destruction ou non des tapis cellulaires en culture. Ce comportement *in vitro* d'une souche ne reflète cependant en rien son pouvoir pathogène *in vivo*, la plupart des souches virulentes étant des souches ncp. Les deux biotypes ont des caractéristiques propres permettant de les différencier (Tableau 1). Seuls les biotypes ncp entraînent une virémie et sont donc capables d'induire une infection transplacentaire. Par ailleurs, la distribution des souches cp dans l'organisme est très réduite de la même manière que leurs capacités de transmission entre individus. (ANON., 2020)

En résumé, le biotype ncp apparaît comme le biotype le plus important, d'un point de vue épidémiologique car il est responsable des transmissions horizontale et verticale du virus.

Tableau 1: Caractéristiques des souches cp et ncp selon l'observatoire de la BVD

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

Les souches cp émergent de souches ncp chez les animaux infectés permanents par des modifications du génome viral de la souche ncp. Ces modifications sont diverses et font suite à des mutations et/ou des insertions de séquences virales ou cellulaires dans le génome, par recombinaison non homologue entre molécules d'ARN. Chaque type cp possède des modifications spécifiques dans son génome. En terme moléculaire, pour certaines souches cytopathiques, un segment petit et variable de la cellule hôte ou de l'acide nucléique viral est intégré à des régions particulières (souvent au sein de NS2 ou directement en amont de la protéine NS3) du génome viral, parfois accompagné de duplication du gène viral ou de délétions (Tautz et al., 2015).

D'autres pestivirus cytopathiques contiennent seulement des duplications de gène viral partielles ou totales de la région encodant les protéines Npro, NS3 ou NS4B entraînant un ARN génomique supérieur à 16,5 kb. Dans tous les cas, le grand cadre de lecture ORF est maintenu. Finalement, les virus cytopathiques peuvent aussi apparaître par délétion d'une large portion de leur génome (Tautz et al., 2015)

Ces modifications entraînent, pour les souches cp, une augmentation significative de l'expression de la protéine NS3 qui n'est plus fusionnée avec NS2 au sein du complexe protéique NS2/3. Différents mécanismes ont été proposés, tels que la sur-activation ou la modification de l'activité auto protéase de NS2 ou un effet chimiotactique sur d'autres

protéases cellulaires capables d'exciser NS3. Dans les cellules, la production de NS3 est sous le contrôle de produits d'expression de gènes cellulaires. Ce contrôle aboutit à une faible expression de NS3 pour les souches ncp mais il est débordé pour les souches cp et finalement NS3 induit une destruction des cellules par mécanisme d'apoptose (Tautz et al., 2015).

2. La maladie de la frontière

2.1. Historique et importance

La Border Disease ou maladie de la frontière a été décrite pour la première fois à la frontière entre l'Angleterre et le Pays-de-Galles par Hugh et al en 1959. Toutefois les signes cliniques de cette maladie, faiblesse, laine hirsute et agneaux tremblants étaient observés dès le début des années 1940 au sein des troupeaux de moutons de cette région.(Løken, 1995)

La cause de la maladie est restée obscure jusqu'à la fin des années 1960, lorsque des suspensions de tissus provenant d'animaux infectés ont permis d'identifier un agent pathogène. Une étiologie virale a été formulée pour la première fois en 1972. Un pestivirus assez proche du virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et légèrement plus éloigné de la fièvre porcine classique (CSFV) a été décrit comme étant à l'origine de la Border disease. Le virus responsable dénommé « Border Disease Virus » ou BDV a été pour la première fois isolé en 1977 (Løken, 1995). Le BDV est majoritairement retrouvé au sein de l'espèce ovine, toutefois il peut infecter les autres ruminants notamment les bovins (Braun et al., 2019). La maladie de la frontière est répartie mondialement en particulier en Europe, en Australie et en Amérique du Nord, elle a aussi été signalée en Israël et en Afrique du Nord. La prévalence des anticorps chez des moutons adultes varie entre 5 et 50% selon les pays mais aussi au sein des régions d'un-même Pays (Nettleton et al., 1998; Oğuzoğlu, 2012).

L'impact de la maladie est variable selon les pays, en fonction de la prévalence de l'infection mais aussi des systèmes de production. En France, elle sévit principalement dans le bassin de Roquefort où elle entraîne quelquefois des formes cliniques systémiques sévères chez les agneaux (Loubière, 2012).

Chez les adultes, l'infection aigue est le plus souvent asymptomatique mais elle entraîne des troubles de la reproduction qui peuvent être là aussi sévères. En effet, le BDV est capable de passer les barrières placentaires lorsqu'il infecte des brebis gravides. Il en résulte des malformations fœtales, des morts nés mais aussi la naissance d'agneaux infectés permanents ou persistants (Tautz et al., 2015).

L'infection par le BDV chez les moutons ressemble donc sur beaucoup d'aspects à l'infection de bovins par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV). De plus, dans certaines parties du monde, principalement où il y a des contacts rapprochés entre moutons, chèvres et vaches, les mêmes signes cliniques peuvent être causés chez les ovins par le BVDV ou le BDV (Tautz et al., 2015).

2.2. Mécanismes de transmission

2.2.1. Sources animales

Le virus n'est pas résistant dans le milieu extérieur et sa transmission est notamment permise principalement entre ovins, par les agneaux infectés permanents (voir 2.2.3). La transmission au sein d'un troupeau peut prendre des années dans des troupeaux par exemple élevés de façon extensive à l'herbe mais au sein de systèmes plus intensifs comme la filière d'engraissement ou tout autre méthode d'élevage permettant un contact rapproché entre les animaux, celle-ci peut s'avérer être beaucoup plus rapide. Chez des ovins élevés en milieu confiné, la transmission via des infectés permanents survient plus facilement et de sérieuses épidémies de Border Disease peuvent apparaître notamment lors-de la période d'agnelage (Nettleton et al., 1998)

En dehors de la transmission entre ovins, le virus BDV peut infecter les bovins, bien qu'il existe peu de données bibliographiques (Braun et al., 2019). Certaines épidémies de Border disease pourraient avoir eu lieu via des contaminations entre les deux espèces (Terpstra, 1981). Il est donc important des les programmes d'éradication d'inclure l'ensemble des espèces potentiellement concernées (Braun et al., 2019).

Enfin, concernant l'espèce porcine, il n'existe pas d'étude mettant en évidence une épidémie de Border disease déclenchée via un contact rapproché avec des suidés. Cependant, une épidémie peste porcine classique a été montré comme ayant été causée par le virus de la Border disease (Roehe et al., 1992).

2.2.2. Matières virulentes

L'étude de C. Terpstra en 1981 a permis de mettre en évidence la présence de virus dans les muqueuses respiratoires et digestives, le tractus urinaire et enfin les glandes parotides des animaux infectés. Ces résultats permettent d'indiquer que le virus est excrété par ces voies. Il semblerait de plus, que la voie buccale soit aussi une voie d'excrétion importante. (Terpstra, 1981)

D'une manière plus élargie, les pestivirus sont transmis par voie horizontale via toutes les sécrétions corporelles des animaux infectés c'est-à-dire la salive, les larmes, les écoulements nasaux, le lait, les urines, les fèces, et le sperme (Terpstra, 1981). La transmission peut avoir lieu lors d'un contact direct entre les animaux ou indirectement par exemple par contact avec des sécrétions infectieuses, de la nourriture contaminée ou via les aiguilles (Tautz et al., 2015).

Par voie verticale, l'infection du tractus génital, et lors de la gestation, de la placentation, des membranes fœtales et du fluide amniotique expliquent l'infection du fœtus (Terpstra, 1981)

Enfin, les souches non cytopathiques des Pestivirus sont des contaminants possibles des vaccins vivants atténués. Tous les vaccins vivants produits sur des cultures cellulaires de moutons, bovins ou porcs ou sur des milieux supplémentés avec des sérums provenant de ces espèces (exemple : sérums de veau fœtal, SVF) risquent d'être contaminés avec des pestivirus. Certaines épidémies de Border Disease ont été associées à l'utilisation de vaccins

utilisés pour la variole ovine ou de vaccins utilisés contre l'ecthyma du mouton et de la chèvre (Nettleton et al., 1998). Récemment, une épidémie a été mise en évidence par l'université de Saragosse suite à la vaccination d'un troupeau de 1600 brebis Lacaune à l'aide d'un vaccin ORF contaminé (Asín et al., 2020).

2.3. Transmission

2.3.1. Transmission horizontale

La voie oro-nasale est la principale voie de transmission horizontale. Cette dernière peut avoir lieu notamment lors de contacts rapprochés entre les animaux (« muflle-muflle ») au sein d'élevages à densité élevée mais aussi via les matières virulentes présentées précédemment. Ce mode de transmission concerne en particulier les moutons ou les brebis saines en dehors de la gestation. Il donne lieu principalement à une infection transitoire avec une virémie détectable entre le quatrième jour et le onzième jour (ANON., 2020). La fin de l'excrétion virale est en général concomitante à l'apparition des anticorps neutralisants (entre 10 et 20 jours). Les animaux immunisés sont protégés pour la plupart contre une infection ultérieure (Løken, 1995).

2.3.2. Transmission verticale

Une des particularités des pestivirus est la faculté à réaliser une infection placentaire et, selon le stade de gestation, à infecter de manière permanente le fœtus puis l'agneau. Il n'existe pas chez les ovins et bovins de passage des anticorps maternels au fœtus pendant la gestation (anatomie placentaire-choriale). Le résultat d'une infection fœtale est principalement dépendant du stade de la gestation. Il peut résulter une résorption fœtale, un avortement, la naissance d'agneaux mort-nés, un large panel de malformations fœtales et surtout la naissance d'agneaux infectés permanents immunotolérants (ou IPI) (cf paragraphe 2.4.2) (Tautz et al., 2015)

2.4. Pathogénie et expression clinique

Comme il a été présenté plus haut, les infections Pestivirales peuvent être diverses : aiguës et transitoires ou permanentes. Par conséquent, il existe un grand panel de tableaux cliniques qui en découle.

2.4.1. Infection transitoire

Lors d'une infection transitoire, les nouveaux nés ainsi que les adultes exposés au virus de la Border disease présentent de faibles symptômes ou une maladie parfois simplement inapparente. En général, en terme de tableau clinique, une fièvre légère ainsi qu'une faible leucopénie sont associées à une virémie assez courte détectable entre les jours 4 et 11 post-infection après lesquels les anticorps neutralisants apparaissent. (Nettleton et al., 1998 ; ANON., 2020)

De façon plus occasionnelle, certains isolats de virus de la Border disease ont entraîné des symptômes plus marqués : forte fièvre, leucopénie profonde et prolongée, anorexie, conjonctivite, décharge nasale, dyspnée, diarrhée et un taux de 50% de mortalité chez les agneaux (Nettleton et al., 1998).

L'exemple le plus emblématique est le cas de la souche Aveyronnise du BDV de génotype 5 qui a été à l'origine de la première détection de ce virus en France en 1983. Cette souche avait été à l'origine d'une épidémie sévère en Aveyron nommée alors « Petega ovina » entraînant une mortalité et une morbidité respectivement de 25% et 7% chez les adultes dans les élevages atteints. Pour les agneaux, les pertes étaient alors encore plus importantes avec une mortalité allant de 15% à 90% dans certains élevages (Loubière, 2012).

Plus récemment, il a été montré que le BDV de génotype 4 a été à l'origine de fortes mortalités au début des années 2000 chez les isards dans les Pyrénées. (Marco et al., 2007)

2.4.2. Infection fœtale

Les principaux signes de la maladie sont consécutifs à l'infection de brebis gravides. Pendant que l'infection de la mère gravide est sub-clinique ou faible, les conséquences sur le fœtus sont sérieuses. Selon le stade de la gestation et par conséquent le développement de l'immuno-compétence, les conséquences sur le fœtus sont variables. Chez les ovins, l'immuno-compétence se met en place entre le 60^{ème} et le 85^{ème} jour de gestation. (Nettleton et al., 1998)

Infection avant 15 jours de gestation :

L'implantation fœtale est assez tardive chez les ovins, celle-ci a lieu entre le 15^{ème} et le 28^{ème} jour de gestation. Par conséquent, avant cette période le virus ne peut pas atteindre l'embryon, la mère élimine donc directement le virus.

La mort fœtale peut survenir à n'importe quel stade de la gestation mais elle est plus fréquente durant les premiers stades. Les fœtus morts nés peuvent subir une résorption ou un avortement peut survenir mais ce dernier passe souvent inaperçu car la brebis continue de bien manger et ne présente aucun signe d'inconfort. (Nettleton et al., 1998)

Infection entre 15 et 60 jours de gestation :

Durant cette période, le virus parvient à traverser la barrière fœtale sans que l'immunité de la mère ne parvienne à l'éliminer et celui-ci parvient donc à atteindre le fœtus alors implanté. Ce dernier ne possède pas encore un système immunitaire compétent. Par conséquent, le virus n'est alors pas reconnu comme un élément extérieur mais plutôt comme faisant parti du soi. L'absence de réponse immunitaire spécifique mise en place n'entraîne pas la production d'anticorps et le virus est alors présent toute la vie de l'animal. Ces animaux sont qualifiés d'infectés permanents immunotolérants (IPI). Après la naissance, ils restent toute leur vie viropositifs et séronégatifs (vis-à-vis de la souche infectieuse). Ils peuvent ainsi contaminer leurs congénères tout au long de leur existence. Toutefois un agneau né IPI ne vit rarement plus d'un an. Ces agneaux présentent souvent une laine hirsute du fait de l'augmentation du nombre de follicules pileux primaires aux dépens des secondaires. De plus,

lorsqu'ils sont logés à l'écart du troupeau sain, ceux-ci peuvent présenter une toux intense associée à des écoulements nasaux et oculaires et même parfois une détresse respiratoire sévère. (Nettleton et al., 1998)

On peut trouver lors de cette période des lésions microscopiques au niveau des placentomes des brebis infectées. Ces lésions sont compatibles avec la présence de thrombose, nécrose des petits vaisseaux et du stroma des cellules du placenta. (Caffrey et al., 1997)

Infection entre 60 et 85 jours :

Le système immunitaire du fœtus n'est opérationnel qu'entre le 60^{ème} et le 85^{ème} jour. Cette variabilité concernant la réponse, rend difficile la caractérisation des agneaux. Certains vont naître IPI et d'autres vont éliminer le virus grâce à leur réponse immunitaire et naissent donc séropositifs. Cette période d'infection peut aussi engendrer des avortements, voire des malformations congénitales. (Mondoly, Pouget, 1998 ; Bethume, 2015)

Ces malformations se traduisent chez les agneaux vivants à la naissance par des signes nerveux sévères, des anomalies au niveau de la démarche et enfin des anomalies au niveau du squelette. Ces agneaux ont des lésions d'hydrocéphalie, de l'arthrogrypose, de l'atrophie cérébelleuse et des microcirconvolutions cérébrales. (Bethume, 2015)

Infection après 85 jours :

La plupart des fœtus infectés tard dans la gestation sont capables d'éliminer le virus. Les agneaux naissent normaux et sains, leur virémie est négative (sauf si ils ont été infectés en fin de gestation, mais elle reste transitoire) et ils présentent des anticorps dirigés contre le BDV (Ac anti-BDV). Plus rarement, certains agneaux peuvent être morts nés, faibles ou peuvent mourir rapidement (Nettleton et al., 1998).

L'ensemble des signes cliniques observés lors d'infection par voie verticale sont ainsi très variables et dépendent de la race du mouton, de la virulence de la souche virale virus et du moment de l'introduction du virus au sein du troupeau (Bethume, 2015).

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

Date de l'infection	Conséquences	Virus	Anticorps
0-15j	Mortalité embryonnaire Élimination du Virus par la mère	-	-
15-60j	Avortements, <u>Agneaux IPI</u> , (trembleurs, hirsutes, faibles ou normaux)	+	-
60-85j	Avortements, <u>Agneaux IPI</u> , malformés	+/-	+/-
à partir de 85j	Avortements, agneaux normaux ou faibles	-	+

2.4.3. Cas particulier des IPI

L'infection permanente par les pestivirus touche les animaux infectés pendant leur gestation lorsque le fœtus a entre 40 et 85 jours. A ce stade, leur système immunitaire spécifique est incompetent et accepte les antigènes viraux comme étant du soi. Cette immunotolérance semble spécifique à l'infection par les pestivirus. Chez les fœtus infectés permanents, la réplication virale est incontrôlée et le virus est présent dans la plupart des tissus (Mondoly, Pouget, 1998).

Comme précisé plus haut les agneaux IPI qui naissent sont viropositifs et séronégatifs à la naissance avant la prise colostrale. Ils restent viropositifs toute leur vie, se séroconvertissent lors de l'ingestion du colostrum et restent séropositifs tant que des anticorps maternels persistent (rarement au delà de 3-4 mois). Un échantillon de sang avant la prise du colostrum montrera un individu virus positif (recherche par PCR) et anticorps négatif (contre NS2-3 ou E2 par ELISA ou séroneutralisation) (ANON., 2020).

Typiquement, il n'y a pas de réaction inflammatoire et les changements caractéristiques résident au niveau du système nerveux central (SNC) et de la peau. Dans tout le système nerveux central, il y a un déficit en myéline. Ce déficit peut être léger chez les agneaux asymptomatiques ou avec de très faibles symptômes mais aussi sévère chez des agneaux présentant des symptômes nerveux prononcés. Au niveau de la peau, on observe chez les IPI des follicules laineux de taille augmentée et peu de follicules laineux secondaires, causant cet aspect de laine hirsute (Bethume, 2015).

Sur le terrain, toutes les formes cliniques sont possibles pour l'IPI, entre un agneau asymptomatique et un agneau chétif, trembleur avec une laine hirsute et qui meurt rapidement. Dans certains cas, il arrive que les IPI expriment de façon tardive la maladie, lorsqu'ils sont surinfectés par une souche BDV cytopathique proche génétiquement de la souche non cytopathique (infection fœtale). En terme de tableau clinique, ces individus peuvent développer spontanément une diarrhée incurable, un affaiblissement, des écoulements oculaires et du jetage nasal excessif avec parfois une détresse respiratoire. A l'autopsie, ces moutons présentent un épaississement de l'iléon distal, du caecum et du colon résultant d'une entéropathie focale et hyperplasique. Du virus BDV de type cytopathique peut être mis en évidence au niveau des intestins de ces agneaux. Ce syndrome qui a aussi été mis en évidence à titre occasionnel lors d'épidémie de Border Disease a beaucoup de similitudes avec la maladie des muqueuses chez les bovins. (Nettleton et al., 1998)

Les agneaux infectés permanents peuvent être détectés par détection du virus par RT-PCR viral sur un échantillon de sang. La virémie est quasiment tout le temps détectable mais elle est très faible dans les deux premiers mois de vie lorsque le virus est neutralisé en grande partie par les anticorps colostraux. En règle générale, l'IPI a des charges virales beaucoup plus fortes qu'un agneau infecté transitoirement. Toutefois, le diagnostic différentiel ne peut se faire qu'en confirmant la virémie persistante en testant une nouvelle fois l'animal après un intervalle de 3 semaines minimum. La plupart des agneaux IPI meurent entre 1 et 2 ans. Certains infectés permanents asymptomatiques survivent cependant jusqu'à la majorité sexuelle et peuvent alors être utilisés pour la reproduction. Les béliers infectés permanents immunotolérants (IPI) ont fréquemment une semence hautement infectieuse, faiblement fertile et de mauvaise qualité. Par conséquent, tous les béliers utilisés pour la reproduction devraient être testés sur des échantillons de sang pour la virémie persistante. En effet, les

cultures sur échantillons de semence sont nettement moins satisfaisantes du fait de la toxicité de celle-ci sur les cultures cellulaires (Nettleton et al., 1998).

Les animaux IPI sont de fait une source continue de contamination au sein des élevages et leur identification est la clef de voute des programmes de contrôles. Les animaux introduits dans les élevages devraient être testés pour l'absence d'une virémie BDV.

2.5. Diagnostic

2.5.1. Diagnostic Différentiel

Le diagnostic différentiel dépend des formes cliniques associées à l'infection par le BDV en particuliers en se basant sur les avortements chez les adultes et des formes cliniques variées (respiratoires, digestives, neurologiques ...) chez les agneaux.

Les troubles de la reproduction dus au BDV chez les ovins seront à différencier en première intention de ceux observés lors de Fièvre Q, Chlamydieuse, Toxoplasmose et Salmonellose à *Salmonella Abortusovis*.

Le tableau suivant permet d'ajouter la liste des maladies cherchées en seconde intention. Il semble important de souligner que la Brucellose est systématiquement recherchée en tant que maladie animale réglementée en France.

Tableau 3 : Diagnostic différentiel des avortements chez les petits ruminants

	Règlementation	1 ^{ère} intention	2 ^{ème} intention
Bactérie	Brucella ovis	Coxiella burnetii (Fièvre Q)	Campylobacter jejuni Campylobacter Fetus
		Chlamydia abortus Chlamydia pecorum Chlamydia psittaci	Listeria monocytogenes Listeria ivanovii
		Salmonella abortusovis	Yersinia spp Yersinia pseudotuberculosis
			Anaplasma marginale Anaplasma phagocytophilum
			Mycoplasma spp
Virus		Border disease virus	SBV (Virus de Smallegen)
Parasites		Toxoplasma gondii	Neospora caninum
Agents mycosiques			Aspergillus, ...

En plus des causes précédemment citées, il est important de ne pas omettre toutes les causes non infectieuses telles que les traumatismes, l'alimentation, le stress, les médicaments et toutes les origines toxiques éventuelles.

Cependant, dans ces cas, il n'existe pas d'éléments cliniques pathognomoniques identifiables permettant d'attribuer aisément une étiologie. En effet, dans la plupart des maladies abortives, on retrouve de manière similaire de la mortalité, la naissance de nouveaux nés chétifs, une infertilité apparente et des taux de mises bas inférieurs à ceux attendus. Par conséquent, les signes étant assez peu spécifiques, il est donc nécessaire

d'adopter une démarche adaptée associée à la recherche d'éléments lésionnels permettant d'orienter le diagnostic. Il s'agit tout d'abord de recueillir un maximum de commémoratifs et de mettre en place des analyses adaptées.

Lors d'infection à **Toxoplasma gondii**, on peut retrouver des lésions principalement localisées au niveau du chorion. On retrouve à ce niveau des petits foyers de minéralisation blanchâtre. De plus, un aspect momifié du fœtus laisse aussi suspecter la Toxoplasmose mais celle-ci est aussi présente lors de Chlamydieuse ou de Fièvre Q.

Lors de **Chlamydieuse**, la mortalité fœtale est assez tardive par conséquent les fœtus sont relativement bien conservés.

Lors de **Salmonellose**, on note aussi un affaiblissement général des brebis gestantes avec des hyperthermies marquées, des métrites et des mortalités possibles.

Enfin, dans le cas de la **Border disease**, une apparition de maladies intercurrentes (liées à l'effet immunosuppresseur du virus) est à signaler dont notamment : diarrhée, ecthyma, laines hirsutes, faible croissance. De plus, l'absence de guérison est souvent courante malgré un interventionnisme de l'éleveur (De cremoux et al, 2015).

Concernant les agneaux, le diagnostic différentiel est large car le BDV est, par son effet immunosuppresseur entre autres, responsable de formes cliniques variées (digestives, pulmonaires, systémiques). Souvent, le diagnostic différentiel est envisagé avec sur les l'ataxie enzootique (carence en cuivre provoquant des anomalies de la toison et des troubles nerveux), daft lamb disease, des méningo-encéphalites bactériennes (forme systémique et nerveuses) et enfin du syndrome hypothermie-Inanition chez les très jeunes agneaux à la naissance (De cremoux et al, 2015).

2.5.2. Diagnostic lésionnel

Il n'existe pas que ce soit chez les adultes ou chez l'agneau de lésions pathognomoniques permettant de conclure facilement au diagnostic de Border disease.

Cependant, on retrouve :

- Chez les adultes :
 - ⇒ Des lésions hémorragiques de la muqueuse de la caillette, de l'intestin grêle et du côlon spiral (pétéchies alignées en coup de griffe) lors de formes digestives sévères.
 - ⇒ Une hypertrophie des ganglions mésentériques, une splénomégalie (dans 25 % des cas) et des pétéchies sur l'omentum.
- Chez les brebis gravides : Des lésions de nécrose du placenta. Présence de fœtus souvent momifiés.
- Chez les fœtus atteints avant 80-85 jours :
 - ⇒ Des anomalies de la toison et de l'ossification.
 - ⇒ Une hypomyélogénèse du système nerveux sans lésions inflammatoires.
 - ⇒ Parfois des lésions de typhlo-colite (forte infiltration lymphoïde de la muqueuse et sous-muqueuse au niveau du colon).

- Chez les fœtus atteints après 85 jours de gestation :
 - ⇒ Des lésions de péri-artérite du système nerveux central.
 - ⇒ Des hydrocéphalies et hypoplasies cérébelleuses.

- Chez les agneaux :
 - ⇒ Des lésions d'entérite plus ou moins hémorragique.
 - ⇒ Une hypertrophie des ganglions mésentériques, une splénomégalie, une congestion du thymus.
 - ⇒ Des pneumonies.
 - ⇒ Des stomatites sévères avec déformation des lèvres en plateau (ecthyma). (Mondoly, Pouget, 1998 ; Bethume, 2015)

2.5.3. Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic de laboratoire peut être réalisé : soit en détectant la présence du BDV lors de la maladie soit en mettant en évidence la réponse de l'hôte (habituellement des anticorps) consécutive à l'infection. Pour les pestivirus, le choix de la technique à utiliser dépend d'abord de l'objectif recherché : détection des infectés transitoires et/ou des infectés permanents. Dans le premier cas, il s'agit d'une infection classique avec multiplication du BDV puis son élimination concomitante à l'apparition de la réponse immunitaire. Pour les animaux IPI, rappelons qu'ils sont porteurs à vie du virus et ne réalisent pas de réponse immunitaire sérologique contre le BDV (ANON., 2020).

2.5.3.1. Détection virale

2.5.3.1.1. Isolement viral en culture cellulaire

L'isolement viral repose sur la mise en culture d'un échantillon sur des cellules ou une lignée cellulaire. Historiquement, cette technique était frustrante car presque tous les isolats de pestivirus sont non cytopathiques et par conséquent plus difficile à mettre en évidence. Des tests d'interférence et d'immunodiffusion avaient été développés avant que la technique d'immunofluorescence (IF) ne devienne la technique de révélation la plus utilisée à partir des années 1970 (Terpstra, 1978).

Les souches non cytopathiques de pestivirus sont des contaminants connus des cultures cellulaires au sein des laboratoires d'analyses notamment via le sérum de veau fœtal. Il est donc essentiel que les laboratoires aient garanti un approvisionnement en sérum de veau fœtal ou en culture cellulaire sans contamination virale ou activité anti-pestivirale.

Le virus peut être isolé dans un grand nombre de cellules primaires ou de lignées cellulaires ovines (écouvillons, reins, poumons), et dans une moindre mesure bovines. Les lignées cellulaires continues d'origine ovine sont rares et commercialement difficiles à obtenir, le plus souvent le virus est amplifié sur la lignée MDBK (Madin Darby Bovine Kidney, cellules de rein bovins, ATCC CCL-22). Des lignées semi continues dérivées de

muscle d'agneau fœtal (FLM) ou de plexus choroïde de mouton peuvent être utilisées mais ces différentes lignées varient notamment sur leur sensibilité au virus. (ANON., 2020)

La rate, la thyroïde, le thymus, le rein, le cerveau, les nœuds lymphatiques et l'appareil digestif sont les meilleurs organes pour l'isolement viral. La semence des béliers infectés peut aussi être utilisée pour la mise en évidence du virus mais celle-ci est particulièrement cytotoxique et doit être diluée à minima au 1/10^{ème}. Par conséquent, le plus souvent, les échantillons de sang sont plus facilement exploitables en comparaison avec la semence dans le but d'identifier des infectés permanents (Nettleton et al., 1998).

Pour l'isolement viral, les résultats faussement positifs peuvent être dus à un défaut de la technique de détection des souches non cytopathiques ou au fait que l'animal prélevé possède des anticorps d'origine maternelle (< 4-5 mois). Ces anticorps colostraux, s'ils sont en quantité suffisante, inactivent une grande partie de la charge virale, diminuant la sensibilité de la méthode d'isolement. Enfin, compte tenu de la charge virale plus importante chez les IPI que chez les infectés transitoires, l'isolement viral est mieux adapté à la recherche de ces premiers et déconseillé pour les animaux de moins de trois mois (présence possible d'anticorps colostraux) (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018).

Par rapport aux techniques plus récentes (immunohistochimie, ELISA et RT-qPCR), les techniques de détection de l'antigène viral apparaissent moins sensibles que la RT-PCR. Cependant, pour le diagnostic définitif de Border disease, l'isolement du virus est requis. Celui-ci est hautement spécifique, toutefois cette technique est haute consommatrice de temps, onéreuse et pas assez sensible lorsque l'autolyse est présente (García-Pérez et al., 2009).

En conclusion, cette technique permet d'isoler une souche infectieuse, qui peut par la suite être caractérisée aux plans biologiques et moléculaires, utilisée à des fins de recherche ou enfin à la production de souches atténuées pour de futurs vaccins.

2.5.3.1.2. Immunohistochimie

La détection des antigènes viraux des protéines Erns et NS2-3 par immunohistochimie est possible dans la plupart des tissus chez les animaux IPI. Cependant, cette méthode n'est pas utilisée en routine pour un diagnostic de certitude. Elle doit être réalisée sur des sections de tissus congelées fixées à l'acétone ou sur des échantillons fixés (le plus souvent au formol) et imprégnés de cire de paraffine en utilisant des anticorps appropriés. Des anticorps pan-Pestiviraux avec une spécificité vers NS2-3 et Erns peuvent être utilisés. Les tissus avec un taux élevé d'antigène viraux pouvant être analysés sont le cerveau, la glande thyroïde, les poumons et la muqueuse buccale. Npro étant une protéine virale et sécrétée, la sensibilité de la détection semble meilleure en comparaison avec la protéine NS2-3. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

De plus, des biopsies de peau ont été montrées comme étant utiles lors de diagnostic in vivo d'une infection persistante au virus de la border disease. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

2.5.3.1.3. Elisa antigène

Plusieurs tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ont été publiés pour détecter des pestivirus et un grand nombre de kits commerciaux sont disponibles en particulier pour détecter le BVDV chez les vaches. Ce sont soit des tests dits directs soit des ELISA de capture, la plupart détectant la protéine NS2-3 ou la protéine Erns. Bien que certains de ces tests puissent être utilisés chez le mouton pour le virus BDV (utilisation d'anticorps qui reconnaissent tous les pestivirus ou juste le BVDV et le BDV), ces tests n'ont pas été calibrés pour cette utilisation et de plus amples études seraient nécessaires pour les valider leur application dans le cas de la Border Disease (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

Il n'existe pas de tests ELISA spécifiques du BDV. Par contre, des ELISA de capture utilisant des anticorps monoclonaux reconnaissant le BVDV et le BDV sont commercialisés. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018).

Le choix des anticorps est crucial, ceux dirigés vers des épitopes conservés contre par exemple la protéine NS3 détecteront un grand nombre de pestivirus incluant le virus de la border disease. A l'inverse, d'autres anticorps dirigés contre une protéine de l'enveloppe Erns pourront détecter tous les virus de la diarrhée virale bovine mais ne permettront pas la détection de la majorité des virus Border Disease (International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology et al., 2003).

Les tests ELISA peuvent être utilisés sur les échantillons sanguins et sur des suspensions tissulaires plus précisément le cartilage auriculaire (voir la rate si l'animal est mort) principalement pour détecter les animaux IPI.

La sensibilité est proche de celle de l'isolement viral et c'est une méthode pratique et peu coûteuse pour étudier un grand nombre d'échantillons de sang.

Comme pour l'isolement viral, des taux élevés d'anticorps colostraux peuvent masquer une virémie persistante dans les deux premiers mois de vie des IPI aboutissant à des résultats faux négatifs. Cette interférence est maximale si le substrat est le sang, elle est moins importante si le prélèvement est constitué de cartilage auriculaire.

Enfin, dans le domaine de la recherche, les ELISA antigènes sont utilisés sur des cultures cellulaires pour confirmer les infections avec les souches ncp, comme alternative aux méthodes d'immunofluorescence et d'immunopéroxydase. L'ELISA NS3 ne serait pas assez sensible pour détecter des phases d'infections transitoires aiguës sur des échantillons de sang, les tests ELISA Erns sont en cours de validation. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

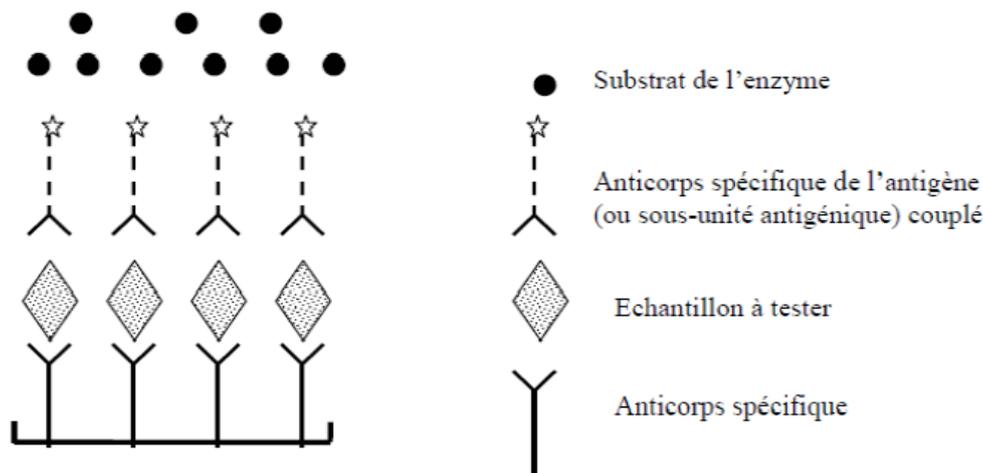


Figure 3 : Schématisation de l'ELISA antigène (Meyer, séminaire ENVT 2007)

2.5.3.1.4. RT-PCR

Cette technique, aussi nommée Reverse Transcriptase Polymérase Chain Reaction (RT-PCR) consiste à mettre en évidence le matériel génétique du virus. Différents types d'échantillons peuvent être utilisés tels que le sang total, le sérum, le plasma, le lait, la peau, le cartilage auriculaire ou encore des organes. La première étape consiste en une extraction de l'ARN Viral. Ensuite, grâce à l'intervention de la reverse transcriptase, on obtient un ADN complémentaire (ADN c) qui va être amplifié, la plupart du temps en utilisant la méthodologie Taqman (utilisation des 2 amorces et d'une sonde de fluorescence, spécifiques des pestivirus). (Vilček, Paton, 2000)

Ces tests sont maintenant utilisés de manière courante dans le monde entier. C'est une technique plus sensible et plus spécifique que l'isolement viral, notamment si on utilise une RT-PCR en temps réelle, qui est la technique la plus utilisée actuellement. Elle permet la détection de quantité très faible d'ARN viral et peut être effectuée sur des mélanges de prélèvements de plusieurs individus (mélange de 20 pour le sang, lait de tank). (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

Cette technique possède l'avantage de pouvoir détecter à la fois les infections virales et les acides nucléiques résiduels. En effet, cette technique ne nécessite pas que le virus soit encore infectieux, elle permet d'investiguer la recherche des pestivirus sur des prélèvements abimés, type avortons ou agneaux mort-nés. De plus, l'interférence des anticorps colostraux reste très limitée : la présence d'anticorps spécifiques du virus dans un échantillon n'a pas d'effet sur la recherche de l'ARN. Toutefois, la présence d'anticorps colostraux en quantité réduit drastiquement la multiplication du virus et donc indirectement la sensibilité de la RT-PCR en temps réel. Il n'en reste pas moins que c'est un test indiqué pour la recherche du statut des jeunes animaux encore sous immunité colostrale.

Cette méthode est aussi utile pour étudier la semence, elle s'est montrée plus sensible que l'isolement viral, sous réserve d'utiliser des protocoles spécifiques d'extraction de l'ARN. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

Du fait du potentiel des ruminants à être infectés avec des souches génétiquement différentes de BDV ou BVDV, une amorce panpestivirale réactive PCR en temps réel doit être utilisée. Dans certains kits, plusieurs couples d'amorce sont utilisés pour couvrir toutes les souches de BVDV et BDV. Si nécessaire les prélèvements positifs peuvent être identifiés plus précisément en utilisant des RT-PCR spécifiques du genre, voir du génotype pour le BVDV. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

Il est important de noter que différents génotypes du virus BDV peuvent circuler au sein des populations, particulièrement chez les ruminants sauvages comme les chamois ou les cerfs, et peuvent toucher les moutons. L'application d'une RT-PCR spécifique du BDV doit être interprétée avec précaution dans le sens où certains variants ou certains génotypes non reconnus peuvent ne pas être détectés. (Mishra, 2012)

Les points négatifs de ce test restent le prix pour la réalisation d'analyses individuelles et l'équipement nécessaire pour l'effectuer. Néanmoins, la possibilité de tester plusieurs échantillons mélangés diminue nettement les coûts. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

2.5.3.2. Détection des anticorps

Les anticorps anti-BDV peuvent être détectés dans le sérum des moutons en utilisant différentes techniques telles que la séroneutralisation (SN) ou des ELISA Anticorps. Le test d'immunodiffusion sur gel d'agar moins sensible n'est pas recommandé. Il est important d'inclure dans chaque test un sérum de référence.

Les sérologies sur le sang collecté provenant de brebis ayant mis bas ou provenant d'agneaux suspect d'être IPI permettent une grande aide au diagnostic. Un seul mélange de sérum (mélange de 5 sérums, ou sur lait de tank) peut aussi être utilisé en ELISA pour déterminer la prévalence de BDV dans un troupeau une région ou un pays (Paton, 1995). Les sérums sont les meilleurs échantillons afin de confirmer une infection aiguë au BDV. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

2.5.3.2.1. Test de séroneutralisation (SN)

Ce test est un test semi-quantitatif fonctionnel permettant d'évaluer la capacité du sérum à neutraliser le virus.

Pour ce faire, on dispose dans différents puits ou tubes des dilutions successives (généralement de 2 en 2) du sérum à tester, en partant du sérum non dilué. Les sérums ayant été préalablement décomplémentés. On rajoute dans chaque puits une quantité constante de pestivirus (entre 150 et 250 TCID₅₀ par puit/tube) et on laisse incuber 1 heure à 37°C (condition la plus souvent utilisée, il existe une variante où l'incubation se fait sur 12 heures à +4°C). Le contenu de chaque puits est alors inoculé sur des cultures cellulaires sensibles à l'infection par les pestivirus. Ces tapis de cellules peuvent être des cellules de testicules ou de rein d'agneau mais souvent ce sont les cellules MDBK qui sont utilisées à raison de 10⁵ cellules par puits de plaque 96 puits. Ces lignées cellulaires doivent préalablement être testées comme étant négatives en Pestivirus.

Le choix des pestivirus utilisés dans le test de séroneutralisation est difficile du fait de leur diversité antigénique. Souvent les souches utilisées sont des souches cytopathiques de référence (Moredu pour le BDV ou NADL et OregonC24V pour le BVDV). Si la souche virale est cytopathique, les effets sont alors directement observables et la neutralisation du virus est facilement observable (virus non neutralisé => cellules lysées). Les souches cytopathiques sont cependant très rares sur le terrain et seules les souches ncp sont capables d'infecter les fœtus et de produire des IPI. Par conséquent, il est plus courant d'utiliser une souche locale non cytopathique et de lire les résultats après détection du virus via une technique d'immunofluorescence (rare car trop compliquée pour des grands échantillons) ou d'immuno-histochimie (IHC), la technique de coloration à l'immunopéroxydase étant la plus utilisée. Cette dernière technique est source de discussion dans la mesure où il n'existe pas de protocole standardisé actuellement. L'interprétation et la comparaison entre résultats étant d'autant plus difficiles. (Nettleton et al., 1998)

Comme pour tout marquage utilisant la détection des antigènes viraux par IHC à la peroxydase, il existe différentes étapes communes comprenant la fixation des cellules, leur perméabilisation, une saturation pour limiter le bruit de fond, puis le marquage proprement dit des antigènes via l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-pestiviraux puis d'anticorps anti-immunoglobulines de souris couplés à la peroxydase.

Pour exemple, le groupe IDvet possède un protocole utilisant une solution de fixation composée à 80% d'acétone et 20% de tampon phosphate salin, d'une solution pour la perméabilisation (tampon phosphate salin avec ajout de 2% de Triton x100), d'une solution de saturation (tampon phosphate salin avec ajout de 10% de sérum de cheval) et une solution de dilution des anticorps (tampon IPMA : 38,5g NaCl, 1% Tween 20, 0,1% NaN₃ et 1% BSA pour 1L de tampon phosphate salin) lors de l'étape de marquage.

A l'inverse, une étude récente datant de 2016 réalisée par Kaiser et al en Suisse, a mis en place un protocole se basant sur des aspects plus « mécaniques ». En effet dans cette étude, l'étape de fixation a été réalisée à travers un séchage des cellules à température ambiante, puis une perméabilisation des cellules par une incubation dans un four à 80°C, pendant 2 heures. Ce protocole présente l'avantage de diminuer le nombre de manipulation (Kaiser et al., 2016). Il est donc nécessaire de s'adapter en fonction des produits et du matériel disponible au sein du laboratoire d'analyse.

La quantification de la capacité neutralisante est obtenue en calculant un titre de neutralisation. Le titre est obtenu en déterminant la dernière dilution à laquelle le virus a été neutralisé dans 50 % des puits. Le plus souvent en utilisant la formule statistique de Spearman-Kärber. Cette technique suppose qu'un minimum de 4 puits de cellules soit testé pour chaque dilution de sérums. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018).

La réponse mesurée prise en compte dans cette méthode est l'apparition d'un effet cytopathique au niveau des cultures cellulaires au sein des puits (ou la présence du virus dans le puits pour les souches ncp). Cette méthode statistique permet d'obtenir la dilution du sérum permettant d'obtenir un effet cytopathique dans 50% des puits grâce à la formule suivante :

$$\log ED_{50} = L - d(\sum P - 0,5)$$

Où :

L : Log de la plus haute dilution à laquelle tous les puits restent intacts ;

d : log du facteur de dilution (i.e. la différence entre le log des intervalles de dilution) ;

$\sum P$: somme des proportions des tests « positifs » (i.e. puits intacts non infectés), allant de la plus haute dilution donnant un résultat positif jusqu'à la plus haute dilution donnant tous les résultats positifs (i. e., $P=1$)

En conclusion, la SN reste la méthode de référence car elle est sensible et spécifique. Certains auteurs ont étudié l'efficacité de vaccins dirigés contre le BVDV par cette technique (Hamers et al., 2002). Cependant elle est longue (5 à 7 jours) et fastidieuse. Il est important de souligner qu'aucune souche virale n'est idéale pour ce type de test. Le choix doit se porter par rapport à l'objectif que l'on se fixe. Dans le domaine de la recherche, lors d'infection expérimentale, on réalise des tests de séroneutralisation contre différentes souches, dont celle qui a été utilisée pour l'inoculation d'épreuve. Lors de dépistage pour le contrôle de la maladie, le choix de la souche est plus complexe. Les souches locales devraient être testées afin de voir quelle souche donne le plus haut taux d'anticorps avec un panel de souches de moutons positifs (Nettleton et al., 1998).

Toutefois, rappelons que ce sont les ELISA et non la SN qui sont alors principalement utilisés. En effet, les tests ELISA sont peu coûteux, automatisables et rapides.

2.5.3.2.2. ELISA indirect

Dans cette technique, l'antigène (virus entier, protéine virale immunogène Erns ou NS2-3) est fixé au fond des puits d'une plaque. On dépose ensuite le sérum à tester contenant ou pas les anticorps antipestiviraux. On réalise un lavage puis on détecte la présence éventuelle des anticorps antipestiviraux en utilisant des anti-immunoglobulines spécifiques d'espèces couplés à la peroxydase. Après l'ajout d'une solution de substrat, on mesure le signal lumineux émis par densité optique avec un spectrophotomètre. Cette mesure étant directement reliée à la quantité d'anticorps présent dans l'échantillon. L'interprétation se fait selon les kits commerciaux par comparaison avec des puits contrôles négatifs et positifs. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

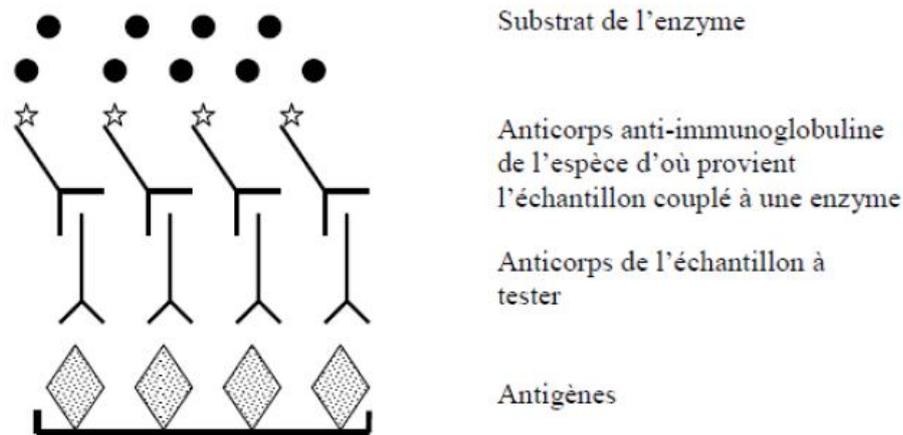


Figure 4 : Schématisation de l'ELISA indirecte (Meyer, séminaire ENVT 2007)

2.5.3.2.3. ELISA compétition

Les plaques contenant les puits contiennent l'antigène NS2-3. Lors de la phase de dépôt des sérums, les anticorps recherchés dans le sérum sont mis en compétition directe avec des anticorps anti-NS2-3 couplés à la peroxydase, pour leur fixation aux antigènes (protéine NS2-3) présents au fond des puits. On obtient donc une densité optique inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon (Nettleton et al., 1998).

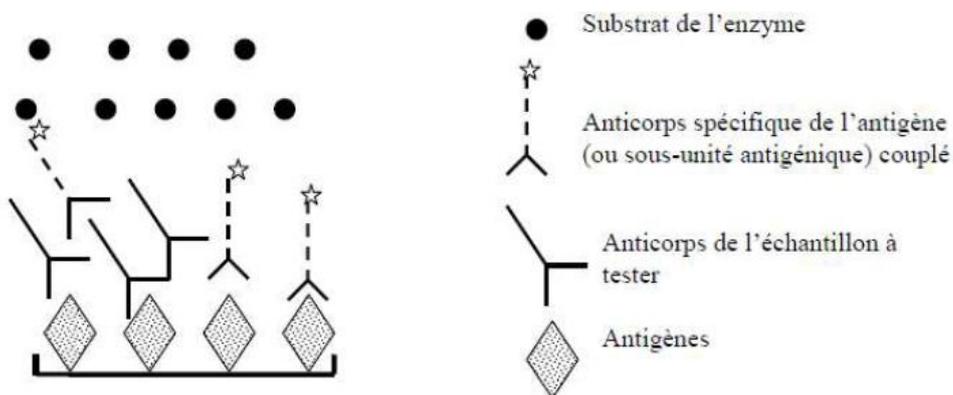


Figure 5 : Schématisation de l'ELISA compétition (Meyer, séminaire ENVT 2007)

Ces techniques ELISA sont rapides automatisables et peu coûteuses. Elles peuvent être réalisées sur sérum ou lait de mélange. Cependant, il est important de souligner que la sensibilité et la spécificité de l'ELISA-anticorps réalisé sur lait de tank afin d'estimer la prévalence au sein d'un troupeau dépend de plusieurs facteurs tels que le temps passé depuis l'infection du troupeau, le nombre de laits individuels à l'origine du lait de tank, l'existence d'un interventionnisme actif et la présence de pestivirus capable d'importer les anticorps dans le lait (Berriatua et al., 2006).

2.6. Contrôle de la maladie

Le contrôle de la maladie s'illustre autour de deux points. La prophylaxie sanitaire, ne faisant appel qu'à des mesures d'hygiène et d'élimination du facteur causal. A l'inverse, la prophylaxie médicale consiste comme son nom l'indique en l'application de moyens médicaux (vaccins, médicaments). Il est important de comprendre que pour le cas de la Border disease comme pour la BVD, la prophylaxie médicale vient le plus souvent en complément des mesures sanitaires.

2.6.1. Prophylaxie Sanitaire et biosécurité

La clé de voute de l'épidémiologie des pestivirus est la présence d'animaux IPI excréteurs à vie du virus. La prophylaxie sanitaire est directement liée au statut du cheptel et se concentre d'abord sur le dépistage et l'élimination des IPI puis sur les mesures de biosécurité, notamment pour limiter l'introduction du virus dans les cheptels sains.

Le contrôle de la BVDV chez les bovins est devenu obligatoire depuis 2020 et suit un cahier des charges précis décrivant toutes les situations épidémiologiques et les conditions de dépistage des troupeaux (ANON., 2020). Toutefois, il n'existe aucun plan de contrôle officiel pour le BDV. Des plans locaux existent dans le bassin de Roquefort où l'impact de la maladie a été démontré. Ceux-ci visent à limiter la circulation virale au sein des troupeaux supposés infectés et entre cheptels notamment lors de pâtures attenantes ou encore pendant la période de transhumance. De plus, à plus grande échelle, il s'agit d'éviter de vendre des animaux viropositifs pour l'élevage (ex: animaux sélectionnés) et d'éviter la contamination des ateliers d'engraissement. (Loubière, 2012)

Pour un cheptel indemne de BDV, la prophylaxie devrait se concentrer sur un dépistage systématique des animaux qui doivent être introduits dans le troupeau. Le dépistage annuel des IPI (sur les agneaux nouveau-nés) et des individus virémiques transitoires peut aussi être utilisé si des conditions épidémiologiques sont à l'origine d'une situation à risque. Une gestion stricte du voisinage ainsi qu'une surveillance sérologique du cheptel régulière doit être mise en place.

Dans le cas d'un cheptel infecté, le but est de dépister et d'identifier les IPI afin de les séparer des femelles sérologiquement ou virologiquement négatives et de les éliminer le plus rapidement possible. Cela suppose à minima de contrôler les nouveau-nés et les jeunes (les plus susceptibles d'être IPI). Ce plan est comparable au modèle Bovin pour la gestion de la diarrhée virale bovine.

La détermination du statut de l'animal IPI ou non IPI repose sur des analyses virologiques et sérologiques comme présentées précédemment. (International Office of Epizootics, Biological Standards Commission, 2018)

Sur sang, la détection du virus peut être réalisée par ELISA ou RT-qPCR. Si la virémie d'un animal est négative, il ne s'agit très certainement pas d'un IPI ni d'un infecté transitoire (si la technique utilisée est la RT-PCR). Cependant, on ne peut pas toutefois exclure un passage viral, compte tenu de la sensibilité et la spécificité du test, de l'interférence possible

des anticorps colostraux, et de la date de prélèvement par rapport au début de l'infection. La sérologie décalée de quelques jours peut alors être intéressante à mettre en place pour mettre en évidence une infection transitoire. Si la virémie est positive, il est alors nécessaire de refaire un second test afin de dissocier infectés permanents et infectés transitoires. Celui-ci peut être réalisé environ 3 semaines plus tard (Nettleton et al., 1998).

Si la sérologie est positive en SN ou en ELISA NS2-3, l'animal est alors non IPI, il a été infecté de manière transitoire et/ou vacciné. Si le test utilisé est la SN, l'animal est alors immunocompétent, les anticorps neutralisants peuvent persister jusqu'à trois ans (Løken, 1995).

Concernant le choix de ces tests, il semble important de prendre en compte deux paramètres notamment le coût de réalisation de ces tests mais aussi avoir une spécificité et une sensibilité assez haute du fait du préjudice financier causé par l'élimination des individus positifs.

En plus de l'identification et de l'élimination des IPI. Certains GDS notamment le GDS 31, GDS 64 ou 12 ont mis en place des plans de gestion via la prophylaxie annuelle. Des analyses sérologiques sont réalisées sur le lait de tank ou sur un mélange de séra. Le but est principalement de suivre le statut global de l'élevage et d'identifier un passage viral au sein du troupeau (ANON., 2020).

En terme de biosécurité, plusieurs recommandations peuvent être mise en place dans le but de prévenir une éventuelle contamination au sein des cheptels sains ou au contraire d'éviter la propagation via les cheptels infectés.

En effet, il est conseillé d'éviter les pâtures mixtes (par exemple ovins – caprins ou encore ovins – bovins) pour limiter les transmissions inter espèces. Une gestion du voisinage rigoureuse ainsi qu'une protection vis-à-vis de la faune sauvage peut aussi être ajoutée.

De plus, il est important d'utiliser de façon vigilante le matériel circulant entre des élevages différents ou entre deux pâtures différentes. Il est par conséquent recommandé de correctement nettoyer et désinfecter les bottes et le matériel en général. L'utilisation de surbottes, blouses ou pédiluve peut être conseillé (de Cremoux, 2013).

2.6.2. Un seul cas de gestion intégrée de la pestivirose Ovine : l'Aveyron

L'Aveyron est le seul département français impliqué depuis plus de 20 ans dans une gestion intégrée et collective de la maladie. Cela s'explique en grande partie par la sévérité clinique et l'impact économique qu'a eu la première épizootie à BDV (1983-1985). Un réseau d'épidémiosurveillance à pestivirus, organisé par la FODSA (Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron), a alors été rapidement 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 d'origine des agneaux et ceci afin de ne pas contaminer des animaux sains.

Grâce à ces mesures, le nombre de cheptels séropositifs a progressivement diminué passant de 20% en 1998, à une prévalence de 4% en 2005. Entre 2006 et 2008, la prévalence est passée de 5,1% à 8%. Fin 2008, une reprise de la circulation virale de la Border Disease avec des incidences cliniques importantes a été suspectée et confirmée début 2009. Les acteurs de la filière ont alors consécutivement engagé différentes actions pour mieux renforcer le dispositif de surveillance et relancer les mesures de gestion. (Loubière, 2012)

Le dépistage sérologique a ainsi été étendu à la moitié des cheptels ovins de plus de 50 ovins (augmentant le nombre d'animaux testés, 9 mélanges de 5 sérums) tout en continuant de tester les cheptels positifs de l'année précédente et les cheptels sélectionneurs. En 2010, sur 1723 cheptels testés, la séroprévalence moyenne était de 9,3%, avec une différence significative entre cheptels laitiers (6% de séropositifs) et allaitants (22% de séropositifs) (Bernardin, 2011)). Sur 1200 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 (Corbière et al., 2012) puis en l'intégrant en 2011 à son dispositif d'épidémiologie. Pour résumer, le dépistage sérologique est actuellement réalisé lors de la prophylaxie de printemps-été chez tous les éleveurs laitiers et allaitants du département sur un échantillonnage d'animaux dans chaque élevage. Le dépistage sur lait de tank se fait lui à l'automne sur base du volontariat, au plus près de la rentrée des agneaux en atelier d'engraissement. Lors de la campagne laitière 2013/2014, 44% des cheptels laitiers ont réalisé un prélèvement sur leur lait de tank. (Bernardin, 2011)

Parallèlement au dépistage, la FODSA a proposé des plans d'action et de maîtrise de la pestivirus ovine qui reposent en premier lieu sur la vaccination et l'application de mesures de biosécurité. 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). Dans les élevages séronégatifs, l'accent est mis sur la biosécurité à l'introduction d'ovins contaminés et sur le voisinage. Dans les élevages naisseur-engraisseurs séronégatifs, celui-ci est mis en plus sur l'introduction d'agneaux contaminés en 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 de 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, liée aux coûts (pris en charge par la FODSA) du dépistage par RT-qPCR individuelle ou de mélange (gestion collective). (ANON., 2012)

2.6.3. Suivi sérologique

En plus de l'identification et de l'élimination des infectés permanents immunotolérants, certains GDS notamment le GDS 31, GDS 64 ou le GDS 12 ont mis en place des plans de gestion via la prophylaxie annuelle.

En effet, des analyses sérologiques sont réalisées sur le lait de tank, sur le sérum ou sur un mélange de sera. Le but est principalement de suivre le statut global de l'élevage et aussi le passage viral au sein du troupeau.

Une étude a été menée dans le Nord de l'Espagne visant à étudier la corrélation entre des analyses sérologiques réalisées sur le lait de tank au sein des élevages ovins et la séroprévalence au sein du troupeau. Il a pu être montré que les analyses sérologiques du lait de tank permettaient une appréciation globale de la prévalence au sein du troupeau. De plus, cette dernière méthode représente l'avantage de pouvoir être réalisée plus facilement matériellement, à plus grande échelle et est plus intéressante économiquement.

En effet, les analyses sérologiques sont directement reliées à l'identification et l'élimination des animaux IPI. Par conséquent, dans l'idéal, après des analyses sérologiques sanguines individuelles de l'intégralité du troupeau, les individus séronégatifs devraient être testés par le biais d'un ELISA antigène. Cette méthode est très coûteuse. En effet, pour un troupeau d'environ 250 femelles reproductrices, ces analyses s'élèveraient à environ 2 875 euros. A l'inverse, en utilisant une analyse via le lait de tank le nombre d'analyses de sérum individuel pourrait être diminué et par conséquent le coût de l'analyse global plus abordable pour l'éleveur. Cette stratégie est notamment largement utilisée pour la gestion de la diarrhée virale bovine. (García-Pérez et al., 2010)

3. Réponse immunitaire et protection vaccinale

La protection de l'individu repose sur la mise en place d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire suite à l'infection. De même, la vaccination devrait permettre de stimuler une réponse protectrice totale avec deux orientations principales.

Premièrement, la protection contre une infection transitoire notamment chez les jeunes ovins et bovins car les pestivirus sont immunosuppresseurs et favorisent donc la venue d'autres pathologies au sein de l'élevage et deuxièmement la protection du fœtus in utero lors d'infection de la mère dans le but d'éviter la formation d'IPI.

3.1. Réponse immunitaire humorale : le rôle des anticorps

Les anticorps sont produits par les lymphocytes B et excrétés sous forme circulante dans le sang et les liquides biologiques par les plasmocytes. Ces derniers jouent un rôle central au niveau de l'immunité acquise notamment en terme de neutralisation mais aussi et surtout en terme de mémoire. C'est sur ce principe que se base la vaccination : en mettant en

contact le système immunitaire une première fois avec l'agent pathogène, la réponse lors d'un contact ultérieur sera bien plus rapide et efficace.

Au niveau des pestivirus, les données sur l'immunité ont été obtenues lors d'études sur le BVDV ou le CSFV, mais pratiquement aucune étude n'existe pour le BDV. Les principales protéines structurales immunogènes sont E2 et Erns (Vilcek et al., 1997).

La glycoprotéine E2 est la glycoprotéine majeure et la cible antigénique pour les anticorps. De plus, elle est très fortement antigénique et suscite la production d'anticorps neutralisants chez l'hôte après infection ou vaccination avec des vaccins vivants ou inactivés. Elle est peu conservée entre les pestivirus.

La glycoprotéine Erns est une protéine hautement glycosylée de l'enveloppe et entraîne la production de taux importants d'anticorps chez les animaux. Même s'ils sont impliqués dans la protection, les anticorps dirigés contre Erns ont une activité neutralisante réduite (Vilcek et al., 1997).

Enfin, la protéine non structurale NS2-3 englobe une région divisée en deux polypeptides séparés NS2 et NS3. Cette protéine est conservée entre pestivirus (notamment NS3), stable dans les cellules infectées et fortement immunogène (Chase, 2013). Les vaches naturellement infectées à l'aide d'une souche BVDV ou d'un vaccin vivant modifié développent une réponse forte en anticorps NS2-3 pendant que les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé développent une réponse plus faible, ce qui n'est pas le cas pour E2. Toutefois, les anticorps anti-NS2-3 ne sont pas ou très peu neutralisants. Comme NS2-3 est conservée entre les pestivirus, il existe des réactions immunologiques croisées entre le CSFV et le BDV, le BVDV et le BDV (Vilcek et al., 1997).

Des études ont montré, lors d'infections naturelles ou suite à une vaccination avec un vaccin vivant modifié, une réponse immunitaire majoritairement dirigée vers les protéines virales E2 et NS2-3 et dans une moindre mesure contre les protéines virales Erns. A l'inverse, lors d'une vaccination avec un vaccin vivant inactivé, la réaction humorale est principalement dirigée contre la protéine virale E2 et dans une moindre mesure contre les autres protéines. En se basant sur des épreuves de neutralisation utilisant des anticorps monoclonaux, des épitopes neutralisant majeurs ont été identifiés sur E2. (Ridpath, 2013)

La capacité des anticorps anti-BVDV à protéger contre l'infection est dépendante de la souche virale, des taux d'anticorps et de leur avidité pour les antigènes de la souche infectante. Les anticorps BVDV totaux détectés par ELISA sont indicateurs de la mise en place d'une réponse antivirale plus que de la mise en place d'une réponse protectrice. Par contre, des taux d'anticorps neutralisants élevés préviennent le développement de la maladie et réduisent (plus rarement empêchent) l'infection par la souche d'épreuve homologe. Le rôle principal attribué aux anticorps neutralisants est d'empêcher l'initiation de la multiplication virale, notamment l'attachement (par interposition entre la surface virale et les récepteurs de la membrane cytoplasmique), mais aussi la pénétration, voire la décapsidation. Les anticorps ne pénètrent pas dans les cellules et sont donc sans action sur la réplication. Les anticorps neutralisants ont pour cible les virus extracellulaires, puisqu'ils ne peuvent entrer dans la cellule. Enfin, il est à noter que la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum n'empêchent pas toujours la virémie lors d'infection secondaire ni l'excrétion du BVDV dans les sécrétions nasales. De plus, la présence d'anticorps neutralisant semble plus précoce et à

des taux plus élevés chez des animaux infectés par des souches ncp plutôt que chez les animaux infectés par des souches cp (Chase, 2013).

De façon intéressante, après une infection avec une souche ncp de BVDV, les vaches gravides mettent en place une séroconversion. Les vaches portant un individu IPI développent de plus haut taux d'anticorps en comparaison avec des vaches qui porteraient des fœtus non infectés. Par conséquent, le taux d'anticorps contenu dans le sérum maternel collecté durant le troisième trimestre de gestation pourrait être utilisé pour évaluer la présence de vaches portant un fœtus IPI. Dans une étude composée de 2160 vaches réparties en 126 élevages, ce test a permis d'atteindre une sensibilité incluse entre 94% et 100%. Cependant, la classification correcte des vaches avec fœtus IPI ou non selon le taux de séroconversion reste problématique au sein des troupeaux avec un mélange de vaches naïves. En effet, il est difficile de dissocier les vaches qui ont été infectées, vaccinées tôt ou récemment infectées après que leur veau soit devenu immunocompétent (Kelling, Topliff, 2013).

Les anticorps anti-BDV peuvent être détectés à partir de la première semaine mais plus généralement entre la deuxième et la cinquième semaine post transmission. Ces anticorps, particulièrement les anticorps neutralisants peuvent être détectés tout au long de la vie de l'animal. La réponse immunitaire pourra effectivement éliminer le virus des fluides corporels et du corps dans les 8-10 jours. Cependant, les anticorps d'origine maternels reçus via le colostrum ne peuvent pas éliminer le virus de manière transitoire chez les animaux IPI. Toutefois, il est important de noter que ces derniers peuvent altérer temporairement les seuils de détections des tests diagnostiques. Le titre en anticorps est un indicateur possible concernant une possible réinfection. L'infection par un pestivirus entraîne une immunité protectrice contre une souche homologue pendant environ 1 an et a priori pendant plusieurs années. Cependant, durant cette période, l'animal peut être sensible à d'autres souches hétérologues (Løken, 1995).

La présence d'anticorps d'origine maternelle chez les veaux interférerait avec le développement de la réponse immunitaire induite par une infection naturelle ou la vaccination. Toutefois, les données de la littérature sont diverses et cette interférence ne concernerait pas le développement de la réponse immunitaire cellulaire. En résumé, un veau possédant des taux importants d'anticorps maternels contre le BVDV ne fera pas de réponse sérologique en cas d'infection ou de vaccination mais pourra développer une immunité cellulaire mémoire. (ANON.,2020)

3.2. Réponse immunitaire cellulaire

3.2.1. Réponse innée

Principe

La voie du complément est une des premières étapes de la réponse immunitaire innée. C'est une première ligne de défense systématique et extrêmement rapide. En effet, cela correspond à un système très puissant formé d'une cascade d'enzymes participant à la défense de l'organisme contre l'infection suite à une présentation d'antigène. Cette voie est composée de 3 types de molécules différentes. En premier, l'**opsonine** qui va permettre une

phagocytose, des **anaphylotoxines** qui vont activer le système inflammatoire et enfin un complexe d'attaque membranaire (**MAC**) qui va entraîner une lyse cellulaire.

La reconnaissance initiale permise par cette voie provoque l'émission de médiateurs chimiques entraînant le début de la phase inflammatoire. Celle-ci débute par la phase vasculaire entraînant tout d'abord une vasodilatation due aux cytokines et aux lipides, une adhésion des leucocytes puis des monocytes à l'endothélium devenant alors plus perméable et enfin, pour finir, la diapédèse des leucocytes. Ces derniers réalisent une phagocytose afin d'éliminer le pathogène puis se met en place une boucle d'auto-amplification en 24 à 48h, via la production de cytokines, chimiokines et de dérivés d'acides arachidoniques. Ces molécules produites vont aussi permettre d'amplifier le recrutement, déjà présent, des cellules présentatrices d'antigène (CPA), c'est-à-dire les macrophages et les cellules dendritiques (ANON., 2020).

La voie des interférons est la clef de l'immunité anti-virale. En effet, il existe un grand nombre de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptors*, PRR), capables de reconnaître un ensemble limité de molécules qui signent la présence d'un pathogène ici viral, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP). Il existe plusieurs types de PRR, tels que des membres de la famille des RLR (*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptor*) et les Toll like récepteurs (TLR). Les membres de la famille des « RIG-I-Like Receptors » (RLR) sont cytosoliques. Les TLR constituent une des familles de PRR les plus étudiées. Ce sont des récepteurs transmembranaires ayant d'un côté de la membrane un domaine de liaison aux ligands et de l'autre un domaine TIR (*Toll/IL-1 resistance*) impliqué dans la transmission du signal. Les TLR7, 8 et 3 reconnaissent l'ARN simple ou double brin et entraînent la production d'interférons de type 1. Les TLR2 et 4 sont capables à moindre mesure de reconnaître des protéines virales présentes dans le milieu extracellulaire. Enfin, un ensemble hétérogène de récepteurs cytosoliques propres à l'ADN double-brin (ADN db) a été caractérisé récemment pour sa capacité à induire la production des interférons de type I.

L'activation des PRR va entraîner la production d'interférons de type 1 (INF-I). Ces interférons sont des cytokines : elles sont produites par des cellules afin d'envoyer un signal à d'autres cellules. Dès qu'il est produit, il va se fixer sur les récepteurs avoisinants et déclencher une cascade aboutissant à l'activation d'environ 300 gènes à fonction antivirale. Ces gènes ont des fonctions différentes comme par exemple le blocage de la production protéique, des polymérase virales, l'activation d'enzymes dégradant les ARN ou bloquant la transcription, la présentation des antigènes viraux pour alerter le système immunitaire, voire une apoptose de la cellule infectée. Tout ceci va permettre un arrêt de la réplication virale (Hansen et al., 2010 ; ANON., 2020).

Régulation de la réponse immunitaire innée

Plusieurs études ont été menées sur la réponse immunitaire mise en place lors d'infection par le BVDV. En effet, un des points clef est l'inhibition de la réponse en interféron par les souches ncp.

Les pestivirus expriment deux facteurs aidant au contrôle de la réponse en interféron, Npro et Erns.

Npro serait utilisée pour supprimer la réponse en interféron via son effet sur IRF3 dans la cellule.

A l'inverse, la protéine Erns, sous sa forme sécrétée dans le sang fonctionnerait plus au niveau systémique. Cette protéine a une activité Rnase plus importante pour les formes ARN double brin. Une fois sécrétée, elle pourrait être internalisée dans les cellules, notamment les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDCs), via une endocytose clathrine-dépendante. Dans la cellule, elle dégraderait l'ARN directement transféré des cellules infectées voisines, prévenant la liaison des ARN viraux aux TLR7, 8 et 3 et la production d'INF-I.

Par conséquent, Erns Rnase et Npro travaillent ensemble pour l'inhibition de la réponse immunitaire innée en INF-I. Ces facteurs viraux permettent aux souches ncp de diffuser rapidement via le sang dans l'organisme et potentiellement d'infecter rapidement les fœtus avant la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique. Cela a été montré lors d'infection expérimentale (Meyers et al., 2007). Par ailleurs, le virus BVDV muté du gène Npro ou du gène Erns se comporte comme la souche sauvage ncp. Par contre, un double mutant délété des 2 gènes ne diffuse pas chez la vache et se comporte comme une souche cp. A la différence du double mutant, les souches cp possèdent Npro et Erns, pourtant elles diffusent peu dans l'organisme et sont responsables d'une réponse INF-I. Ces différences entre souches cp et ncp ne sont pas encore totalement comprises. Ce qui est certain, c'est que dans les souches cp, on trouve majoritairement les protéines NS2 et NS3 clivées, alors que c'est la forme NS2-3 non clivée qui est présente dans les souches ncp. NS3 a une activité cytolytique mais serait aussi impliquée dans la production de très larges quantités d'ARN double brin. Il se pourrait que la production importante d'ARN db dépasse le système de régulation de la protéine Erns et aboutisse à la production d'INF-I, limitant leur diffusion (Peterhans, Schweizer, 2013).

Par ailleurs pour savoir si les fœtus réagissaient de manière différente aux souches cp et ncp de BVDV, des infections in utero dans le liquide amniotique ont été réalisées avec des souches BVDV-2 cp et ncp et des mutants ôtés des gènes Npro ou Erns ou ERns + Npro. Une première étude d'infection aigüe a montré que si la souche ncp sauvage n'induisait pas de production d'INF-I par le fœtus la souche cp, les mutants eux induisaient de l'INF-I. Dans tous les cas, il était possible d'isoler le virus dans le fœtus (Meyers et al., 2007). Dans une seconde expérience, pour savoir si du BVDV ôtés des gènes Npro et Erns était capable d'établir une infection persistante une fois dans le fœtus, les auteurs ont directement inoculé ce virus muté dans des fœtus de 74 jours et ont réalisé un suivi viral sur 2 mois. Malheureusement, les 3 vaches infectées ont avorté sans que le virus puisse être détecté (autolyse rapide des fœtus), ne leur permettant pas de savoir si le double mutant avait un pouvoir abortif (Meyers et al., 2007). Toutefois, l'avortement pourrait être corrélé à la forte production d'INF-I par le fœtus infecté par le double mutant (Peterhans, Schweizer, 2013).

En conclusion, l'absence d'infection fœtale par le double mutant serait d'abord expliquée par son incapacité à interférer avec la réponse innée de la mère et par conséquent son incapacité à infecter le fœtus. Par conséquent, ces deux éléments sont particulièrement importants pour l'établissement et la maintenance des infections permanentes.

Depuis que les animaux infectés permanents jouent un rôle crucial dans la maintenance des pestivirus au sein des populations hôtes, ces deux facteurs sont d'une importance majeure pour ces virus et ont été par conséquent conservés durant l'évolution du virus (Tautz et al., 2015).

Il est important de noter que même la combinaison de contrôle de la réplication d'ARN viral associée avec la répression de la réponse immunitaire innée via Npro et Erns ne conduira pas nécessairement au blocage complet de la réponse immunitaire innée. En réalité,

des données non publiées ont indiqué que des réponses de faibles niveaux peuvent être observées au moins transitoirement.

Cependant, les réactions au sein du fœtus de la réponse immunitaire innée avec une souche BVDV ncp sont évidemment réduites à un niveau tolérable afin d'établir une infection et maintenir la persistance.

La persistance des autres pestivirus n'a pas été investiguée aussi précisément que pour le BVDV mais des différences sont connues. Les similitudes ont généralement plus importantes au sein du groupe des virus infectant les ruminants comparé au CSFV.

Il est important de comprendre que l'infection transplacentaire des fœtus est un thème général dans le sens ou beaucoup d'aspects du concept décrit pour le BVDV ci-dessus pourraient être aussi vrais pour d'autres pestivirus en particulier le besoin de contrôler une réponse immunitaire immune et adaptative. (Schweizer, Peterhans, 2014)

En plus des deux protéines virales présentées précédemment une découverte récente a porté sur la comparaison de l'expression des gènes CXCL12 et CXCR4 entre des vaches portant des individus IPI et des vaches portant des individus non infectés. Cette étude a montré une baisse de l'expression des gènes CXCL12/CXCR4 dans le sang de la femelle gestante lors d'infection par le BVDV et ceci pendant approximativement 90 jours. (Hansen et al., 2010).

La persistance du virus chez les animaux IPI entraîne une stimulation prolongée de la réponse en INF-I et une production permanente des protéines Erns et Npro par la souche ncp. Cela a notamment été montré via l'analyse de l'expression des protéines ISG chez le veau IPI ainsi que l'analyse profils d'expression des gènes impliqués dans la réponse INF-I (e.g. MX2, ISG15...). La stimulation des ISGs est variable dans le temps, jusqu'à 115 jours post infection chez les fœtus IPI et donc après la naissance. Les INF-I pouvant agir en limitant la croissance cellulaire et tissulaire, il se pourrait que la stimulation pérenne du système INF-I chez les IPI ne contribue pas à réduire ou limiter le développement intra utérin du fœtus (Kelling, Topliff, 2013).

3.2.2. Réponse cellulaire spécifique lymphocytaire

L'immunité cellulaire joue un rôle essentiel dans l'élimination du virus BVDV. Certaines protéines non structurales, exprimées lors la réplication virale comme par exemple les protéines NS2-3 et NS4 pourraient jouer un rôle dans l'induction de cette immunité cellulaire. L'immunité cellulaire, dans le cas de la BVD, nécessiterait alors une réplication virale, ce qui est possible avec un vaccin vivant ou lors d'une infection naturelle. (ANON., 2020)

Après phagocytose des virus et débris cellulaires infectés par les cellules présentatrices d'antigène, ces dernières vont maturer, produire des cytokines, processor l'antigène et migrer jusqu'au nœud lymphatique drainant où elles vont présenter aux lymphocytes les antigènes viraux associés aux molécules.

Lors d'infection naturelle par les pestivirus, les cellules présentatrices de l'antigène activées, sécrètent un profil de cytokines (dont l'IL-12) qui vont permettre la différenciation des LT-CD4 en lymphocytes de type Th1 (LTh-1). Les LTh-1 produisent alors de l'IFN γ et

du TNF- α . Les cytokines produites par les LTh1 vont permettre d'une part la différenciation et la prolifération des plasmocytes qui vont produire des anticorps (réponse immunitaire à médiation humorale), et d'autre part la différenciation des LT-CD8 en LT cytotoxiques qui seront les effecteurs de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Les LT cytotoxiques migrent alors au site d'infection pour détruire les cellules infectées. Les antigènes viraux ne peuvent être reconnus par les lymphocytes T CD8+ uniquement s'ils sont présentés au niveau de la cellule infectée associés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou MHC en anglais) de classe-I.

Leur rôle est primordial pour l'élimination complète des pestivirus. Par ailleurs, ces derniers produisent le facteur Il-2 et de l'IFN γ indiquant une réponse mémoire de type 1 chez les vaches infectées.

Les lymphocytes T cytotoxiques ont été mis en évidence 9 mois après une infection au BVDV. Une cartographie précise des épitopes des LT cytotoxiques n'a pas été réalisée. Des prédictions informatiques basées ont toutefois indiqué que les protéines C, Erns, E2 et NS2-3 contiendraient ces épitopes

Le mécanisme présenté ci-dessus n'est pas le seul mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire. En effet, la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, aussi appelée **ADCC** consiste en une lyse d'une cellule cible marquée par des anticorps liés à des antigènes présents à sa membrane par une autre cellule immunitaire. L'ADCC est effectuée par une cellule effectrice, aussi appelée NK (natural killer) qui est capable de reconnaître les Immunoglobulines G (IgG). Cette cellule peut être un macrophage, un neutrophile ou un éosinophile. (Vély, Vivier, 1996)

Le rôle des cellules gamma delta T (LT γ/δ) dans l'infection au BVDV n'a pas encore été pleinement investigué. Les ruminants ont naturellement des taux plus élevés de LT γ/δ en comparaison avec les autres espèces. Morphologiquement, ces cellules ressemblent énormément à des lymphocytes. Cependant, leur fonction s'apparenterait plus aux cellules NK présentes dans l'immunité innée. Il semblerait que ces cellules jouent un rôle important dans le développement de la maladie des muqueuses chez les individus IPI. (Chase, 2013)

Globalement les réponses cellulaires et humorales sont toutes deux importantes lors d'infection aiguë par les BVDV/BDV et sont partiellement spécifiques du génotype pour le BVDV. Lors d'infection en période de gestation, la présence préalable d'anticorps circulants chez la mère jouerait un rôle important pour limiter/empêcher l'infection du fœtus. Enfin, les anticorps maternels bloquent la réponse systémique en anticorps lors d'infection ou de vaccination mais la réponse lymphoïde cellulaire se met en place et apparaît le plus souvent comme étant protectrice.

4. Vaccins et protection contre le BVDV

4.1. Objectifs : Protection transitoire et fœtale

La vaccination représente une stratégie commune et largement utilisée dans de nombreux pays pour prévenir l'apparition d'IPI au sein du troupeau et par conséquent pour prévenir les pertes économiques dues aux infections pestivirales (Tautz et al., 2015 ; Newcomer et al., 2015).

Des vaccins atténués et inactivés contre le BVDV et CSFV sont commercialement disponibles.

Les vaccins vivant viraux ont été atténués par passages successifs de souches sauvages en culture cellulaire. Concernant le BVDV, des preuves claires d'une atténuation sont difficiles à obtenir dans le sens où la plupart des isolats sauvages ne provoquent pas de symptômes significatifs lors d'infection aiguë. En général, les bases génétiques de l'atténuation virale ne sont pas connues, de même que les risques de réversion de la virulence.

En termes d'innocuité, le risque pour les vaccins vivants possédant des souches ncp de pestivirus est leur capacité résiduelle à infecter le fœtus lors de vaccination de vaches gravides. En fonction du vaccin utilisé, la vaccination d'animaux gravides peut ainsi mener à des dommages fœtaux, le déclenchement d'un avortement, ou l'établissement d'infection permanente (Newcomer et al., 2015).

En conséquence, l'utilisation de vaccins vivants pestiviraux contenant des souches ncp est controversée en dépit de leur efficacité exceptionnelle. Cette limite ne s'adresse pas aux vaccins atténués contenant des souches cp puisque ces dernières ne diffusent pas dans l'organisme. De même, une souche vaccinale atténuée a plus récemment été construite par génie génétique en délétant les gènes codant pour Npro et Erns. Lors d'administration en sous cutané ou en intramusculaire, il a été montré que cette souche ne diffusait pas chez les vaches gravides et qu'elle offrait une protection complète contre les infections fœtales à BVDV-1 et BVDV-2 (Meyers et al., 2007).

Pour limiter les risques de diffusion des souches vaccinales atténuées, de nombreux vaccins inactivés ont été développés et produits. Pour le BVDV, ils sont composés de virus entiers inactivés. Des essais sont en cours pour tester des vaccins sous-unitaires n'exprimant que la protéine E2 du virus. Ces formulations de vaccins sont en soi plus sécuritaires mais probablement moins efficaces, notamment concernant l'efficacité contre l'infection fœtale. Parfois, un rappel de vaccination est nécessaire pour compléter l'immunité protectrice. En plus des immunisations standards en deux étapes utilisant le même type de vaccin pour les deux étapes, des études ont proposé un nouveau protocole de primo-vaccination améliorant la protection avec pour la première injection l'utilisation d'un vaccin inactivé et pour la 2^{ème} injection 3 semaines plus tard l'utilisation d'un vaccin atténué (Tautz et al., 2015).

4.2. Vaccins disponibles en France

En France, il existe actuellement différents vaccins commercialisés pour le BVDV mais aucun pour le BDV. En termes de types, des vaccins à virus inactivé ou atténué sont disponibles. Certains vaccins polyvalents ont une indication de protection contre les deux génotypes 1 et 2 de BVDV alors que d'autres ont des indications uniquement pour le BVDV-1. Tous les vaccins permettent de réduire l'excrétion virale et la virémie lors d'infection horizontale, seuls certains d'entre eux ont en plus une indication de protection contre

l'infection du fœtus. L'âge de la primo-vaccination, des rappels ainsi que le protocole mis en place est fonction de la RCP vaccinale. Les vaccins atténués entraînent une réponse sérologique vis-à-vis de la protéine non structurale NS2-3 et interfèrent par la suite avec le dépistage des animaux infectés (sérologie NS2-3), ce que les vaccins inactivés ne feraient pas.

Tableau 4 : Vaccins disponibles sur le marché français

Nom déposé	Type	Souche	Indication	Contre Indication	Protocole primovaccination	Rappels	Protection foetale
BOVELA® (Boehringer Ingelheim)	vivant atténué	BVDV-1 ncp KE-9 BVDV-2 ncp NY-93	Bovins > 3 mois : réduction de l'hyperthermie et minimisation de la réduction du nombre de leucocytes dues aux BVDV-1 et BVDV-2 Réduction de l'excrétion virale et de la virémie dues au BVDV-2. Prévention de la naissance d'IPI	Aucune	1 injection 3 semaines avant la saillie / Insémination	annuels	OUI
BOVILIS® BVD (MSD santé animale)	Vivant inactivé adjuvé	BVDV-1, cp C-86	Bovins > 8 mois : - immunisation active contre l'infection transplacentaire du fœtus par le virus de la diarrhée virale bovine	Avant injection, laisser le vaccin atteindre la température ambiante (+15°C - +25°C)	<u>Vaccination individuelle :</u> 2 injections à 4 semaines d'intervalle. Seconde injection au plus tard 4 semaines avant le début de la gestation <u>Vaccination du troupeau (>8 mois) :</u> 2 injections à 4 semaines d'intervalle.	<u>Vaccination individuelle :</u> 1 injection 4 semaines avant le début de la gestation <u>Vaccination du troupeau :</u> 1 injection 6 mois après la primovaccination et prochains rappels à un intervalle ne dépassant pas 1 an.	OUI
MUCOSIFFA® (CEVA)	vivant atténué	BVDV-1, cp Oregon C24	Bovins : Prévention de la virémie causée par BVDV -1 Immunitisation active contre l'infection transplacentaire du fœtus par BVDV-1	Aucune	<u>Bovins < 6 mois :</u> - 1ère injection dès l'âge de 2 ou 3 mois -2ème injection à 5 ou 6 mois. <u>Bovins > 6 mois:</u> une seule injection <u>Femelles reproductrices :</u> une seule injection au plus tard 1 mois avant mise à la reproduction.	<u>Veaux :</u> Rappel à l'âge d'un an puis rappel annuel <u>Femelle reproductrices :</u> annuel	OUI
RISPOVAL® 3 BRSV PI3 BVD (Zoetis)	vivant inactivé adjuvé	BVDV-1 cp 5960 et ncp 6309	Bovins > 12 semaines : immunisation active afin de réduire l'excrétion virale et la sévérité de la leucopénie consécutive à une infection par BVDV-1.	Ne pas utiliser pendant la gestation ou la lactation	Première injection > 12 semaines Seconde injection : 3 à 4 semaines plus tard	Tous les 6 mois	NON
RISPOVAL® RS-BVD & RISPOVAL® BVD (Zoetis)	vivant atténué	BVDV-1 RIT4350	Bovins : immunisation active contre les affections dues au virus respiratoire syncytial bovin (VRSB) et au BVDV	Ne pas utiliser pendant la gestation ou la lactation	<u>Bovins < 4 mois :</u> 2 injections à 3 semaines d'intervalle <u>Bovins > de 4 mois:</u> 2 injections à 3 semaines d'intervalle	annuel	NON

4.3. Efficacités des Vaccins sur le Marché

4.3.1. Efficacité globale

L'efficacité des vaccins BVDV est étudiée soit par des études expérimentales contrôlées en station, soit par des études épidémiologiques de terrain. Concernant la protection fœtale et les essais de vaccination-challenge en station, des conditions de validation de l'essai peuvent être demandées, concernant notamment le nombre minimal de vaches utilisées dans les groupes vaccinés et non vaccinés (contrôle positif) et une efficacité de 100% d'infection fœtale après inoculation de la souche d'épreuve pour les vaches gravides non vaccinées. De nombreuses études ont ainsi été réalisées pour tester l'efficacité vaccinale des vaccins BVDV.

Une méta-analyse a été réalisée par une équipe américaine de l'Université d'Auburn (Alabama) en 2015 à partir de 44 publications visant à répertorier tous les vaccins BVDV mis sur le marché (Newcomer et al., 2015).

Selon cette étude, indépendamment du type de vaccin utilisé ou du protocole vaccinal, le risque relatif d'infection fœtale était de 1/7 pour les animaux vaccinés par rapport à des animaux non vaccinés. Des réductions significatives en terme de risque d'infection fœtale ont été mises en évidence dans toutes les études exception faites pour certaines lorsque les animaux vaccinés étaient challengés avec une souche hétérologue. La probabilité d'infection fœtale était la plus faible lors de l'utilisation d'un vaccin formé de plusieurs souches (BVDV-1 et BVDV-2) ou d'un vaccin vivant atténué.

De plus dans les études incluses dans cette méta-analyse, il a été montré que la vaccination BVDV réduisait le taux d'avortement global de 40% en comparaison avec le groupe contrôle des individus non vaccinés. La meilleure protection contre les avortements était obtenue lorsque le génotype de la souche infectante était inclus dans le vaccin; malheureusement un nombre insuffisant d'études était incluses dans cette méta-analyse pour estimer le taux d'avortement chez les vaches infectées avec une souche de génotype hétérologue à celui de la souche vaccinale. L'utilisation de vaccins vivants atténués était plus efficace dans la réduction du risque d'avortement en comparaison avec l'utilisation de vaccins vivants inactivés.

Concernant les taux de fertilité, l'effet global de la vaccination BVDV n'était pas démontré. Cependant, les taux de fertilité étaient significativement plus élevés chez les individus vaccinés que chez les individus non vaccinés. Par ailleurs, il n'a pas été mis en évidence de différences significatives ($p < 0,05$) au niveau du taux de fertilité en prenant en compte les paramètres « type de vaccin utilisé » ou « protocole vaccinal mis en place ».

Les données combinées dans cette analyse ont aussi permis de mettre en évidence que l'infection expérimentale d'un réservoir naïf durant une période sensible de gestation pouvait résulter en une contamination fœtale dans 95% des cas. Cela suggère que, compte tenu de cette efficacité d'infection fœtale et du nombre important d'animaux non vaccinés sur le terrain, le risque d'apparition d'IPI est largement sous estimé. Toutefois, l'efficacité d'infection fœtale dans des conditions naturelles a pu être investiguée. Cette dernière est probablement moins importante que lors d'infections expérimentales. Sur le terrain, pour cet étude, le pourcentage de troupeaux non vaccinés séropositifs au BVD est estimé à environ 53% aux Etats-Unis. Ce chiffre permet de mettre en lumière une circulation importante du

virus et le fait qu'un nombre conséquent d'animaux font une réponse immunitaire naturelle protectrice. Par conséquent, la vaccination de ces animaux séropositifs peut sembler redondante surtout d'un point de vue économique d'autant que la présence d'anticorps est rarement recherchée avant la vaccination.

En conclusion de cette étude, la vaccination BVDV permet de réduire le taux d'avortement d'environ 45% et le taux d'infection fœtale d'environ 85%. De plus, le taux de fertilité est augmenté d'environ 5 % lors de vaccination. Bien que les vaccins atténués semblent plus efficaces, tous les types vaccinaux permettent une protection significative. La décision de mettre en place un vaccin et le protocole vaccinal sont donc aussi important que le type de vaccin à utiliser. Rappelons aussi qu'actuellement le contrôle de la BVDV repose avant tout sur la prophylaxie sanitaire et la biosécurité. La vaccination en support des précédentes mesures, peut cependant énormément réduire l'impact négatif de la BVDV sur les paramètres de la reproduction, notamment si les circonstances épidémiologiques limitent l'efficacité des mesures sanitaires (Newcomer et al., 2015).

D'un point de vue annexe, il semble important d'ajouter qu'une mauvaise observance globale au niveau de la vaccination pourrait réduire les performances du plan d'éradication. En effet, certaines caractéristiques spécifiées sur la RCP vaccinale ou encore le protocole vaccinal régional ne sont pas facilement respectés par les éleveurs ou les vétérinaires. Celles-ci sont indépendantes de la performance du vaccin en tant que tel.

4.3.2.Efficacité croisée BVDV-1/ BVDV-2

Vu la diversité génétique des pestivirus, la question de la protection hétérologue notamment entre les deux génotypes de BVDV s'est rapidement posée. L'analyse génétique des isolats de BVDV a permis la reconnaissance de deux génotypes viraux distinct BVDV-1 et BVDV-2. Les isolats BVDV-1 sont généralement classés en tant que sous génotypes en se basant sur les séquences génotypiques. Bien que ces génotypes réalisent des réactions croisées, des différences antigéniques existent entre ces deux espèces.

Les réponses ont été apportées soit par des tests *in vitro* de neutralisation croisée (on vérifie si les anticorps des animaux vaccinés avec une souche/génotype de BVDV neutralisent d'autres souches/génotype) ou lors d'inoculation d'épreuve hétérologue (on vaccine avec une souche/génotype et on challenge avec une souche/génotype différent).

Les résultats de tests de neutralisation croisées employant différents antisérum dirigés vers différents pestivirus ont permis de mettre en évidence que les souches de BVDV-1 sont faiblement voire non neutralisées par les antisérums dirigés contre le BVDV-2, BDV, CSFV et pestivirus de la Girafe (Becher et al., 2003). En général, plusieurs études ont permis de mettre en évidence que les isolats BVDV-1 étaient antigéniquement plus proches entre eux qu'avec des souches BVDV-2, avec des nuances selon les souches de BVDV-1 testées. En effet, des différences antigéniques significatives entre BVDV-1a et BVDV-1b ont été rapportées (Avalos-Ramirez et al., 2001 ; Becher et al., 2003) à un niveau identique à celui existant entre BVDV-1 et BVDV-2. Ceci a été confirmé par une étude menée aux Etats-Unis montrant que les vaccins contenant uniquement des souches de BVDV-1a entraînaient l'apparition d'anticorps ne neutralisant que faiblement le BVDV-1b, le tout pouvant mener à

une protection hétérologue partielle ou inadéquate (Fulton, 2015). Ces différences doivent être prises en compte dans le développement des vaccins et des programmes de contrôles. Concernant le BVDV-2, la diversité génétique et antigénique semble moins importante (uniquement 3 sous groupes), et il existe peu de données sur la protection croisée au sein du génotype 2. Toutefois, il est de règle que les vaccins contenant uniquement des souches vaccinales BVDV-2 ne protègent que partiellement contre les infections à BVDV-1 quel que soit le sous génotype.

Ces différences de protection croisée entre génotypes sont à mettre en parallèle avec le fait que la protéine E2 des virus BVD-1 possède un épitope neutralisant dominant pendant que les virus BVDV-2 en possèdent 3. En effet, les anticorps spécifiques de la protéine E2 du BVDV-1 ont été identifiés comme réagissant uniquement avec des isolats BVDV -1.

Ces différences sont importantes cliniquement dans le sens où la protection vaccinale est maximisée lorsque le génotype de souche vaccinale correspond au génotype de la souche infectante. Lors de la méta-analyse présentée précédemment, une protection vaccinale accrue a été mise en évidence lors de l'infection avec une souche homologe en comparaison avec une souche hétérologue. Cependant, il est important de souligner que généralement le génotype viral circulant est rarement connu avec précision. Toutefois, en Europe, ce sont principalement des souches de BVDV-1 qui circulent alors qu'aux Etats-Unis la proportion de souches de BVDV-2 est très importante. Dans les pays où les deux génotypes co-circulent, les vaccins polyvalents BVDV-1/BVDV-2 ont démontré plus d'efficacité (en protection fœtale et pour la réduction des avortements) que les vaccins monovalents. Une autre étude de neutralisation croisée avec 8 vaccins différents a montré que la durée des neutralisations croisées avec des anticorps BVDV de types 2 diminuait dans les vaccins ne contenant que les souches de type BVDV 1 (Newcomer et al., 2015).

4.4. Vaccins BVDV et protection croisée contre le BDV

4.4.1. La pratique de terrain

En pratique, la détection/élimination précoce des IPI dans les élevages infectés n'est pas systématiquement réalisée du fait des contraintes économiques imposées par ces tests. La détection des animaux IPI peut être réalisée au cas par cas notamment dans les cheptels sélectionneurs ou avant la circulation d'animaux. De plus, comme les animaux IPI ont une durée de vie courte en moyenne, le contrôle des animaux de renouvellement (0 à 18 mois en fonction du système d'élevage) est normalement suffisant.

De plus, les symptômes de la maladie étant en grande majorité inapparents, les pertes économiques au sein des élevages passent souvent inaperçues et par conséquent une partie des éleveurs reste sceptique face à la mise en place de ces plans de gestion.

Le GDS de l'Ariège s'est aussi interrogé sur l'intérêt de la vaccination pour les troupeaux réalisant la transhumance. En effet, la mise en place d'une prophylaxie sanitaire et médicale a pour but la constitution d'une population d'ovins protégés, évitant les contaminations entre troupeaux et les contaminations croisées avec la faune sauvage notamment les isards (ANON., 2020).

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. Le faible taux de séroconversion au sein du troupeau a conduit à ne pas recommander ce type de protection (Berriatua et al., 2004).

L'Aveyron est le seul département français impliqué depuis plus de 20 ans dans une gestion intégrée et collective de la Border Disease. Ceci est en grande partie expliqué par la sévérité des répercussions économiques qu'ont eues les différentes épidémies sur ce territoire. Un dépistage à grande échelle ainsi que l'application de règles de biosécurité majeures ont été mis en place par la FODSA (Fédération des Organismes de Défense Sanitaire de l'Aveyron) au début des années 80 notamment pour les acteurs de la filière ovins viande.

Le dépistage sérologique (35 animaux analysés/cheptel – 7 mélanges de 5) est actuellement réalisé lors de la prophylaxie de printemps-été chez tous les éleveurs laitiers et allaitants du département sur un échantillonnage d'animaux dans chaque élevage. Le dépistage sur lait de tank se fait lui à l'automne sur la base du volontariat, au plus près de la rentrée des agneaux en atelier d'engraissement. Lors de la campagne laitière 2013/2014, 44 % des cheptels laitiers ont réalisé un prélèvement sur leur lait de tank.

Parallèlement au dépistage, la FODSA propose des plans d'action et de maîtrise de la pestivirus ovine (BDV) qui reposent en premier lieu sur la vaccination et l'application de mesures de biosécurité. La vaccination de la totalité du cheptel infecté est très fortement recommandée. Des mesures de biosécurité sont systématiquement mises en place, souvent en complément de la vaccination, par les acteurs lors de plans de contrôle de la pestivirus. 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...).(ANON., 2020)

Dans le reste de l'Occitanie, un plan similaire a été plus récemment proposé aux cheptels prouvés comme étant infectés ou aux élevages suspects d'infections, présentant des symptômes évocateurs.

Dans les cheptels suspects, il est proposé de mettre en place des prélèvements et des analyses PCR sur des agneaux présentant des symptômes évocateurs (chétifs, hirsutes, trembleurs, malformés, ...) ou des avortons (le prélèvement de choix étant la rate, un mélange étant possible). Deux cas de figures sont alors possibles : si la PCR est positive, le cheptel est considéré comme atteint, si la PCR est négative et qu'il n'est pas possible d'en réaliser d'autres, il est préférable de faire un contrôle sérologique conformément aux spécifications du point suivant.

Si il n'y a pas d'avortons ou d'agneaux suspects ou si l'élevage est en lien épidémiologique, il est conseillé de réaliser une analyse sérologique de 6 mélanges de 5 animaux par sondage sur 2 ou 3 classes d'âge (jeunes de 6 à 18 mois, brebis de 18 mois à 30 mois et brebis de plus de 30 mois) et/ou lots d'agnelage. Lorsque le statut du cheptel est

inconnu et si un mélange au moins est positif chez les jeunes (6 à 18mois), cela témoigne d'une circulation virale. Si les analyses des jeunes sont négatives, il faudra alors réaliser un nouveau contrôle à partir de 2 ou 3 mélanges chez les jeunes. Ensuite, si le cheptel est considéré comme infecté au vu des analyses sérologiques. Il se met en place un plan de gestion adapté.

La première année la principale préconisation est la vaccination. La vaccination de la totalité du cheptel ou du pré-troupeau seulement est à discuter en fonction de la séroprévalence intra-cheptel, de la conduite d'élevage et des risques de diffusion à d'autres cheptels lors de rassemblements, vente d'animaux ou mise à l'engraissement. Dans l'idéal, la vaccination de l'ensemble des animaux est à préférer. Les années suivantes, il est conseillé de vérifier le statut sérologique du troupeau afin d'évaluer une possible circulation virale avant de réaliser la vaccination. Pour ce faire, un contrôle des jeunes est mis en place avec notamment 6 sérologies de mélange de 5 jeunes (6 à 18 mois). Si ces analyses reviennent négatives durant 2 années consécutives, la maladie peut être considérée maîtrisée sur le cheptel, la vaccination peut être arrêtée ou poursuivie selon le contexte. Pour des raisons économiques, il peut être décidé de ne vacciner que le troupeau de renouvellement (ANON., 2020).

Dans tous les cas, la vaccination contre la BDV chez les ovins repose sur l'utilisation de vaccins hétérologues BVDV commercialisés pour les bovins. Actuellement, il n'existe en effet pas de vaccins BDV avec AMM pour les ovins puisqu'aucun vaccin présent dans le commerce ne possède de souches de BDV et d'indication contre ce virus. Les vaccins BVDV avec AMM chez les bovins sont alors utilisés dans le cadre de la cascade, 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 fœtale (cf tableau 5). Les deux vaccins vivants modifiés (Mucosiffa® et Bovela®) entraînent la production d'anticorps NS2-3 et posent donc des problèmes lors du dépistage sérologique de la BDV. Le vaccin inactivé Bovilis-BVD ® n'induit théoriquement pas 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 et la dose à utiliser. Sur le terrain, les ovins sont vaccinés à l'aide des vaccins BVDV utilisés à demi dose, voir quart de dose de celle préconisée pour les bovins. La raison est essentiellement économique, la justification scientifique de ce protocole n'étant pas établie. Par ailleurs, l'efficacité de ces vaccins en conditions expérimentales pour une protection fœtale hétérologue n'avait jamais été testée jusqu'il y a peu de temps.

4.4.2. Les Données préliminaires

Actuellement, très peu d'études ont été réalisées visant à évaluer l'efficacité de la mise en place d'un plan de vaccination habituellement mis en place chez les bovins contre des souches hétérologues de BDV. Une première étude a montré l'effet positif d'un programme de vaccination (vaccin inactivé Bovilis BVD®, MSD) 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 (Mondoly, Pouget, 1998).

Par la suite, une étude a été réalisée par Anne en 2012 à l'ENVT sur l'étude de la réponse en anticorps neutralisant le BVDV et le BDV, après immunisation de moutons avec différentes doses d'un vaccin inactivé (Bovilis BVD, ¼ et ½ doses de celles utilisées chez les bovins) et d'un vaccin atténué (Mucosiffa, CEVA, ½ dose). Six mois après la vaccination, une inoculation d'épreuve avec une souche de BDV isolée à l'ENVT localement a été réalisée.

Selon les résultats obtenus, il semblerait que la vaccination avec une demi-dose de vaccin (par rapport à la dose bovin) entraîne une production plus importante et plus longue dans le temps d'anticorps neutralisants que la vaccination avec un quart de dose, pour la souche BVDV-1 NADL et les souches de BDV (Aveyronite et 10405) testées. Six mois après la vaccination à demi-dose les brebis présentaient des anticorps neutralisant la souche BVDV NADL à des titres moyens et des anticorps neutralisant les souches BDV à des titres faibles. Pour le groupe quart-de-dose, une baisse voire une disparition de la présence d'anticorps neutralisants chez les animaux était notée environ six mois après la vaccination. Ces données suggèrent une réaction sérologique croisée au moins dans les tous premiers mois après la vaccination lorsque les brebis étaient vaccinées à demi-dose. Il n'avait pas été observé de différences entre les deux vaccins utilisés. Par contre, une variabilité individuelle avait pu être mise en évidence dans chaque lot et 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. (Anne, 2012)

Cependant, en l'état des connaissances actuelles, il est difficile de corréler un titre en anticorps neutralisants à une protection clinique et virologique contre une infection à BVDV, et surtout à BDV pour lequel les données bibliographiques sont manquantes. Les seules données de références pourraient être le titre en anticorps induits par la vaccination tel que précisé sur le RCP ou l'étude de Hamers visant à étudier l'efficacité vaccinale hétérologue entre souches de BVDV-1 et BVDV-2 par la technique de séroneutralisation. Les valeurs obtenues lors de l'étude étaient supérieures notamment pour la souche NADL. Toutefois il semble important de souligner que les cadres de ces études étaient tout à fait différents et par conséquent les résultats difficilement comparables.

4.4.3. Etude de protection fœtale en conditions expérimentales menée à l'ENVT en 2016 (thèse de M. Combes)

Pour apporter des éléments scientifiques à la vaccination de la BDV avec des vaccins hétérologues BVDV, la FODSA et l'ENVT ont réalisé en 2016 une étude expérimentale d'efficacité vaccinale (Combes, 2017).

L'objectif de cette étude était d'évaluer la protection fœtale apportée par les vaccins BVDV atténués et inactivés contre une inoculation d'épreuve avec une souche de BDV isolée en Aveyron lors de l'épidémie de 2011.

Pour se faire trois groupes de brebis gestantes séronégatives et vironégatives ont été constitués. Dans chaque lot, une première partie des brebis a été vaccinée puis infectée, la deuxième non vaccinée mais infectée et enfin pour finir des brebis sentinelles (non vaccinées et non infectées) étaient également présentes dans chaque groupe. Trois vaccins différents ont été testés Mucosiffa®, Bovela®, Bovilis-BVD ®, ces derniers étant les seules spécialités possédant une AMM concernant l'infection transplacentaire. Le vaccin Mucosiffa® est le plus ancien et comprend une souche atténuée cp de BVDV-1. Le Vaccin Bovela® est le plus récent et comprend deux souches BVDV-1 et BVDV-2 atténuées par génie génétique par délétion du gène Npro et mutation du gène Erns. Enfin, le vaccin Bovilis-BVD® contient une souche inactivée de BVDV-1.

La composition des trois lots était la suivante :

- Lot 1 : 11 brebis gestantes infectées et vaccinées Mucosiffa® à demi dose de celle préconisée pour les bovins, 6 brebis gestantes infectées non vaccinées et 3 brebis sentinelles
- Lot 2 : 11 brebis gestantes infectées et vaccinées Bovela® à demi dose de celle préconisée pour les bovins, 6 brebis gestantes infectées non vaccinées et 3 brebis sentinelles
- Lot 3 : 11 brebis gestantes infectées et vaccinées Bovilis® BVD à demi dose de celle préconisée pour les bovins (2 injections en primovaccination), 7 brebis gestantes infectées non vaccinées et 3 brebis sentinelles

Les brebis séronégatives (naïves vis-à-vis du BDV ou du BVDV, dans 2 élevages indemnes de pestivirus) ont été vaccinées au sein de leur élevage d'origine en suivant le protocole réglementaire (1 injection pour les atténués et deux injections pour l'inactivé) mis à part l'utilisation d'une demi-dose. Elles ont été par la suite toutes inséminées au même moment en élevage puis transportées 12 jours avant inoculation d'épreuve dans une unité expérimentale de niveau 1 de l'ENVV puis réparties en trois loges indépendantes. Les loges ainsi que le matériel étaient séparées, afin de limiter les sources de contamination possibles. Des suivis sérologiques et virologiques ont confirmé l'absence d'infection naturelle par un pestivirus dans les deux élevages d'origine.

Tableau 4 : Indication (RCP) des trois vaccins utilisés

Lot	Vaccins (Laboratoire)	Type	Souches	Nombre d'injection	Date	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

Les brebis ont été inoculées par voie intramusculaire au niveau de l'encolure, à 52 jours de gestation, avec la souche BDV-6 6390 (J0 sur la figure ci-dessous). Chaque brebis a été infectée à l'aide d'une charge virale de 2.10^5 DIC₅₀/brebis soit une dose de 5 mL d'une solution virale à 4.10^4 DIC₅₀/mL. Le virus avait été titré directement après inoculation afin de vérifier sur pouvoir infectieux. La souche BDV-6 6390 avait été isolée à l'ENVT en 2010 à partir d'un agneau IPI provenant d'Aveyron. L'inoculation de cette souche à des brebis gestantes de 52 jours avait été testée préalablement, et avait alors abouti à la naissance de 100% d'agneaux IPI.

Pour finir, les brebis ont été euthanasiées environ deux mois après l'inoculation d'épreuve, à environ 110 jours de gestation soit 66 jours après l'infection (J66 sur la figure ci-dessous).

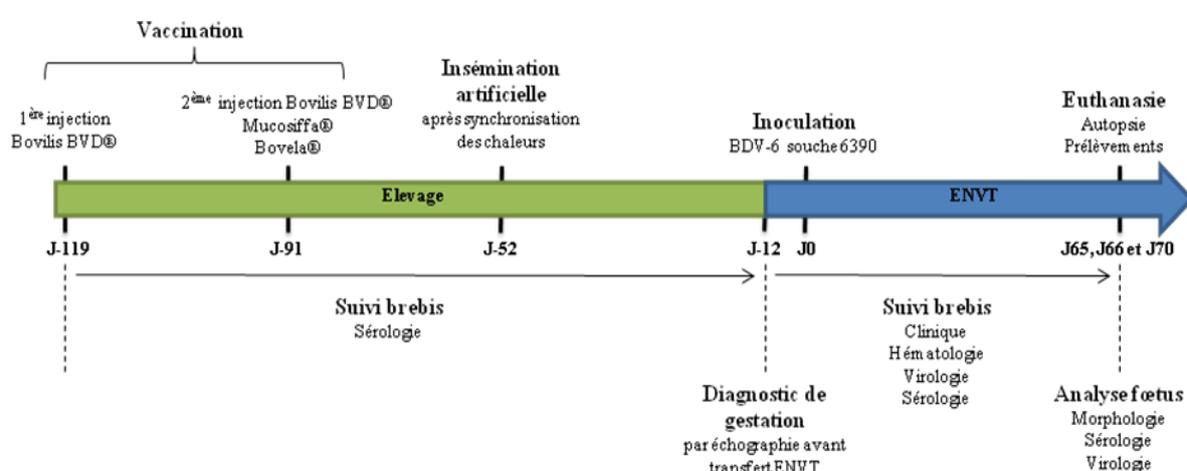


Figure 6: Frise chronologique expérimentation Mickael Combes (thèse ENVT, M. Combes)

Le suivi expérimental a consisté en un suivi clinique, hématologique, virologique et enfin sérologique.

Suivi clinique et hématologique

Le suivi clinique n'avait pas permis la mise en évidence de signes cliniques majeurs chez toutes les brebis infectées que ce soit suite à la vaccination ou suite à l'inoculation d'épreuve. De plus aucune phase d'hyperthermie n'avait pu être notée contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature. Par contre une leucopénie et une lymphopénie avait été observée entre J2 et J14 (J0 = inoculation d'épreuve) chez les brebis pour l'ensemble des groupes.

Le premier intérêt du suivi hématologique était de confirmer l'infection par le BDV puisqu'une leucopénie et une lymphopénie étaient observées (diminution de 43% du nombre de leucocytes dans le groupe contrôle à J3). Ces données étaient cohérentes avec l'étude précédente de Bethume (Bethume, 2015).

Le deuxième intérêt de ce suivi a été d'évaluer l'efficacité de la protection permise par les différents vaccins vis-à-vis d'une infection transitoire en ce qui concerne une possible immunodépression. Dans cette étude, aucune différence significative concernant la diminution du nombre de lymphocytes et de son intensité n'a pu être mise en évidence. Cependant, il semblerait que la vaccination permette tout de même de diminuer la durée de la lymphopénie, au moins pour les vaccins atténués. De plus, les différences significatives respectivement de J6 à J8 et à J7 montrent que le vaccin inactivé (Bovilis BVD®) est plus lent dans le rétablissement du taux de lymphocytes que les vaccins vivants atténués Mucosiffa® et Bovela®.

Suivi sérologique

Ce suivi a été réalisé avant et après inoculation par recherche des anticorps dirigés contre la protéine NS2-3 au moyen d'un test commercial.

Avant la vaccination, 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 vaccinées Mucosiffa®, une brebis était douteuse à J0 mais séropositive à J-12.

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 (cf tableau 5).

Tableau 5 : Pourcentage de brebis séropositives dans les différents lots en fonction du temps (nombre

Vaccin	brebis/effectif						
	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)

Il a été montré que les vaccins vivants modifiés entraînaient une séroconversion de plus de la moitié des brebis, 73% pour le Mucosiffa® et 64% pour le Bovela®, 91 jours après la vaccination. De plus, lors de la vaccination avec un vaccin inactivé, une séroconversion des brebis n'a pas été notée mais induit tout de même une réponse immunitaire, dans le sens où la séroconversion après inoculation d'épreuve est plus précoce que celle observée pour les brebis non vaccinées. En effet, M. Combes a observé une séroconversion de plus de la moitié des brebis à J14 (64%) pour les brebis vaccinées Bovilis-BVD® alors qu'il fallait 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 (statut qui passe de séropositif à séronégatif puis qui revient séropositif). Dans les lots vaccinés Mucosiffa® et Bovela®, 2 brebis ont également eu un statut variable et de même dans le groupe témoin 7 brebis sont apparues séronégatives par intermittence.

Des séroneutralisations ont été réalisées vis-à-vis de la souche de BVDV-1 NADL cp pour tester l'efficacité de la vaccination contre le BVDV. Seuls les sérums prélevés le jour de la vaccination (J-91), le jour l'inoculation (J0) et le jour des autopsies (J65, J66 et J70) ont été testés. 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 +/- 1,4 Log₂ ED₅₀/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 +/- 3,8, de 7,8 +/- 1,5 et de 6,1 +/- 3,3 Log₂ ED₅₀/mL. Parmi les brebis vaccinées Mucosiffa® et Bovilis BVD®, 2 brebis sur 11 étaient négatives le jour de l'inoculation, ce qui explique les valeurs d'écart-type calculées 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 +/- 2,1, de 13,5 +/- 0,9 et de 13,3 +/- 0,9 Log₂ ED₅₀/mL. Ces titres étaient significativement (p<0,0001) supérieurs au titre moyen, de 9,4 +/- 1,4 Log₂ ED₅₀/mL, des brebis non vaccinées. Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents groupes de vaccin.

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

Pour résumer :

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

Les sérologies post-inoculation ont permis 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

La présence d'anticorps neutralisants la souche NADL du BVDV-1, dans le sérum des brebis vaccinées, a montré la capacité des trois vaccins à induire une réponse humorale neutralisante contre le BVDV-1. Cette immunité a permis, suite à l'inoculation de la souche 6390 du BDV-6, d'augmenter le taux d'anticorps neutralisants la souche NADL du BVDV-1 comme le montre les résultats de séroneutralisation sur les sérums prélevés le jour de l'autopsie.

L'immunité « mémoire » induite par la vaccination avec Bovilis BVD® a permis la mise en place d'une réponse immunitaire plus précoce, suite à l'inoculation d'épreuve. 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.

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-BVD® et contrôle. La détection était fugace (entre 1 et 2 jours par brebis), quelque 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 dégageait pas de différences majeures entre les différents lots. Ces résultats étaient similaires à ceux observés par Bethume en 2015 pour le BDV-6 6390 et dans les mêmes conditions expérimentales.

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) dans les brebis non vaccinées qui étaient présentes dans le lot 2 (Bovela®).

Analyse des fœtus

Aucune différence significative de poids ou de taille ou de prolificité n'a été mise en évidence entre les différents groupes.

La majorité des fœtus étaient vivants, sauf deux fœtus de mères vaccinés Bovilis-BVD® retrouvés morts. 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.

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 étaient conformes à ceux de Bethume (2015) qui ont montré que, seulement deux fœtus sur 20 présentaient des congestions diffuses et modérées du cerveau suite à l'inoculation de la même souche, dans les mêmes conditions expérimentales (BETHUME, 2015). L'absence de différences significatives peut être interprétée comme une absence de retard de croissance chez les fœtus ou comme un retard de croissance homogène dans tous les groupes n'ayant pas pu être empêché par une protection vaccinale.

Les sérologies réalisées sur le sang des fœtus 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). 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.

Aucune différence significative de charges virales concernant les différents groupes n'a été observée pour les deux organes. Par ailleurs, deux analyses indépendantes ont été réalisées pour confirmer ces résultats. Les mêmes échantillons tissulaires ont été testés via le laboratoire IdVet et un kit RT-qPCR d'un autre fabricant Taqvet BVD. En utilisant deux cibles ARN différentes du BVDV, l'ensemble des résultats a été confirmé.

Pour conclure cette étude a montré que, malgré la présence d'anticorps neutralisant la souche BVDV-1 NADL chez les brebis le jour de l'inoculation d'épreuve, le BDV-6 est capable d'infecter l'ensemble des fœtus des brebis contrôles et vaccinées pour induire des IPI. Dans les conditions expérimentales utilisées, la protection fœtale par les vaccins BVDV était donc nulle vis-à-vis d'une infection par le BDV-6.

Deuxième partie :
PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Objectif :

La vaccination a pour objectif d'éviter l'apparition de formes cliniques, d'empêcher, ou à défaut de limiter, la naissance de d'agneaux infectés persistants immunotolérants (IPI) en protégeant le fœtus contre une infection transplacentaire et de réduire l'excrétion virale consécutive aux infections transitoires ou persistantes. Comme déjà précisé précédemment, il n'existe pas actuellement de vaccin possédant une AMM pour la prévention de l'infection par le BDV chez les moutons. Les seuls vaccins disponibles sur le marché et utilisés sur le terrain, dans le cadre du principe de la cascade, sont des vaccins utilisés habituellement contre le BVDV chez les bovins. Ces vaccins ne possèdent pas de souches de BDV dans leur composition. Au sein des élevages ovins, ces vaccins sont utilisés avec la moitié, voir quelquefois le quart de la dose utilisée chez les bovins. 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'avait en effet pas fait jusqu'à l'étude de M. Combes, 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 (Combes, 2017).

La thèse réalisée par Mickael Combes en 2015 a consisté à l'évaluation de l'efficacité de trois vaccins BVDV commercialisés, utilisés à demi-dose, à protéger le fœtus contre l'infection par une souche de BDV de génotype 6 (récemment isolée en 2010 en Aveyron) lors d'inoculation d'épreuve chez les mères à 52 jours de gestation. Les résultats ont indiqué une absence de protection quel que soit le vaccin utilisé. Pourtant la vaccination des brebis avait permis la production d'anticorps neutralisants le BVDV-1 (souche NADL) avec des titres importants présents le jour de l'inoculation d'épreuve. Notre travail de thèse s'inscrit dans la suite du travail de M. Combes.

L'hypothèse est de dire que si la vaccination des brebis avait induit des taux importants d'anticorps neutralisant le BVDV-1, la capacité de ces anticorps produits à neutraliser la souche hétérologue BDV-6 d'inoculation pourrait être nulle (absence de neutralisation croisée). Les sérums issus de l'expérimentation de M. Combes ont donc été testés quant à leurs capacités à neutraliser la souche BDV-6. Comme cette dernière souche est non cytopathique, il nous a fallu dans un premier temps développer une méthode immunohistochimique (IPMA- peroxidase) de détection du virus.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Cultures cellulaires

Les cellules utilisées étaient des cellules rénales bovines MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney cells*, ATCC CCL22). Elles ont été cultivées en étuve à 37°C sous 5% de CO₂, en Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle et le L-glutamine (MEM complet

1X), additionné d'acides aminés non essentiels (AANE, 1X), de pénicilline (1 UI/mL) et de streptomycine (100 µg/mL).

Deux types de lignées cellulaires ont été entretenus durant la manipulation : la première contenant du sérum de veau fœtal (FCS) à 10%, ne contenant pas d'anticorps anti-pestiviraux, ni de pestivirus (vérification au laboratoire par ELISA et RT-PCR en temps réel), et la seconde contenant du sérum de cheval (HS) à 5%. Durant l'étude, les cultures cellulaires ont été plus difficiles à maintenir avec un milieu supplémenté en HS. C'est pourquoi, il a été décidé d'utiliser le premier type de lignée cellulaire comme base de protocole.

2.2. Réalisation de plaques de cellules

Les lignées cellulaires conservées avec du milieu décrit précédemment additionné de sérum de veaux fœtal (SVF) ont été réparties sur des plaques constituées de 96 puits de marque Falcon® à fond plat stérile. La croissance cellulaire a pu être appréciée régulièrement grâce à un hématimètre de Mallassez.

2.3. Virus et titrage

Plusieurs souches virales ont été utilisées durant cette étude pour la mise au point de la détection par technique IPMA. Le choix de ces souches virales repose essentiellement sur les différentes souches virales utilisées dans l'étude de Béthume M.A. (2015) et Combes M. (2016). (Bethume, 2015 ; Combes, 2017)

- *Souches BVDV :*
 - BVDV1a, souche cp NADL
 - BVDV-1f, souche ncp HAN
- *Souches BDV :*
 - souche Aveyronite (1984) typée comme BDV-5
 - souche ENVT-6390 ncp, typée comme BDV-6

Les différentes souches virales ont été conservées à -80°C après 6 passages en cellules MDBK.

Les solutions virales titraient à $8,3 \times 10^3$ TCID₅₀/ml pour le BDV-6, $7,4 \times 10^5$ TCID₅₀/ml pour le BVDV-1 souche NADL, $3,5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml pour le BDV-5 et $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml pour le BVDV-1 souche HAN.

La souche BDV 6390 de génotype 6, a par la suite été utilisée pour le protocole de séroneutralisation. Elle a été 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. (Bethume, 2015 ; Combes, 2017)

2.4. Anticorps disponibles

Plusieurs anticorps à des concentrations différentes ont été utilisés dans cette étude pour la mise au point de la technique immunohistochimique (IPMA, coloration à la peroxydase)

- Anticorps primaire :
 - Anticorps monoclonal spécifique de groupe pestivirus de ruminants WB 103/105 (ref RAE 0801 Veterinary Laboratories Agency, Weybridge UK),
 - Anticorps monoclonal spécifique du BDV WB WS363 (souche Nettleton) (ref RAE 0825 Veterinary Laboratories Agency, Weybridge UK).
 - Anticorps polyclonal de mouton dirigé contre le BDV-6 (souche d'épreuve) issu d'un mouton non vacciné et infecté BDV-6 lors de l'expérimentation de M. Combes (sérum à J66).

- Anticorps secondaire :
 - Anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de souris et marqué à la peroxydase de raifort (ref P0260 Dako_Cytomation Glostrup, Danemark).
 - Anticorps polyclonal dirigé contre les immunoglobulines de moutons et marqué à la peroxydase de raifort.

2.5. Coloration disponible

Deux colorations différentes ont été testées :

- un chromogène, l'aminoéthylcarbazole (ref 101 AEC chromogène Kit Sigma St Louis USA). Une coloration brun rouge du cytoplasme cellulaire révèle la présence du virus.
- TMB, 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (Ref N301 ThermoFisher). Après action de la peroxydase, le TMB prend une coloration bleue qui peut être mesurée par absorbance

2.6. Sérums étudiés

Les sérums étudiés ont été prélevés lors de l'étude de Mickael Combes en 2015, le jour de la vaccination, le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) avec la souche BDV-6 et deux mois après l'inoculation (fin de l'expérimentation). (cf figure 6).

Lors de cette étude, trois lots avaient été formés. Les lots étaient composés à chaque fois de brebis gravides vaccinées tel qu'il est spécifié ci-dessous et de brebis gravides non vaccinées. Le lot 1 contenait les brebis vaccinées avec Mucosiffa® (vaccin atténué BVDV-1), la loge 2 les brebis vaccinées par Bovela® (vaccin atténué BVDV-1 et BVDV-2) et la loge 3 les brebis vaccinées Bovilis-BVD ® (vaccin inactivé BVDV-1).

Tableau 6: Identification des brebis étudiées

Vaccinées gravides		
Loge 1	Loge 2	Loge 3
L1-196	L2 249	L3-019
L1-235	L2 262	L3 -180
L1 346	L2 445	L3 251
L1 3116	L2-939	L3 334
L1 4160	L2-5124	L3-391
Non vaccinées gravides		
Loge 1	Loge 2	Loge 3
L1 197	L2 104	L3-046
L1 781	L2-155	L3 172
L1 2296	L2 1177	L3 312
L1 7204		L3 943
L1 9168		L3 3216
		L3 4112

2.7. Protocole de séroneutralisation

Les tests de séroneutralisation ont été réalisés dans le but de détecter la présence d'anticorps neutralisant au sein des sérums des brebis. Il a donc été décidé de comparer le titre en anticorps neutralisant à J0 (le jour de l'inoculation) et à J66 chez des femelles vaccinées à l'aide des 3 vaccins différents et chez des femelles non vaccinées.

Le protocole de séroneutralisation utilisé est similaire à celui de Hamers et al. (2002). Il s'agit d'un protocole de neutralisation en microplaques à quantité de virus constante. Pour cela, des dilutions des sérums (préalablement décomplémentés à 56°C pendant 30 minutes) d'un facteur 2 ont été réalisées allant de 1/2 à 1/2058. Chaque dilution a été mise en contact avec 250 TCID₅₀ du virus BDV-6 pendant une heure à 37°C en milieu MEM sans sérum. Les dilutions ont ensuite été déposées sur culture cellulaire, à raison de 10⁵ cellules MDBK par puits de plaque 96 puits pendant 2 heures à 37°C en étuve CO₂ à 5%. Chaque dilution a été déposée 4 fois (dans 4 puits). Le milieu (qui contenait le virus et le sérum) a ensuite été éliminé puis remplacé par du milieu MEM +PS1% (Pénicilline –Streptomycine) et 5% de sérum de veau fœtal pendant 3 jours à 37°C en étuve à CO₂ à 5%.

Les plaques ont ensuite été fixées puis colorées. Les titres ont été calculés 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 présentée précédemment.

Le détail des manipulations est le suivant :

Avant la manipulation, les sérums sont préalablement décomplémentés en les passant à l'étuve 30 minutes à 56 °C.

Ensuite, il s'agit de placer 300µl de milieu neutre constitué de Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle et le L-glutamine (MEM complet 1X), additionné d'acides aminés non essentiels (AANE, 1X), de pénicilline (1 UI/mL) et de streptomycine (100 µg/mL) dans tous les cônes à dilution.

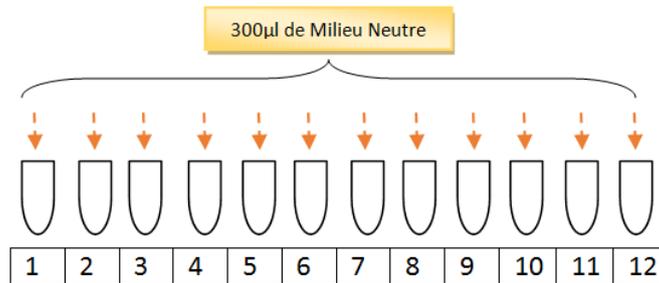


Figure 7 : Exemple : Première ligne des cônes à dilution

L'étape suivante consiste à répartir les sérums au sein des cônes à dilution dans les colonnes 1. En premier, au sein d'une même ligne, 300µl de sérums sont placés au niveau du premier cône puis des dilutions sont faites de deux en deux le long de la ligne.

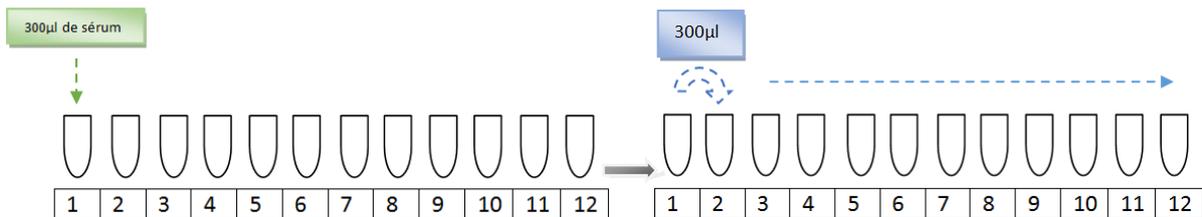


Figure 8 : Exemple 2 : Première ligne des cônes à dilution

Un milieu d'infection est préparé avec la souche BDV-6 6390 avec un titre viral correspondant à environ 200 TCID₅₀ / 100µl. On répartit 300µL dans les 11 premiers cônes à dilution pour chaque ligne. Enfin, on ajoute, 300µl de milieu neutre préalablement constitué dans la colonne 12.

streptomycine (100 µg/mL) et de 5% de sérums de veau fœtal. Elles sont ensuite mises à l'étuve pendant 3 jours à 37°C sous 5% CO₂.

3. Résultats

3.1. Première mise au point de la méthode IPMA de détection du BDV en cultures cellulaires MDBK et choix des paramètres

Cette technique consiste à :

- Fixer les cellules infectées
- Perméabiliser les cellules
- Saturer les cellules pour éviter le bruit de fond
- Faire agir un anticorps primaire (Ac primaire) spécifique des pestivirus qui se liera aux protéines virales
- Faire agir un anticorps secondaire (Ac secondaire) dirigé contre l'anticorps primaire et marqué à la peroxydase (horse radish peroxydase)
- Appliquer un substrat colorimétrique de la peroxydase qui révèle les liaisons antigène viral-Ac primaire-Ac secondaire
- Lire au microscope optique la présence d'une coloration

Lors de la mise au point nous avons fait jouer et tester plusieurs paramètres, le choix des anticorps primaire et secondaire, le choix de la fixation des cellules, de la technique de coloration. Sans entrer dans le détail de toutes les manipulations réalisées, les mises au point ont été faites sur des cellules MDBK infectées par les différentes souches de virus en suivant les différentes conditions :

3.1.1. Infection par les différents virus

L'infection virale a été effectuée sur des puits à environ 80% de confluence. Les souches virales stockés à -80°C ont été décongelées en veillant à ne pas dépasser la température de 37°C. Cette dernière pouvant altérer l'intégrité du virus. Les infections ont été faites à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1. La souche BVDV-1 NADL étant cytopathique, elle nous a servi de contrôle pour valider le protocole d'infection.

Le MOI aussi appelé « Multiplicity of infection » est le ratio entre le nombre de particules virales et le nombre de cellules cible au sein d'un puits. Soit pour le cas présent, celui-ci a été choisi comme correspondant à 1 particule virale pour 10 cellules.

Le protocole suivant a été mis en place :

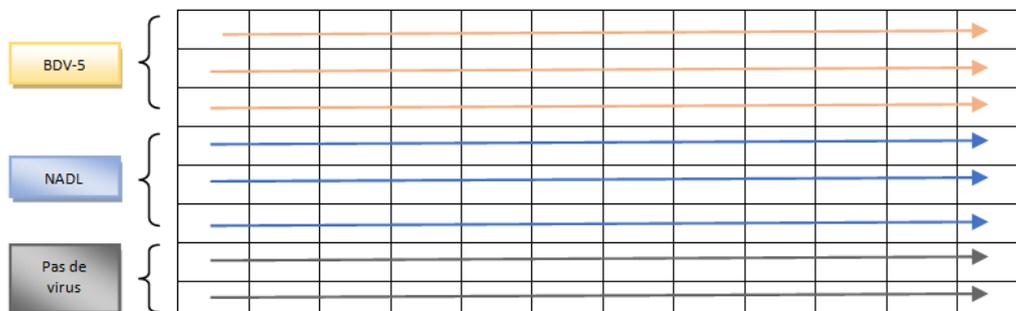
Protocole d'infection virale
Vérification de la confluence au sein d'un puits
Décongélation des virus
Préparation des milieux d'infection Tampon = DMEM +1% PS
Retrait du milieu des puits à l'aide d'une pipette multicanaux
Distribution de 100µl de milieu d'infection selon le plan de plaque établi
Mettre les plaques à l'étuve pendant 2h sous 5% de CO2 à 37°C
Retrait du milieu des puits à l'aide d'une pipette multicanaux
Distribution de 100µl de DMEM+ 1% PS+ 6% SVF selon le plan de plaque établi

Figure 11: Protocole d'infection virale

En suivant les plans de plaques suivants :



Plaque 1 :



Plaque 2 :

Figure 12: Plans de plaques lors de l'infection virale

Les plaques ont ensuite été incubées pendant 3 jours sous 5% de CO2 à 37°C.

3.1.2. Choix des anticorps primaires et secondaires

Les anticorps primaires et secondaires (cf 2.4.) ont été testés à plusieurs dilutions selon les plans de plaque suivants.

Chaque anticorps primaire a été testé à 3 concentrations différentes : WB 103/105 (1/50, 1/100, 1/250), WB BDV (1/50, 1/100, 1/250), Polyclonal (1/100, 1/250, 1/500).

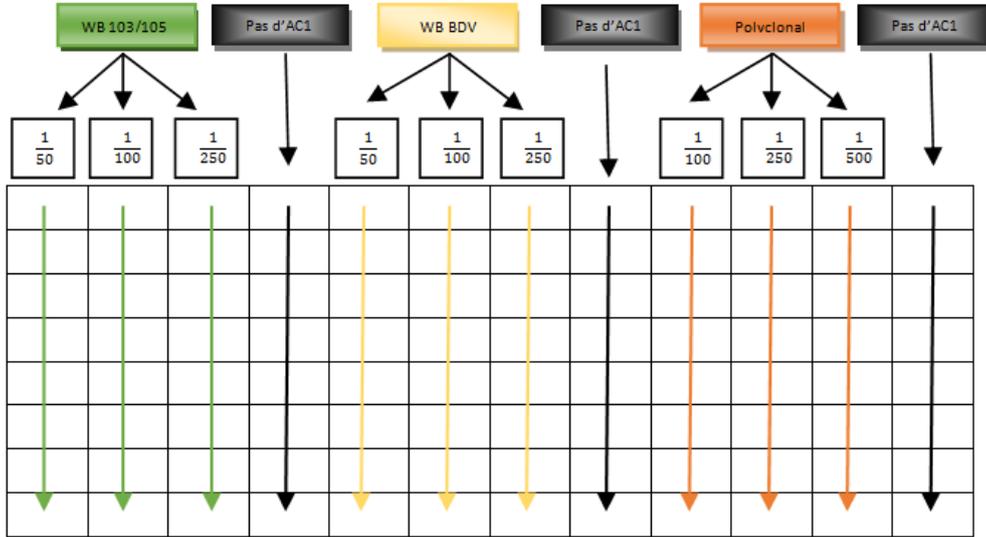


Figure 13 : Mise en place de l'anticorps primaire

Enfin, les anticorps secondaires, anti IgG de souris ou anti IgG de moutons selon l'anticorps primaire, ont été disposés (aux dilutions 1/100 et 1/250) suivant le plan de plaque suivant :

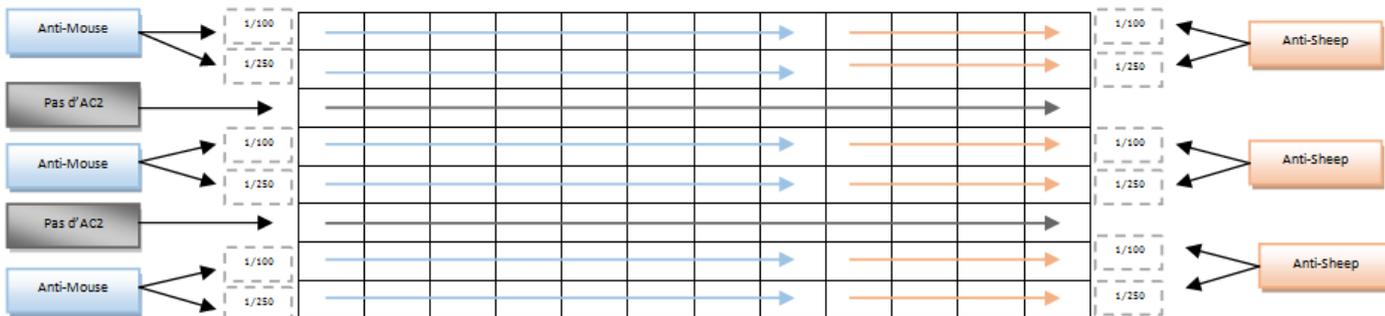


Figure 14 : Mise en place de l'anticorps secondaire

Au final, les plans de plaques finaux étaient donc les suivants :

Plaque n°1	WB 103/105 1/50	WB 103/105 1/100	WB 103/105 1/250	Pas d'anticorps primaire	WB BDV 1/50	WB BDV 1/100	WB BDV 1/250	Pas d'anticorps primaire	polyclonal sheep 1/100	polyclonal sheep 1/250	polyclonal sheep 1/500	Pas d'anticorps primaire
BDV-5	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100
BDV- 5	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250
BDV-5	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
BVD NADL	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100
BVD NADL	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250
BVD NADL	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Cellules non infectées	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100
Cellules non infectées	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250

Plaque n°2	WB 103/105 1/50	WB 103/105 1/100	WB103/105 1/250	Pas d'anticorps primaire	WB BDV 1/50	WB BDV 1/100	WB BDV 1/250	Pas d'anticorps primaire	polyclonal sheep 1/100	polyclonal sheep 1/250	polyclonal sheep 1/500	Pas d'anticorps primaire
BDV-6	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100
BDV-6	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250
BDV-6	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
HAN	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100
HAN	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250
HAN	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Cellules non infectées	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AM 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100	AS 1/100
Cellules non infectées	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM1/250	AM 1/250	AM 1/250	AM 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250	AS 1/250

Figure 15 : Plans de plaques finaux

NB: AM: anticorps secondaire anti-souris, AS : anticorps secondaire anti-mouton; PS : pas d'anticorps secondaire

3.1.3. Méthode de fixation-Perméabilisation-coloration des cellules infectées

Pour chaque plan de plaque réalisé précédemment deux méthodes ont été utilisées. Ces dernières reposent sur des données recueillies dans la littérature. Par conséquent, deux groupes formés à chaque fois des deux plaques ont été mis en place afin de comparer les deux méthodes explicitées ci-dessous (IDVET, Kaiser et al., 2016)

Tableau 7 : Comparaison des deux méthodes utilisées

	Méthode 1	Méthode 2
Fixation	Dépôt dans chaque puits de 35µl de Protoformaldéhyde 4% laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes Retrait du milieu à l'aide d'une pipette multicanaux Dépôt dans chaque puits de 100 µl de Protoformaldéhyde 4% puis incubation pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C sous 5% de CO ₂ . Rinçage à l'aide de PBS	Rinçage à l'aide de PBS Séchage à l'air ambiant pendant 1 h Incubation 2 h à 80°C
Perméabilisation	Rinçage avec du tampon de Perméabilisation Dépôt de 100µl/ puit de PBS+ 2% de Triton x100, 60 minutes à 37°C Rincer les cellules 2 fois avec PBST (=PBS+0,25% tween 20)	
Saturation des puits	Dépôt de 100µl/ puit de PBS+ lait écrémé 3% , 60 minutes à 37°C Rinçage 3 fois à l'aide de PBST	
Dépôt Anticorps Primaire	Tampon = PBS+0,05 % tween 20 + Lait écrémé 5%, 100µl/ puit, 60 minutes à 37°C Rinçage 2 fois avec PBST Rinçage 3 fois à l'aide de PBST en laissant les plaques 5 minutes à 37°C	Tampon= PBS+ 5% tween 20, 100µl/puit, 90 minutes à température ambiante Rinçage 3 fois avec PBS + 5% tween 20
Dépôt Anticorps Secondaire	Tampon = PBS+0,05 % tween 20 + Lait écrémé 5%, 100µl/ puit, 60 minutes à 37°C Rinçage 2 fois avec PBST Rinçage 3 fois à l'aide de PBST en laissant les plaques 5 minutes à 37°C	Tampon= PBS+ 5% tween 20 + 5% lait écrémé, 100µl/puit, 90 minutes à température ambiante Rinçage 2 fois avec PBS+ 5% tween 20 Rinçage 1 fois avec de l'eau distillée

Enfin pour finir, 2 méthodes de coloration différentes ont été testées, une coloration à l'AEC ou au TMPP (cf 2.5.).

3.1.4. Principaux résultats obtenus lors de la mise au point du protocole d'IPMA

➤ Fixation des cellules infectées :

En ce qui concerne l'étape de fixation, les deux protocoles ont donné des résultats complètement différents. En effet, concernant la méthode 1 de fixation au paraformaldéhyde, le tapis cellulaire a été correctement fixé et n'a a priori subi aucun dommage.

A l'inverse, concernant la méthode 2 de fixation par la chaleur, on note un tapis cellulaire beaucoup plus fragile avec quelques plages de décollement rendant la lecture finale plus difficile. La méthode 1 a par la suite été retenue.

➤ **Anticorps primaire**

Tout d'abord l'anticorps primaire spécifique de la border disease n'a pas permis de détecter la souche BDV-6 6390. Il s'agit d'un anticorps anti Erns obtenu à partir d'une souche BDV-1.

A l'inverse, l'anticorps primaire de type pan-pestiviral (WB 103/105) a permis d'obtenir des résultats pour les concentrations étudiées et tous les virus testés, notamment avec un optimum à la concentration de 1/100. Enfin, l'anticorps polyclonal semble fonctionner aussi, notamment vis-à-vis de la souche BDV-5 plus que pour celle du BDV-6 6390, ce qui est surprenant car ce sérum provient d'une brebis infectée par cette dernière. Enfin, le sérum polyclonal de mouton a donné un bruit de fond beaucoup plus important, quelles que soient les dilutions utilisées.

En bilan l'anticorps monoclonal panpestiviral WB 103/105 a donné les meilleurs résultats à la dilution de 1/100^e.

➤ **Anticorps secondaire**

Concernant l'anticorps secondaire anti-souris, les deux concentrations testées ont permis de donner des résultats interprétables. A l'inverse, l'anticorps secondaire anti-mouton n'a fonctionné uniquement qu'à la concentration 1/100.

➤ **Coloration**

La première coloration à base d'aminoéthylcarbazole (kit AEC) a très bien fonctionné alors que la seconde à l'aide de TMB n'a pas permis la lecture des résultats.

3.2. Mise au point de la technique IPMA

Durant cette seconde phase de manipulations, il a été décidé en plus de :

- Modifier le plan de plaque. C'est-à-dire en particulier de n'infecter une plaque cellulaire qu'avec une seule souche virale pour éviter le risque de contamination croisée.
- Ne plus utiliser l'anticorps primaire spécifique Border disease (WB WS363)
- Utiliser plusieurs doses de virus différentes, autour de la dose moyenne 250 TCID₅₀/Puits de plaque 96 puits, de manière à optimiser la lecture des puits cellulaires infectés versus non infectés.

3.2.1 Protocole

➤ Infection virale

Pour cette seconde série de manipulation, un seul type de virus a été utilisé par plaque. Pour chaque virus, cinq titres viraux ont été testés (10X, X, 1/5X, 1/10X, 1/50 X) en partant de X=200 TCID₅₀/puits (calculé à partir des titres viraux). L'infection a été réalisée avec le même protocole que présenté précédemment en utilisant le plan de plaque suivant (exemple du BDV-5).

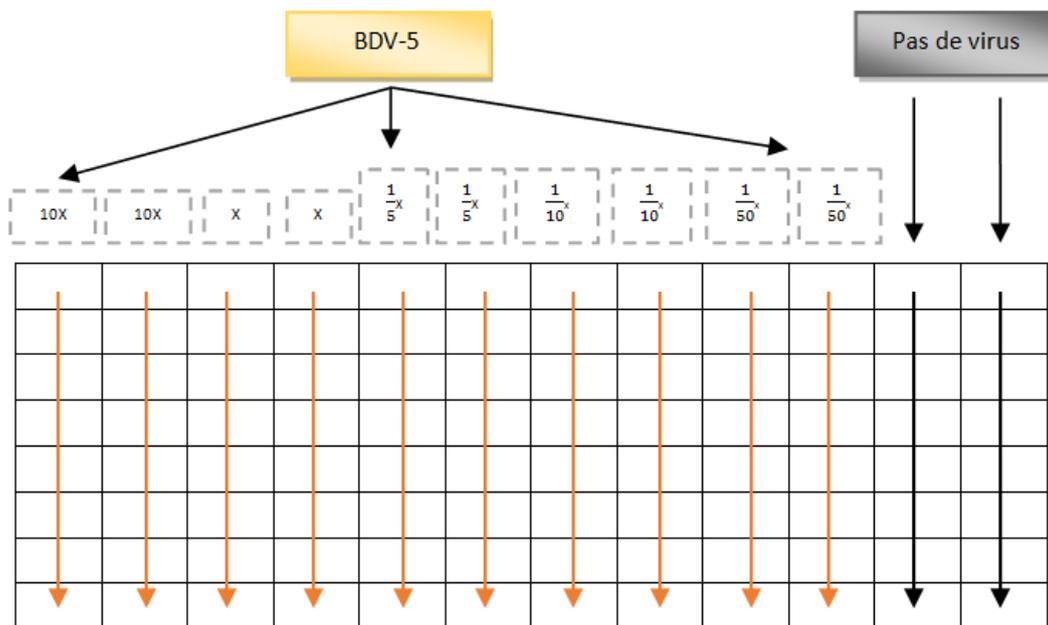


Figure 16 : Protocole final : Plan de plaque lors d'infection virale

➤ Mise en place anticorps Primaire

Du fait des résultats obtenus lors de la première manipulation, il a été décidé de ne plus utiliser l'anticorps primaire spécifique de la border disease. Les anticorps WB 103/105 et Polyclonal ont été utilisés à plusieurs concentrations différentes respectivement 1/100 puis 1/50 et 1/100. La disposition a été réalisée selon le plan de plaque suivant :

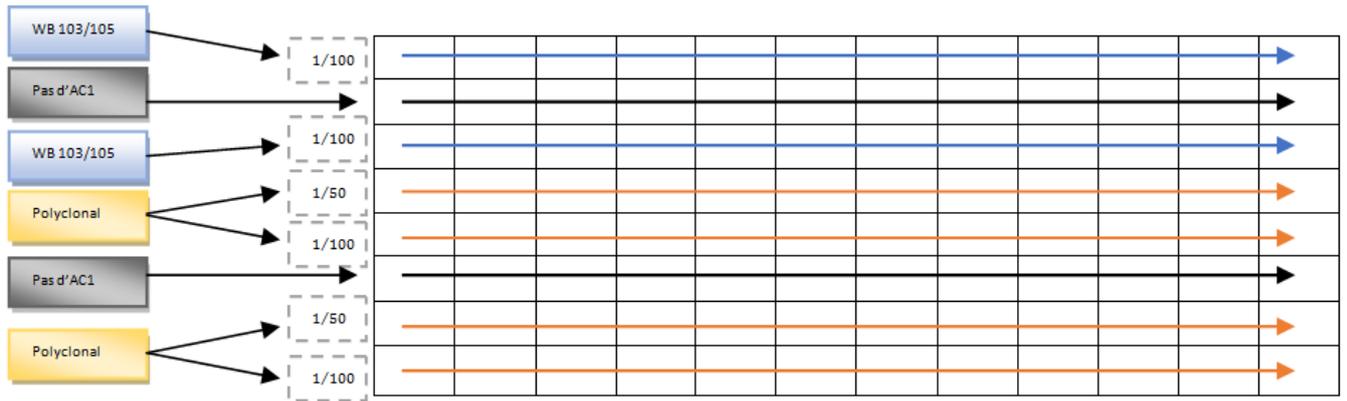


Figure 17 : Protocole final : Mise en place de l'anticorps primaire

➤ **Mise en place anticorps secondaire**

De la même manière que pour la première manipulation deux anticorps secondaires ont été utilisés : l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de souris (pour l'anticorps primaire WB103/105) et contre les IgG de moutons (pour le sérum polyclonal comme anticorps primaire). Les anticorps ont été utilisés à deux concentrations différentes respectivement : 1/100 et 1/250 pour l'anti-souris et 1/50 et, 1/100 pour l'anti-mouton.

La disposition a été réalisée selon le plan de plaque suivant :

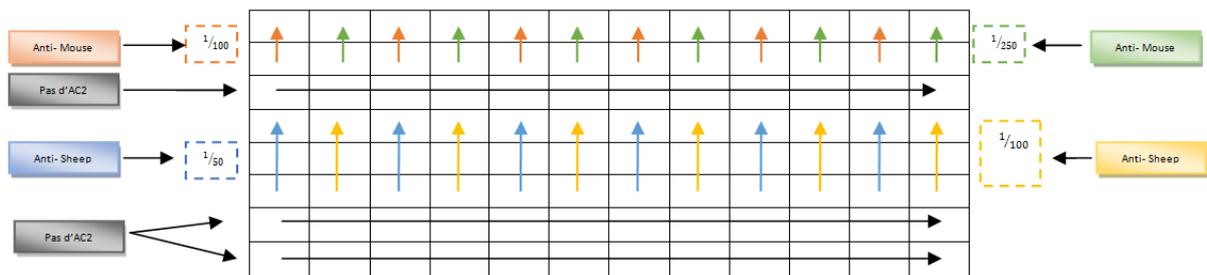


Figure 18 : Protocole final : Mise en place de l'anticorps secondaire

Les Plans de plaques finaux sont décrits dans le tableau suivant:

	BDV-5 10x	BDV-5 10x	BDV-5 x	BDV-5 x	BDV-5 1/5ème	BDV-5 1/5ème	BDV-5 1/10ème	BDV-5 1/10ème	BDV-5 1/50ème	BDV-5 1/50ème	cellules non infectées
WB103/105 1/100	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100
Pas d'anticorps Primaire	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100	AM 1/250	AM 1/100
WB103/105 1/100	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Polyclonal Sheep 1/50	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50
Polyclonal Sheep 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50
Pas d'anticorps primaire	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50	AS 1/100	AS 1/50
Polyclonal Sheep 1/50	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS
Polyclonal Sheep 1/100	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS	PS

Figure 19 : Protocole final : Plan de plaque obtenu

Par ailleurs, durant cette manipulation, les deux méthodes de fixation/saturation/perméabilisation ont été testées pour infirmer ou confirmer les premiers résultats.

3.2.2. Principaux résultats obtenus lors de la mise au point du protocole d'IPMA

➤ Fixation

Cette seconde série de manipulation a confirmé les problèmes de fragilité du tapis cellulaire pour la seconde méthode. En utilisant cette technique, la coloration appliquée a mis en évidence beaucoup de bruit de fond rendant les résultats difficilement interprétables. En particulier, plusieurs puits cellulaires non infectés ont été colorés notamment pour la plaque infectée avec le virus BVDV-1 HAN. Par ailleurs, à l'inverse, la coloration était assez faible lors de l'utilisation de sérum polyclonal anti-BDV-6 de mouton.

Concernant la première méthode, la coloration a été correcte rendant les résultats complètement interprétables. Les résultats qui suivent ne concernent donc que cette première méthode.

➤ Concentration virale

Pour les BVDV-1, NADL et le BDV-6, les dilutions du virus au cinquième, au dixième ou au cinquantième ont permis d'avoir les résultats les plus nets. Pour le virus BVDV-1 HAN, les résultats les plus nets ont été obtenus avec une concentration au dixième voir au cinquantième. Pour le virus BDV-5, aucun résultat n'a pu être obtenu sans que l'on puisse déterminer la raison. On peut imaginer que le titre viral de départ était largement surcalculé.

➤ **Concentration en anticorps primaires**

Les résultats ont pu être interprétés avec l'anticorps monoclonal panpestiviral WB 103/105. En revanche, pour le sérum Polyclonal, un bruit de fond est présent sur l'ensemble des puits à la dilution 1/50^e et, de manière moins importante à la dilution 1/100^e. Toutefois, il aurait fallu essayer une dilution plus importante, avec le risque de perdre le signal.



Figure 20 : Exemples de lecture de puits positifs

3.3. Protocole définitif

Au vu des résultats obtenus, il a été décidé d'utiliser :

- Un virus BDV-6 avec un titre viral d'origine de $8,3 \times 10^3$ TCID₅₀/ml et dilué au cinquième.
- Un anticorps primaire de type WB 103/105 à la concentration 1/100.
- Un anticorps secondaire de type IgG de chèvres dirigé contre les IgG de souris et marqué à la horse radish peroxidase, à la concentration 1/100.

Tableau 8: Protocole définitif pour l'infection

Décomplémentation des sérums	Mise en place des échantillons à l'étuve 30 minutes à 56 °C
Préparation du milieu d'infection	Disposer 300 µl de milieu neutre dans tous les cônes à dilution (milieu : DMEM + 1% PS) Mettre 300µl de sérum dans la première colonne des cônes de dilution. Prendre 300µl de milieu de la première colonne et le vider dans la seconde colonne de cône de dilution. Faire de même pour tous les cônes à dilution Préparer un milieu d'infection avec un titre de BDV6 correspondant à environ 100 TCID 50 / 100µl. Mettre 300µl de milieu d'infection par cône sur pour les 11 premières colonnes enfin mettre 300µl de milieu neutre dans la dernière colonne
Incubation	Laisser les cônes de dilution 1h à 37°C sous 5% de CO2.
Préparation des plaques	Retirer le milieu de culture des plaques p96 préalablement préparées et mettre 100 µl du milieu par puit en suivant la règle suivante : pour une ligne de cône de dilution il y a 4 lignes sur une plaque correspondante
Incubation des plaques	Laisser les plaques à l'étuve 2h à 37°C sous 5% de CO2
	Retirer le milieu et disposer 100 µl par puit de milieu composé de DMEM + 1% PS + 5% SVF
Incubation	Laisser les plaques à l'étuve pendant 3 jours à 37°C sous 5% CO2

Pour l'étape suivante, le protocole de révélation fixation mis en place est celui du groupe 1 tel que défini ci contre.

Tableau 9 : Protocole définitif pour la manipulation

Fixation	Dépôt dans chaque puit de 35µl de Protoformaldéhyde 4% laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes Retrait du milieu à l'aide d'une pipette multicanaux
Perméabilisation	Dépôt dans chaque puit de 100 µl de Protoformaldéhyde 4% puis incubation pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C sous 5% de CO2. Rinçage à l'aide de PBS Rinçage avec du tampon de Perméabilisation
Saturation des puits	Dépôt de 100µl/ puit de PBS+ 2% de Triton x100, 60 minutes à 37°C Rincer les cellules 2 fois avec PBST (=PBS+0,25% tween 20) Dépôt de 100µl/ puit de PBS+ lait écrémé 3% , 60 minutes à 37°C Rinçage 3 fois à l'aide de PBST
Dépôt Anticorps Primaire	Tampon = PBS+0,05 % tween 20 + Lait écrémé 5%, 100µl/ puit, 60 minutes à 37°C Rinçage 2 fois avec PBST Rinçage 3 fois à l'aide de PBST en laissant les plaques 5 minutes à 37°C
Dépôt Secondaire Anticorps	Tampon = PBS+0,05 % tween 20 + Lait écrémé 5%, 100µl/ puit, 60 minutes à 37°C Rinçage 2 fois avec PBST Rinçage 3 fois à l'aide de PBST en laissant les plaques 5 minutes à 37°C
Coloration	AEC staining kit 100µl/puit Rinçage 2 fois avec eau bi distillée 100µl/puit

3.4. Résultats de la séroneutralisation vis-à-vis du BDV-6

Seuls les sérums prélevés le jour de la vaccination (J-119), le jour l'inoculation (J0) et le jour des autopsies (J66) ont été testés. Tous les sérums des brebis prélevés lors de la vaccination à J-119 étaient dépourvus d'anticorps neutralisant le BDV-6.

3.4.1. Résultats obtenus par loge

- Loge 1 : Vaccination par Mucosiffa® (vaccin atténué BVDV-1)

Titre en anticorps neutralisants		
Log 2(ED50/ml)		
	J0	J66
Vaccinées gravides		
L1-196	6,56	11,57
L1-235	4,57	7,32
L1 346	4,32	9,82
L1 3116	4,32	8,32
L1 4160	4,32	9,07
Non vaccinées gravides		
L1 197	4,32	7,32
L1 781	4,32	4,57
L1 2296	4,82	13,57
L1 7204	4,32	5,32
L1 9168	6,07	8,82

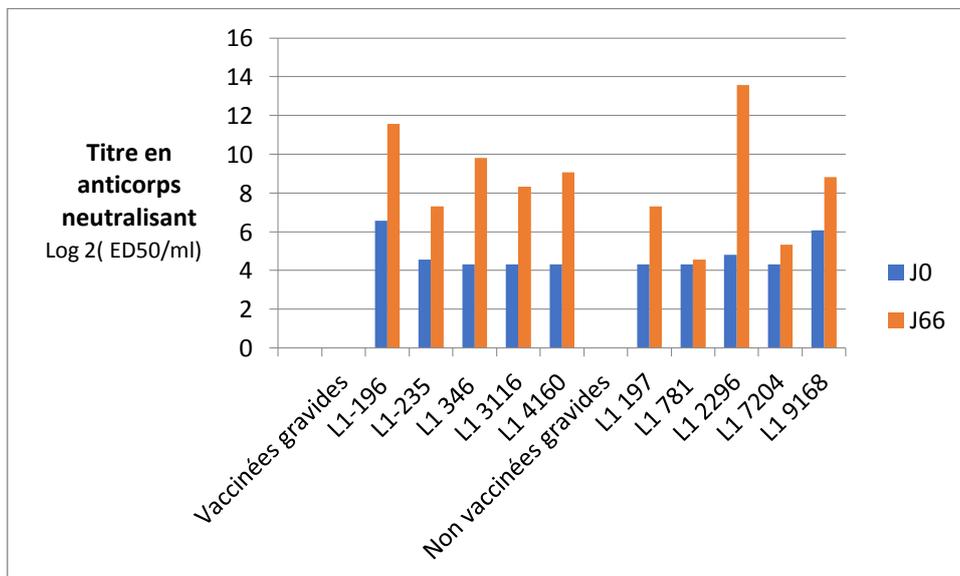


Figure 21 : Valeur et représentation graphique des titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 obtenus chez les brebis vaccinées par Mucosiffa® et non vaccinées le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérimentation (J66)

Deux mois après la vaccination et avant l'inoculation d'épreuve (J0), les brebis vaccinées Mucosiffa® et non vaccinées, présentaient respectivement des titres moyens de 4,82 +/- 0,70 Log₂ ED₅₀/ml et 4,77 +/- 0,54 Log₂ ED₅₀/ml.

Le jour de l'autopsie, soit environ 66 jours après l'inoculation, les titres en anticorps neutralisants avaient augmenté et étaient respectivement de 9,22 +/- 1,18 et de 7,92 +/- 2,62 Log₂ ED₅₀/mL.

- Loge 2 : vaccination par Bovela® (vaccin atténué BVDV-1 et BVDV-2)

Titre en anticorps neutralisants Log ₂ (ED ₅₀ / ml)		
	J0	J66
Vaccinées Gravides		
L2 249	8,56	13,82
L2 262	6,32	14,82
L2 445	5,57	11,32
L2-939	4,07	14,57
L2-5124	5,57	11,57
Non Vaccinées gravides		
L2 104	4,32	13,82
L2-155	4,32	9,57
L2 1177	4,32	6,57

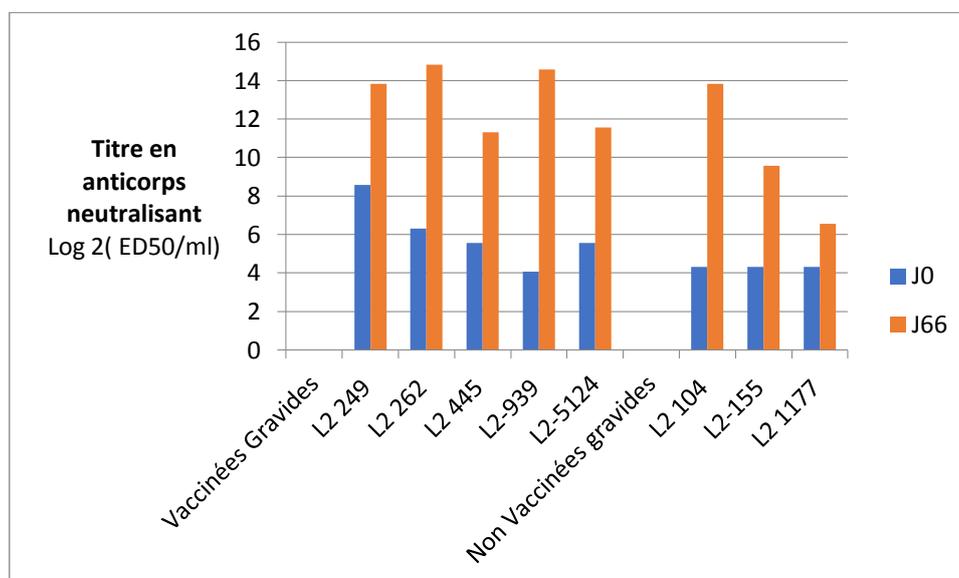


Figure 22: Valeur et représentation graphique des titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 obtenus chez les brebis vaccinées par Bovela® et non vaccinées le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérience (J66)

Deux mois après la vaccination et avant l'inoculation d'épreuve (J0), les brebis vaccinées Bovela® et non vaccinées, présentaient respectivement des titres moyens de 6,02 +/- 1,14 Log₂ ED₅₀/ml et 4,32 Log₂ ED₅₀/ml.

Le jour de l'autopsie, soit environ 66 jours après l'inoculation, les titres en anticorps neutralisants avaient augmenté et étaient respectivement de 13,22 +/- 1,42 et de 9,98 +/- 2,56 Log₂ ED₅₀/mL.

- Loge 3 : Vaccination par Bovilis-BVD ® (vaccin inactivé BVDV-1)

Titre en anticorps neutralisants log 2 (ED50 / ml)		
	J0	J66
Vaccinées gravides		
L3-019	4,82	8,57
L3 -180	4,32	9,82
L3 251	5,82	8,82
L3 334	6,07	13,07
L3-391	4,82	11,32
Non vaccinées gravides		
L3-046	4,32	5,32
L3 172	4,32	6,32
L3 312	4,32	8,56
L3 943	4,32	10,57
L3 3216	5,82	12,07
L3 4112	5,07	14,82

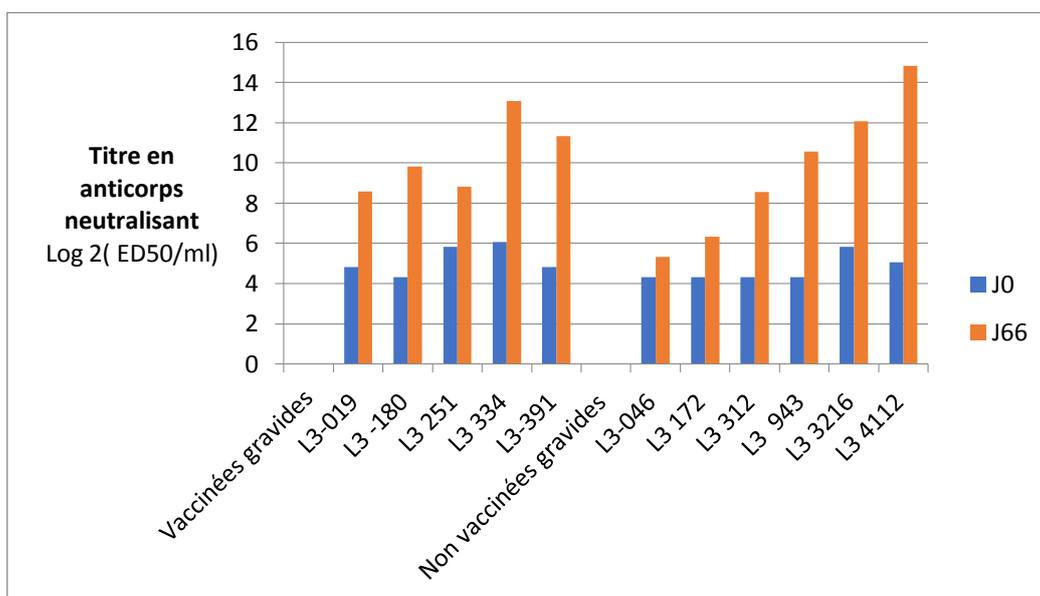


Figure 23 : Valeur et représentation graphique des titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 obtenus chez les brebis vaccinées par Bovilis-BVD ® et non vaccinées le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérience (J66)

Deux mois après la vaccination et avant l'inoculation d'épreuve (J0), les brebis vaccinées Bovilis -BVD® et non vaccinées, présentaient respectivement des titres moyens de 5,17 +/- 0,62 Log₂ ED₅₀/ml et 4,70 +/- 0,50 Log₂ ED₅₀/ml.

Le jour de l'autopsie, soit environ 66 jours après l'inoculation, les titres en anticorps neutralisants avaient augmenté et étaient respectivement de 10,32 +/- 1,50 et de 9,61 +/- 2,88 Log₂ ED₅₀/mL.

3.4.2. Résultats par groupes pour la séroneutralisation vis-à-vis du BDV-6

Les moyennes des groupes (avec les écarts moyens) sont représentées à la Figure 23. Pour cela nous avons regroupé toutes les brebis non vaccinées dans un groupe unique.

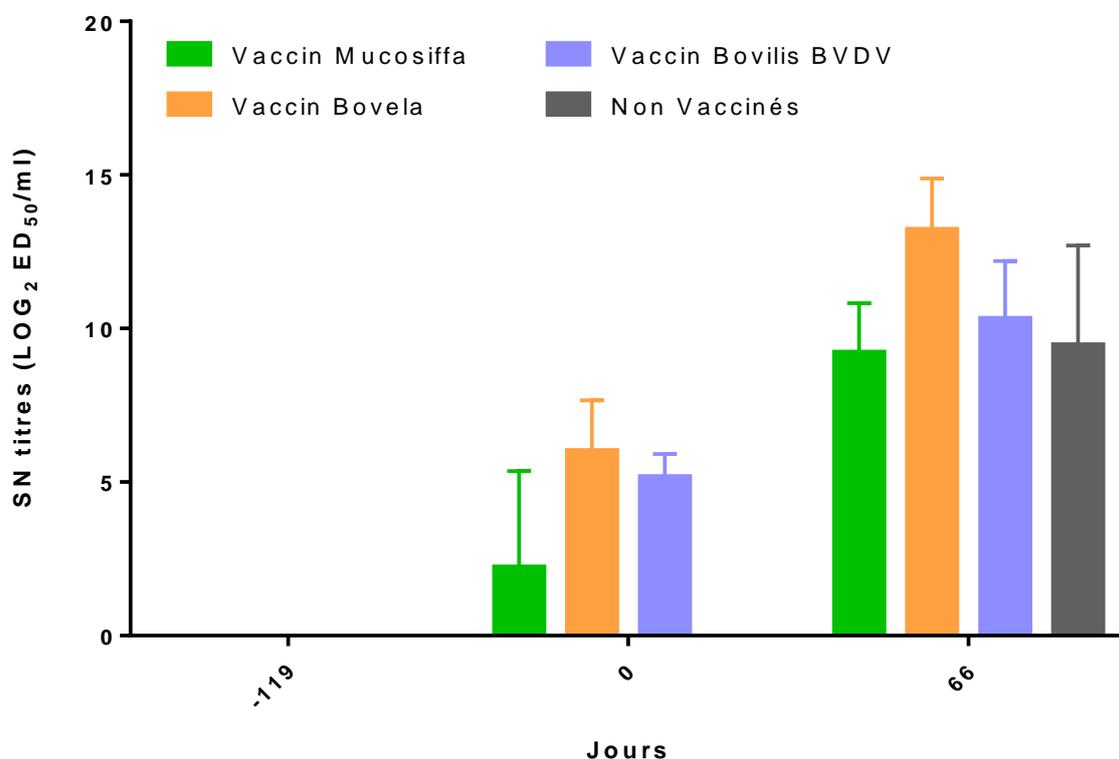


Figure 24: Titres en anticorps séroneutralisants le BDV-6 chez les brebis vaccinées par Mucosiffa® (en vert), Bovela® (en orange), Bovilis BVD® (en violet) ou non vaccinées (en gris), le jour de la vaccination (J-119), le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérience (J66).

3.4.3 Résultats comparés des titres neutralisant le BDV-6 et le BVDV-1 (souche NADL)

Pour comparer les réponses neutralisantes vis-à-vis de la souche BDV-6 de challenge ou du virus BVDV-1 (génotype compris dans les trois valences vaccinales), nous avons comparé nos résultats et ceux obtenus par M. Combes pour la séroneutralisation contre la souche BVDV-1 NADL (Combes, 2017). Cette souche a été sélectionnée car c'est une souche BVDV-1 couramment utilisé dans la bibliographie pour les études de séroneutralisation. Elle possède l'intérêt d'être cytopathique et par conséquent de ne donc pas nécessiter de technique de coloration IPMA. Les puits infectés versus non infectés sont alors déterminés par lecture de l'effet cytopathique. Hormis cette différence, la méthodologie utilisée par M. Combes est strictement la même que celle que nous avons utilisé et nous avons bien sur comparé les sérums des mêmes animaux aux mêmes dates (tube de sérum de conservation jamais utilisé préalablement). Trois sérums déjà testés par M. Combes contre NADL ont été re-testés avec notre méthode IPMA. Les résultats ont montré des titres identiques entre les deux méthodes de détection du virus (IPMA ou effet cytopathique). Les résultats finaux de séroneutralisation sont présentés à la Figure 24.

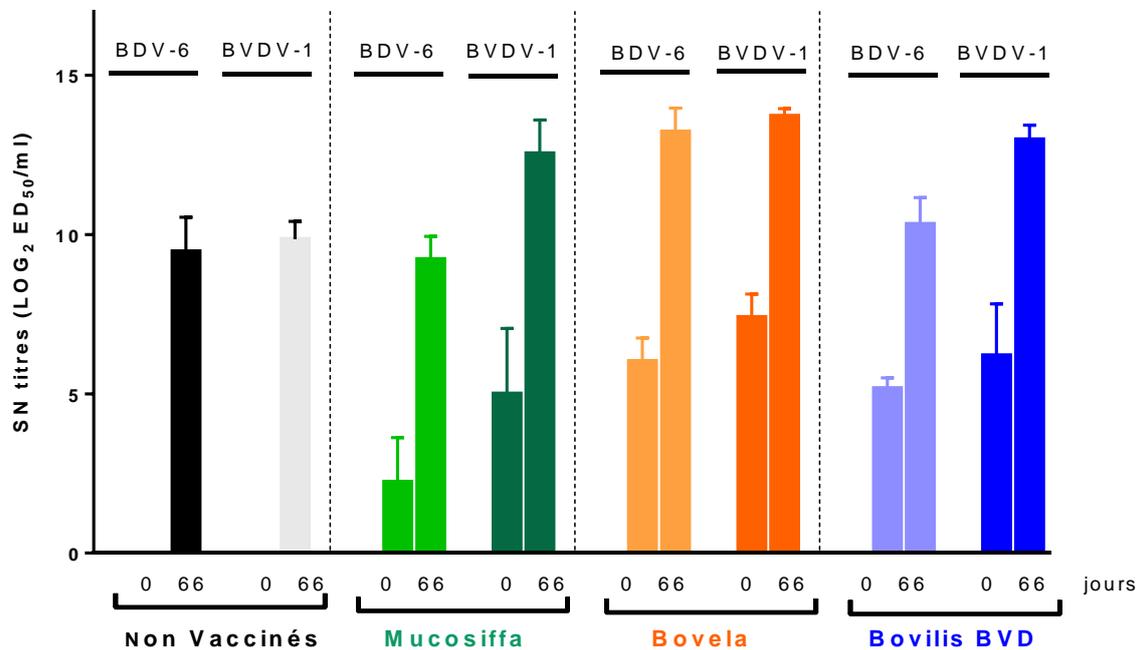


Figure 25 : Titres en anticorps séroneutralisant le BDV-6 (souche 6390) ou le BVDV-1 (souche NADL) chez les brebis vaccinées par Mucosiffa® (en vert), Bovela® (en orange), Bovilis BVD® (en violet) ou non vaccinées (en gris) le jour de l'inoculation d'épreuve (J0) et à la fin de l'expérience (J66).

3.4.5 Analyses statistiques et analyses des résultats

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

Une ANOVA à deux paramètres avec mesures répétées (two-way ANOVA) a été utilisée pour les analyses cinétiques par groupe. Le test de comparaison multiple de Tukeys a été appliqué quand les effets jours et groupes étaient significatifs (significant among interactions), pour effectuer une comparaison des groupes sur chaque jour.

Les résultats sont présentés ci-dessous.

Tableau 10 : Tests statistiques (ANOVA) de comparaison entre les groupes de brebis et les deux types de séronéutralisation (BDV-6 et BVDV-1) pour le jour J0 (juste avant l'inoculation d'épreuve et 119 jours après la première injection du vaccin Bovilis BVD®). ns : non significatif ; * : p<0,05 ; ** p<0,005 ; * p<0,001 ; **** p< 0,0001**

J0 (avant challenge, 119 jours après vaccination)	Mucosiffa BDV- 6	Mucosiffa BVDV-1	Bovela BDV-6	Bovela BVDV-1	Bovilis BVD-6	Bovilis BVDV-1	Non Vaccinés BDV-6	Non vaccinés BVDV-1
Mucosiffa BDV-6		ns	*	***	ns	*	ns	ns
Mucosiffa BVDV-1			ns	ns	ns	ns	****	****
Bovela BDV-6				ns	ns	ns	****	****
Bovela BVDV-1					ns	ns	****	****
Bovilis BDV6						ns	****	****
Bovilis BVDV-1							****	****
Non vaccinés BDV6								ns
non vaccinés BVDV-1								

Les résultats montrent :

- A J0, les titres en anticorps neutralisants sont inférieurs à ceux observés à J66 quels que soient le groupe et le virus testé. L'efficacité de l'inoculation d'épreuve à BDV-6 a permis de booster la réponse immunitaire humorale, les différences de titres SN étant significatives entre J0 et J66 (p< 0.001, non montrés ici) pour chaque groupe et chaque virus testé.
- Les titres en anticorps neutralisant le BDV-6 sont significativement plus faibles à J0 pour le groupe Mucosiffa®, comparés aux groupes Bovela® et Bovilis-BVD®. Ce n'est pas le cas lorsque l'on s'intéresse à la neutralisation du virus BVDV-1.
- Il n'y a pas de différences significatives à J0 entre les groupes Bovela® et Bovilis BVD®, que ce soit pour la neutralisation du virus BDV-6 ou du virus BVDV-1.

- Toujours à J0, quand on compare les résultats de séroneutralisation entre BVDV-1 et BDV-6 pour chaque vaccin, aucune différence significative n'est observée, quel que soit le groupe vaccinal étudié. Toutefois, pour le groupe Mucosiffa[®], les titres SN sont supérieurs pour le BVDV-1 par rapport au BDV-6, alors qu'ils sont similaires pour les deux autres groupes vaccinaux.
- Par rapport aux animaux non vaccinés, à J0 des différences significatives ont été observées avec les groupes Bovilis-BVD[®] et Bovela[®] pour la neutralisation du BDV-6 (pas pour le groupe Mucosiffa[®]) et pour les groupes Mucosiffa[®], Bovilis-BVD[®] et Bovela[®] pour la neutralisation du BVDV-1. Il en est de même pour J66 sauf pour la comparaison entre Bovilis –BVD[®] et non vaccinés qui est non significative pour le BDV-6.

4. Discussion

La Border disease est une maladie présente dans le monde entier, entraînant des pertes économiques majeures au sein des élevages ovins. Depuis l'épidémie notée en Aveyron nommée « Petega ovina », des programmes de contrôles sont mis en place notamment par la FODSA et associent de l'épidémiologie à des mesures sanitaires et médicales, dont la vaccination. Cette vaccination s'appuie sur le modèle de gestion d'une autre pestivirus : la BVD chez les bovins. En effet, comme il a été précédemment décrit, il n'existe pas de formulation vaccinale mise sur le marché possédant une AMM pour la Border Disease. Actuellement, ce sont les vaccins utilisés pour la BVD qui sont utilisés à quart ou demi-dose chez les ovins. Cette pratique, jusqu'il y a quelques années, ne s'appuyait sur aucune preuve scientifique mais plutôt sur l'hypothèse d'une réaction immunitaire croisée entre les deux pestivirus.

L'objectif de la vaccination est double. En effet, il s'agit de mettre en place une protection individuelle contre une infection aiguë entraînant une immunodépression transitoire mais aussi de protéger les fœtus et par conséquent la possible formation d'individus IPI. Ces derniers étant les principales sources de contamination au sein de l'élevage. L'étude réalisée par Mickael Combes en 2015, avait pour objectif principal de tester la pratique vaccinale mise en place sur le terrain en évaluant une possible protection fœtale (Combes, 2017). Pour les 3 vaccins BVD testés (Mucosiffa[®], Bovilis BVD[®], Bovela[®]), l'étude a conduit à une absence d'efficacité dans les conditions expérimentales réalisées, puisque 100% des fœtus des femelles gravides vaccinées trois mois avant, étaient infectés par le BDV-6 après l'inoculation d'épreuve. Pourtant, la grande majorité des brebis possédaient des anticorps neutralisant le BVDV-1 le jour de l'inoculation d'épreuve.

Notre hypothèse était de dire que si la vaccination des brebis avait induit des taux importants d'anticorps neutralisant le BVDV-1, la capacité de ces anticorps à neutraliser la souche hétérologue BDV-6 6390 d'inoculation pourrait être différente et insuffisante pour empêcher l'infection fœtale. Pour cela, les sérums issus de l'expérimentation de M. Combes, récoltés avant vaccination, 82 jours après la vaccination (juste avant l'inoculation d'épreuve) et deux mois après l'inoculation, ont donc été testés quant à leurs capacités à neutraliser le BDV-6.

4.1. Mise au point de la technique IPMA

Comme la souche BDV-6 6390 utilisée est non cytopathique, la première étape a consisté à valider un test d'IHC (IPMA-péroxydase) afin de la mettre en évidence sur des cultures cellulaires. Il n'existe dans la littérature que peu d'études détaillant de manière précise ce type de protocole. Nous avons néanmoins pu identifier deux études qui nous ont servi de base pour nos différents essais (IDVET, Kaiser et al., 2016). Il convient aussi de rappeler que les pestivirus sont présents dans le sérum de veau fœtal, notamment quand les vaches sont infectées pendant la période d'immunotolérance et produisent des IPI. Par conséquent, les pestivirus sont des contaminants possibles des cultures cellulaires via l'utilisation de sérum de veau fœtal (SVF). Des études récentes réalisées en Angleterre ou aux Etats-Unis, ont permis de mettre en évidence que la prévalence de BVDV au sein des troupeaux bovins était comprise entre 30 et 95%. (Newcomer et al., 2015). Ces chiffres permettent de comprendre que l'infection par le BVDV est ubiquitaire et touche de nombreux animaux, donc potentiellement les fœtus. Si la fréquence d'infection des fœtus est plus faible (entre 1 et 2% d'IPI), les lots de sérum de veau sont préparés à partir d'un grand nombre de fœtus, ce qui explique la contamination fréquente de ces lots. Par conséquent, au sein des laboratoires d'analyses, le risque d'utilisation de produits contaminés est très important notamment lors d'utilisation de produits d'origine bovine (Audet et al., 2000). Pour exemple, plusieurs épidémies de Pestivirus ont eu lieu via l'utilisation de lots de vaccins vivants contaminés lors de la production du virus atténué en culture cellulaires. Une étude réalisée par le collègue vétérinaire de Norvège a notamment mis en évidence une sévère épidémie sur un nombre important de troupeaux de chèvres suite à l'utilisation d'un vaccin normalement utilisé pour lutter contre le parapoxvirus Orf, et contaminé par du BVDV (Løken et al., 1991). Plus récemment en 2018, un vaccin espagnol atténué contre l'ecthyma contagieux des ovins a été incriminé pour expliquer une épizootie à BDV dans le centre de la France. (Asín et al., 2020)

Par conséquent, lors de notre étude, une première étape de vérification a été de s'affranchir de toutes les sources possibles de contaminations extérieures par des pestivirus. En premier lieu, le laboratoire teste par RT-qPCR la présence de pestivirus dans tous les lots de sérums avant de les acheter, ainsi que dans nos cellules MDBK. Les cellules étaient négatives et un lot de sérum sur les 6 testés était négatif (sérum sélectionné pour l'étude). Pour plus de sécurité nous avons fait un premier choix qui consistait à utiliser du sérum de cheval (HS pour Horse sérum) à la place du SVF. Malheureusement, le HS est moins riche que le SVF en facteurs de croissance et il n'a pas été possible de maintenir les cultures de cellules MDBK avec le HS.

Pour écarter toute contamination par un pestivirus endogène, nous avons inclus des témoins négatifs dans chaque manipulation. Pour chaque plaque 96 puits, la dernière colonne était composée de cellules non infectées. L'absence complète de signal de coloration sur les cellules MDBK non infectées (ligne contrôle introduite sur chaque plaque de 96 puits) nous a confirmé que notre technique de détection n'identifiait pas de pestivirus endogène et donc que les colorations positives étaient bien liées à la présence du BDV-6 ou BVDV-1 NADL utilisés. Cette technique de révélation est d'ailleurs une des méthodes utilisées pour évaluer la contamination en pestivirus des lignées cellulaires (Potts et al., 1989).

Un dernier point méthodologique critique concernait l'utilisation de lait écrémé dans la technique de révélation, lait qui pourrait contenir des anticorps anti BVD, ces derniers entrant en compétition avec l'anticorps primaire anti-pestiviral. Nous avons montré, qu'en l'absence

d'utilisation de l'anticorps primaire, nous ne détectons aucun signal de coloration sur des plaques de cellules MDBK infectées par le BVDV ou le BDV-6.

Lors de la mise au point de la coloration IPMA, nous avons testé plusieurs anticorps anti-pestiviraux, un anticorps monoclonal spécifique du BDV dirigé contre Erns, un conjugué de deux anticorps monoclonaux panpestiviraux dirigé contre NS2-3 et le sérum polyclonal d'une brebis contrôle non vaccinée et infectée par le BDV-6 lors de l'étude de M. Combes (récupéré à la fin de l'expérimentation). Le conjugué panpestiviral comprend deux anticorps monoclonaux non compétitifs entre eux, de classes IgG1 (WB103) et IgG2 (WB105) et dirigés contre la protéine NS2-3, initialement de la souche Oregon C24V (souche américaine BVDV-1). Ce produit a notamment été confirmé pour reconnaître de nombreuses souches de BVDV et les souches Moredun (BDV-1) et Aveyron (BDV-5). L'anticorps monoclonal spécifique BDV a été produit contre la souche SF87/6 (génotype BDV-1) isolée d'un porc en Angleterre et reconnaît la protéine Erns du BDV. Ce produit a été positivement testé contre les souches Moredun (BDV-1) et Aveyron (BDV-5). En bilan, le sérum polyclonal et le conjugué d'anticorps monoclonaux pan pestivirus ont donné des résultats positifs. Toutefois, le sérum polyclonal donnait un bruit de fond plus important, nous avons donc choisi le conjugué monoclonal pan pestivirus. Par ailleurs, il est surprenant que l'anticorps monoclonal spécifique du BDV n'ait absolument pas fonctionné lors des essais que ce soit lors du titrage de la souche BDV-6 ou lors des essais en séroneutralisation. La première hypothèse consiste à dire que la concentration que nous avons testée était trop faible pour détecter le BDV-6. Nous n'avons pas souhaité tester d'autres dilutions plus concentrées avec ce monoclonal, compte tenu des coûts que cela aurait engendré et des résultats positifs obtenus avec le conjugué panpestiviral. Une autre hypothèse serait de dire que le monoclonal ne reconnaît pas notre souche BDV-6, isolée en 2010 en Aveyron. Il a été produit avec une souche très ancienne de BDV-1 et testé uniquement contre deux souches, là aussi très anciennes de BDV-1 et BDV-5. Le gène Erns est, de plus, un gène génétiquement plus variable que le gène NS2-3 qui est le plus conservé au sein des pestivirus. (Tautz et al., 2015). Il n'existe pas dans la littérature de données phylogénétiques de comparaison des séquences nucléotidiques des gènes Erns pour les BDV. Seules des séquences d'une partie de NS2-3 sont disponibles qui permettent de classer le BDV en 8 génotypes, les plus récents étant les génotypes 6,7 et 8. (Caruso et al., 2017). Nous n'avons pas investigué plus en profondeur ces hypothèses car ce n'était pas l'objectif de cette étude.

Toutefois, lors des premiers essais avec différents virus, le fait que nous n'ayons pas pu détecter notre souche BDV-5 Aveyron avec le monoclonal spécifique du BDV (contrairement à ce qui est indiqué dans la fiche produit) suggérerait en premier lieu un effet concentration.

4.2. Réponse humorale neutralisante et protection fœtale hétérologue

Parmi les techniques de détection des anticorps, la séroneutralisation est encore souvent considérée comme une méthode de référence de par sa forte spécificité. Cette technique nécessite cependant une manipulation longue, couteuse et délicate quand il s'agit d'identifier des souches virales non cytopathiques. Elle est aussi la méthode qui permet une quantification de la réponse humorale neutralisante, et donc de la protection, en partie au moins, contre l'infection par les pestivirus. La protection fœtale par les anticorps repose sur l'hypothèse que, s'il existe des quantités suffisantes d'anticorps neutralisants dans le sang, ces derniers sont capables de neutraliser la fraction libre des pestivirus (non intracellulaire, dans les

lymphocytes) et de les empêcher de traverser la barrière placentaire. Cela suppose aussi que seuls les virus libres seraient responsables du franchissement de cette barrière, ce qui n'a jamais été démontré.

Par rapport à l'objectif principal de ce travail, nos résultats montrent que la vaccination à l'aide des 3 vaccins BVDV a permis chez les brebis la production d'anticorps neutralisant le BVDV-1 (souche NADL) mais aussi le BDV-6 (souche 6390). A J0, soit 91 jours après la deuxième injection du Bovilis BVD® et l'injection des vaccins Bovela® et Mucosiffa®, les titres en anticorps neutralisant le BDV-6 n'étaient pas significativement différents de ceux neutralisant le BVDV-1, et ce quel que soit le vaccin testé. Cela suggère que le défaut d'efficacité des vaccins à protéger le fœtus ne s'explique pas par une absence de réaction humorale neutralisante croisée entre BVDV-1 et BDV-6. Cette protection humorale croisée avait déjà été en partie abordée par l'étude de Anne (2012) qui avait mis en évidence en 2012 une neutralisation croisée partielle entre la souche C86 cp de BVDV-1 du vaccin Bovilis BVD® (brebis vaccinées) et deux souches de BDV-5 et de BDV-3. Chez les brebis vaccinées par Bovilis BVD®, les titres en anticorps neutralisants 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 (Anne, 2012).

Les résultats obtenus lors de cette étude pour la souche BDV-6 ne présagent en rien des résultats pouvant être obtenus avec d'autres génotypes de BDV. En effet, comme il a été précisé précédemment, il y a relativement peu d'études concernant le test de neutralisation croisée concernant les Pestivirus des moutons et des chèvres. (Nettleton et al., 1998). Lors d'une étude ancienne Vantsis *et al.*, (1980a) ont montré des différences importantes en réponse neutralisante (ici contre le BVDV-1 NADL) lorsqu'on inocule deux souches différentes de BDV à des brebis (titres supérieurs avec la souche référence Moredum par rapport à une souche de terrain). Des différences antigéniques significatives ont aussi été mises en évidence entre les sous-groupes BDV-1, BDV-2 et BDV-3, voire entre souches au sein d'un même sous-groupe BDV-1 (Becher et al., 2003). De la même manière, le sérum d'un chamois naturellement infecté avec le virus BDV-4 possédait un titre neutralisant homologue (contre le BDV-4) plus important que contre les virus hétérologues de type BDV-1 et BDV-2 (Mishra, 2012). Par conséquent, il serait intéressant, maintenant que le protocole de séroneutralisation a été mis en place d'étendre notre étude à d'autres génotypes de BDV. En effet, les souches de BDV circulantes sont variables en fonction de la zone géographique concernée. Par exemple, si on s'intéresse à la situation actuelle française, en Aveyron on retrouve en majorité des souches de génotypes 3 et 6 alors que dans les Pyrénées circule le génotype 4 (Anne, 2012).

Dans notre étude pour expliquer l'absence de protection fœtale, on pourrait émettre l'hypothèse que, dans nos conditions expérimentales et même s'il existe une réaction croisée, la quantité d'anticorps neutralisants présents (et donc les titres), n'est pas suffisante pour neutraliser les charges virales importantes (2.10^5 DIC₅₀/brebis) inoculées par voie intramusculaire, donc rapidement disponibles dans le compartiment sanguin. Ainsi, les titres en anticorps neutralisants le BDV-6 ou le BVDV-1, deux mois après vaccination (moyenne de 2,2 à 6,1 Log₂ ED₅₀/ml pour le BDV-6 selon les vaccins) chez les brebis vaccinées sont inférieurs aux titres obtenus deux mois après inoculation du virus chez les brebis non vaccinées (moyenne de 9,4 Log₂ ED₅₀/ml pour le BDV-6, groupe non vacciné), suggérant une réponse quantitative en neutralisation nettement plus importante lors d'infection. Il n'existe que très peu d'études concernant la « quantification » des anticorps neutralisant le BDV chez les ovins (étude récente de Anne en 2012) et donc peu de valeurs chiffrées permettant de comparer nos résultats (Anne, 2012). C'est plus facile pour les titres BVDV, notamment ceux

définis dans l'étude de Hamers réalisée en 2002, qui compare les réponses neutralisantes croisées post vaccinales (Hamers et al., 2002). Dans cette étude, Hamers a comparé la réponse neutralisante de veaux vaccinés à l'aide du vaccin Rispoval 4® contre 22 souches de BVDV-1 et BVDV-2. Les titres obtenus variaient considérablement entre 2,6 et 8,8 Log₂ ED₅₀/ml. La souche NADL n'avait pas été testée dans cette étude mais considérant leur technique de séroneutralisation très similaire à la nôtre, les taux d'anticorps neutralisant la NADL à J0 sont entre 5 (Mucosiffa ®) et 7 (Bovela ®) Log₂ ED₅₀/ml dans notre étude, soit dans la fourchette haute de l'intervalle défini par l'auteur. Cela suggérerait que la vaccination chez les ovins avec les trois vaccins BVDV induirait des titres en anticorps neutralisants proches de ceux obtenus lors de vaccination des bovins avec un vaccin non utilisé dans cette étude. A l'inverse, on peut comparer les taux d'anticorps neutralisants entre les ovins vaccinés avec Mucosiffa ® à demi-dose (notre étude) et des bovins vaccinés Mucosiffa à dose complète (étude menée à l'ENVT, Meyer et al, 2011) testés par la suite en protection foetale. Deux mois après la vaccination, les titres en anticorps neutralisant la souche NADL (méthode identique de séroneutralisation) étaient en moyenne de 8.8 +/- 0,3 Log₂ ED₅₀/ml chez les vaches vaccinées et 5 +/- 1,1 Log₂ ED₅₀/ml chez les brebis vaccinées. Cet écart pourrait en partie expliquer l'absence de protection foetale chez les brebis alors que les fœtus des vaches étaient eux tous protégés d'une infection à BVDV-1 (Meyer et al., 2012). Toutefois si on regarde les résultats individuels, trois de nos brebis vaccinées (une dans chaque groupe) avaient à J0 des titres élevés en neutralisation NADL, entre 9,1 et 9,3 Log₂ ED₅₀/ml. Malgré ces titres élevés, leurs fœtus ont été infectés par le BDV-6.

Si l'on compare les trois vaccins, alors que M. Combes ne trouvait aucune différence significative quand il pratiquait la séroneutralisation envers le BVDV-1 NADL, nous avons observé que les titres en anticorps neutralisant le BDV-6 étaient significativement plus faibles à J0 (après la vaccination) pour le groupe Mucosiffa ® (2,2 Log₂ ED₅₀/ml) comparés aux groupes Bovela ® et Bovilis-BVD ® (6 et 5,2 Log₂ ED₅₀/ml). Toutefois dans l'étude de Combes, les dix brebis de chaque groupe ont été testées alors que dans notre étude nous avons réalisé un échantillonnage aléatoire de 5 brebis par groupe. L'échantillonnage aléatoire a abouti à la sélection des 2 seules brebis (sur les 10) du groupe mucosiffa qui n'ont pas séroconverti, ce qui n'a pas été le cas dans les 2 autres groupes (Combes, 2017). Cela pourrait expliquer les différences obtenues entre les 2 groupes. Les séroneutralisations devront être réalisées sur les 5 autres brebis des groupes pour affiner ces résultats. De même quelles que soient les différences individuelles observées en titres SN entre les vaccins, *in fine* aucun des fœtus n'était protégé contre l'infection foetale.

Si l'on compare les essais réalisés pour valider la protection foetale chez les bovins avec les trois vaccins et l'étude réalisée à l'ENVT, les différences portent sur les voies et doses d'inoculation et la dose de vaccin inoculé. Les charges virales utilisées à l'ENVT sont similaires à celles utilisées dans le modèle vache, pour des animaux qui ont 5 à 10 fois moins de poids. A l'inverse, les brebis n'ont reçu qu'une demi-dose de vaccin, ce qui pourrait être limitant au moins pour le vaccin inactivé. La voie d'inoculation utilisée en bovin-BVDV est le plus souvent la voie intranasale qui mime la voie d'infection naturelle alors qu'en modèle ovin-BDV, la grande majorité des études utilisent la voie intramusculaire, sans qu'il n'y ait de justification scientifique. On pourrait imaginer que le challenge chez les ovins est plus « puissant » que chez les bovins, libérant un grand nombre de virus infectieux en un temps court, qui pourrait déborder la capacité des anticorps neutralisants (à des titres déjà inférieurs) et permettre le passage de la barrière placentaire par le virus. Sur le terrain, une protection partielle pourrait exister si les charges infectieuses sont moins importantes que celles utilisées lors d'inoculation d'épreuve (par exemple lors de contamination par un infecté transitoire). A l'inverse, lors de fortes infections (contamination par un IPI par exemple), la protection

n'existerait pas. Cela aurait l'avantage d'expliquer les résultats variables et contradictoires que l'on observe dans les élevages ovins, avec la vaccination BVD pour contrôler la BDV. Cela reste toutefois une hypothèse sans preuves scientifiques à l'heure actuelle, notamment les charges virales dans le sang des brebis vaccinées Mucosiffa® puis infectées par le BDV-6 (Combes, 2017) ne semblent pas très différentes de celles observées chez les vaches vaccinées Mucosiffa et infectés par le BVDV-1 (protégées, Meyer et al., 2011).

Pour finir, les points majeurs qu'il faudrait continuer à investir sont de connaître plus précisément les modalités d'infection du fœtus et les différents mécanismes de la réponse immunitaire chez la vache, mais aussi le fœtus. Dans cette étude nous ne nous sommes intéressés qu'à la réponse en anticorps neutralisants mais de nombreux progrès ont été obtenus ces dernières années pour comprendre la réponse immunitaire innée et adaptative cellulaire. Même si la réponse neutralisante est la plus souvent étudiée, la relation entre le taux d'anticorps neutralisants présent chez l'animal et la protection induite demeure controversée. En effet il n'existe pas de données actuelles permettant d'associer clairement un titre en anticorps neutralisants à une protection clinique ou virologique lors d'infection à BDV. Expérimentalement, il a été montré que les anticorps anti BVDV contenus dans le sérum étaient capables de protéger contre une infection expérimentale. (Oirschot et al., 1999) Cependant, ces résultats ne présagent en rien d'une éventuelle protection clinique *in vivo*. Par conséquent, il pourrait être intéressant de réaliser une étude permettant d'évaluer le lien entre la virémie et le taux d'anticorps neutralisants.

Comme déjà précisé, nous nous sommes intéressés ici uniquement à la réponse humorale. La réponse innée et cellulaire adaptative (via notamment la réponse CD8+ en lymphocytes cytotoxiques) sont tout aussi importantes pour limiter la diffusion des pestivirus dans l'organisme et donc le passage de la barrière transplacentaire (Ridpath, 2013). Ainsi la présence en anticorps maternels lors de vaccination avec un vaccin BVDV atténué chez le jeune interfère avec la réponse humorale mais n'empêche pas les veaux de développer une réponse cellulaire lymphocytaire en CD4+, CD8+ et cellules mémoires B (Endsley et al., 2003). Cette réponse serait protectrice lors d'une inoculation d'épreuve, même si les veaux sont séronégatifs (Endsley et al., 2003). Le vaccin Bovela® est un vaccin atténué récemment mis sur le marché pour lequel il existe des données sur sa capacité à induire une réponse immunitaire cellulaire (Platt, 2017). On peut supposer qu'une réaction immunitaire cellulaire apparaît aussi lors de vaccination avec le vaccin atténué Mucosiffa®. Il serait ainsi intéressant d'étudier la réponse immunitaire cellulaire induite par ces deux vaccins dans notre étude pour savoir si elle prend une part importante pour expliquer l'échec de la vaccination.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons pu mettre en place un protocole permettant de déterminer un titre en anticorps séroneutralisants les souches ncp et cp des BVDV et le BDV, induit par trois vaccins (Mucosiffa®, Bovela®, Bovilis-BVD ®) après inoculation d'épreuve à l'aide d'une souche BDV-6 (6390).

Ce travail s'inscrivant dans les travaux réalisés par M. Combes en 2017, il nous a été possible de mettre en évidence la production d'anticorps neutralisants le BVDV-1 (souche NADL) mais aussi le BDV-6 (souche 6390) après vaccination, titres qui augmentent après inoculation d'épreuve chez les brebis vaccinées. Les titres obtenus entre BDV-6 et BVDV-1 étant significativement comparables, l'hypothèse de réaction croisée entre ces deux souches a donc pu être confirmée et ne permet donc pas d'expliquer l'échec vaccinal constaté.

Ces travaux s'inscrivent dans une longue série d'études déjà réalisées sur la lutte contre le BDV. Cependant, plusieurs points restent à approfondir :

En effet, le protocole de séroneutralisation étant maintenant établi, il serait intéressant de pouvoir élargir cette étude à d'autres souches de BDV afin de s'adapter aux souches circulant géographiquement.

De plus, l'étude des anticorps neutralisants telle que représentée dans cette étude ne représente qu'une partie de la réaction immunitaire mise en place par la femelle gravide et le fœtus. En effet, la relation entre anticorps neutralisants et protection reste à l'heure actuelle soumise à controverse. Une autre partie de la réponse immunitaire : la réponse innée et cellulaire adaptative, sont tout aussi importantes pour limiter la diffusion des pestivirus dans l'organisme et par conséquent l'infection fœtale. Il serait intéressant d'étudier la réponse cellulaire mise en place après vaccination avec un vaccin vivant atténué (Mucosiffa®, Bovela®) et de voir si un défaut de réponse immunitaire cellulaire pourrait expliquer l'échec vaccinal observé.

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'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Marie MINDEGUIA intitulée « Protection fœtale croisée entre *Pestivirus* des ruminants : Rôle de la réponse post-vaccinale en anticorps neutralisants » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 02/10/2020
Enseignant-chercheur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Gilles MEYER



Vu :
Le Directeur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS




Vu :
Le Président du jury
Professeur Jacques IZOPET

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO

Professeur Jacques IZOPET
Chef de Service de Virologie
Plateau Technique d'Infectiologie
Institut Fédératif de Biologie
330, avenue de Grande-Bretagne
TSA 40091 - 31069 TOULOUSE Cedex 9
Tél. 05 67 69 04 25 - Fax 05 67 69 04 25



Fabienne ALARY
Déléguée de l'Université Paul Sabatier,
pour la délégation
de l'Université de la CFVU

Mme Marie MINDEGUIA
a été admise(e) sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Université
de Toulouse

Bibliographie :

ANNE, Stéphanie, 2012. Vaccination contre la maladie des frontières (Border disease) chez le mouton : premiers essais d'efficacité du vaccin inactivé Bovilis-BVD. ENVT Ecole nationale vétérinaire de TOULOUSE . p. 96.

ANON., 2017. Flaviviridae. In : *Fenner's Veterinary Virology* [en ligne]. S.l. : Elsevier. p. 525-545. [Consulté le 1 avril 2020]. ISBN 978-0-12-800946-8. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128009468000295>.

ANON., 2020. Access online: OIE - World Organisation for Animal Health. In : [en ligne]. [Consulté le 13 octobre 2020 a]. Disponible à l'adresse : <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.

ANON., 2017 . AVIS et RAPPORT de l'Anses relatif à la pestivirus dans les Pyrénées | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. In : [en ligne]. [Consulté le 15 octobre 2020 b]. Disponible à l'adresse : <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-lanses-relatif-%C3%A0-la-pestivirus-dans-les-pyr%C3%A9n%C3%A9es>.

ANON., 2020. Border Disease - FRGDS Occitanie. In : [en ligne]. [Consulté le 15 août 2020 c]. Disponible à l'adresse : <https://www.frgds-occitanie.fr/Border-Disease>.

ANON., 2020. BVD Observatoire. In : *BVD observatoire* [en ligne]. [Consulté le 13 octobre 2020 d]. Disponible à l'adresse : <https://www.bvdobservatoire.com>.

ANON., 2020. Genus: Pestivirus - Flaviviridae - Positive-sense RNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). In : [en ligne]. [Consulté le 9 juillet 2020 e]. Disponible à l'adresse : https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus.

ANON., 2020 . Immunité innée antivirale et reconnaissance de motifs moléculaires étrangers. In : *Planet-Vie* [en ligne]. [Consulté le 15 octobre 2020 f]. Disponible à l'adresse : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-immunitaire/immunit%C3%A9-inn%C3%A9e-antivirale-et-reconnaissance-de-motifs>.

ASÍN, J., DE MIGUEL, R., RODRÍGUEZ, A., VENTURA, J., HILBE, M., SCHWEIZER, M. et LUJÁN, L., 2020. An Outbreak of Border Disease-Like Syndrome in Sheep Associated With a BVDV-II-Contaminated Orf Vaccine. In : *Journal of Comparative Pathology*. janvier 2020. Vol. 174, p. 148. DOI 10.1016/j.jcpa.2019.10.027.

AUDET, S.A., CRIM, R.L. et BEELER, J., 2000. Evaluation of Vaccines, Interferons and Cell Substrates for Pestivirus Contamination. In : *Biologicals*. mars 2000. Vol. 28, n° 1, p. 41-46. DOI 10.1006/biol.1999.0240.

AVALOS-RAMIREZ, Ramiro, ORLICH, Michaela, THIEL, Heinz-Jürgen et BECHER, Paul, 2001. Evidence for the Presence of Two Novel Pestivirus Species. In : *Virology*. août 2001. Vol. 286, n° 2, p. 456-465. DOI 10.1006/viro.2001.1001.

BECHER, P., FISCHER, N., GRUNDHOFF, A., STALDER, H., SCHWEIZER, M. et POSTEL, A., 2014. Complete Genome Sequence of Bovine Pestivirus Strain PG-2, a Second Member of the Tentative Pestivirus Species Giraffe. In : *Genome Announcements*. 15 mai 2014. Vol. 2, n° 3, p. e00376-14, 2/3/e00376-14. DOI 10.1128/genomeA.00376-14.

BECHER, Paul, AVALOS RAMIREZ, Ramiro, ORLICH, Michaela, CEDILLO ROSALES, Sibilina, KÖNIG, Matthias, SCHWEIZER, Matthias, STALDER, Hanspeter, SCHIRRMEIER, Horst et THIEL, Heinz-Jürgen, 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. In : *Virology*. juin 2003. Vol. 311, n° 1, p. 96-104. DOI 10.1016/S0042-6822(03)00192-2.

BECHER, Paul, MEYERS, Gregor, SHANNON, Anthony D et THIEL, Heinz-Jürgen, 1996. Cytopathogenicity of Border Disease Virus Is Correlated with Integration of Cellular Sequences into the Viral Genome. In : *J. VIROL.* 1996. Vol. 70, p. 7.

BECHER, Paul, ORLICH, Michaela, KOSMIDOU, Alexandra, KONIG, Matthias, BAROTH, Martina et THIEL, Heinz-Jürgen, 1999. Genetic Diversity of Pestiviruses: Identification of Novel Groups and Implications for Classification. In : *Virology*. 1999. n° 262, p. 64-71.

BEKAL, Sadia, DOMIER, Leslie L., GONFA, Biruk, MCCOPPIN, Nancy K., LAMBERT, Kris N. et BHALERAO, Kaustubh, 2014. A novel flavivirus in the soybean cyst nematode. In : *Journal of General Virology*. 1 juin 2014. Vol. 95, n° 6, p. 1272-1280. DOI 10.1099/vir.0.060889-0.

BERRIATUA, E., BARANDIKA, J., ADURIZ, G., ATXAERANDIO, R., GARRIDO, J. et GARCÍA-PÉREZ, A.L., 2004. Age-specific seroprevalence of Border disease virus and presence of persistently infected sheep in Basque dairy-sheep flocks. In : *The Veterinary Journal*. novembre 2004. Vol. 168, n° 3, p. 336-342. DOI 10.1016/j.tvjl.2003.11.005.

BERRIATUA, E., BARANDIKA, J.F., ADURIZ, G., HURTADO, A., ESTÉVEZ, L., ATXAERANDIO, R. et GARCÍA-PÉREZ, A.L., 2006. Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. In : *Veterinary Microbiology*. novembre 2006. Vol. 118, n° 1-2, p. 37-46. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.06.013.

BETHUME, Marie-Anne, 2015. *Influence du génotype viral sur l'infection fœtale par le virus de la maladie de la frontière (border disease)*. ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

BRAUN, Ueli, HILBE, Monika, PETERHANS, Ernst et SCHWEIZER, Matthias, 2019. Border disease in cattle. In : *The Veterinary Journal*. avril 2019. Vol. 246, p. 12-20. DOI 10.1016/j.tvjl.2019.01.006.

CAFFREY, J.F., DUDGEON, A.M., DONNELLY, W.J.C., SHEAHAN, B.J et ATKINS, G.J, 1997. Morphometric analysis of growth retardation in fetal lambs following experimental infection of pregnant ewes with Border Disease virus. In : *Research in Veterinary Science*. mai 1997. Vol. 62, n° 3, p. 245-248. DOI 10.1016/S0034-5288(97)90198-3.

CARUSO, Claudio, PELETTI, Simone, CERUTTI, Francesco, MODESTO, Paola, ROBERTO, Serena, DOMENIS, Lorenzo, MASOERO, Loretta et ACUTIS, Pier Luigi, 2017. Evidence of circulation of the novel border disease virus genotype 8 in chamois. In : *Archives of Virology*. février 2017. Vol. 162, n° 2, p. 511-515. DOI 10.1007/s00705-016-3112-4.

CHASE, Christopher C.L., 2013. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. In : *Biologicals*. janvier 2013. Vol. 41, n° 1, p. 52-60. DOI 10.1016/j.biologicals.2012.09.009.

COMBES, Mickaël, 2017. 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. ENVT : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse. p. 125.

CORBIÈRE, F., POUGET, C., BERNARDIN, E., BRUGIDOU, R. et SCHELCHER, F., 2012. Short communication: Performance of a blocking antibody ELISA bulk-tank milk test for detection of dairy sheep flocks exposed to border disease virus. In : *Journal of Dairy Science*. novembre 2012. Vol. 95, n° 11, p. 6542-6545. DOI 10.3168/jds.2012-5589.

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.

ELISE, Bernardin, 2012. 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. ENVT : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse p. 94.

ENDSLEY, Janice J., ROTH, James A., RIDPATH, Julia et NEILL, John, 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. In : *Biologicals*. juin 2003. Vol. 31, n° 2, p. 123-125. DOI 10.1016/S1045-1056(03)00027-7.

FACTOR, C., YUS, E., EIRAS, C., SANJUAN, M. L., CERVIÑO, M., ARNAIZ, I. et DIÉGUEZ, F. J., 2016. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses from the Galicia region of Spain. In : *Veterinary Record Open*. octobre 2016. Vol. 3, n° 1, p. e000196. DOI 10.1136/vetreco-2016-000196.

FIRTH, C., BHAT, M., FIRTH, M. A., WILLIAMS, S. H., FRYE, M. J., SIMMONDS, P., CONTE, J. M., NG, J., GARCIA, J., BHUVA, N. P., LEE, B., CHE, X., QUAN, P.-L. et LIPKIN, W. I., 2014. Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal *Rattus norvegicus* in New York City. In : *mBio*. 14 octobre 2014. Vol. 5, n° 5, p. e01933-14, mBio.01933-14. DOI 10.1128/mBio.01933-14.

FULTON, Robert W., 2015. Impact of species and subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus on control by vaccination. In : *Animal Health Research Reviews*. juin 2015. Vol. 16, n° 1, p. 40-54. DOI 10.1017/S1466252315000079.

GARCÍA-PÉREZ, A.L., RUIZ-FONS, F., BARANDIKA, J.F., ADURIZ, G., JUSTE, R.A. et HURTADO, A., 2010. Border disease virus seroprevalence correlates to antibodies in bulk-tank milk and reproductive performance of dairy sheep flocks. In : *Journal of Dairy Science*. juin 2010. Vol. 93, n° 6, p. 2444-2449. DOI 10.3168/jds.2009-2774.

GARCÍA-PÉREZ, Ana L., MINGUIJÓN, Esmeralda, BARANDIKA, Jesús F., ADURIZ, Gorka, POVEDANO, Inés, JUSTE, Ramón A. et HURTADO, Ana, 2009. Detection of *Border Disease Virus* in Fetuses, Stillbirths, and Newborn Lambs from Natural and Experimental Infections. In : *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. mai 2009. Vol. 21, n° 3, p. 331-337. DOI 10.1177/104063870902100304.

GIAMMARIOLI, Monica, LA ROCCA, Severina Anna, STEINBACH, Falko, CASCIARI, Cristina et DE MIA, Gian Mario, 2011. Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group. In : *Veterinary Microbiology*. janvier 2011. Vol. 147, n° 3-4, p. 231-236. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.06.027.

GIAMMARIOLI, Monica, ROSSI, Elisabetta, CASCIARI, Cristina, BAZZUCCHI, Moira, CLAUDIA, Torresi et DE MIA, Gian Mario, 2015. Genetic characterization of border disease virus (BDV) isolates from small ruminants in Italy. In : *Virus Genes*. avril 2015. Vol. 50, n° 2, p. 321-324. DOI 10.1007/s11262-014-1165-6.

HAMERS, C., DI VALENTIN, E., LECOMTE, C., LAMBOT, M., JORIS, E., GENICOT, B. et PASTORET, P., 2002. Virus Neutralising Antibodies Against 22 Bovine Viral Diarrhoea Virus Isolates in Vaccinated Calves. In : *The Veterinary Journal*. janvier 2002. Vol. 163, n° 1, p. 61-67. DOI 10.1053/tvjl.2001.0638.

HANSEN, Thomas R., SMIRNOVA, Natalia P., VAN CAMPEN, Hana, SHOEMAKER, Megan L., PTITSYN, Andrey A. et BIELEFELDT-OHMANN, Helle, 2010. Maternal and Fetal Response to Fetal Persistent Infection with Bovine Viral Diarrhea Virus*: FETAL PERSISTENT INFECTION WITH BVDV. In : *American Journal of Reproductive Immunology*. octobre 2010. Vol. 64, n° 4, p. 295-306. DOI 10.1111/j.1600-0897.2010.00904.x.

INTERNATIONAL OFFICE OF EPIZOOTICS et BIOLOGICAL STANDARDS COMMISSION, 2018. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: (mammals, birds and bees)*. S.l. : s.n. ISBN 978-92-95108-18-9.

INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE WORLD ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS AND OIE SEMINAR ON BIOTECHNOLOGY, ROONGROJE THANAWONGNUWECH, PRINGSRI INGGANINUN, THAI ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS, THAI VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION UNDER THE ROYAL PATRONAGE et INTERNATIONAL OFFICE OF EPIZOOTICS (éd.), 2003. *The 11th international symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE seminar on biotechnology Bangkok, Thailand, November 9-13, 2003: proceedings*. Bangkok : The Thai Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. ISBN 978-974-13-2589-4.

KAISER, V., NEBEL, L., SCHÜPBACH-REGULA, G., ZANONI, R. G. et SCHWEIZER, M., 2016. Influence of border disease virus (BDV) on serological surveillance within the bovine virus diarrhoea (BVD) eradication program in Switzerland. In : *BMC Veterinary Research*. décembre 2016. Vol. 13, n° 1, p. 21. DOI 10.1186/s12917-016-0932-0.

KELLING, Clayton L. et TOPLIFF, Christina L., 2013. Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhoea virus infections. In : *Biologicals*. janvier 2013. Vol. 41, n° 1, p. 20-25. DOI 10.1016/j.biologicals.2012.09.006.

KLEMENS, O., DUBRAU, D. et TAUTZ, N., 2015. Characterization of the Determinants of NS2-3-Independent Virion Morphogenesis of Pestiviruses. In : SANDRI-GOLDIN, R. M. (éd.), *Journal of Virology*. 15 novembre 2015. Vol. 89, n° 22, p. 11668-11680. DOI 10.1128/JVI.01646-15.

KREY, Thomas, BONTEMS, Francois, VONRHEIN, Clemens, VANEY, Marie-Christine, BRICOGNE, Gerard, RÜMENAPF, Till et REY, Félix A., 2012. Crystal Structure of the Pestivirus Envelope Glycoprotein Erns and Mechanistic Analysis of Its Ribonuclease Activity. In : *Structure*. mai 2012. Vol. 20, n° 5, p. 862-873. DOI 10.1016/j.str.2012.03.018.

LIU, Yong-Hong, HE, Bo, LI, Kai-Rui, LI, Fei, ZHANG, Lu-Yao, LI, Xian-Qiang et ZHAO, Li, 2019. First report of border disease virus in *Melophagus ovinus* (sheep ked) collected in Xinjiang, China. In : QIU, Jianming (éd.), *PLOS ONE*. 20 août 2019. Vol. 14, n° 8, p. e0221435. DOI 10.1371/journal.pone.0221435.

LØKEN, T., KROGSRUD, J. et BJERKÅS, I., 1991. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated orf vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. In : *Journal of Comparative Pathology*. février 1991. Vol. 104, n° 2, p. 195-209. DOI 10.1016/S0021-9975(08)80103-X.

LØKEN, Torleiv, 1995. Border Disease in Sheep. In : *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. novembre 1995. Vol. 11, n° 3, p. 579-595. DOI 10.1016/S0749-0720(15)30468-0.

LOUBIÈRE, Angélique, 2012 . La border disease en Aveyron : analyse de la situation épidémiologique entre 2006 et 2010. ENVT : Ecole nationale vétérinaire de Toulouse p. 177.

MARCO, Ignasi, LOPEZ-OLVERA, Jorge Ramon, ROSELL, Rosa, VIDAL, Enric, HURTADO, Ana, JUSTE, Ramon, PUMAROLA, Marti et LAVIN, Santiago, 2007. Severe outbreak of disease in the southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) associated with border disease virus infection. In : *Veterinary Microbiology*. février 2007. Vol. 120, n° 1-2, p. 33-41. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.10.007.

MEYER, Gilles, DEPLANCHE, Martine, ROUX, Dominique, MOULIGNIE, Martine, PICARD-HAGEN, Nicole, LYAZRHI, Faouzi, RABOISSON, Didier, MATHEVET, Pierre et SCHELCHER, François, 2012. Fetal protection against bovine viral diarrhoea type 1 virus infection after one administration of a live-attenuated vaccine. In : *The Veterinary Journal*. mai 2012. Vol. 192, n° 2, p. 242-245. DOI 10.1016/j.tvjl.2011.05.011.

MEYERS, Gregor, EGE, Andreas, FETZER, Christiane, VON FREYBURG, Martina, ELBERS, Knut, CARR, Veronica, PRENTICE, Helen, CHARLESTON, Bryan et SCHÜRMAN, Eva-Maria, 2007. Bovine Viral Diarrhea Virus: Prevention of Persistent Fetal Infection by a Combination of Two Mutations Affecting Erns RNase and Npro Protease. In : *Journal of Virology*. 1 avril 2007. Vol. 81, n° 7, p. 3327-3338. DOI 10.1128/JVI.02372-06.

MIROSŁAW, Paweł et POLAK, Mirosław, 2019. Increased genetic variation of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle in Poland. In : *BMC Veterinary Research*. décembre 2019. Vol. 15, n° 1, p. 278. DOI 10.1186/s12917-019-2029-z.

MISHRA, Niranjana, 2012. Genetic and Antigenic Diversity of Ruminant Pestiviruses: Implications for Diagnosis and Control. In : ANIL PRAKASH, SATYANARAYANA, T. et JOHRI, Bhavdish Narain (éd.), *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. p. 153-172. [Consulté le 3 avril 2020]. ISBN 978-94-007-2213-2. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-2214-9_9.

MONDOLY, Paul et POUGET, Céline, 1998. La border disease. In : *Société Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires*. novembre 1998. n° Fiche n°18.

NETTLETON, Peter F, GILRAY, Janine A, RUSSO, Pierre et DLISSI, Elyess, 1998. Border disease of sheep and goats p. 15.

NEWCOMER, Benjamin W., WALZ, Paul H., GIVENS, M. Daniel et WILSON, Alan E., 2015. Efficacy of bovine viral diarrhoea virus vaccination to prevent reproductive disease: A meta-analysis. In : *Theriogenology*. février 2015. Vol. 83, n° 3, p. 360- 365.e1. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.09.028.

OĞUZOĞLU, Tuba Çiğdem, 2017. A Review of Border Disease Virus Infection in Ruminants: Molecular Characterization, Pathogenesis, Diagnosis and Control. In : . p. 10.

OIRSCHOT, J.T.van, BRUSCHKE, C.J.M et RIJN, P.A.van, 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. In : *Veterinary Microbiology*. janvier 1999. Vol. 64, n° 2-3, p. 169-183. DOI 10.1016/S0378-1135(98)00268-5.

PATON, D.J., 1995. Pestivirus diversity. In : *Journal of Comparative Pathology*. avril 1995. Vol. 112, n° 3, p. 215-236. DOI 10.1016/S0021-9975(05)80076-3.

- PETERHANS, Ernst et SCHWEIZER, Matthias, 2013. BVDV: A pestivirus inducing tolerance of the innate immune response. In : *Biologicals*. janvier 2013. Vol. 41, n° 1, p. 39-51. DOI 10.1016/j.biologicals.2012.07.006.
- PLATT, Ratee, 2017. Comparison of humoral and T-cell-mediated immune responses to a single dose of Bovela® live double deleted BVDV vaccine or to a field BVDV strain. In : *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2017. p. 8.
- POTTS, Barbara J., SAWYER, Mary, SHEKARCHI, Isabel C., WISMER, Trish et HUDDLESTON, David, 1989. Peroxidase-labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cell cultures. In : *Journal of Virological Methods*. octobre 1989. Vol. 26, n° 1, p. 119-124. DOI 10.1016/0166-0934(89)90080-3.
- RIDPATH, Julia F., 2013. Immunology of BVDV vaccines. In : *Biologicals*. janvier 2013. Vol. 41, n° 1, p. 14-19. DOI 10.1016/j.biologicals.2012.07.003.
- RIEDEL, C., LAMP, B., HEIMANN, M. et RUMENAPF, T., 2010. Characterization of Essential Domains and Plasticity of the Classical Swine Fever Virus Core Protein. In : *Journal of Virology*. 1 novembre 2010. Vol. 84, n° 21, p. 11523-11531. DOI 10.1128/JVI.00699-10.
- ROEHE, Paulo M., WOODWARD, Martin J. et EDWARDS, Steven, 1992. Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. In : *Veterinary Microbiology*. novembre 1992. Vol. 33, n° 1-4, p. 231-238. DOI 10.1016/0378-1135(92)90051-T.
- SCHWEIZER, Matthias et PETERHANS, Ernst, 2014. Pestiviruses. In : *Annual Review of Animal Biosciences*. février 2014. Vol. 2, n° 1, p. 141-163. DOI 10.1146/annurev-animal-022513-114209.
- SIMMONDS, Peter, BECHER, Paul, BUKH, Jens, GOULD, Ernest A., MEYERS, Gregor, MONATH, Tom, MUERHOFF, Scott, PLETNEV, Alexander, RICO-HESE, Rebecca, SMITH, Donald B., STAPLETON, Jack T. et ICTV REPORT CONSORTIUM, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. In : *Journal of General Virology*. 1 janvier 2017. Vol. 98, n° 1, p. 2-3. DOI 10.1099/jgv.0.000672.
- SMITH, Donald B., MEYERS, Gregor, BUKH, Jens, GOULD, Ernest A., MONATH, Thomas, SCOTT MUERHOFF, A., PLETNEV, Alexander, RICO-HESE, Rebecca, STAPLETON, Jack T., SIMMONDS, Peter et BECHER, Paul, 2017. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. In : *Journal of General Virology*. 1 août 2017. Vol. 98, n° 8, p. 2106-2112. DOI 10.1099/jgv.0.000873.
- TAUTZ, Norbert, TEWS, Birke Andrea et MEYERS, Gregor, 2015. The Molecular Biology of Pestiviruses. In : *Advances in Virus Research* [en ligne]. S.l. : Elsevier. p. 47-160. [Consulté le 26 septembre 2019]. ISBN 978-0-12-802179-8. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352715000755>.
- TERPSTRA, C., 1978. Detection of Border disease antigen in tissues of affected sheep and in cell cultures by immunofluorescence. In : *Research in Veterinary Science*. novembre 1978. Vol. 25, n° 3, p. 350-355. DOI 10.1016/S0034-5288(18)32952-7.
- TERPSTRA, C., 1981. Border disease: virus persistence, antibody response and transmission studies. In : *Research in Veterinary Science*. mars 1981. Vol. 30, n° 2, p. 185-191. DOI 10.1016/S0034-5288(18)32579-7.
- TORTORICI, M. Alejandra, DUQUERROY, Stéphane, KWOK, Jane, VONRHEIN, Clemens, PEREZ, Javier, LAMP, Benjamin, BRICOGNE, Gerard, RÜMENAPF, Till, VACHETTE, Patrice et REY, Félix A., 2015. X-Ray

Structure of the Pestivirus NS3 Helicase and Its Conformation in Solution. In : DIAMOND, M. S. (éd.), *Journal of Virology*. 15 avril 2015. Vol. 89, n° 8, p. 4356-4371. DOI 10.1128/JVI.03165-14.

VÉLY, Frédéric et VIVIER, Éric, 1996. Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK. In : *méddecine/science* . Vol. 12, p. 7.

VILCEK, S, NETTLETON, P F, PATON, D J et BELV°K, S, 1997. Molecular characterization of ovine pestiviruses. In : *Journal of General Virology*. 1 avril 1997. Vol. 78, n° 4, p. 725-735. DOI 10.1099/0022-1317-78-4-725.

VILČEK, Štefan et PATON, David J., 2000. A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. In : *Veterinary Research*. juillet 2000. Vol. 31, n° 4, p. 437-445. DOI 10.1051/vetres:2000130.

WU, Z., REN, X., YANG, L., HU, Y., YANG, J., HE, G., ZHANG, J., DONG, J., SUN, L., DU, J., LIU, L., XUE, Y., WANG, J., YANG, F., ZHANG, S. et JIN, Q., 2012. Virome Analysis for Identification of Novel Mammalian Viruses in Bat Species from Chinese Provinces. In : *Journal of Virology*. 15 octobre 2012. Vol. 86, n° 20, p. 10999-11012. DOI 10.1128/JVI.01394-12.

NOM : MINDEGUIA PRENOM : MARIE

TITRE : Protections croisées entre Pestivirus : Réponse post-vaccinale en anticorps neutralisants

RESUME :

La maladie de la frontière est due à un pestivirus, le Border Disease Virus (BDV), majoritairement présent chez les ovins. Cette maladie entraîne des troubles de la reproduction chez les brebis et de la mortalité chez les agneaux, avec des répercussions économiques importantes pour certaines filières. La gestion de cette maladie passe par l'élimination des agneaux infectés permanents immunotolérants, la mise en place de mesures de biosécurité et la vaccination pour une protection des fœtus lors d'infection des brebis gestantes. En l'absence de vaccins commercialisés contre le BDV, la vaccination repose sur l'utilisation de vaccins dirigés contre un pestivirus apparenté, le virus de la diarrhée virale bovine ou BVDV. Toutefois une étude expérimentale menée en 2016 a montré l'absence de protection fœtale post immunisation avec trois vaccins commerciaux BVDV lors d'une inoculation d'épreuve avec une souche de BDV de genotype 6. Ce travail a pour objectifs d'évaluer le niveau des anticorps séroneutralisants le BVDV et le BDV, induit par les trois vaccins et de déterminer si l'absence d'efficacité des vaccins BVDV est due à un défaut de réponse immunitaire humorale croisée entre les deux pestivirus. Les résultats obtenus sont discutés par rapport aux données scientifiques existantes et par rapport à la méthodologie utilisée.

MOTS CLEFS : MOUTONS, VIRUS DE LA BORDER DISEASE, PESTIVIRUS INFECTES PERMANENTS IMMUNOTOLERANTS, VACCINATION, FŒTUS, ANTICORPS NEUTRALISANTS

TITLE : Cross-protections between Pestivirus : Vaccination response in neutralizing antibodies

SUMMARY :

The border disease (BD) is caused by a pestivirus mainly present in sheep, the Border Disease Virus (BDV). This disease causes reproductive disorders in ewes and mortality in lambs, with significant economic repercussions. The control of BD involves the elimination of permanently infected lambs, the implementation of biosecurity measures and finally vaccination to protect the foetus when pregnant ewes are infected. In the absence of commercially available BDV vaccines, vaccination is based on the use of vaccines against a related pestivirus, bovine viral diarrhoea virus (BVDV). An experimental study conducted in 2016 showed the absence of fetal protection when a challenge with a BDV strain was carried out in pregnant ewes previously vaccinated with three commercial BVDV vaccines. The objectives of this thesis are to evaluate the level of serum-neutralizing antibodies to BVDV and BDV induced by the three vaccines in ewes and to determine whether the lack of efficacy of the BVDV vaccines is due to a lack of cross-humoral immune response between the two pestiviruses. The results obtained are discussed in relation to the existing scientific data and the methodology used.

KEYWORDS: SHEEPS, BORDER DISEASE VIRUS, PESTIVIRUS, PERSISTENTLY INFECTED, VACCINATION, FETUS, NEUTRALIZING ANTIBODIES