
INFECTION EXPERIMENTALE PAR LE VIRUS DE LA DIARRHEE VIRALE BOVINE (BVDV) : EVALUATION DE LA PROTECTION FŒTALE INDUITE PAR UN VACCIN VIVANT ATTENUÉ

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Dominique ROUX

Né le 3 janvier 1981 à SAINT-FOY LA GRANDE (Gironde)

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Gilles MEYER

JURY

PRESIDENT :

M. Jacques IZOPET

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Gilles MEYER

M. François SCHELCHER

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

| | | |
|---------------|---------------|---------------------------------|
| M. L. FALIU | M. J. CHANTAL | M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE |
| M. C. LABIE | M. JF. GUELFY | |
| M. C. PAVAU | M. EECKHOUTTE | |
| M. F. LESCURE | M. D.GRIESS | |
| M. A. RICO | M. CABANIE | |
| M. A. CAZIEUX | M. DARRE | |
| Mme V. BURGAT | M. HENROTEAUX | |

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

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

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie et Thérapeutique*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine, Ophtalmologie*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle **BUCK-ROUCH**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
M. **SEGUELA Jérôme**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **GIN Thomas**, *Production et pathologie porcine*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

A notre président de thèse,

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 notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur Gilles MEYER

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des Ruminants

Qui nous a confié ce travail et nous a guidé dans son élaboration.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur François SCHELCHER

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse cour

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

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

Aux « Martines » du laboratoire de virologie

Pour leur gentillesse, leur disponibilité et le travail de fourmi qu'elles ont effectué tout au long de l'étude.

A Marion S, Cédric, Jean-Yves, Matthieu et tous ceux que j'oublie

Pour avoir eu la gentillesse de se lever à 6h du matin pour venir m'aider à chatouiller les narines d'une trentaine de génisses charolaises dociles...

A mes parents

A Manu, Mireille, Elie et Laura

A JB et Alex

A mes grands parents

Pour votre soutien de tous les instants

Pour les provisions et autres breuvages bergeracois qui ont fait mon bonheur et celui de mes amis pendant plus de 7 ans !

Pour votre patience...

A Jean-Yves, mon alcoyte de tous les instants

Aux apéros de trois heures de l'après midi, aux soirées guitare, aux virées montoises, aux tribunes de l'ASSigoulès, au bout du bar, au trou du bar...

A mes amis du premier jour : Cédric, Matthieu, Yannick, Davy

Aux repas, soirées et autres apéros...

A mes amis d'école : Flunchy (et sa fââme), Marie-Phillippe (et Julien), Charline, Fifi, Bid, Myriam, Alex, Simon, Flo, Noémie, Juliette, Aurélie et les autres

Aux soirées ré(télé)vision de veille d'examen avec Flunch

Au sourire « Nutella » de Marie

Aux deux compères de la Paillotte : Julien et Mathieu

Pour leurs petits plats light...

A mes poulots

Ceux de l'équipe de bovine

Pour les après-midi défumage des vacances de Noël, pour la bonne humeur et l'écoute de Julie, pour les talents d'anesthésiste de Rhymbow et Marcho (ouh là là !), pour la dépendance au travail de Paulineu-là, pour les talents de poète de Jean-Seb, pour le rire communicatif de la Muss, et yé bonnes biagues de Beubeuille.

Pour votre efficacité, à toute l'équipe en général.

Celles de la Pinède : Claire, Miloute, Sophie et Chloé

Pour les nombreux repas où j'ai mis les pieds sous la table, pour les « café-Malcolm » et autres barbecues improvisés.

A Claire, pour son sens aigu de l'hospitalité...

A « La Bovine »

A Françoise

Pour ta gentillesse et ton dynamisme. Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés.

A Pascal

Pour ta disponibilité, ton humour et ta blattitude, sans lesquels mon année d'assistant aurait été bien longue...

A Seb

Pour t'être accaparé toutes les colères de Schelch'...

A Doogy

Pour ta disponibilité et ton aide. N'oublie pas de fermer la porte du service en rentrant des souris...

A Fabien

Pour tes conseils éclairés, tes rondes sans voyelle et tes cascades boomesques...

A Caro

Pour avoir souvent été la seule à donner un sens aux corrections de Schelch', quand personne n'arrivait à déchiffrer son écriture...

A Olivier

A tes fausses excuses pour offrir des fûts à la communauté, à la glace pilée du labo et aux côtes de bœuf des Marronniers.

A Didier

Plus !

**A tous les autres membres du service, sans qui l'ambiance ne serait pas la même :
Laurent, Lucien, Patrick, Jean-Marc, Richard, Emeline et Jean-Jacques**

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 12 |
| LISTE DES FIGURES | 13 |
| LISTE DES TABLEAUX | 13 |
| LISTE DES PHOTOGRAPHIES | 13 |
| INTRODUCTION..... | 15 |
| PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 17 |
| I) Le virus de la Diarrhée Virale Bovine : présentation | 19 |
| A) Historique et importance | 19 |
| B) Taxonomie..... | 19 |
| C) Propriétés structurales et organisation génomique..... | 20 |
| D) Propriétés biologiques | 20 |
| 1) Sensibilité du virus | 20 |
| 2) Variabilité génétique..... | 21 |
| 3) Notion de biotype | 21 |
| II) Pathogenèse, expression clinique et conséquences épidémiologiques..... | 23 |
| A) Infection hors gestation | 23 |
| 1) Pathogenèse | 23 |
| 2) Expression clinique..... | 24 |
| a) Forme subclinique | 24 |
| b) Troubles digestifs | 24 |
| (i) Diarrhée virale bovine aiguë bénigne | 24 |
| (ii) Entérite diarrhéique néonatale | 24 |
| c) Troubles de la reproduction..... | 25 |
| d) Autres troubles | 25 |
| (i) Syndrome hémorragique..... | 25 |
| (ii) Troubles respiratoires | 26 |
| B) Infection d'une femelle gravide | 26 |
| 1) Pathogenèse et signes cliniques associés | 26 |
| a) Conséquences en fonction du stade de gestation..... | 26 |
| (i) Infection pendant le premier mois | 26 |
| (ii) Infection entre 1 et 5 mois | 27 |
| (iii) Infection entre 3 et 5 mois | 27 |
| (iv) Infection entre 5 et 9 mois | 27 |
| (v) Infection quelques jours avant la mise bas | 27 |
| (vi) Cas particulier de l'infection entre 1 et 4 mois de gestation (40-120 jours) .. | 28 |
| b) Bilan des troubles observés | 29 |
| 2) Cas de la maladie des muqueuses au sens strict | 29 |
| a) Pathogenèse | 29 |
| b) Expression clinique | 30 |
| (i) Forme aiguë de la maladie des muqueuses..... | 30 |
| (ii) Forme chronique de la maladie des muqueuses | 31 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| C) | Conséquences épidémiologiques de l'immunotolérance | 32 |
| 1) | Les bovins IPI : principale source de virus à l'échelle individuelle | 32 |
| 2) | Les bovins IPI : origine de la contamination à l'échelle du troupeau..... | 33 |
| 3) | Les bovins IPI : maintien de la circulation virale au sein du troupeau..... | 33 |
| III) | Les moyens de lutte contre la Diarrhée Virale Bovine..... | 34 |
| A) | Mesures sanitaires | 34 |
| 1) | Elimination des IPI | 34 |
| 2) | Stratégies collectives | 35 |
| a) | Contrôles à l'introduction..... | 35 |
| b) | Certification des cheptels | 35 |
| c) | Garantie d'animaux non IPI | 36 |
| B) | Mesures médicales : la vaccination..... | 36 |
| 1) | Objectifs de la vaccination contre le BVDV | 36 |
| a) | Protection clinique..... | 36 |
| b) | Protection fœtale..... | 36 |
| 2) | Les vaccins..... | 37 |
| a) | Vaccins vivants..... | 37 |
| b) | Vaccins inactivés | 37 |
| c) | Caractéristiques des vaccins commercialisés en France | 38 |
| 3) | Performances des vaccins | 38 |
| a) | Innocuité..... | 38 |
| b) | Efficacité vaccinale | 40 |
| (i) | Protection clinique post-natale | 40 |
| (ii) | Protection fœtale..... | 41 |
| (iii) | Protection hétérologue | 42 |
| (iv) | Durée d'immunité..... | 43 |
| c) | Performances des vaccins utilisés en France..... | 43 |
| C) | Les différentes stratégies de lutte contre le virus BVD..... | 44 |
| 1) | Echelle individuelle | 44 |
| a) | Cas des élevages à circulation virale démontrée | 44 |
| b) | Cas des élevages sains à risque | 45 |
| 2) | Echelle collective..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE | 47 |
| I) Objectifs de l'étude..... | 49 |
| II) Matériel et méthodes | 50 |
| A) Animaux..... | 50 |
| B) Vaccination | 50 |
| C) Reproduction et sélection des vaches gravides | 51 |
| D) Inoculation..... | 53 |
| E) Abattage des génisses..... | 55 |
| F) Paramètres étudiés..... | 55 |
| 1) Suivi sérologique | 55 |
| a) Utilisation de kits ELISA | 55 |
| b) Séroneutralisation | 56 |
| 2) Suivi clinique et hématologique | 56 |
| a) Suivi clinique, pendant les 20 jours post-inoculation..... | 56 |
| b) Suivi des avortements, de l'inoculation jusqu'à l'abattage | 56 |
| c) Suivi hématologique, pendant les 20 jours post-inoculation..... | 57 |
| 3) Suivi virologique | 57 |
| a) Dans le sang des génisses, pendant les 20 jours post-inoculation..... | 57 |
| L'amplification a été répétée quarante fois. | 58 |
| L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel LightCycler 480. | 58 |
| b) Dans les tissus fœtaux, après abattage des génisses | 58 |
| III) Résultats | 59 |
| A) Résultats de reproduction..... | 59 |
| B) Résultats sérologiques..... | 59 |
| 1) Kits ELISA | 59 |
| 2) Détection des anticorps neutralisants..... | 60 |
| C) Suivi des avortements | 61 |
| D) Etude de la réponse clinique | 62 |
| E) Résultats hématologiques..... | 62 |
| F) Suivi virologique..... | 64 |
| 1) Dans le sang des génisses | 64 |
| 2) Dans les tissus fœtaux..... | 65 |
| IV) Discussion | 67 |
| CONCLUSION..... | 73 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 75 |

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
BDV : Border Disease Virus
BVD : Bovine Viral Diarrhea
BVDV : Bovine Viral Diarrhea Virus
CP : CytoPathogène
CSFV : Classical Swine Fever Virus
Ct : threshold Cycle (=cycle seuil)
DICC : Dose Infectieuse Concentration Cellulaire
ED : Effective Dose
EDTA : Ethylène Diamine Tetra-Acétate
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
IA : Insémination Artificielle
IPI : Infecté Permanent Immunotolérant
kb : kilobase
kDa : kilodalton
MD : Mucosal Disease
MDBK : Madin-Darby Bovine Kidney
MEM : Minimum Essential Medium
MM : Maladie des Muqueuses
nCP : non CytoPathogène
nm : nanomètre
NS : Non Structurales
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGF2 α : Prostaglandine F2 α
PMSG : ancien nom de l'eCG (equine Chorionic Gonadotrophin)
PSPB : Pregnant Specific Protein B
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
TCID : Toxic Cell Infectious Dose

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Organisation génomique du virus BVD | 20 |
| Figure 2 : Superposition partielle des trois conséquences d'une infection par le BVDV pendant les deux premiers trimestres de la gestation..... | 29 |
| Figure 3 : Conséquences de l'infection par le BVDV en fonction du stade de gestation | 31 |
| Figure 4 : Diagramme du protocole expérimental de l'étude | 52 |
| Figure 5 : Evolution de la moyenne des titres en anticorps neutralisants | 60 |
| Figure 6 : Evolution du nombre de leucocytes après infection | 62 |
| Figure 7 : Evolution du nombre de lymphocytes après infection | 63 |
| Figure 8 : Evolution de la virémie après infection | 64 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Caractéristiques des biotypes CP et nCP | 22 |
| Tableau 2 : Caractéristiques des souches vaccinales utilisées en France | 38 |
| Tableau 3 : Efficacité de protection fœtale des vaccins commercialisés en France | 44 |
| Tableau 4 : Bilan des résultats de reproduction | 59 |
| Tableau 5 : Charges virales sur tissus fœtaux le jour de l'abattage | 66 |

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

| | |
|---|----|
| Photo 1 : Inoculum conservé dans la glace | 54 |
| Photo 2 : Contention et inoculation intranasale..... | 54 |

INTRODUCTION

Le virus BVD est un agent pathogène d'actualité, à l'origine de troubles divers regroupés sous le nom de syndrome BVD / MD, ou syndrome Diarrhée Virale Bovine / Maladie des Muqueuses. La pathogénie de l'infection est caractérisée par la possibilité d'une transmission verticale in utero, pouvant donner naissance à des individus jouant un rôle clé dans la propagation de la maladie, non seulement au sein du troupeau mais aussi entre élevages.

Principal moyen de lutte utilisé, la vaccination doit aujourd'hui non seulement protéger les individus contre une transmission horizontale classique, mais aussi et surtout contre une transmission foetale aux conséquences épidémiologiques beaucoup plus graves.

Le travail présenté a pour objectif d'étudier l'efficacité de la protection foetale d'un vaccin vivant atténué (Mucosiffa[®], Merial) contre une inoculation d'épreuve à virus BVD. En effet à l'heure actuelle, l'AMM de ce vaccin ne contient que l'indication « protection clinique » contre les transmissions horizontales.

La première partie synthétisera les données bibliographiques actuellement disponibles concernant le virus BVD, l'épidémiologie de la maladie, et surtout les moyens de lutte disponibles. Puis nous présenterons en seconde partie le protocole expérimental mis en place afin d'atteindre nos objectifs, les résultats obtenus à l'issue de l'étude, ainsi qu'une interprétation et une discussion de ces différentes données.

PREMIERE PARTIE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I) Le virus de la Diarrhée Virale Bovine : présentation

A) Historique et importance

En 1946, un pestivirus a pour la première fois été mis en évidence (Olafson et al., 1946) dans le cadre d'une maladie épidémique touchant les bovins adultes, et provoquant une diarrhée aiguë bénigne assimilée à une « grippe intestinale ». On parlait alors du virus de la Diarrhée Virale Bovine.

Quelques années plus tard, un pestivirus a de nouveau été isolé (Ramsey et al., 1953), cette fois-ci dans le cadre d'une maladie sporadique extrêmement sévère touchant les jeunes bovins, létale dans 100 % des cas, et provoquant l'apparition d'ulcères sur tous les épithéliums pavimenteux malpighiens (muqueuses buccale, œsophagienne, ruminale...). On parlait dans ce cas-là du virus de la Maladie des Muqueuses.

Ce n'est qu'en 1961 (Gillespie et al.) qu'une parenté antigénique a été mise en évidence entre les virus responsables de ces deux entités cliniques. On parlera alors (Pritchard, 1963) de virus du « complexe Diarrhée Virale Bovine / Maladie des Muqueuses », ou complexe BVD / MD.

L'importance de la maladie, tant médicale qu'économique, repose en partie sur les pertes directes provoquées par les signes cliniques, mais la détection des principaux individus excréteurs et les difficultés à éradiquer la maladie restent les points essentiels à retenir. Le cas particulier de la forme clinique de la maladie des muqueuses est rare et ponctuel, mais son apparition est inexorablement létale.

B) Taxonomie

L'agent responsable du complexe BVD / MD est appelé Bovine Viral Diarrhea Virus, ou BVDV. Il appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Pestivirus*.

Ce genre comprend deux autres virus à l'origine de maladies bien connues : le virus de la Border Disease (BDV) qui touche les ovins, et le virus de la Peste Porcine Classique ou Classical Swine Fever (CSFV). Cette parenté entre les trois virus suggère la possibilité de contaminations interspécifiques. Ainsi le BVDV peut par exemple se transmettre au porc et au mouton, donnant toutefois des infections le plus souvent inapparentes.

C) Propriétés structurales et organisation génomique

Le BVDV est un virus de petite taille (environ 50 nm), enveloppé, à capsidie icosaédrique. L'enveloppe contient trois protéines virales (E0 ou E^{ms}, E1 et E2) qui constituent des cibles de choix pour les anticorps protecteurs contre le virus, en particulier E0 et E2. La protéine C est le principal constituant de la capsidie. Celle-ci contient le génome viral, constitué d'un brin d'ARN monocaténaire de polarité positive de 12 à 13 kb, codant pour environ 4000 acides aminés (Figure 1). Les deux tiers du génome viral (dans la partie 3') codent pour des protéines dites non structurales. Parmi celles-ci, le complexe NS2-3 joue sans aucun doute le rôle le plus important : pour les souches cytopathiques du virus BVD, le clivage du complexe NS2-3 aboutit à deux protéines de plus petite taille : NS2 et NS3. La protéine NS3 est la protéine la plus conservée au sein du genre Pestivirus. Elle constitue elle aussi une cible privilégiée pour les anticorps lors d'infection, mais ces derniers ne sont pas protecteurs, contrairement à ceux dirigés contre les protéines de l'enveloppe virale.

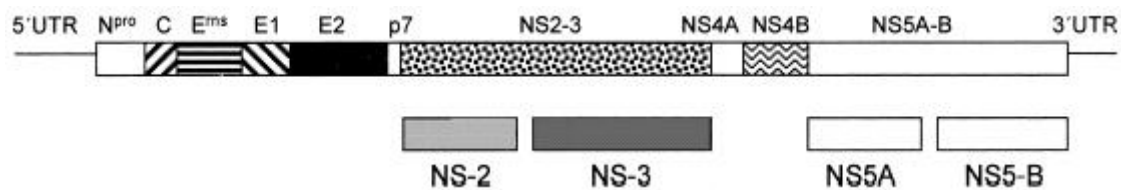


Figure 1 : Organisation génomique du virus BVD (© 2002 ASM Press)

D) Propriétés biologiques

1) Sensibilité du virus

Il s'agit d'un virus relativement peu résistant dans le milieu extérieur. Il ne résiste que dix jours dans la matière organique, et est sensible aux détergents usuels virucides. Il est inactivé par le formol, la soude, l'eau de Javel, ainsi que par des températures supérieures à 56°C (Chappuis, 1993). En revanche il résiste aux températures négatives, ce qui permet de le conserver afin de différer les analyses. En pratique au laboratoire, le virus est stocké à une température de -80°C.

2) Variabilité génétique

Le BVDV, comme les autres Pestivirus, et plus globalement comme les autres virus à ARN, se caractérise par une importante variabilité génétique. Cette variabilité est marquée pour les protéines structurales alors qu'elle est très faible pour la protéine NS3.

Grâce notamment à la variabilité élevée de la protéine E2, on a pu différencier deux génotypes différents, BVDV-1 et BVDV-2, eux-mêmes divisés en multiples sous-types génétiquement distincts (Bolin et Grooms, 2004 ; Ridpath et al., 1994). En Amérique du nord, les génotypes 1 et 2 sont subdivisés en 1a et 1b, 2a et 2b, alors qu'en Europe, on définit au moins 11 sous-génotypes de BVDV-1 (1a à 1k). Les souches de génotype 2 ont été associées à des formes cliniques sévères : dépression marquée, hyperthermie sévère (jusqu'à plus de 42°C), anorexie, dyspnée (broncho-pneumonie aiguë), diarrhée aqueuse parfois hémorragique (Ellis et al., 1998 ; Odeon et al., 1999). Cependant la virulence d'une souche n'est pas parfaitement corrélée avec son génotype car d'une part ces formes sévères ont aussi été rencontrées avec des souches de génotype 1, d'autre part il existe des souches peu pathogènes de génotype 2.

3) Notion de biotype

Le biotype d'une souche virale correspond à son effet sur différentes cultures cellulaires. Il s'agit donc d'un effet *in vitro*, et non de manifestations cliniques provoquées sur animal vivant. On parlera de biotype cytopathogène (CP) pour une souche virale qui induit un effet cytopathique sur les cellules, et de biotype non cytopathogène (nCP) dans le cas contraire.

Ces deux biotypes ont des caractéristiques propres permettant de les différencier (Tableau 1).

| Biotype | nCP | CP |
|---|--|---|
| Transmission horizontale | +++ | + |
| Transmission verticale | +++ | - |
| Clinique | Signes très variables | Signes minimales |
| Réponse humorale (anticorps neutralisants) | Apparition précoce (14 j) Titres élevés Persistance longue | Apparition tardive (25 j) Titres faibles Persistance courte |
| Distribution tissulaire | Large | Réduite |
| Virémie | Fréquente | Rare |

Tableau 1 : Caractéristiques des biotypes CP et nCP

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.

Sur le plan moléculaire, une souche de biotype nCP est caractérisée par la présence de la protéine NS2-3, d'un poids moléculaire de 125 kDa. En revanche, le biotype CP « dérive » du biotype nCP par clivage de la protéine NS2-3 en deux protéines de plus petite taille (NS2 et NS3) (Hamers et al., 2001).

II) Pathogénèse, expression clinique et conséquences épidémiologiques

L'infection par le Virus de la Diarrhée Virale Bovine (BVDV) se définit par un ensemble très complexe de tableaux cliniques polymorphes : troubles de la reproduction, avortements, entérites, pneumonies, malformations congénitales... De répartition mondiale, elle concerne principalement les bovins, mais peut également toucher les espèces porcine, ovine et caprine, ainsi que certains ongulés sauvages.

La pathogénèse de la maladie dépend de nombreux facteurs liés au virus et à l'hôte. Parmi ces derniers, le stade physiologique de l'animal infecté joue un rôle important. Deux cas de figure vont donc se présenter : infection hors gestation et infection d'une femelle gravide. Dans cet exposé nous incluons le cas de la contamination chez le mâle dans la partie « Infection hors gestation ».

A) Infection hors gestation

1) Pathogénèse

Dans le cas d'une transmission horizontale, le virus se transmet facilement par contact et pénètre le plus souvent par voie oronasale, mais aussi par voie conjonctivale ou génitale. On observe alors une phase de multiplication initiale au niveau du site d'infection, suivie d'une phase de virémie, 4 à 5 jours après la contamination. A partir de là, le virus circule soit sous forme liée, pris en charge par les cellules mononucléées sanguines, soit sous forme libre dans le compartiment sanguin. Cette phase de virémie dure en moyenne une quinzaine de jours.

L'infection par le virus BVD induit une immunodépression importante, qui semble être à l'origine de la plupart des effets pathogènes observés. L'agent viral est capable de se répliquer dans toutes les sous-populations de lymphocytes, principaux acteurs de la réponse immunitaire acquise. La manifestation hématologique la plus visible provoquée par l'action du BVDV est représentée par une leucopénie, persistant 10 à 15 jours après l'infection. Plus précisément, on observe une neutropénie et une lymphopénie dans la même période.

L'action pathogène directe du virus BVD dans les infections horizontales est très discutée. En effet, l'agent viral paraît être un simple facteur causal des troubles observés, de par l'immunodépression induite.

2) Expression clinique

a) Forme subclinique

Il s'agit de la forme la plus fréquente : 70 à 90 % des infections seraient subcliniques chez les animaux immunocompétents séronégatifs (Baker, 1995).

Cette forme correspond à un syndrome fébrile modéré passant souvent inaperçu : légère hyperthermie, diminution de l'appétit, diarrhée modérée, leucopénie de courte durée, légère chute de la production laitière. Les animaux touchés produisent rapidement des anticorps neutralisants et la guérison a lieu au bout de quelques jours.

b) Troubles digestifs

(i) Diarrhée virale bovine aiguë bénigne

Le BVDV est un agent infectieux responsable de diarrhées épidémiques chez la vache adulte. Il s'agit de la forme initialement décrite par Olafson en 1946. Elle touche les jeunes bovins âgés en moyenne de 6 à 24 mois, et entraîne des symptômes inconstants tels qu'une diarrhée, une anorexie, une légère hyperthermie, une chute de production laitière, et parfois un épiphora et un jetage séreux. Ce type d'infection apparaît sous forme d'épizootie, et est caractérisé par une forte morbidité et une mortalité très faible.

(ii) Entérite diarrhéique néonatale

Le virus peut également être à l'origine de diarrhées chez le nouveau-né, touchant ponctuellement des veaux de moins de 15 jours. Dans la plupart des cas le BVDV n'est pas directement à l'origine des signes cliniques, mais il entraîne une immunodépression favorisant l'action d'autres agents pathogènes, principalement des virus de type coronavirus ou rotavirus.

La circulation du BVDV au sein d'un élevage n'entraîne pas systématiquement des diarrhées néonatales, mais en cas de co-infection par d'autres agents pathogènes responsables de diarrhées chez le veau, la gravité des symptômes sera accrue.

c) Troubles de la reproduction

Ils sont principalement représentés par de l'infertilité.

Chez le mâle, on retrouve du virus dans la semence des individus infectés, dont la qualité est alors altérée. On observe une diminution du volume récolté, une baisse de la motilité, une diminution de la concentration en spermatozoïdes, et une augmentation de leur mortalité et de leurs anomalies. Ces conséquences ne sont pas systématiques. Il est donc possible de rencontrer un taureau virémique, sans pour autant qu'il y ait d'altération de la fertilité.

Chez la femelle, l'infection hors gestation peut également provoquer de l'infertilité lorsqu'elle a lieu peu avant l'insémination. Le virus BVD est en effet susceptible, en provoquant une inflammation des différentes parties de l'appareil génital femelle, d'entraîner des anomalies du fonctionnement ovarien (croissance folliculaire et ovulation anormales) et de perturber la fécondation (Chastang et Maillard, 1999).

d) Autres troubles

(i) Syndrome hémorragique

Il se traduit par des hémorragies multiples du vivant de l'animal. On observe de l'épistaxis, une hématurie, une diarrhée hémorragique ou des bouses contenant des filets de sang, des pétéchies ou des suffusions sur toutes les séreuses (intestinale, cardiaque et respiratoire) ainsi que sur les muqueuses (oculaire, buccale et génitale), et des saignements persistants aux sites d'injection. On observe également chez les individus touchés une apathie sévère et une hyperthermie pouvant aller jusqu'à 41°C. Les troubles de la coagulation observés sont dus à une thrombocytopénie sévère, entraînée par une destruction périphérique massive des plaquettes par le virus. L'évolution est mortelle dans la quasi-totalité des cas.

(ii) Troubles respiratoires

L'immunodépression induite par une infection par le BVDV favoriserait la co-infection par d'autres agents pneumopathogènes viraux ou bactériens, dont l'intensité des signes cliniques sera aggravée (Baker, 1987).

B) Infection d'une femelle gravide

1) Pathogénèse et signes cliniques associés

La pénétration initiale du virus dans l'organisme maternel s'effectue de la même façon que lors d'une infection horizontale classique chez une femelle non gravide ou un mâle. En revanche, chez une femelle en cours de gestation, la phase de virémie va entraîner une placentite et un passage viral transplacentaire, aboutissant à des conséquences variables suivant le stade de gestation.

a) Conséquences en fonction du stade de gestation

(i) Infection pendant le premier mois

Les conséquences cliniques immédiates sont représentées en grande majorité par de l'infécondité, pouvant être expliquée par une mortalité embryonnaire tardive. Il s'agit d'une conséquence majeure de l'infection par le BVDV, entraînant des pertes économiques non négligeables.

Ces troubles apparaissent chez les femelles mises à la reproduction, lorsque l'introduction de virus survient au tout début de la gestation : à partir de quelques jours avant l'insémination, jusqu'à la fin de la période embryonnaire précoce. On observe alors une réduction non négligeable de la fertilité, provoquée par une augmentation du taux de mortalité embryonnaire. Si cette mort embryonnaire a lieu assez tôt (avant le 16^{ème} jour de gestation), elle est qualifiée de précoce, et la conséquence majeure est représentée par du repeat breeding, c'est-à-dire par des retours en chaleur répétés à intervalles réguliers d'environ 21 jours. Les conséquences peuvent également être retardées et n'être visibles qu'au moment de l'expulsion

du veau : momifications fœtales, avortements, naissances prématurées, veaux mort-nés, malformations congénitales...

(ii) Infection entre 1 et 5 mois

L'avortement est alors la conséquence la plus courante. On pourra observer soit des retours en chaleur décalés par mortalité embryonnaire tardive, soit des avortements *sensu stricto* en cas d'infection plus tardive.

La mort de l'embryon (traduite par de l'infécondité) ou du fœtus ne semble pas être expliquée par une action directe du virus. Ce dernier provoquerait plutôt des lésions placentaires responsables de la mort du *conceptus*.

(iii) Infection entre 3 et 5 mois

On obtiendra alors le plus souvent des malformations anatomiques, observées de manière différée lors de l'avortement ou de la mise bas.

Cet effet tératogène s'explique d'une part par la forte affinité du virus pour les cellules à multiplication rapide, d'autre part par son action sur les endothéliums vasculaires, entraînant une hypoxie et une dégénérescence cellulaire.

(iv) Infection entre 5 et 9 mois

Dans ce cas, le fœtus pourra développer une immunité active contre le virus, et l'infection sera le plus souvent asymptomatique.

(v) Infection quelques jours avant la mise bas

Dans ce cas l'animal naîtra normal mais présentera une virémie transitoire jusqu'à l'apparition des anticorps neutralisants, quelques jours après la mise bas. En quelques sortes, ce cas peut être assimilé à un cas « classique » d'infection transitoire.

(vi) Cas particulier de l'infection entre 1 et 4 mois de gestation (40-120 jours)

Cette fenêtre d'infection correspond à la période critique d'acquisition de la tolérance immune du fœtus, au cours de laquelle il acquerra la faculté de distinguer le « soi » du « non soi ». S'il est infecté pendant ce délai, il pourra alors accepter l'intrusion virale, mettre en place une tolérance spécifique vis-à-vis du virus, et considérer le BVDV comme du « soi ».

On peut donc aboutir à la naissance d'individus appelés « Infectés Permanents Immunotolérants » (IPI), qui ont la particularité d'être virémiques permanents, mais séronégatifs vis-à-vis du BVDV.

Les conséquences cliniques d'un animal infecté permanent immunotolérant sont très variables :

- Dans de rares cas, aucune manifestation n'est observable, et les veaux naissent et se développent normalement.
- Chez certains animaux, on peut observer un retard de croissance important par rapport aux autres individus de la même cohorte. Ces animaux sont de petite taille, ont le poil piqué, et une tête de taille importante par rapport au reste du corps.
- Chez d'autres individus, on peut avoir des affections diverses, comme des troubles cutanés (teigne) ou pulmonaires.

Il est établi que les animaux IPI ont une espérance de vie diminuée par rapport aux individus d'une même cohorte (Houe, 1993), même si aucune donnée chiffrée n'a été rapportée.

b) Bilan des troubles observés

- si l'infection est précoce (premier mois) : mort embryonnaire
- si l'infection a lieu dans les deux premiers trimestres de la gestation, elle peut aboutir à une, deux ou trois des conséquences suivantes :
 - malformations congénitales
 - avortement
 - naissance d'un animal infecté permanent immunotolérant (IPI)

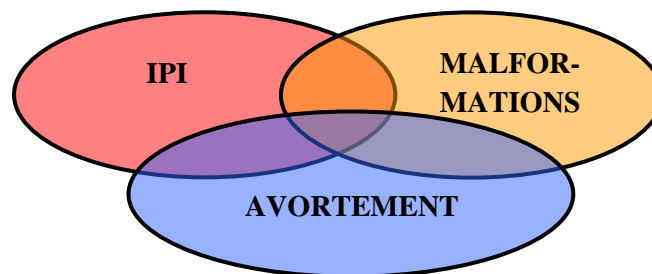


Figure 2 : Superposition partielle des trois conséquences d'une infection par le BVDV pendant les deux premiers trimestres de la gestation

- si l'infection est tardive (dernier trimestre) : infection asymptomatique.

2) Cas de la maladie des muqueuses au sens strict

Il s'agit de la forme initialement observée par Ramsey en 1953. Se déclarant uniquement chez des animaux IPI, elle touche généralement des jeunes bovins de 6 mois à 2 ans.

a) Pathogénèse

Sur le plan moléculaire, les individus déclarant une maladie des muqueuses se caractérisent par la présence simultanée de deux souches CP et nCP au sein de leur organisme. La maladie se déclare à partir d'une surinfection par une souche CP, d'un individu IPI hébergeant

initialement une souche nCP (Brownlie et al., 1984 ; Bolin et al., 1985). Les conséquences cliniques dépendront du degré d'homologie entre ces deux souches :

- Si les deux biotypes diffèrent sur le plan antigénique, l'animal fabriquera des anticorps protecteurs contre la souche surinfectante, et ne développera pas de maladie des muqueuses
- Si les deux biotypes sont homologues, l'animal immunotolérant acceptera l'intrusion virale et déclarera une maladie des muqueuses dite aiguë
- Si les deux biotypes ne diffèrent que très légèrement, on observera alors une forme chronique de la maladie des muqueuses

b) Expression clinique

(i) Forme aiguë de la maladie des muqueuses

Caractérisée par une durée d'évolution très courte (environ 8 à 10 jours), elle apparaît généralement de façon sporadique, touche principalement des animaux de 3 mois à 3 ans, et son évolution est inexorablement létale. Les symptômes sont caractéristiques : on observe du ptyalisme, une démarche anormale (on dit que l'animal « marche sur des œufs »), une diarrhée pouvant être de nature très diverse : aqueuse, mucoïde, hémorragique ou avec présence de caillots sanguins... En début d'évolution une légère hyperthermie peut apparaître, mais elle a généralement disparu au moment de l'apparition des principaux signes cliniques. A l'ouverture de la bouche, on observe des lésions ulcéreuses caractéristiques, dont le degré d'intensité varie : cela peut aller d'une stomatite congestive marquée généralisée jusqu'à la présence d'ulcères superficiels fusiformes d'extension totale, langue comprise. Les espaces interdigités présentent également des ulcères recouverts d'un enduit nécrofibrineux, le plus souvent étendus sur les quatre pieds.

(ii) Forme chronique de la maladie des muqueuses

La forme chronique est caractérisée par une durée d'évolution plus longue (quelques semaines à quelques mois), mais sa terminaison est également fatale dans tous les cas. Les circonstances d'apparition sont identiques à celles de la forme aiguë. Les symptômes sont par contre moins spécifiques et d'intensité moindre : on observe de l'inappétence, un amaigrissement progressif, un retard de croissance, une diarrhée intermittente ou continue, et parfois quelques ulcères buccaux et interdigités qui guérissent puis réapparaissent.

La figure 3 représente un bilan des conséquences possibles de l'infection d'une femelle gravide :

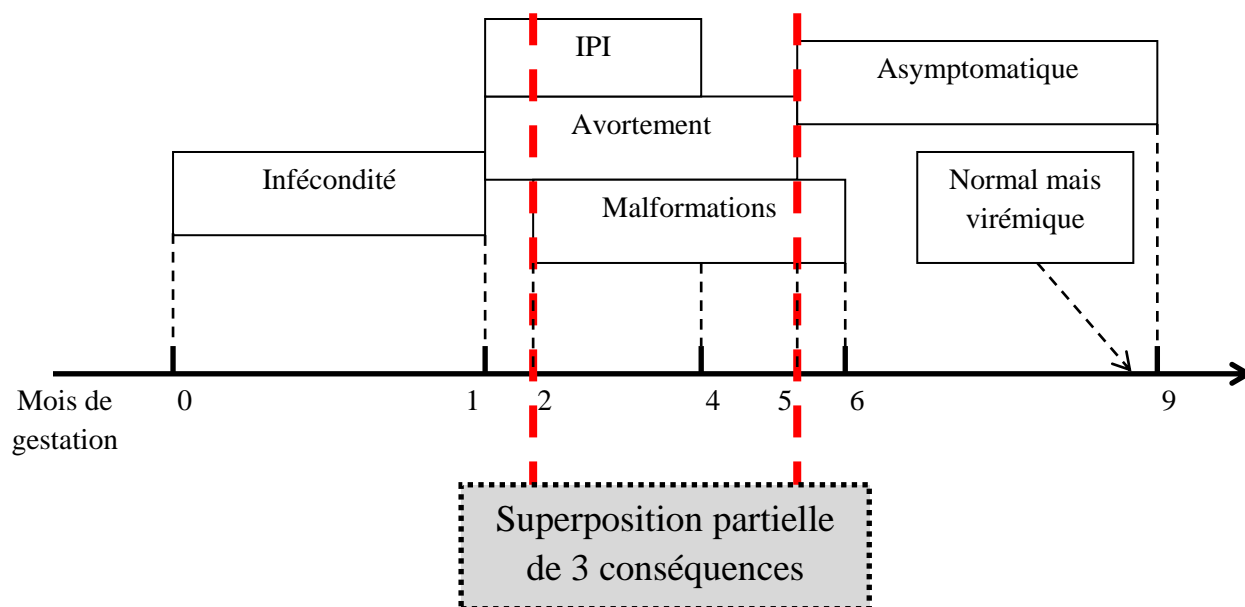


Figure 3 : Conséquences de l'infection par le BVDV en fonction du stade de gestation

La pathogénèse est donc complexe, et explique l'existence de deux types d'infections par le BVDV :

- Les infections transitoires, transmises de manière horizontale après la naissance ;
- Les infections permanentes, transmises verticalement au cours de la gestation.

C) Conséquences épidémiologiques de l'immunotolérance

Nous avons vu que l'infection d'une femelle gravide entre le premier et le quatrième mois de gestation pouvait entraîner la naissance d'individus IPI. Ces derniers constituent la clé de l'épidémiologie de la maladie. En effet, dès la naissance les IPI sont des animaux virémiques permanents, mais séronégatifs jusqu'à la buvée colostrale. La conséquence épidémio-clinique est catastrophique : ils peuvent ne présenter aucun signe clinique, tout en excréant massivement le virus dans le milieu extérieur. En France, leur proportion au sein de la population bovine est d'environ 1% (Maillard, 2007).

1) Les bovins IPI : principale source de virus à l'échelle individuelle

Les sources virales sont représentées à 90 % par les animaux excréteurs et à 10 % par l'environnement, qui est une source limitée du fait de la faible résistance du virus dans le milieu extérieur. En revanche, le réservoir animal présente un impact très fort pour l'épidémiologie de la maladie.

Représentant environ 70 % des bovins excréteurs, les individus IPI sont la clé de la transmission du virus. En effet ce sont des excréteurs permanents, et à des titres viraux élevés, en comparaison avec les individus infectés transitoires qui sont excréteurs à des titres plus faibles, et uniquement pendant une période correspondant, à quelques jours près, à la phase de virémie.

Les matières virulentes sont nombreuses : jetage, sang pendant la phase de virémie, lait, sperme. En revanche les matières fécales sont un mauvais milieu de prélèvement pour mettre en évidence l'infection virale.

La transmission virale horizontale s'effectue majoritairement par voie directe : de mufler à mufler par l'intermédiaire du jetage, ou par voie sexuelle par l'intermédiaire du sperme infecté. La pénétration par voie orale existe, mais il s'agit d'une voie de contamination mineure. Cette transmission horizontale peut également s'effectuer de manière indirecte, par l'intermédiaire de matériel contaminé (mouchettes...), ou par le biais de l'environnement souillé. Une transmission vectorielle animée peut également être envisagée par des insectes

tels que les mouches transportant le virus sur leurs pattes, à condition que le « temps de vol » entre l'animal excréteur et l'animal récepteur ne soit pas trop long.

La propagation de l'infection est conditionnée par la nature de la source virale. Elle sera beaucoup plus rapide et efficace s'il s'agit d'un individu IPI que s'il s'agit d'un infecté transitoire.

2) Les bovins IPI : origine de la contamination à l'échelle du troupeau

La transmission du virus à l'échelle de l'élevage s'effectue de deux manières : soit par introduction de bovin(s), soit plus rarement par contact avec un autre troupeau, notamment au pâturage dans les zones d'élevage à forte densité ou lors de rassemblements publics de bovins. Ce sont encore une fois les animaux IPI qui constituent le risque majeur, étant donné les titres élevés d'excrétion virale et le caractère permanent de cette excrétion. Ce risque est d'autant plus élevé que l'animal introduit est jeune (génisse ou taurillon), la reproduction étant la modalité majeure de transmission du virus au sein du troupeau.

Il ne faut cependant pas négliger l'impact des animaux infectés transitoires, dont le rôle dans cette transmission est mineur mais bien réel. Le cas particulier de l'introduction d'une vache gravide portant un veau futur IPI, est très important à prendre en compte.

3) Les bovins IPI : maintien de la circulation virale au sein du troupeau

Les individus IPI ont trois caractéristiques : ils ne produisent pas d'anticorps contre le BVDV, ils rejettent en permanence du virus dans le milieu extérieur, et leurs titres d'excrétion virale sont très élevés. Cette description fait d'eux de véritables bombes à virus au sein même du troupeau. Ce sont les IPI qui vont faire circuler le BVDV dans le troupeau de manière rapide, à bas bruit dans un premier temps, mais avec des conséquences épidémiologiques très graves. Cette circulation se fera en grande majorité par l'intermédiaire de transmissions horizontales, mais également verticales. En effet un individu IPI peut survivre jusqu'à la puberté, et s'il s'agit d'une femelle que l'on met à la reproduction, elle donnera obligatoirement naissance à un veau IPI lui aussi.

III) Les moyens de lutte contre la Diarrhée Virale Bovine

L'objectif de la lutte contre le BVDV consiste en une évaluation la plus précise possible des modalités de la circulation virale et à la diminution voire l'élimination de cette circulation, tout en veillant à adopter la solution la plus économique possible.

Cette lutte repose sur des mesures sanitaires et médicales, qui vont être mises en œuvre en fonction des nombreuses investigations diagnostiques sérologiques et virologiques mises en place au préalable.

A) Mesures sanitaires

1) Elimination des IPI

Le but étant de diminuer la circulation virale, la mesure sanitaire la plus importante consistera en une élimination des principaux excréteurs. Le dépistage et l'abattage des individus IPI semble donc être la principale mesure sanitaire à mettre en œuvre, permettant ainsi de diminuer le réservoir de la maladie. Il ne faut cependant pas négliger les animaux infectés transitoires, qui représentent aussi une source de contamination à l'échelle du troupeau.

Dans tous les cas, chaque élevage devra être abordé en intégrant la notion de « lots physiques », correspondant à des groupes d'animaux de même âge (+/- 6 mois). Par exemple, un lot de génisses de première année, s'il est physiquement séparé du reste du troupeau, pourra être considéré comme une entité à part entière et être géré indépendamment. C'est ce qui permettra une gestion raisonnée de la lutte, entraînant des coûts moins élevés et une logistique simplifiée.

2) Stratégies collectives

Ces mesures, mises en place par les groupements d'éleveurs, diffèrent d'une région à une autre. Elles ont pour objectif de protéger les élevages acheteurs supposés indemnes, et de faciliter les échanges d'animaux pour les élevages vendeurs supposés indemnes.

a) Contrôles à l'introduction

Il s'agit d'un contrôle systématique du statut BVDV lors de chaque échange d'animaux. On réalise pour cela une sérologie (recherche d'anticorps) et une virologie (recherche directe du virus). On pourra ainsi déterminer si les animaux sont sains, infectés transitoires ou IPI (cas des individus séronégatifs et positifs en virologie).

L'interprétation des résultats sérologiques sera impossible sans la connaissance du statut vaccinal de chaque animal. Un individu vacciné peut en effet être séropositif.

Dans certains cas, ces contrôles peuvent être simplifiés. Par exemple, les vaches âgées (plus de 4-5 ans) non gravides pourront être contrôlées avec une simple virologie. En effet, étant trop âgées pour être IPI, une virémie négative suffira à confirmer qu'elles ne sont pas des infectées transitoires.

Ces contrôles à l'introduction pourront être complétés par la mise en place d'une quarantaine d'environ trois semaines pour chaque entrée. On élimine ainsi les risques de transmission de l'infection par la présence éventuelle d'un infecté transitoire dans le lot introduit.

b) Certification des cheptels

Il s'agit d'une certification non reconnue par l'Etat, mise en place en fonction des régions. Les modalités diffèrent suivant le type de production. En élevage laitier, on se base sur une recherche d'anticorps dans le lait sur de grands mélanges, à raison d'au moins trois prélèvements négatifs successifs à 4 mois d'intervalle. En élevage allaitant, on travaille avec des sérologies sur des petits mélanges de sang (5 à 10 animaux).

c) Garantie d'animaux non IPI

Le caractère « non IPI » est un caractère qui se conserve toute la vie de l'animal. Il est donc possible de le garantir afin de faciliter les échanges d'animaux en limitant les dépistages ultérieurs. Il s'agit d'une garantie à l'échelle individuelle, qui a donné naissance à un fichier d'animaux garantis non IPI, mais elle ne dispense pas la réalisation d'une quarantaine à l'entrée de ces individus, qui peuvent tout de même être infectés transitoires.

B) Mesures médicales : la vaccination

1) Objectifs de la vaccination contre le BVDV

a) Protection clinique

Le premier objectif de la vaccination contre le BVDV est une protection contre les infections horizontales post-natales. Il s'agit donc d'empêcher l'apparition des infections transitoires, en protégeant les individus vaccinés contre les signes cliniques très variés rencontrés dans ce type d'infection : troubles de la reproduction, diarrhée, troubles respiratoires, syndrome hémorragique...

Lors de l'apparition des premiers vaccins contre le BVDV, cet objectif de protection contre les infections post-natales était le seul envisagé, et reste une indication importante pour les vaccins actuels.

b) Protection fœtale

Avec l'étude épidémiologique de plus en plus précise de la maladie, notamment en ce qui concerne les connaissances sur les individus IPI, un deuxième objectif vaccinal est apparu. Il s'agit de la protection vis-à-vis d'une infection transplacentaire, ou protection fœtale, qui est aujourd'hui devenue une indication majeure. Les critères d'efficacité sont la production, après épreuve virulente, d'une infection de tous les fœtus issus de vaches non vaccinées, associée à une absence d'infection sur au moins 90 % des fœtus issus de vaches vaccinées.

2) Les vaccins

a) Vaccins vivants

Les vaccins vivants modifiés contre le BVDV ont été les premiers produits, et ce dès les années 1960 aux Etats-Unis (Van Oirschot et al., 1999).

L'atténuation des souches utilisées dans les vaccins commercialisés en France a été obtenue par passages en série sur cellules (exemple de la souche Oregon C24V contenue dans le Mucosiffa[®], Merial) ou par mutagenèse chimique (exemple de la souche thermosensible RIT 4350 contenue dans le Rispoval[®], Pfizer) (Douart et al., 1997).

En Europe, les vaccins vivants actuellement sur le marché contiennent tous une souche de génotype BVDV 1, et le plus souvent de biotype cytopathogène (CP). En Amérique du Nord, de nouveaux vaccins contenant à la fois une souche BVDV-1 et une souche BVDV-2 font leur apparition.

La réponse humorale provoquée par les vaccins vivants modifiés est rapide et durable : les anticorps neutralisants apparaissent en trois semaines, et leur titre se maintient pendant au moins 18 mois. Leur utilisation permet d'effectuer la primovaccination en une seule injection.

b) Vaccins inactivés

Les vaccins inactivés contre le BVDV, également appelés vaccins inertes, ont été développés ultérieurement. Les souches utilisées ont été inactivées à l'aide d'agents chimiques divers. En raison du caractère peu immunogène du virus, ces vaccins nécessitent l'apport d'adjuvants de l'immunité tels que l'hydroxyde d'alumine, afin d'entraîner une réponse sérologique satisfaisante.

De la même façon que les vaccins vivants, ils contiennent tous une souche de génotype BVDV1, mais ces souches sont ici beaucoup plus diverses : elles peuvent être de biotype non cytopathogène (nCP) comme les souches New York et Aveyron contenues dans le Mucobovin[®] (Merial), ou de biotype cytopathogène (CP) comme la souche C86 contenue dans le Bovilis BVD[®] (Intervet).

La réponse humorale provoquée par ces vaccins inactivés est plus faible et de plus courte durée, généralement inférieure à un an. Leur utilisation nécessite souvent deux injections pour réaliser la primovaccination.

c) Caractéristiques des vaccins commercialisés en France

Ils sont au nombre de 7, contre plus de 180 aux Etats-Unis (Kelling, 2004).

| Nom commercial | Souche | Vivant/Inactivé | Génotype | Biotype |
|----------------------------------|---------------------|-----------------|----------|---------|
| Bovilis BVD [®] | C86 | I | 1 | CP |
| Mucobovin [®] | New York Aveyron | I | | nCP |
| Mucosiffa [®] | Oregon | V | | CP |
| Pregsure [®] | 5960 | I | | CP |
| Rispoval BVD [®] | RIT 4350 | V | | CP |
| Rispoval RS-BVD [®] | RIT 4350 | V | | CP |
| Rispoval RS-BVD-PI3 [®] | 5960 6309 | I | | CP |

Tableau 2 : Caractéristiques des souches vaccinales utilisées en France

3) Performances des vaccins

a) Innocuité

Les dangers liés à la vaccination contre le BVDV concernent en grande majorité les vaccins vivants atténués, en raison de leur virulence élevée.

Le risque le plus fréquemment décrit est représenté par les accidents de contamination de lots vaccinaux. Le plus souvent, c'est le sérum de veau fœtal utilisé pour la fabrication des vaccins qui est initialement contaminé par une souche de virus BVD non cytopathogène. Plusieurs

« épidémies » ont été décrites (Kreeft et al., 1990 ; Levings et al., 1990) suite à l'utilisation de vaccins vivants modifiés contaminés, y compris des vaccins destinés à lutter contre d'autres agents pathogènes que le BVD.

La diffusion de la souche vaccinale constitue un autre risque potentiel. Elle peut avoir lieu dans l'organisme des animaux, entraînant alors une virémie (Cortese et al., 1997), ou bien entre les animaux, par infection transplacentaire (Liess et al., 1984 ; Orban et al., 1983). Aucune de ces études n'a mis en évidence la possibilité d'une excrétion nasale et d'une transmission horizontale. De plus, d'après les connaissances actuelles sur les modalités de transmission des différents biotypes, le risque de diffusion est très faible avec les souches CP. Pourtant, par précaution, ces observations ont conduit à limiter l'utilisation de certains vaccins vivants modifiés au dernier tiers de gestation lors de vaccination d'animaux gravides.

Le déclenchement d'une maladie des muqueuses au sens strict a déjà été rapporté suite à la vaccination (Rosner et al., 1968), mais l'incidence reste très faible (maximum un cas sur 15000 doses administrées). Il est admis que ce cas de figure ne se présente que chez des animaux infectés permanents par une souche non cytopathogène, lorsqu'ils sont vaccinés avec une souche cytopathogène (Bolin, 1995a).

Il existerait également pour les vaccins vivants modifiés, un risque de recombinaison génétique avec l'ARN de l'individu vacciné ou avec l'ARN d'autres virus (Meyers et al., 1991 et 1992 ; Qi et al., 1992). Il y aurait alors la possibilité de création et de diffusion d'une nouvelle souche, potentiellement pathogène. Ce cas de figure se pose notamment dans le cas particulier de la vaccination d'un individu IPI, si la souche vaccinale est génétiquement éloignée de la souche pour laquelle il est immunotolérant.

Certains vaccins vivants modifiés pourraient également avoir un effet immunosuppresseur (Roth et al., 1983), à l'origine d'une diminution des défenses face à d'autres agents infectieux, aboutissant à des « maladies post-vaccinales ».

Enfin, des désagréments mineurs peuvent être notés après vaccination, tels qu'une réaction inflammatoire locale au point d'injection, ou une légère baisse de production laitière chez la vache laitière dans les quelques jours suivant l'injection.

b) Efficacité vaccinale

Les objectifs de la vaccination, nous l'avons vu, sont l'apparition d'une protection clinique post-natale et une protection fœtale. L'évaluation de l'efficacité vaccinale dépend donc de ces deux critères.

(i) Protection clinique post-natale

L'efficacité vaccinale vis-à-vis de la protection clinique est évaluée par l'intermédiaire d'études expérimentales se basant sur différents critères. Le premier est de nature clinique, avec vérification de l'absence de symptômes chez les animaux vaccinés après une inoculation d'épreuve avec du BVDV. Des critères hématologiques sont également pris en compte, par l'observation d'une réduction voire d'une absence de leucopénie après cette même épreuve. Enfin, en raison du caractère peu expressif sur le plan clinique des souches d'épreuve utilisées (virus BVD de génogroupe 1), une grande importance est accordée aux critères virologiques tels qu'une réduction de la fréquence, de la durée, voire de l'intensité de la virémie et/ou de l'excrétion nasale après épreuve virulente (Howard et al., 1994).

La protection des veaux nouveau-nés vis-à-vis d'une infection transitoire aiguë constitue un cas particulier. Les deux possibilités envisageables sont une protection passive par l'intermédiaire de la vaccination des mères en cours de gestation, et une protection active par la vaccination directe des veaux.

La vaccination des vaches gravides doit induire des titres suffisamment élevés en anticorps neutralisants, afin d'assurer un transfert satisfaisant de l'immunité passive. Malgré tout, la virémie et l'excrétion nasale restent possibles en présence de titres élevés d'anticorps maternels (Bolin et Ridpath, 1995).

Le choix de la vaccination directe des veaux nouveau-nés peut être envisagé, mais il faut alors prendre en compte l'interférence de l'immunité maternelle colostrale sur le développement de la réponse immunitaire post-vaccinale (Ellis et al., 2001 ; Menanteau-Horta et al., 1985). Il a notamment été montré que, même si l'immunité maternelle bloquait la réponse vaccinale en anticorps neutralisant, une réponse immune cellulaire pouvait cependant être générée (Endsley et al., 2003).

(ii) Protection fœtale

La protection du fœtus vis-à-vis d'une transmission transplacentaire est devenue une indication majeure de la vaccination. De la même façon que pour la protection clinique post-natale, l'efficacité vaccinale vis-à-vis de la protection fœtale est évaluée par l'intermédiaire d'études expérimentales suivant des critères précis. Le premier concerne les effectifs : le lot vacciné doit comporter au moins 12 vaches, tandis que le lot témoin doit en compter au moins 7. Le critère majeur d'efficacité repose sur le caractère infecté ou non des fœtus après épreuve virulente sur les mères : tous les fœtus issus des vaches témoins doivent être infectés, tandis qu'au moins 90 % des fœtus issus des vaches vaccinées doivent être indemnes de BVDV.

Selon la nature des vaccins, les résultats d'efficacité en termes de protection fœtale sont caractérisés par une très grande diversité.

Concernant les vaccins inactivés, les différentes études expérimentales menées ont révélé des résultats mitigés en termes de protection fœtale. Ainsi, après utilisation d'un vaccin inactivé A ou d'un vaccin inactivé B, respectivement 6 génisses sur 9 et 8 génisses sur 15 ont donné naissance à des veaux IPI, après inoculation intra-nasale d'une mixture de 3 souches de BVDV différentes, 82 jours après insémination. On obtient donc une efficacité respective de 33% et 47% en termes de protection fœtale (Zimmer et al., 2002).

De même, l'utilisation d'un vaccin inactivé a montré une efficacité de 73% en termes de protection fœtale (4 IPI sur 15 mères vaccinées), après mise en contact avec le virus entre 52 et 150 jours de gestation (Grooms et al., 2007).

Un autre vaccin inactivé a permis d'obtenir une protection fœtale de 100% après challenge entre 25 et 80 jours de gestation (Brownlie et al., 1995). Ces résultats ne peuvent toutefois pas être objectivés puisque les effectifs étaient insuffisants (6 et 9 animaux pour les 2 groupes vaccinés, et 6 animaux pour le groupe témoin), et seulement 4 génisses sur les 6 du groupe témoin ont donné naissance à des individus IPI.

Certains vaccins inactivés possèdent tout de même une indication de protection fœtale. Par exemple, après utilisation d'un vaccin inactivé, 9 génisses sur les 11 vaccinées ont donné naissance à des veaux sains non IPI, après infection par un virus BVD à 87 jours de gestation. Les 2 restantes ont avorté avant terme mais le virus n'a pas pu être mis en évidence dans les

tissus fœtaux récoltés lors de l'avortement. De plus tous les animaux du groupe témoin (N = 7) ont donné naissance à des veaux IPI (Patel et al., 2002).

Les études expérimentales mises en œuvre avec des vaccins vivants atténués ont-elles aussi apporté des résultats divers.

Par exemple, l'utilisation d'un vaccin vivant modifié a révélé une efficacité de 58% en termes de protection fœtale (8 IPI sur 19 mères vaccinées), après inoculation intra-nasale de virus BVD à 75 jours de gestation (Brock et Cortese, 2001).

De la même façon, une protection fœtale de 83% (2 veaux IPI sur 12 mères vaccinées) a été démontrée avec l'utilisation d'un autre vaccin vivant, après inoculation entre 70 et 75 jours de gestation (Cortese et al., 1998a).

Enfin, une efficacité de 91% (2 IPI sur 22 mères vaccinées) a été amenée par l'utilisation d'un vaccin vivant atténué, après inoculation entre 55 et 100 jours de gestation (Dean et al., 2003).

D'autres études ont montré des protections fœtales pouvant aller jusqu'à 100% (Kovacs et al., 2003 ; Fairbanks et al., 2004 ; Ficken et al., 2006).

(iii) Protection hétérologue

La diversité antigénique des Pestivirus amène à s'interroger sur la question de la protection croisée.

En termes de protection clinique, l'efficacité de certains vaccins contenant une souche BVD de génotype 1, a été démontrée pour des virus hétérologues de type 2 (Shimazaki et al., 2003 ; Makoschey et al., 2001 ; Hamers et al., 2003 ; Cortese et al., 1998b ; Kelling et al., 2007 ; Dean et al., 1999). L'une de ces études expérimentales ne tient compte que de critères cliniques et hématologiques pour conclure à la protection clinique hétérologue (Makoschey et al., 2001), alors que toutes les autres incluent un critère de virémie. L'une de celles-ci prend également en compte un critère d'excrétion nasale, pour lequel l'efficacité du vaccin utilisé est de 87% (Dean et al., 1999).

En ce qui concerne la protection fœtale hétérologue, les résultats en termes d'efficacité sont globalement médiocres.

Ainsi d'après deux études mettant en œuvre le même protocole, l'utilisation d'un vaccin vivant modifié contenant une souche BVD de génotype 1 a entraîné une protection fœtale

respective de 58 % et 67 %, après inoculation d'épreuve avec un virus de type 2 (Brock et al., 2001 ; Ficken et al., 2006).

Une protection fœtale complète a par ailleurs été démontrée pour le protocole combinant un vaccin inactivé et un vaccin vivant modifié, tous deux du génotype 1, contre une inoculation d'épreuve avec un mélange de deux souches, l'une de type 1 et l'autre de type 2 (Frey et al., 2002).

D'autre part, certaines études sont difficilement interprétables en ce qui concerne la protection fœtale hétérologue, en raison de l'utilisation de préparations vaccinales mixtes, contenant à la fois une souche BVD de type 1 et une souche BVD de type 2 (Kovacs et al., 2003 ; Fairbanks et al., 2004).

(iv) Durée d'immunité

La durée d'immunité est très variable d'un vaccin à l'autre, et on considère souvent qu'elle est supérieure pour les vaccins vivants modifiés par rapport aux vaccins inactivés (Bolin, 1995b ; Kelling, 2004 ; Fulton, 2001).

Ainsi par exemple, pour un vaccin vivant modifié, les titres en anticorps neutralisants se maintiennent pendant au moins 18 mois, même si une fraction d'animaux présente une chute de ces anticorps 12 mois après la vaccination (Cortese et al., 1998c).

Pour les vaccins inactivés, la durée d'immunité est généralement considérée inférieure à un an (Bolin, 1990).

c) Performances des vaccins utilisés en France

La protection vis-à-vis d'une infection horizontale des jeunes bovins et des adultes a été démontrée pour tous les vaccins actuellement commercialisés en France, et constitue pour certains d'entre eux la seule indication retenue.

En ce qui concerne la protection fœtale, seuls deux vaccins commercialisés en France possèdent l'indication dans leur AMM : Bovilis BVD[®] (Intervet) et Pregsure[®] (Pfizer). D'autre part, cette protection fœtale a été démontrée pour un protocole combinant une primovaccination avec Mucobovin[®], vaccin inactivé, et un rappel avec Mucosiffa[®], vaccin

vivant modifié mis en jeu dans l'étude illustrant notre travail (Frey et al., 2002 ; Moennig et al., 2005).

| Nom commercial | Labo | Vivant/Inactivé | Protection fœtale | |
|----------------------------------|----------|-----------------|-------------------|--------------------------|
| Bovilis BVD [®] | Intervet | I | + | |
| Mucobovin [®] | Merial | I | - | + (Frey et al., 2002) |
| Mucosiffa [®] | | V | - | |
| Pregsure [®] | Pfizer | I | + | |
| Rispoval BVD [®] | | V | - | |
| Rispoval RS-BVD [®] | | V | - | |
| Rispoval RS-BVD-PI3 [®] | | I | - | |

Tableau 3 : Efficacité de protection fœtale des vaccins commercialisés en France

C) Les différentes stratégies de lutte contre le virus BVD

Nous avons vu des mesures sanitaires, dont la principale est l'élimination des IPI, et des mesures médicales par la vaccination. Différentes stratégies de lutte existent, mettant en œuvre l'une ou l'autre de ces mesures, voire un couplage des deux.

Les programmes de maîtrise de l'infection par le virus BVD sont mis en œuvre à l'échelle individuelle de l'élevage ou à une échelle collective de populations d'élevages.

1) Echelle individuelle

a) Cas des élevages à circulation virale démontrée

Il s'agit des troupeaux dans lesquels on a mis en évidence un ou plusieurs bovins virémiques ou des séroconversions.

Dans ce cas, la stratégie la plus pertinente consiste à coupler les deux types de mesures décrites précédemment : élimination des éventuels animaux IPI et vaccination. Cette vaccination aura alors deux objectifs : à la fois la protection clinique des animaux encore séronégatifs et la protection fœtale des vaches en début de gestation encore séronégatives, de façon à limiter la naissance de nouveaux individus IPI.

Les stratégies vaccinales vont varier en fonction des modalités de dépistage retenues au début du plan de lutte.

Si le dépistage préalable des animaux IPI a été effectué par sérologie exhaustive suivie d'une virologie sur les animaux séronégatifs, les statuts sérologiques individuels sont connus et on pourra vacciner uniquement les sujets séronégatifs. La vaccination des bovins séropositifs suite à une infection sauvage ne semble en effet pas nécessaire, étant donné que la durée des anticorps neutralisants est d'au moins trois ans, dans les conditions naturelles et en dehors de toute nouvelle exposition au virus (Fredriksen et al., 1999).

Si en revanche le dépistage des animaux IPI a été effectué par virologies successives directes sur les jeunes animaux (moins de trois ans environ), alors les statuts sérologiques individuels sont inconnus, et il semble économiquement plus avantageux d'effectuer une vaccination exhaustive systématique. Les coûts analytiques représentés par un sondage sérologique pré-vaccinal sont alors évités.

b) Cas des élevages sains à risque

Il s'agit ici des élevages ayant un fort risque d'exposition au virus BVD :

- Troupeaux comportant de nombreuses introductions d'animaux, sans quarantaine et sans contrôle à l'achat
- Elevages ayant des contacts avec d'autres bovins. Les foires et les concours constituent le risque le plus élevé puisque aucun des exposants ne peut garantir l'absence d'infection transitoire pendant la durée de la manifestation. Le voisinage peut également représenter un risque non négligeable, en particulier en période de pâturage.

- Elevages bovins dans lesquels les contacts avec d'autres espèces animales sont possibles. Le cas le plus répandu correspond aux élevages mixtes ovins-bovins.

Au sein de ce type d'élevage, la stratégie généralement conseillée utilise la vaccination comme principal support de la lutte. Des mesures sanitaires sont cependant recommandées en complément, telles que les contrôles à l'introduction, la certification des cheptels et la garantie d'animaux non IPI.

2) Echelle collective

A l'échelle collective, les stratégies de lutte sont mises en place de manière différente en fonction de la région. Ainsi la vaccination est diversement intégrée dans les programmes d'éradication.

Dans certaines régions comme la Bourgogne, la vaccination est considérée comme l'outil principal de lutte, et cette stratégie repose sur le volontariat des éleveurs.

D'autres plans combinent à la fois les mesures sanitaires de dépistage et élimination des individus IPI, et la vaccination. Il s'agit d'une stratégie couramment utilisée.

En revanche, certaines régions comme la Bretagne axent leur stratégie collective sur les mesures de dépistage et élimination des individus IPI, sans recours systématique à la vaccination, dont l'utilisation est laissée à l'appréciation des acteurs individuels (vétérinaires...).

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE

I) Objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu, la protection fœtale est devenue une indication majeure de la vaccination contre les infections par le virus BVD. Une certaine compétition s'est donc mise en place entre les différents laboratoires commercialisant des vaccins contre le BVD, avec d'un côté ceux qui ont l'AMM protection fœtale, et de l'autre ceux qui ne l'ont pas.

L'étude porte sur l'utilisation du vaccin vivant modifié Mucosiffa[®] (Merial) qui, selon l'AMM actuellement en vigueur, ne comporte que l'indication protection clinique contre les infections par le virus BVD. Une étude expérimentale (Frey et al., 2002) incluant une première injection avec Mucobovin[®] (vaccin inactivé commercialisé par le même laboratoire) et une deuxième injection avec Mucosiffa[®], a démontré une protection fœtale, mais aucun élément ne permet de dire si cette protection est permise par la première, la deuxième ou les deux injections.

Ce vaccin possédant déjà une AMM, les expérimentations démontrant son efficacité vis-à-vis de la protection clinique et son innocuité ont déjà été menées. L'objectif de l'étude est donc simple et unique : évaluer la protection fœtale induite par la vaccination avec Mucosiffa[®].

II) Matériel et méthodes

A) Animaux

L'étude porte sur 30 génisses nullipares de races Charolaise (n=22) et Salers (n=8), en bonne santé, âgées de 17 à 36 mois au début de la manipulation, et issues de trois élevages indemnes de BVDV.

Dès leur entrée dans l'expérimentation, les statuts sérologiques vis-à-vis du BVDV ont été confirmés négatifs, individuellement, à l'aide d'un kit ELISA NS3 (SERELISA BVD p80 Ab Mono Blocking[®], Synbiotics), et par séroneutralisation. La recherche individuelle de virus BVD dans le sang a également été confirmée négative par RT-PCR sur la totalité des animaux. D'autre part, les statuts sérologiques vis-à-vis de la néosporose, de la chlamyphilose et de la fièvre Q ont eux aussi été confirmés négatifs.

Le logement comprenait une stabulation libre paillée couverte et une aire d'exercice bétonnée donnant sur une auge couverte avec cornadis. La ration distribuée tout au long de l'expérimentation comprend du foin de prairie permanente à volonté et un granulé concentré pour jeunes bovins à raison de 2 kg par jour, distribué en 2 fois.

Les animaux ont été répartis en deux groupes expérimentaux, approximativement homogènes par rapport à leur race et à leur âge :

- Groupe 1 : 18 animaux vaccinés avec Mucosiffa[®]
- Groupe 2 : 12 animaux témoins

B) Vaccination

Les 18 animaux du groupe 1 ont été vaccinés avec Mucosiffa[®] (lot 5MCA 2101/0036 et lot 5MCA 2101/0071) selon le protocole AMM : une administration, à raison de 2 mL par animal, par voie intramusculaire dans l'encolure.

Ce vaccin vivant atténué est préparé à partir de la souche Oregon C24V, de génotype 1 et de biotype cytopathogène. Chaque dose de 2 mL contient une quantité de Pestivirus atténué supérieure ou égale à $10^{3.5}$ DICC₅₀.

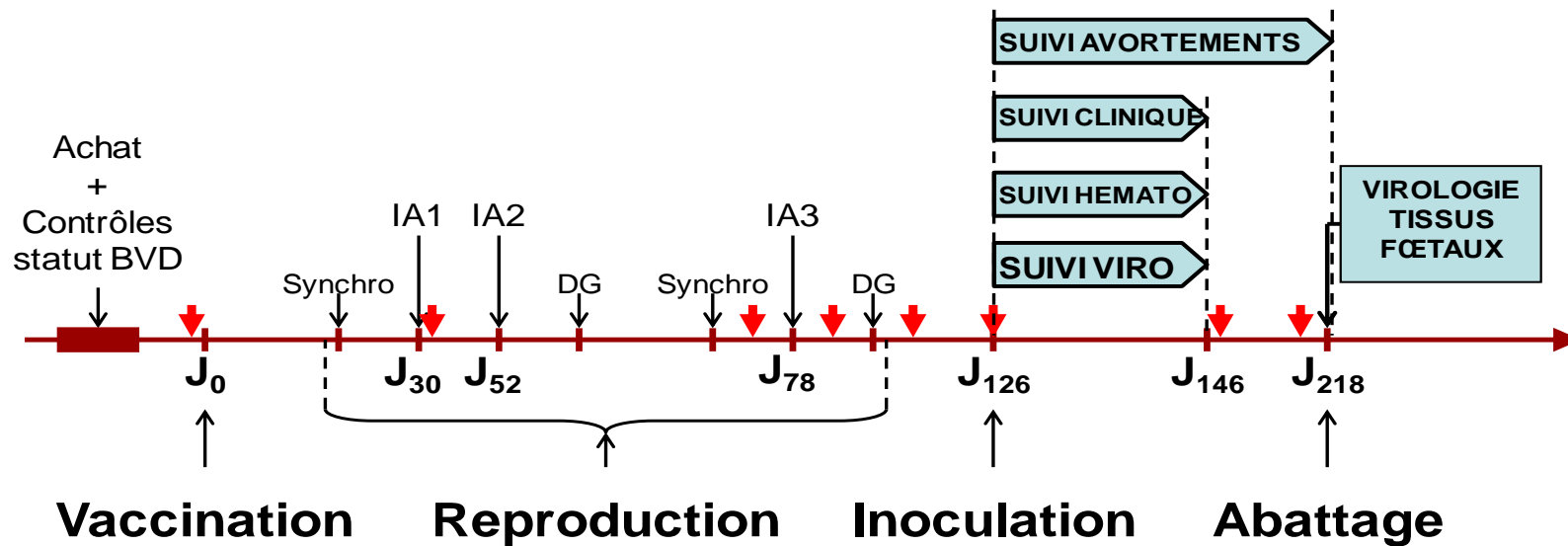
Le jour de la vaccination correspond au jour 0 de l'étude (Figure 4). L'injection a été effectuée à l'encolure, à l'aide de seringues et d'aiguilles à usage unique. Les manipulateurs étaient munis de gants à usage unique changés entre chaque animal, ainsi que de combinaisons et bottes jetables.

C) Reproduction et sélection des vaches gravides

L'objectif étant d'étudier la protection fœtale induite par le vaccin, il est indispensable d'obtenir un nombre suffisant d'animaux gravides. D'autre part, cette étape de reproduction est à envisager en relation avec l'étape future d'inoculation : l'important est ici de synchroniser le plus possible de génisses de façon à obtenir des animaux à des stades de gestation approximativement équivalents. Ainsi on pourra infecter les animaux pendant la période à risque au cours de laquelle le passage transplacentaire est susceptible de donner naissance à des veaux IPI.

Un protocole de synchronisation classique a été utilisé pour grouper les chaleurs :

- pose de spirales à imprégnation progestéronique (PRID[®], CEVA) pendant 10 jours
- injection de PGF2 α (ENZAPROST[®], CEVA) : 5 mL par animal, intramusculaire, 24 h avant le retrait des spirales
- injection de PMSG (SYNCRO-PART PMSG[®], CEVA) : 450 UI par animal, intramusculaire, le jour du retrait des spirales
- insémination artificielle 60 h après le retrait, à l'aide d'une semence de taureau Gascon indemne de virus BVD



▼ = Sérologie individuelle
 Synchro = protocole de synchronisation
 IA = insémination artificielle
 DG = diagnostic de gestation

Figure 4 : Diagramme du protocole expérimental de l'étude

Plusieurs méthodes de diagnostic de gestation ont ensuite été employées :

- Contrôle des retours en chaleur autour de 21 jours post IA

Deux génisses observées en chaleur 21 et 22 jours après l'IA1 ont donc été réinséminées (IA2).

- Dosage de la PSPB (UNCEIA...) à 31 jours post IA

La PSPB est une glycoprotéine spécifique des ruminants, sécrétée par les cellules binucléées du trophoblaste lorsque l'animal est gravide. Tout au long de la gestation, la quantité sécrétée augmente progressivement, et peut être détectée à partir de 30 jours après l'insémination fécondante. La sensibilité de ce test est de l'ordre de 85 % et il a une spécificité de près de 100 %. Cette protéine possède une demi-vie très longue, et une sécrétion résiduelle peut persister jusqu'à 100 jours après la mise-bas. Dans notre étude il s'agit de génisses, ce qui exclut tout problème de faux positif dû à une gestation antérieure.

- Echographie génitale à 37 jours post IA

A l'issue de cette première étape de reproduction, les génisses diagnostiquées vides par échographie et dosage de PSPB ont de nouveau subi un protocole de synchronisation identique au premier, à la suite duquel une IA3 a été effectuée. Cette insémination a eu lieu 48 jours après l'IA1, soit 78 jours après la vaccination.

Deux derniers diagnostics de gestation ont alors été effectués : dosage de la PSPB sur les génisses ayant subi l'IA3, puis une dernière échographie sur la totalité des animaux de l'étude.

D) Inoculation

Le jour de l'inoculation (J126) a été choisi afin que toutes les génisses se trouvent dans la fenêtre d'infection (40-120 jours) au cours de laquelle la contamination peut conduire à la naissance de veaux IPI. Les génisses se trouvaient aux stades de gestation suivants :

- 96 jours pour les mères fécondées lors de l'IA1
- 74 jours pour celles fécondées lors de l'IA2
- 48 jours pour celles fécondées lors de l'IA3

La voie intra nasale, voie naturelle de contamination lors d'infection naturelle, a été choisie pour inoculer les animaux. L'inoculum a été acheminé et conservé sous froid positif jusqu'au moment de l'instillation intra nasale. Les manipulateurs étaient munis de combinaisons à usage unique, de surbottes, et d'une paire de gants changée entre chaque animal.



Photo 1 : Inoculum conservé dans la glace



Photo 2 : Contention et inoculation intranasale

La souche d'épreuve utilisée est la souche 22146/Han 81, de génotype 1 et de biotype non cytopathogène, fournie par le Professeur Irene Greiser Wilke (Hannover Institute, Allemagne). Ce virus avait été isolé à partir d'un animal IPI en 1981, et classé dans le sous génotype BVDV 1f (Tajima *et al.*, 2001). Avant congélation, il a été répliqué par trois passages sur cellules MDBK (ATCC CCL-22) et titré par immuno-histochimie (Kramps, 1994) à $7,5 \cdot 10^7$ TCID₅₀ / mL.

Avant inoculation, la solution virale a été diluée à 10^5 TCID₅₀ / mL dans un milieu MEM. Le titre de la solution diluée a été vérifié immédiatement après inoculation intranasale, et établi à 8.10^4 TCID₅₀ / mL, ce qui est très proche du titre de départ.

La dose inoculée est de 10^6 TCID₅₀ par animal, à raison de 5.10^5 TCID₅₀ par narine.

E) Abattage des génisses

A J218, soit environ 3 mois après l'inoculation, les génisses ont été abattues et les fœtus récupérés. Les stades de gestation étaient alors les suivants :

- IA1 fécondante : 188 jours
- IA2 fécondante : 166 jours
- IA3 fécondante : 140 jours

F) Paramètres étudiés

1) Suivi sérologique

Un suivi de la réponse humorale a été effectué pendant toute la durée de l'expérimentation, par l'intermédiaire de différentes méthodes.

a) Utilisation de kits ELISA

Ces kits de détection n'ont été utilisés que ponctuellement, après la vaccination, de façon à objectiver la réponse humorale induite. Les prélèvements sanguins ont été effectués successivement 42, 77, 95 et 112 jours après la vaccination.

Deux types de tests ont été employés :

- ELISA indirect anticorps : kit HERDCHECK BVDV Antibody Test[®] (Idexx[®])
- ELISA NS2/3 : kit SERELISA BVD p80 Ab Mono Blocking[®] (Synbiotics[®])

Ces deux kits permettent d'obtenir une réponse qualitative quant à la présence ou l'absence des anticorps recherchés. Leur objectif principal était de vérifier la présence d'une réponse humorale à la vaccination, par le biais de méthodes simples, rapides et peu chères.

b) Séroneutralisation

Le suivi régulier tout au long de l'étude a été effectué par séroneutralisation. Ainsi la réponse mesurée est une réponse en anticorps neutralisants, qui sont responsables de la protection. De plus, cette méthode apporte des résultats quantitatifs. On a ainsi pu obtenir une valeur individuelle du titre en anticorps neutralisants par mois, depuis le début de l'expérimentation jusqu'à quelques jours avant l'abattage des animaux.

La réponse en anticorps neutralisants a été étudiée par des tests de séroneutralisation à quantité de virus constante (Hamers et al., 2002). Le virus utilisé pour la séroneutralisation était la souche cytopathogène BVDV-1 NADL (Gutekunst et Malmquist, 1964). Les titres en anticorps neutralisants ont été exprimés en dose effective 50 (ED₅₀, dilution effective inhibant 50% des puits infectés), calculée par la méthode de Spearman-Kärber.

2) Suivi clinique et hématologique

a) Suivi clinique, pendant les 20 jours post-inoculation

De façon à détecter toute manifestation clinique due au virus BVD, des points représentatifs à surveiller de manière biquotidienne ont été choisis : appétit, dyspnée, jetage, toux, diarrhée, écoulements vulvaires. De la même façon, un suivi de la température rectale a été effectué, avec un relevé par jour vers 19 heures.

b) Suivi des avortements, de l'inoculation jusqu'à l'abattage

A partir de l'inoculation, un suivi biquotidien a été effectué de façon à détecter tout éventuel avortement. Cela a été permis par une vérification de la présence d'écoulements vulvaires et par la recherche d'avortons ou de restes placentaires à même le sol dans l'enceinte de la stabulation expérimentale.

c) Suivi hématologique, pendant les 20 jours post-inoculation

La réponse cellulaire a également été prise en compte durant les trois semaines post-inoculation. Pour cela, une prise de sang sur tube EDTA a été effectuée toutes les 48 heures afin de déterminer les numérations cellulaires et les formules leucocytaires individuelles (MS9-5 analyser ; Melet Schloesing Laboratories).

3) Suivi virologique

a) Dans le sang des génisses, pendant les 20 jours post-inoculation

Les virémies ont été mesurées à partir de prélèvements sanguins effectués sur EDTA toutes les 48 heures. La recherche du virus a été effectuée à la fois dans les cellules sanguines et dans le plasma, par l'utilisation d'une méthode de RT-PCR quantitative en temps réel 'panpesti', inspirée des travaux de Hofmann et al., 2006.

Différentes étapes ont été nécessaires à la détection du virus.

Une centrifugation à 2500 tours par minute pendant 20 minutes a d'abord été réalisée afin de séparer les fractions cellulaire et plasmatique.

L'extraction d'ARN a été effectuée à l'aide de deux kits différents en fonction de la fraction sanguine :

- fraction plasmatique : QIA amp Viral RNA mini kit[®] (Quiagen[®])
- fraction cellulaire : RN easy kit[®] (Quiagen[®])

Les amorces 'Panpesti V-236' (TCAACTCCATGTGCCATGTAC) et 'BVD 190-F' (GRAGTCGTCAR TGGTTCGAC) ont été employées pour l'amplification, ainsi que la sonde TQ-Pesti (TGCCACGTGGACGAGGGCATGC).

Une gamme de plasmide a préalablement été réalisée de façon à établir une équivalence entre le Ct mesuré par PCR et la quantité correspondante de copies d'ARN. Pour cela le plasmide a été amplifié à partir de la souche Han 81 par les amorces Panpesti V-236 et BVD 190-F, puis cloné (Kit Topo TA Cloning, Invitrogen[®]), dosé et dilué de 10 en 10 pour obtenir une gamme

comprise entre 10^2 et 10^6 copies. Enfin le plasmide, linéarisé par l'enzyme de restriction NotI, a été rétrotranscrit (Kit Riboprobe In Vitro Transcription, Promega®). L'ARN ainsi obtenu a été dosé et dilué pour obtenir une gamme elle aussi comprise entre 10^2 et 10^6 copies.

Les ARN (échantillons et gamme) ont été amplifiés à l'aide du Kit LightCycler RNA Master HybProbe (Roche®). Le programme d'amplification, effectué sur LightCycler 480 (Roche®), est le suivant :

- Rétro-transcription : 61°C pendant 20 minutes
- Dénaturation : 95°C pendant 5 minutes
- Amplification : - 95°C pendant 15 secondes
- 60°C pendant 1 minute

L'amplification a été répétée quarante fois.

L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel LightCycler 480.

b) Dans les tissus fœtaux, après abattage des génisses

Après abattage des génisses, les utérus contenant les fœtus ont été prélevés, rigoureusement identifiés, et transportés jusqu'au laboratoire de virologie. La rate, le thymus et le cervelet des fœtus ont alors été prélevés individuellement, ainsi qu'un morceau de caroncule placentaire.

L'extraction des ARN totaux a été effectuée le jour même (kit RNeasy, Qiagen®) après broyage et homogénéisation, et les prélèvements ont immédiatement été placés à -80°C.

La recherche du virus a ensuite été effectuée par la même méthode de RT-PCR quantitative détaillée précédemment.

III) Résultats

A) Résultats de reproduction

| Nombre de génisses gravides | après IA1 | après IA2 | après IA3 | Total retenues | Total écartées |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------|----------------|
| Lot vacciné (n=18) | 10 | 2 | 1 | 13 | 5 |
| Lot non vacciné (n=12) | 8 | 0 | 1 | 9 | 3 |
| Totaux | 18 | 2 | 2 | 22 | 8 |

Tableau 4 : Bilan des résultats de reproduction

Parmi les 30 génisses initialement comprises dans l'étude, 22 seront donc retenues à l'issue de la première étape de reproduction : 13 dans le groupe vacciné, et 9 dans le groupe témoin.

B) Résultats sérologiques

1) Kits ELISA

Tous les animaux du groupe 1 (vacciné) étaient séropositifs aux quatre tests ELISA effectués à partir d'un mois après la vaccination, que ce soit en recherche d'anticorps totaux ou en recherche d'anticorps anti-NS2/3.

Tous les animaux du groupe 2 (témoin) étaient séronégatifs aux tests de recherche d'anticorps anti-NS2/3 (Kit SERELISA BVD p80 Ab Mono Blocking[®], Synbiotics) réalisés à partir d'un mois après la vaccination, mais 2 génisses se sont révélées faiblement séropositives en anticorps totaux (Kit HERDCHECK BVDV Antibody Test[®], Idexx), 32 jours avant l'inoculation. Ces deux animaux ont été confirmés séronégatifs par séroneutralisation à la même date, ce qui nous permet d'attribuer ces résultats faiblement positifs à un probable défaut de spécificité du test.

2) Détection des anticorps neutralisants

Les résultats de la séroconversion sont présentés à la figure 5. Les titres en anticorps neutralisants obtenus ont été convertis en \log_2 .

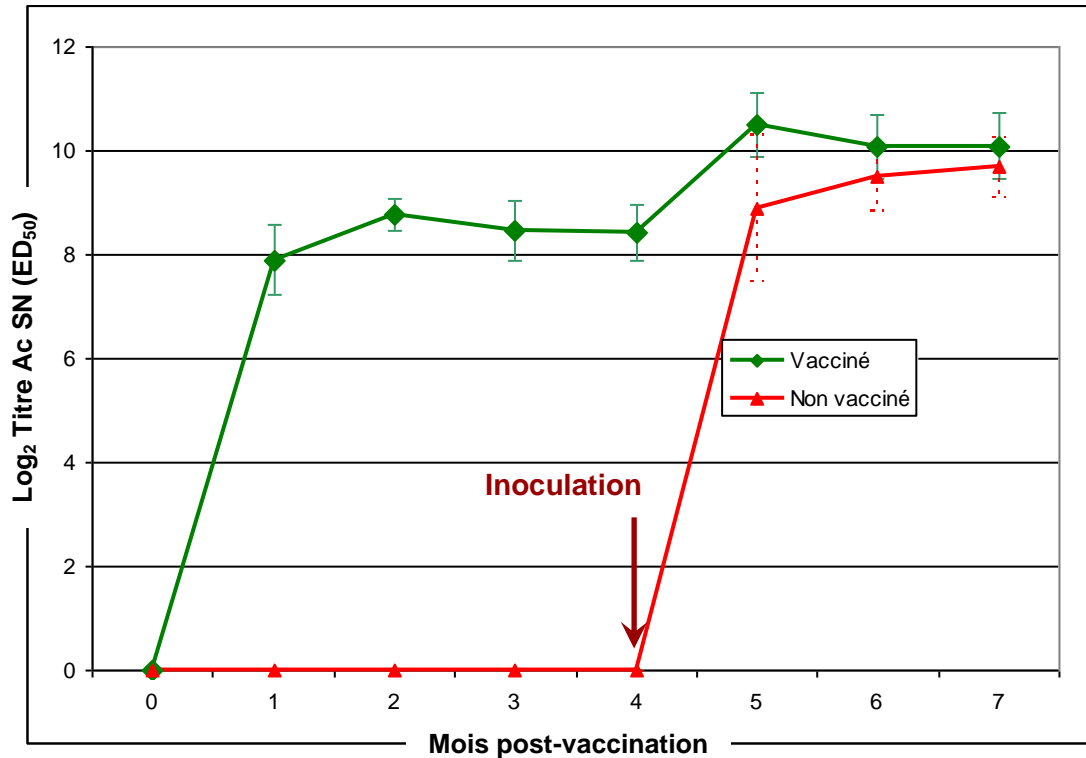


Figure 5 : Evolution de la moyenne des titres en anticorps neutralisants

Quatre semaines après la vaccination, tous les animaux du groupe 1 avaient des titres élevés en anticorps neutralisants, avec une moyenne à $7.9 \pm 0.7 \log_2 ED_{50}$. Cette valeur est restée constante à environ 4 log jusqu'à l'inoculation, suite à laquelle une augmentation d'environ 0.5 log a été observée.

Dans le groupe 2, aucun anticorps n'a été détecté jusqu'à l'épreuve virale. Quatre semaines après l'inoculation, une forte augmentation du titre en anticorps neutralisants a été observée dans ce groupe non vacciné, jusqu'à atteindre les mêmes ordres de grandeur que le groupe vacciné. Suite à cela, le titre moyen reste légèrement supérieur pour les animaux vaccinés, mais on observe une tendance à s'harmoniser au bout de deux mois. Aucune baisse du titre en anticorps neutralisants n'a été observée au cours de l'étude.

On peut également noter la forte homogénéité de la réponse en anticorps neutralisants entre les individus (écarts types faibles).

C) Suivi des avortements

Deux avortements ont été observés au cours de l'expérimentation :

- 48 jours après inoculation (animal n°411)

Il concerne une génisse du groupe témoin. Des écoulements vulvaires hémorragiques ont été observés, et un avorton a été trouvé au sol. Les analyses virologiques par RT-PCR quantitative en temps réel sur cet avorton ont mis en évidence la présence de virus BVD dans la rate en quantité marquée (Tableau 5). Par ailleurs, d'autres causes possibles d'avortement ont été écartées par la recherche directe de différents agents pathogènes : *Chlamydomphila abortus*, *Coxiella burnetii*, *Neospora caninum*, *Leptospira interrogans* et *Toxoplasma gondii*. Ces analyses ont été effectuées par PCR quantitative (Laboratoire Vétérinaire Départemental du Tarn et Garonne) et se sont toutes révélées négatives.

- 62 jours après inoculation (animal n°4861)

Il concerne une génisse du groupe vacciné. Des écoulements vulvaires séro-hémorragiques en très faible quantité ont été notés, mais aucun avorton n'a été retrouvé au sol. Aucune analyse virologique n'a donc pu être effectuée dans ce cas-là, et il est impossible de conclure quant au rôle du virus BVD dans cet avortement. Il est même très difficile d'affirmer qu'il s'agit d'un avortement, et non d'écoulements sanguins consécutifs aux chaleurs de l'animal, dont le diagnostic de gestation aurait été erroné. Cette génisse ne pourra donc pas être prise en compte dans les résultats de l'étude.

Son statut virémique a toutefois été confirmé négatif par RT-PCR le jour de la découverte des écoulements. Des analyses sérologiques ont également été effectuées pour écarter des maladies telles que la fièvre Q, la néosporose et la chlamydomphiloze. Les résultats étaient négatifs pour les deux premiers, mais cet animal était faiblement positif en anticorps contre la chlamydomphiloze le jour de l'avortement, ainsi qu'un mois avant. Ces résultats peuvent être expliqués de plusieurs façons. Il peut tout d'abord s'agir d'un problème de spécificité du test sérologique utilisé. Ceci serait conforté par le fait que la chlamydomphiloze ne provoque que de

très rares avortements dans l'espèce bovine, contrairement aux ovins. On peut aussi attribuer ces résultats à une réelle implication de *Chlamydomphila abortus* dans l'éventuel avortement de cet animal, ce qui confirmerait une absence d'implication du virus BVD. Dans tous les cas il est impossible de conclure quant à l'origine de ces écoulements, et la génisse a été écartée de l'étude.

D) Etude de la réponse clinique

Aucun signe clinique n'a été observé au cours des trois semaines post-inoculation, que ce soit chez les génisses du lot témoin ou du lot vacciné.

De la même façon, la moyenne des températures rectales de chacun des deux groupes expérimentaux n'a pas révélé de différence significative.

E) Résultats hématologiques

Les figures 6 et 7 représentent les résultats des numérations leucocytaires.

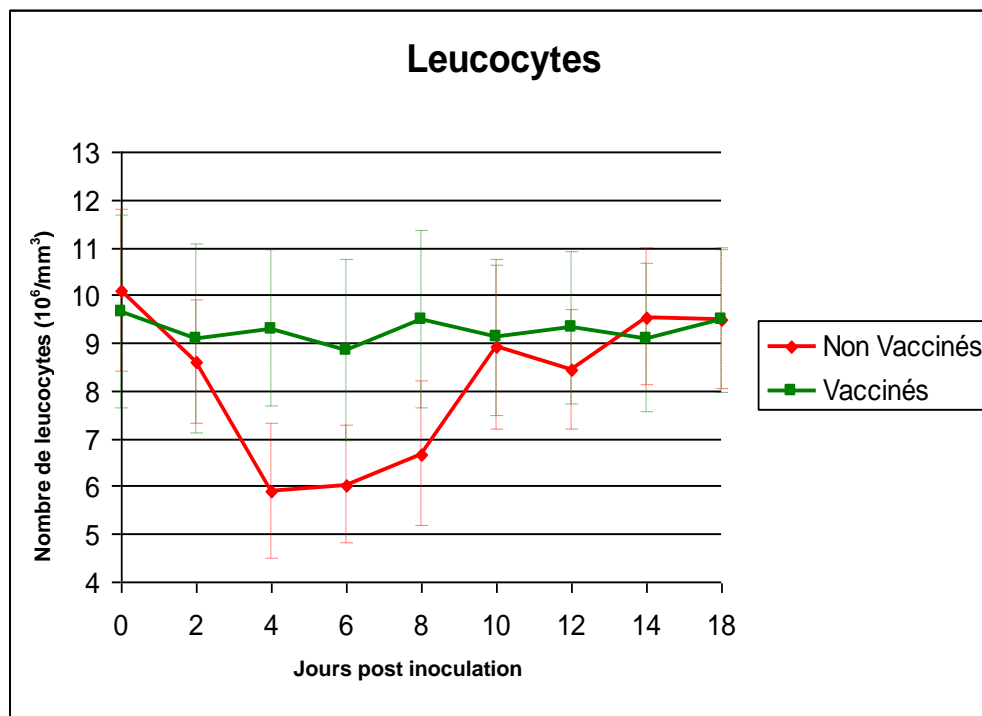


Figure 6 : Evolution du nombre de leucocytes après infection

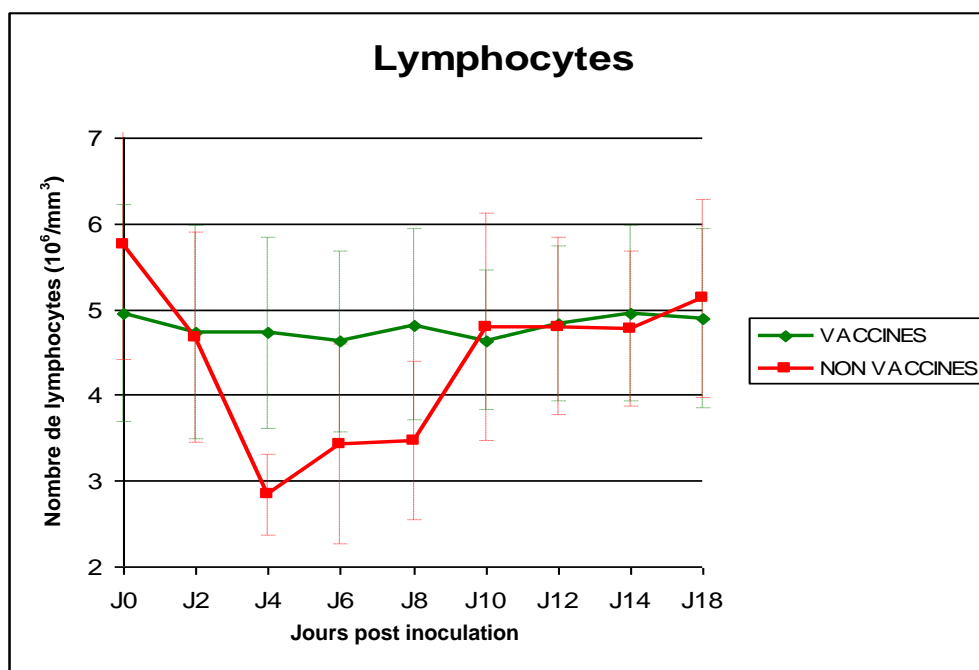


Figure 7 : Evolution du nombre de lymphocytes après infection

Chez les animaux non vaccinés, on observe une diminution nette des leucocytes totaux entre 2 et 10 jours après l'infection (Figure 6), principalement caractérisée par une lymphopénie (Figure 7). A J0 (inoculation), le nombre moyen leucocytes était de $10.1 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$ (extrêmes : 6.1 et 15.3) et a atteint son plus bas niveau au jour 4 post-inoculation : $5.9 \cdot 10^6$ leucocytes / mm^3 (extrêmes : 4 et 8.7).

De la même façon, le nombre moyen de lymphocytes est passé de $5.7 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$ (extrêmes : 3.8 et 10.8) le jour de l'inoculation, à $2.8 \cdot 10^6 / \text{mm}^3$ (extrêmes : 2 et 3.6) 4 jours après.

A l'opposé, aucune diminution du nombre de leucocytes totaux n'a été observée chez les animaux vaccinés.

Les différences de moyennes du nombre de leucocytes et de lymphocytes entre le lot témoin et le lot vacciné sont significatives (anova pour données répétées avec correction de Bonferroni, dont le seuil de significativité α a été fixé à 0.0001) entre J4 et J8 post-inoculation.

En revanche, aucune différence significative n'a été observée pour les autres paramètres : granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), monocytes, hématies, plaquettes.

F) Suivi virologique

1) Dans le sang des génisses

On note tout d'abord une absence de virémie dans le plasma et la fraction cellulaire pour les génisses préalablement vaccinées avec Mucosiffa®.

Le graphique de la figure 8 représente la moyenne des charges virales mesurées en fonction du temps, dans le plasma et la fraction cellulaire des animaux du groupe témoin :

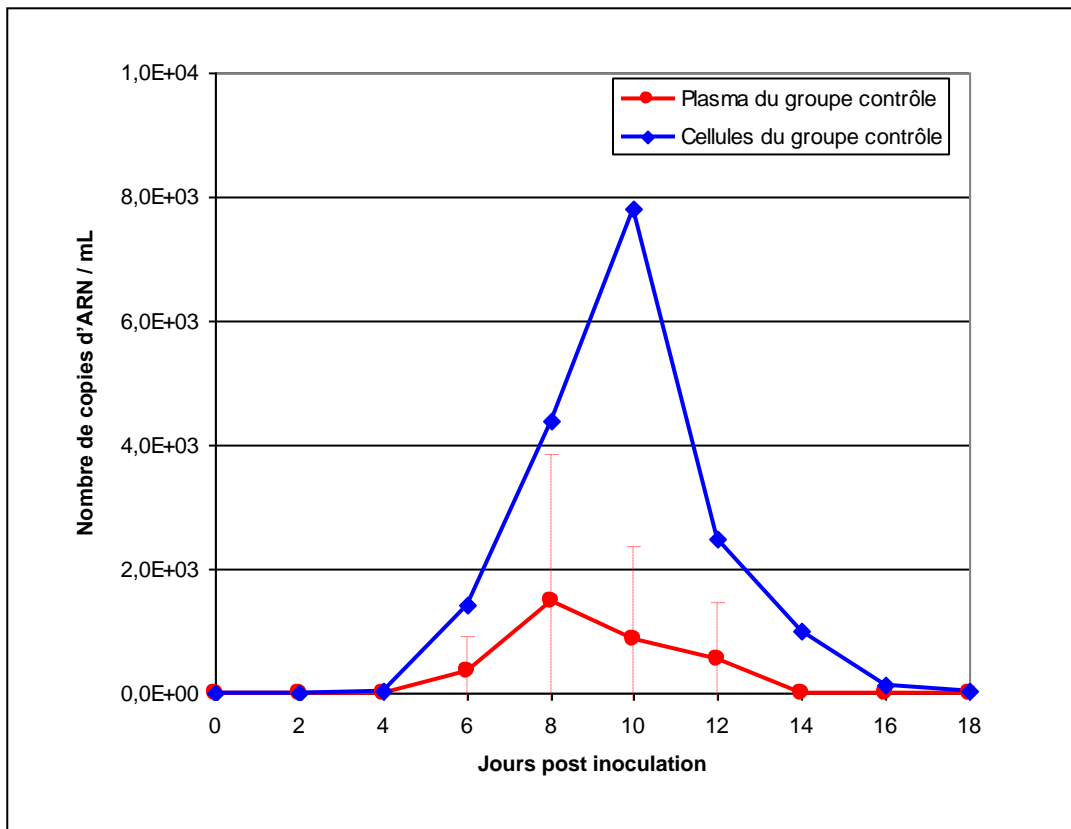


Figure 8 : Evolution de la virémie après infection

Le virus BVD a été mis en évidence dans le sang des génisses non vaccinées entre le sixième et le quatorzième jour post-inoculation, avec des titres faibles. La plus haute moyenne a été atteinte au huitième jour post-inoculation pour la fraction plasmatique avec $1,5 \cdot 10^3$ copies par millilitre de sang (extrêmes : 0 et $1,5 \cdot 10^4$), et au dixième jour pour la fraction cellulaire avec

7.8 10³ copies par millilitre de sang (extrêmes : 0 et 5 10⁵). Individuellement, les résultats de virémie sont très variables d'un animal à l'autre. Ainsi pour la fraction cellulaire, cinq génisses sur huit sont restées positives pendant au moins deux jours, alors que les trois autres n'étaient que faiblement positives. De la même façon pour la fraction plasmatique, une génisse est restée négative après l'inoculation, et seulement deux animaux se sont révélés clairement positifs. Malgré cette variabilité individuelle, étant donné qu'aucun des animaux du groupe vacciné n'a présenté de virémie positive, la différence entre les deux groupes est significative.

Par ailleurs le virus a été détecté à des titres plus élevés dans la fraction cellulaire que dans fraction plasmatique, mais la différence n'est pas significative (anova).

2) Dans les tissus fœtaux

Le jour de l'abattage, les génisses ont été testées négatives en BVDV dans le sang, par RT-PCR.

A l'issue de l'abattage, 23 fœtus ont été récupérés. Ceci est dû au fait que la génisse n°419 (lot vacciné) a donné des triplés (notés 419a, 419b et 419c dans le tableau 5).

Un fœtus de 188 jours né de mère non vaccinée était anormal : la longueur atlo-caudale était de 34 cm, alors que la moyenne pour les autres fœtus du même âge était de 45 cm (extrêmes : 40 à 53). Il présentait une coloration jaune diffuse, un œdème sous-cutané, une décoloration du foie, des reins et de la rate.

Les résultats des virologies (RT-PCR en temps réel) sur les tissus fœtaux sont synthétisés dans le tableau 5. Les organes de tous les fœtus issus de mères vaccinées avec Mucosiffa[®] sont vironégatifs. En revanche ceux de tous les fœtus issus de mères non vaccinées sont positifs avec des charges virales élevées, dont les moyennes sont de 3.05 10⁵, 4.60 10⁴ et 1.95 10⁶ copies d'ARN viral par gramme d'ARN total, respectivement dans la rate, le thymus et le cervelet.

Le virus a également été détecté dans les placentas des mères non vaccinées.

| Lot | Fœtus (numéros des mères) | Rate | Thymus | Cervelet |
|---------|----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| VACCINÉ | 386 | NEG | NEG | NEG |
| | 388 | NEG | NEG | NEG |
| | 389 | NEG | NEG | NEG |
| | 405 | NEG | NEG | NEG |
| | 414 | NEG | NEG | NEG |
| | 419a | NEG | NEG | NEG |
| | 419b | NEG | NEG | NEG |
| | 419c | NEG | NEG | NEG |
| | 1215 | NEG | NEG | NEG |
| | 5611 | NEG | NEG | NEG |
| | 5633 | NEG | NEG | NEG |
| | 5639 | NEG | NEG | NEG |
| | 6088 | NEG | NEG | NEG |
| | 6986 | NEG | NEG | NEG |
| | 7703 | NEG | NEG | NEG |
| TEMOIN | 384 | 1.63 10 ⁵ | 2.44 10 ⁵ | 2.13 10 ⁶ |
| | 393 | 5.11 10 ³ | 1.33 10 ⁴ | 1.57 10 ⁶ |
| | 408 | 2.11 10 ² | 2.34 10 ² | 8.83 10 ³ |
| | 4611 | 6.20 10 ³ | 1.46 10 ⁴ | 3.55 10 ⁶ |
| | 5613 | 4.35 10 ⁵ | 3.83 10 ⁴ | 6.81 10 ³ |
| | 6089 | 8.70 10 ⁵ | 3.40 10 ⁴ | 5.65 10 ⁶ |
| | 7699 | 5.21 10 ⁵ | 2.32 10 ⁴ | 6.52 10 ⁵ |
| | 7700 | 4.42 10 ⁵ | 2.21 10 ² | 2.00 10 ⁶ |
| | 411 (Avortement 48 j post-inoc.) | 3.10 10 ⁵ | n.d. | n.d. |
| | Moyenne lot témoin | 3.05 10 ⁵ | 4.60 10 ⁴ | 1.95 10 ⁶ |

Tableau 5 : Charges virales sur tissus fœtaux le jour de l'abattage
(exprimées en nombre de copies d'ARN viral par gramme d'ARN total)

IV) Discussion

Plusieurs points de méthodologie peuvent faire l'objet d'une discussion, à commencer par les résultats de la reproduction des génisses. La première insémination a donné lieu à 18 fécondations pour 30 animaux concernés, soit 60 % de réussite en première IA. Il s'agit d'un bon résultat, montrant que le choix du protocole de synchronisation était adéquat. En revanche, les résultats de la troisième IA après mise en place du même protocole de synchronisation sont plus médiocres, avec seulement 2 animaux gravides sur 10, soit un taux de réussite de 20 %. A l'issue des trois séries d'inséminations artificielles, 22 animaux sur 30 étaient gravides, ce qui donne un taux de réussite global de 73.3 %. Il s'agit d'un résultat moyen, en comparaison avec les autres études menées sur le sujet. On n'accordera pourtant que peu d'importance à ces taux de réussite chiffrés, le but étant d'atteindre les effectifs minimums requis dans ce type d'expérimentation, soit 12 animaux dans le groupe vacciné et 7 animaux dans le groupe témoin. L'objectif est donc atteint pour ce qui est des résultats de reproduction.

Le choix des méthodes de suivi sérologique mérite également d'être abordé. Le procédé de référence choisi est la séroneutralisation, méthode quantitative permettant un suivi du titre en anticorps séroneutralisants tout au long de l'expérimentation, et autorisant donc une comparaison entre les différentes étapes de l'étude. L'intérêt de l'utilisation de cette méthode réside dans le fait que les anticorps neutralisants sont les anticorps protecteurs contre une infection par le virus BVD, et donc les principaux effecteurs de la réponse humorale.

Il ne faut toutefois pas oublier le rôle de la réponse cellulaire, qui n'a pas été étudiée dans ce travail. En effet, une infection primaire par le BVDV entraîne une réponse immunitaire à médiation cellulaire capable d'éliminer le virus en deux à trois semaines. De plus, les populations de lymphocytes T, combinées à l'action des anticorps neutralisants, contribuent à une élimination rapide du BVDV après exposition secondaire au virus (Silflow et al., 2005).

Le choix d'utiliser en parallèle des tests ELISA qualitatifs est basé sur un souci de simplification et de gain de temps lors de la vérification de la réponse humorale après vaccination, et de la non séroconversion du lot non vacciné jusqu'à l'inoculation.

Le choix d'abattre les génisses avant le terme de la gestation et de rechercher le virus sur les tissus fœtaux peut aussi faire l'objet d'une discussion. En effet, l'observation de la protection clinique ne peut pas être effectuée jusqu'à la fin de la gestation. En particulier, la possibilité d'avoir des avortements dans le lot vacciné ne peut pas être contrôlée. Un bon nombre d'études sur le sujet comprennent un protocole dans lequel les animaux mettent bas naturellement et les analyses ont lieu sur les veaux nouveau-nés avant prise colostrale. De plus en plus d'auteurs emploient cependant un protocole avec récupération des fœtus avant terme, soit par abattage des mères (Fairbanks et al., 2004 ; Kovacs et al., 2003 ; Brock et al., 2001) soit par césarienne (Grooms et al., 2007). Notre objectif est de définir si les produits des génisses sont infectés permanents ou non. Il faut donc se trouver assez longtemps après l'infection. Ainsi dans notre étude, les fœtus ont été récoltés 91 jours après l'inoculation. De cette façon, les individus positifs le sont forcément depuis une longue durée, ce qui élimine une infection transitoire et confirme leur statut IPI.

Ceci n'élimine pas la possibilité d'une infection transitoire par une souche différente de celle utilisée pour l'épreuve, quelques jours avant l'abattage des génisses. Pour s'assurer qu'un tel phénomène ne se produise pas, le seul moyen serait d'effectuer un séquençage de la souche retrouvée dans les tissus fœtaux, pour la comparer à la souche d'épreuve. Malgré tout, la mise en œuvre de cette étape supplémentaire ne se justifiait pas dans le protocole de notre expérimentation, étant donné les mesures sanitaires strictes adoptées afin d'éviter toute contamination exogène.

Plusieurs points permettent de valider le modèle expérimental mis en place, ainsi que les résultats obtenus dans notre étude.

Premièrement, la totalité des témoins et de leurs fœtus ont été infectés. Ceci est démontré par plusieurs résultats, que nous allons discuter successivement : présence de virémie, détection d'une réponse forte en anticorps neutralisants, et obtention de 100 % de veaux IPI.

La virémie mesurée après infection chez les génisses du groupe témoin a révélé des charges virales relativement faibles s'étalant autour de 10^3 copies d'ARN par millilitre de sang, avec un pic légèrement inférieur à 10^4 . Ces résultats pourraient être interprétés par le choix d'une dose virale inoculée trop faible. L'infection a été effectuée par instillation de 5.10^5 TCID₅₀ par

narine pour chaque génisse, soit 10^6 TCID₅₀ par animal. L'analyse des autres études menées sur le sujet montre que les doses utilisées sont en général comprises entre 10^4 et $10^{6.5}$ TCID₅₀ (Dean et al., 2003 ; Frey et al., 2002 ; Cortese et al., 1998a ; Zimmer et al., 2002 ; Kovacs et al., 2003 ; Fairbanks et al., 2004 ; Ficken et al., 2006). La valeur choisie dans notre étude se situe donc dans la moyenne par rapport aux protocoles couramment utilisés dans ce domaine. Ces virémies faibles pourraient également être expliquées par la moindre efficacité des infections expérimentales par rapport aux infections naturelles à partir de virus sauvages. De plus les souches virales couramment utilisées pour les inoculations expérimentales sont beaucoup moins virulentes et n'entraînent que des formes cliniques très discrètes, accompagnées de virémies faibles.

La plupart des études sur le sujet révèlent des virémies inférieures à $10^{3.5}$ TCID₅₀/mL après infection expérimentale (Makoschey et al., 2001 ; Kelling et al., 2007). Ces valeurs mesurées par le biais de cultures cellulaires ne peuvent être comparées à nos résultats obtenus par PCR, mais on peut toutefois affirmer qu'il s'agit là aussi de virémies faibles. Les charges virales sanguines faibles après inoculation ne semblent donc pas représenter un point négatif dans notre étude. Par ailleurs les quantités de virus mesurées ultérieurement dans les tissus fœtaux sont élevées (entre 10^4 et 10^6 copies d'ARN viral par gramme d'ARN total), ce qui montre que la virémie induite a suffi à provoquer un passage viral transplacentaire.

La réponse en anticorps neutralisants après infection permet également de valider le modèle expérimental : la souche virale utilisée ainsi que les méthodes d'inoculation employées (instillation intra-nasale) ont induit rapidement des taux d'anticorps neutralisants élevés chez les animaux non vaccinés (Figure 5).

L'obtention de 100 % de veaux IPI chez les génisses du groupe témoin valide également les résultats. Ce dernier point n'est pas toujours observé dans les différents travaux menés sur le sujet. Ainsi, seulement 18 génisses sur les 19 du groupe témoin (soit 95 % environ) ont donné naissance à des IPI après inoculation avec une souche de BVDV de type 2 entre 62 et 104 jours de gestation (Ficken et al., 2006). De la même façon, seulement 4 des 6 génisses du groupe témoin ont donné naissance à des veaux IPI après inoculation entre 25 et 80 jours de gestation (Brownlie et al., 1995).

Deuxièmement, la vaccination a entraîné une protection clinique et fœtale. Ceci a été démontré par plusieurs résultats : présence d'une réponse en anticorps neutralisants après vaccination, absence de virémie après inoculation chez les génisses vaccinées, et obtention de 100 % de veaux sains non IPI.

La réponse en anticorps neutralisants après vaccination est satisfaisante (Figure 5) : elle démontre la capacité du vaccin à induire rapidement des taux élevés (jusqu'à 8 log₂), similaires à ceux obtenus après une infection expérimentale. Par ailleurs au même moment, aucun anticorps neutralisant n'a été détecté chez les animaux non vaccinés.

L'absence de virémie après inoculation sur la totalité des animaux du groupe vacciné, valide également le modèle utilisé. Par ailleurs la sensibilité élevée du test de détection utilisé (RT-PCR quantitative) renforce ces résultats (Hoffmann et al., 2006).

Enfin, l'obtention de 100 % de veaux non IPI chez les génisses vaccinées constitue un excellent résultat et valide l'objectif initial de démonstration de protection fœtale. Ces données sont renforcées par la grande variabilité des résultats de protection fœtale (de 58 à 100 % pour les vaccins vivants atténués) obtenus jusqu'alors dans les différents travaux mis en place sur le sujet (Cf. Première partie, III/, B/, 3/, b/).

Le caractère vivant du vaccin Mucosiffa[®] participe beaucoup à l'obtention de tels résultats. Ces vaccins induisent une réponse rapide et durable en anticorps neutralisants, et donc une protection plus efficace que les vaccins inactivés. Malgré tout, comme nous l'avons décrit précédemment (Première partie, III/, B/, 3/, a/), ils possèdent des inconvénients, représentés par des problèmes d'innocuité. En particulier, en cas de vaccination pendant la gestation, ils présentent un risque potentiel d'infection du fœtus par réversion de virulence et passage transplacentaire. Cependant la souche contenue dans le vaccin Mucosiffa[®] est une souche cytopathogène. Or dans l'état actuel des connaissances, une souche appartenant à ce biotype n'est pas capable de traverser la barrière placentaire (Tableau 1) ni de diffuser dans l'organisme après vaccination.

Ainsi cette spécialité paraît remplir les critères d'innocuité nécessaires. Pourtant les risques liés au caractère vivant de la souche, bien que très faibles, ont conduit à déconseiller la vaccination durant les deux premiers tiers de la gestation. Ils ont également mené certains

auteurs à mettre en place un protocole combinant les deux types de vaccins (Frey et al., 2002) : primovaccination à l'aide d'un vaccin inactivé (Mucobovin[®], Merial) suivie d'un rappel avec Mucosiffa[®], vaccin vivant atténué. Cette étude a abouti à la naissance de 100 % de veaux sains chez les génisses vaccinées, et 100 % de veaux IPI dans le groupe témoin, soit une protection fœtale optimale. On combine ainsi l'innocuité du vaccin inactivé, avec l'efficacité protectrice du vaccin vivant.

Dans notre étude, la souche vaccinale et la souche d'épreuve n'appartiennent pas au même sous-groupe au sein du génotype 1 (respectivement 1a et 1f). Les résultats exposés montrent donc l'efficacité de la protection fœtale hétérologue permise par Mucosiffa[®], contre une infection par une souche du même génotype, mais antigéniquement distincte.

Nous avons vu précédemment que les études en matière de protection fœtale hétérologue contre une souche de génotype différent sont rares, et les résultats d'efficacité globalement médiocres (Première partie, III/, B/, 3/, b/, (iii)). Toutefois l'étude précédemment décrite combinant Mucosiffa[®] et Mucobovin[®] (deux vaccins contenant une souche de génotype 1) met en évidence une protection fœtale complète contre une inoculation d'épreuve avec un mélange de BVDV-1 et BVDV-2 (Frey et al., 2002). En association avec un vaccin inactivé, l'utilisation de Mucosiffa[®] entraîne donc une protection fœtale croisée contre une souche de BVDV de génotype 2.

Qu'en est-il de la protection fœtale hétérologue permise par Mucosiffa[®] seul, contre une souche de génotype 2 ? Cette question pourrait trouver réponse dans une autre étude, combinant une vaccination avec Mucosiffa[®] et une épreuve virulente à l'aide d'une souche BVDV de type 2. Plus simplement, on pourrait aussi tester la capacité du sérum d'animaux vaccinés à neutraliser un virus de type 2. Pour cela, on pourrait envisager d'utiliser le sérum des génisses vaccinées lors de notre étude, et d'effectuer une séroneutralisation à l'aide d'une souche virale de génotype 2.

L'intérêt scientifique de ces études paraît grand, mais la justification pratique de la mise en place de tels travaux est discutable dans le contexte européen. En effet, les différentes souches de virus BVD mises en évidence sur ce continent appartiennent en grande majorité au génotype 1. Dans la situation épidémiologique actuelle, il ne semble donc pas indispensable de démontrer l'efficacité de protection fœtale hétérologue des vaccins mis sur le marché. La

situation est différente en Amérique du Nord, où l'on met en évidence approximativement autant de souches de génotype 1 que de souches de génotype 2. Le choix de développer des spécialités vaccinales contenant une souche capable d'apporter une protection fœtale hétérologue paraît donc ici beaucoup plus pertinent. A l'heure actuelle, compte tenu de la diversité des résultats d'efficacité obtenus dans ce domaine, la majorité des travaux sont menés avec des vaccins contenant à la fois une souche de type 1 et une souche de type 2.

Au final, l'objectif initial de notre travail est atteint : par le biais d'un protocole expérimental validé, nous avons démontré grâce à des résultats sérologiques et virologiques que la vaccination avec Mucosiffa[®] entraîne une protection fœtale complète.

CONCLUSION

Ce travail, par l'intermédiaire d'une étude expérimentale validée, montre l'efficacité optimale de la protection fœtale induite par la vaccination avec Mucosiffa[®]. Il clôt un long parcours emprunté par la firme qui le commercialise, concurrencée par d'autres laboratoires ayant déjà mis sur le marché des vaccins dont l'AMM contient une indication de protection fœtale. En effet avec Mucosiffa[®], Merial a été un des premiers à sortir un vaccin BVD. Mais avec l'étude plus approfondie sur la maladie, et en particulier son épidémiologie, les exigences en termes de vaccination ont évolué. Ainsi, après la mise sur le marché des vaccins Bovilis BVD[®] et Pregsure[®], l'utilisation du vaccin Mucosiffa[®] « ancienne génération » avait progressivement diminué. Dans un contexte très concurrentiel, cette étude représente donc un nouveau point d'appui dans la « course » à l'obtention de l'AMM protection fœtale, à laquelle se livrent les principaux laboratoires fabricants de vaccins.

Ces résultats ne doivent pas nous faire oublier l'importance de la mise en œuvre des mesures sanitaires dans les protocoles d'éradication du virus BVD. L'élimination des animaux IPI doit en effet rester une des premières règles à respecter, en association avec la vaccination.

Dans le contexte épidémiologique rencontré outre-Atlantique, cette étude, associée aux nombreux autres travaux publiés ces dernières années sur la protection fœtale vaccinale, ouvre des perspectives d'expérimentations dont l'objectif serait de mettre au point un vaccin avec l'indication de protection fœtale hétérologue contre une souche virale de génotype différent.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mr Dominique, ROUX

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 Juillet 2007

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

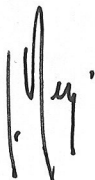
Je soussigné, Gilles MEYER, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :

Mr Dominique, ROUX

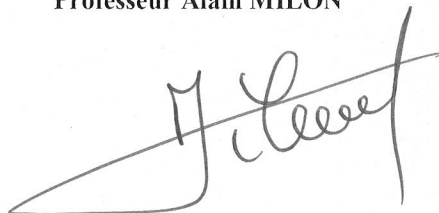
intitulée :

« Infection expérimentale par le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) : Evaluation de la protection fœtale induite par un vaccin vivant atténué »

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Gilles MEYER**



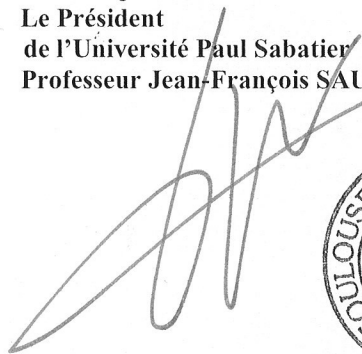
**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jacques IZOPET**



**Vu le : 5 - DEC. 2007
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **BAKER, J.C.** Bovine viral diarrhea virus: A review. *J Am Vet Med Assoc*, 1987, **190**, 1499-1458.
2. **BAKER, J.C.** The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1995, **11**(3), 425-445.
3. **BEER, M., WOLF, G., PICHLER, J., et al.** Cytotoxic T-lymphocyte responses in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*, 1997, **58**, 9-22.
4. **BEER, M., HEHNEN, H.R., WOLFMAYER, A., et al.** A new inactivated BVDV genotype I and II vaccine. An immunisation and challenge study with BVDV genotype I. *Vet Microbiol*, 2000, **77**, 195-208.
5. **BOLIN, S.R., et al.** Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhea virus, 1985, *Am J Vet Res*, **46**, 573-576.
6. **BOLIN, S.R., RIDPATH, J.F.** Specificity of neutralizing and precipitating antibodies induced in healthy calves by monovalent modified-live bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am J Vet Res*, 1989, **50**, 817-821.
7. **BOLIN, S.R., RIDPATH, J.F.** Range of viral neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhea virus vaccines. *Am J Vet Res*, 1990, **51**, 703-707.
8. **BOLIN, SR.** The pathogenesis of mucosal disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1995a, **11**(3), 489-500.
9. **BOLIN, SR.** Control of bovine viral diarrhea infection by use of vaccination. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1995b, **11**(3), 615-625.
10. **BOLIN, S.R., RIDPATH, J.F.** Assessment of protection from systemic infection or disease afforded by low to intermediate titers of passively acquired neutralizing antibody against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am J Vet Res*, 1995c, **56**, 755-759.
11. **BOLIN, SR., GROOMS, DL.** Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2004, **20**(1), 51-68.
12. **BROCK, K.V., CHASE, C.C.L.** Development of a fetal challenge method for the evaluation of bovine viral diarrhea virus vaccines. *Vet Microbiol*, 2000, **77**, 209-214.

13. **BROCK, K.V., CORTESE, V.S.** Experimental fetal challenge using type II bovine viral diarrhoea virus in cattle vaccinated with modified-live virus vaccine. *Veterinary Therapeutics*, 2001, **2**, 354-360.

14. **BROCK, K.V., et al.** Protection against fetal infection with either bovine viral diarrhoea virus type 1 or type 2 using a noncytopathic type 1 modified live virus vaccine. *Vet Ther*, 2006, **7**, 27-34.

15. **BROWNLIE, J., CLARKE, M.C., HOWARD, C.J.** Experimental production of fatal mucosal disease in cattle, 1984, *Vet Rec*, **114**, 535-536.

16. **BROWNLIE, J., CLARKE, M.C., HOOPER, L.B., BELL, G.D.** Protection of the bovine fetus from bovine viral diarrhoea virus by means of a new inactivated vaccine. *Vet Record*, 1995, **137**, 58-62.

17. **CHAPPUIS, G.** Caractéristiques du virus BVD-MD. *Bull Group Tech Vet*, 1993, **446**, 7-10.

18. **CHASTANG, S., MAILLARD, R.** BVD et troubles de la reproduction. *Point Vet*, 1999, **30**, 59-66.

19. **CORTESE, V.S., ELLIS, J., WHITTAKER, R., et al.** BVD virus transmission following attenuated vaccines to BVDV seronegative cattle. *Larg Anim Pract*, 1997, 18-24.

20. **CORTESE, V.S., GROOMS, D.L., ELLIS, J., et al.** Protection of pregnant cattle and their fetuses against infection with bovine viral diarrhoea virus type 1 by use of a modified-live virus vaccine. *Am J Vet Res*, 1998a, **59**, 1409-1413.

21. **CORTESE, V.S., WEST, K.H., HASSARD, L.E., et al.** Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc*, 1998b, **213**, 1312-1319.

22. **CORTESE, V.S., WHITTAKER, R., ELLIS, J., et al.** Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea. *Am J Vet Res*, 1998c, **59**, 848-850.

23. **DEAN, H.J., LEYH, R.** Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge. *Vaccine*, 1999, **17**, 1117-1124.

24. **DEAN, H.J., HUNSAKER, B.D., BAILEY, O.D., WASMOEN, T.** Prevention of persistent infection in calves by vaccination of dams with noncytopathic type-1 modified-live bovine viral diarrhoea virus prior to breeding. *Am J Vet Res*, 2003, **64**, 530-537.

25. **DOUART, A., SIMON, A.** Diagnostic et contrôle de l'infection par le BVD. *Point Vét*, 1997, **28**, 85-93.
26. **ELLIS, J., et al.** Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine viral diarrhoea virus type II. *Can J Vet Res*, 1998, **62**, 161-169.
27. **ELLIS, J., WEST, K., CORTESE, V., et al.** Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea virus type II in young calves. *J Am Vet Med Assoc*, 2001, **219**, 351-356.
28. **ENDSLEY, J.J., ROTH, J.A., RIDPATH, J., NEILL, J.** Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*, 2003, **31**, 123-125.
29. **FAIRBANKS, K., SCHNACKEL, J., CHASE, C.C.** Evaluation of a modified live virus type-1a bovine viral diarrhoea virus vaccine (Singer strain) against a type-2 (strain 890) challenge. *Vet Ther*, 2003, **4**, 24-34.
30. **FAIRBANKS, K.K., RINEHART, C.L., OHNESORGE, W.C., LOUGHIN, M.M., CHASE, C.C.L.** Evaluation of fetal protection against experimental infection with type 1 and type 2 bovine viral diarrhoea virus after vaccination of the dam with a bivalent modified-live virus vaccine. *J Am Vet Med Association*, 2004, **225**, 1898-1904.
31. **FICKEN, M.D., ELLSWORTH, M.A., TUCKER, C.M., CORTESE, V.S.** Effects of modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines containing either type 1 or types 1 and 2 BVDV on heifers and their offspring after challenge with noncytopathic type 2 BVDV during gestation. *J Am Vet Med Association*, 2006, **228**, 1559-1564.
32. **FREDRIKSEN, B., et al.** Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec*, 1999, **144**, 111-114.
33. **FREY, H.R., EICKEN, K., GRUMMER, B., KENKLIES, S., OGUZOGLU, T.C., MOENNIG, V.** Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination. *J Vet Med*, 2002, **49**, 489-493.
34. **FULTON, R.W., BURGE, L.J.** Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. *Vaccine*, 2001, **19**, 264-274.
35. **FULTON, R.W., RIDPATH, J.F., CONFER, A.W., et al.** Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity : impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, 2003, **31**, 89-95.

36. **GILLESPIE, J.H., COGGINS, L., THOMPSON, J., BAKER, J.A.** Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease. *Cornell Vet*, 1961, **51**, 155-159.
37. **GROOMS, D.L., BOLIN, S.R., COE, P.H., BORGES, R.J., COUTU, C.E.** Fetal protection against continual exposure to bovine viral diarrhoea virus following administration of a vaccine containing an inactivated bovine viral diarrhoea fraction to cattle. *Am J Vet res*, 2007, **68**, 1417-22.
38. **GUTEKUNST, D.E., MALMQUIST, W.A.** Separation of soluble antigen and infectious particles of bovine viral diarrhoea viruses and their relationship to hog cholera. *Can J Comp Med Vet Sci*, 1963, **27**, 121-123.
39. **HAMERS, C., DEHAN, P., COUVREUR, B., et al.** Diversity among bovine pestiviruses. *The Vet Journal*, 2001, **161**, 112-122.
40. **HAMERS, C., et al.** Virus neutralising antibodies against 22 bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves. *Vet J*, 2002, **163**, 61-67.
41. **HAMERS, C., COUVREUR, B., DEHAN, P., et al.** Assessment of the clinical and virological protection provided by a commercial inactivated bovine viral diarrhoea virus genotype 1 vaccine against a BVDV genotype 2 challenge. *Vet Record*, 2003, **153**, 236-240.
42. **HOFFMANN, B., DEPNER, K., SCHIRRMEIER, H., BEER, M.** A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*, 2006, **136**, 200-209.
43. **HOUE H.** Survivorship of animals persistently infected with bovine virus diarrhoea virus (BVDV). *Prev Vet Med*, 1993, **15**, 275-283.
44. **HOWARD, C.J., CLARKE, M.C., STOPP, P., BROWNLIE, J.** Systemic vaccination with inactivated bovine virus diarrhoea virus protects against respiratory challenge. *Vet Microbiol*, 1994, **42**, 171-179.
45. **KALAYCIOGLU, AT.** Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination. A review. *Vet Q*, 2007, **29**(2), 60-7.
46. **KELLING, CL.** Evolution of bovine viral diarrhoea vaccines. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2004, **20**(1), 115-130.
47. **KELLING, CL., HUNSAKER, BD., STEFFEN, DJ., et al.** Characterization of protection against systemic infection and disease from experimental bovine viral diarrhoea virus type 2 infection by use of a modified-live noncytopathic type 1 vaccine in calves. *Am J Vet Res*, 2007, **68**(7), 788-96.

48. **KOVACS, F., MAGYAR, T., RINEHART, C., et al.** The live attenuated bovine viral diarrhoea virus components of a multi-valent vaccine confer protection against fetal infection. *Vet Microbiol*, 2003, **96**, 117-131.

49. **KRAMPS, J.A., et al.** A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus 1. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**, 2175-81.

50. **KREEFT, H.A., GREISER-WILKE, I., MOENNIG, V., HORZINEK, M.C.** Attempts to characterize bovine viral diarrhoea virus isolated from cattle after immunization with contaminated vaccine. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 1990, **97**, 63-65.

51. **LEVINGS R.L., WESSMAN S.J.** Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. *Dev Biol Stand*, 1990, **75**, 177-186.

52. **LIESS, B., ORBAN, S., FREY, H.R., et al.** Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. *Vet Med B*, 1984, **31**, 669-681.

53. **MAILLARD R. , DOUART A.** L'histoire naturelle du virus BVD : infection individuelle et propagation dans le troupeau chez les bovins. *Nouveau Praticien Vétérinaire Elevage et Santé*, 2007, **5**, 383-388.

54. **MAKOSCHEY, B., JANSSEN, M.G.J., VRIJENHOEK, M.P., et al.** An inactivated bovine virus diarrhoea virus (BVDV) type 1 vaccine affords clinical protection against BVDV type 2. *Vaccine*, 2001, **19**, 3261-3268.

55. **MENANTEAU-HORTA, A.M., AMES, T.R., JOHNSON, D.W., MEISKE, J.C.** Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhoea vaccines. *Can J Comp Med*, 1985, **49**, 10-4.

56. **MEYERS G., et al.** Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology*, 1991, **180**, 602-609.

57. **MEYERS G., et al.** Rearrangement of viral sequences in cytopathogenic pestiviruses. *Virology*, 1992, **191**, 368-378.

58. **MOENNIG, V., LIESS, B.** Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food An Pract*, 1995, **11**, 477-487.

59. **MOENNIG, V., EICKEN, K., FLEBBE, U., et al.** Implantation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea. *Prev Vet Med*, 2005, **72**, 109-114.

60. **ODEON, A.C., KELLING, C.L., et al.** Experimental infection of calves with bovine viral diarrhoea virus genotype II (NY-93). *J Vet Diagn Invest*, 1999, **11**, 221-8.

61. **OLAFSON, P., MAC CALLUM, A., FOX, F.** An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet*, 1946, **36**, 205-13.
62. **ORBAN, S., LIESS, B., HAFEZ, S.M., et al.** Studies on transplacental transmissibility of a Bovine Virus Diarrhoea (BVD) vaccine virus. *Vet Med B*, 1983, **30**, 619-634.
63. **PATEL, J.R., SHILLETTO, R.W., WILLIAMS, J., ALEXANDER, D.C.** Prevention of transplacental infection of bovine foetus by bovine viral diarrhoea virus through vaccination. *Arch Virol*, 2002, **147**, 2453-2463.
64. **PRITCHARD, W.R.** The bovine viral diarrhoea-mucosal disease complex. *Adv Vet Sci*, 1963, **8**, 1-47.
65. **QI F., et al.** Analysis of the bovine viral diarrhea virus genome for possible cellular insertions. *Virology*, 1992, **189**, 285-293.
66. **RAMSEY, F.K., CHIVERS, W.H.** Mucosal disease of cattle. *North Am Vet*, 1953, **34**, 629-633.
67. **RIDPATH, J.F., BOLIN, S.R., et al.** Segregation of BVDV into genotypes. *Virology*, 1994, **205**, 66-74.
68. **ROSNER, S.F.** Complication following vaccination of cattle against infectious bovine rhinotracheitis, bovine viral diarrhea-mucosal disease, and parainfluenza type 3. *J Am Vet Med Assoc*, 1968, **152**, 898-902.
69. **ROTH, J.A., KAEBERLE, M.L.** Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with or without the administration of ACTH. *Am J Vet Res*, 1983, **44**, 2366-2374.
70. **SCHELCHER, F., FOUCRAS, G., MEYER, G., VALARCHER, J.F.** Vaccins et vaccination contre le virus BVD. *Bull GTV*, 2000, **6**, 35-41.
71. **SCHELCHER, F., CORBIERE, F., FOUCRAS, G., LACROUX, C., MEYER, G.** La vaccination contre le virus BVD chez les bovins. *Nouv Prat Vet Elev San*, 2007, **5**, 400-404.
72. **SHIMAZAKI, T., NAKAMURA, S., TAGUCHI, K., INOUE, Y.** Efficacy of bovine viral diarrhea vaccine used in Japan against bovine viral diarrhea virus type 2 strain 890. *J Vet Med Sci*, 2003, **65**, 263-266.
73. **SILFLOW, R.M., DEGEL, P.M., HARMSSEN, A.G.** Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, **103**, 129-139.

74. **TAJIMA, M., FREY, H.R., YAMATO, O., MAEDE, Y., MOENNIG, V., SCHOLZ, H., GREISERWILKE, I.** Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res*, 2001, **76**, 31-42.
75. **VAN OIRSCHOT, J.T., BRUSCHKE, C.J.M., VAN RIJN, P.A.** Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol*, 1999, **64**, 169-183.
76. **ZIMMER, G.M., WENTINK, G.H., BRUSCHKE, C., WESTENBRINK, F.J., BRINKHOF, J., DE GOEY, I.** Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol*, 2002, **89**, 255-265.

Imprimer à TOULOUSE par
la S.A.R.L. NOTREL



84, chemin des Capelles • 31300 TOULOUSE
notrel.sarl@wanadoo.fr

<http://www.photocopie-imprimerie-notrel.com>