



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/  
Eprints ID : 4391](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 4391)

**To cite this version :**

VIVILLE, Jean-Sébastien. *Efficacité d'un vaccin inactivé contre une inoculation d'épreuve A BTV-8 réalisée sur des béliers reproducteurs une semaine avant la période officielle de couverture vaccinale : étude clinique, virologique et impact sur la qualité de la semence*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2010, 86 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

---

# EFFICACITE D'UN VACCIN INACTIVE CONTRE UNE INOCULATION D'EPREUVE A BTV-8 REALISEE SUR DES BELIERS REPRODUCTEURS UNE SEMAINE AVANT LA PERIODE OFFICIELLE DE COUVERTURE VACCINALE : ETUDE CLINIQUE, VIROLOGIQUE ET IMPACT SUR LA QUALITE DE LA SEMENCE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement le 26/10/2010  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**VIVILLE Jean-Sébastien**  
Né le 24 Novembre 1985 à METZ (57)

---

**Directeur de thèse : Mr. le Docteur Gilles MEYER**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Jacques IZOPET**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :

**M. Gilles MEYER**

**M. Stéphane BERTAGNOLI**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE 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. GUELFI	M. DORCHIES	
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. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*  
Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*  
M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
M. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*  
M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*  
M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*  
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
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, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*  
M. DUCOS Alain, *Zootéchnie*  
M. DUCOS DE LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*  
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*  
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*  
M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*

- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

#### **PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

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

#### **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
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*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PRIYEMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

#### **MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

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

- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*  
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

# REMERCIEMENTS

## A notre président de thèse

### **A Monsieur le Professeur Jacques IZOPET**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

*Virologie*

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

## A notre jury de thèse

### **A Monsieur le Docteur Gilles MEYER**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie des Ruminants*

Qui nous a confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,  
Pour son soutien, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse,  
Sincères remerciements.

### **A Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI,**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie Infectieuse*

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

**A Martine DEPLANCHE,**  
Pour son travail au laboratoire de virologie,  
Sincères remerciements

**A Faouzi LYAZHRI,**  
Pour son aide précieuse de statisticien,  
Sincères remerciements

**A E. SELLEM et son équipe de l'UNCEIA,**  
Pour les prélèvements et les analyses de sperme,  
Sincères remerciements

**A Kunthea LIM et à Gilles FOUCRAS,**  
Pour leur aide lors de l'épreuve virulente,  
Sincères remerciements

**Aux zonards de la PFIE de l'INRA de Tours-Nouzilly,**  
Pour leur travail et surtout pour leur accueil chaleureux,  
Sincères remerciements

**A Maxence DELVERDIER,**  
Pour la réalisation des histologies,  
Sincères remerciements

A mes parents, **Jocelyne et André**, pour votre amour et votre soutien constants, pour les principes que vous m'avez inculqués. Mille mercis.

A ma sœur, **Marie-Bérangère**, pour m'avoir supporté près de 20 ans.

A mes grands-parents : **mamie Antoinette**, pour nos cachettes lors des visites de M. Cayatte ; **mamie Jeannette**, pour tes soins toujours attentionnés de mes égratignures ; **papi Roger**, pour ton amour du travail bien fait que j'espère avoir acquis, ton jambon, tes lapins ; **papi Joseph**, pour ton espièglerie lors de nos parties de belotte, petits chevaux et moulin.

A mes cousins et cousines, et en particulier à **Jean-Pierre**, pour avoir été mon presque grand-frère, à **Aurélie, Carole, Manue, Julien et Mathieu**.

A **Chloé**, my lobster, pour être la moins parisienne des parisiennes, pour m'avoir fait partager ton goût des voyages et parce qu'on est les meilleurs tu veux dire. Je t'aime.

A mes amis du Burkina, en particulier **Christiane, Boniface, Roger**, pour les Flags partagées et à partager. Suka

A **Brigitte** et à mes amis des JTM : **Anne, Audrey, Céline, Emilie, Fréd, Maude, Romain** et les autres, pour Orval, Cologne et tous ces bons moments.

A mes amis du lycée, **Jérôme, Julien et Pierre**, pour le petit carnet répertoire, évidemment, pour notre démarche au niveau du magnétoscope (Jean-Marie je ne comprends pas...) et pour le buisson de Rook. A **Julien et Stéphane**, pour nos trajets en TER et notre soutien au FC METZ...

A mes amis de la prépa agro 129 : **Frédo, Faouin, Simon, Livier, Guerric, Nicolas, Cyril, Blandine**, pour nos agro-chouilles (merci BCP\*-initiatives), notre Star-agronomie, et parce que c'est pas ma colle !

A la promo Desnoyers et surtout au groupe  $\alpha$  ;) : à **Elsa**, pour ton dynamisme et pour tes ouiches ; à **Julie**, pour ta bonne humeur et pour tes saluU ; à **Marivan**, pour ta couleur de peau alcoolo-dépendante et pour tes 17 sujets de thèse ; à **Chaton**, pour ta finesse, tes tympanes et pour nos origines communes ; à **Etienne** pour tes remarques pertinentes, ton talent de chanteur non monotone, ta spatieuse R21 légendaire, et pour tous ceux qui ne te connaissent pas ; à **Julien**, pour ta lourdeur et pour toutes les femmes de ta vie ; à **Nico**, pour ta sociabilité et pour tes tenues de jockey ; à **Thomas**, pour tes tenues de boom et tes bonnes blagues ; à **Timothée**, pour ta roumattitude, tes lacunes au baby-foot et ton fair-play.

Au harem de la muss : **Pauline, Stéphanie, Laura**.

Aux barbottes et aux barbots : à **Claire**, pour ta maladresse à vélo ; à **Miloute**, pour nos surnoms affectifs et pour notre année de coloc de blattes ; à **Mélo, Sophie, Crémence, Marion** ; à **Bali**, pour tes bonnes blagues, ton amour de la boxe, ton flex et ton bouc ; à **Beubeuille**, pour ton sourire ; à **Rhymbow, Fabien, Rominou, Shyk, Guigui**.

A mes plumes : à **Marco** pour tes chansons inspirées et ton kayak-polo ; à **Jean-Marie**, pour m'avoir gardé à ton resto de thèse, à **Dub'** et **Léni**, pour votre amour de la

poule ; à **Huch**, pour tes petits ronds ; à **Sherm, Mado, Crado, Pascal, Brice**, pour notre taïaut.

A mes docs : **Ramo**, pour ton riz et pour ton rire, **Mathilde, Claudie, Charlotte, Clément, Lolo, Alex, Patou, Bibi** et tous les autres, pour ces brimades qui resteront un excellent souvenir.

A ceux qui étaient poulots quand j'étais plume : **Elise, Manon, Aurélie, La Boul., Mumu, Gued, Laz', Germain** et tous les autres : DE RIEN !

A mes poulottes et poulots : **Guinette, Julia, Lucie, Lucie, Margaux, Séverine, Arthur, Bala, Camille, Françou, Grég, Nico le Belge, Raph, Ximun** et tous les autres : vous êtes des bons poulots et je suis fier de vous.

Au service de bovine de l'ENVT et à ses assistants : à **Flonflon**, pour ton grand lit, à **Foufoune**, pour ton talent de pareur, à **Mat.**, pour tes futurs 4x4 et van noirs, à **Dumé**, à **Renaud**, à **Doogy**, pour tes anecdotes, à **Fabien**, pour tes 58 kg étrangement distribués, à **Caro et Olivier**, pour les bonnes soirées aux Marronniers ou chez vous, à **F.S.**, pour vos leçons de métier et surtout de vie, à **Laurent**, pour nos parties de tennis (on s'est régalé), à **Françoise**, pour vos rares fessées.

A Saint-Sim, légendaire coloc de l'ENVTP. A nos élevages, nos repas-canards, nos méchoui, notre salon de Noël, notre beau bordel. A **Séb**, la mégablatte, pour ta ponctualité, ton sens des économies et pour ton chiot, le bel Ubin.

Au **VRC**, pour ces bons moments sur et en dehors du terrain ! Aux vieux : **Iban, Doudou**.

Au regretté **Lulu**, âme de l'ENVTP.

Aux vétérinaires qui m'ont formé en stage, en particulier **Gilles Reinartz et Gilles Hoerner**.

# SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>19</b>
<b>2.1. LA FIEVRE CATARRHALE OVINE</b>	<b>20</b>
2.1.1. EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE	20
2.1.2. SIGNES CLINIQUES	23
2.1.3. LÉSIONS NECROPSIQUES	26
2.1.4. PATHOGENIE	27
2.1.5. EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE	30
<b>2.2. LE VIRUS ET LA RÉPONSE IMMUNITAIRE</b>	<b>33</b>
2.2.1. LE VIRUS DE LA BLUETONGUE	33
2.2.2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE CONTRE LE BTV	37
<b>2.3. LES MOYENS DE LUTTE</b>	<b>39</b>
2.3.1. DIAGNOSTIC	39
2.3.2. VACCINATION	40
<b>3. ÉTUDE EXPERIMENTALE</b>	<b>43</b>
<b>3.1. OBJECTIF</b>	<b>44</b>
<b>3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>44</b>
3.2.1. VIRUS ET CULTURES CELLULAIRES	44
3.2.2. SCHEMA EXPERIMENTAL	45
3.2.3. ANALYSES	47
3.2.4. ANALYSES STATISTIQUES	51
<b>3.3. RESULTATS</b>	<b>52</b>
3.3.1. SIGNES CLINIQUES	52
3.3.2. QUANTITE ET QUALITE DU SPERME.	54
3.3.3. LÉSIONS	59
3.3.4. VIROLOGIE	60
3.3.5. SEROLOGIE	65
<b>3.4. DISCUSSION</b>	<b>67</b>
<b>4. CONCLUSION</b>	<b>73</b>
<b>5. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>75</b>
<b>6. ANNEXES</b>	<b>83</b>
<b>6.1. GRILLE DE NOTIFICATION DES SIGNES CLINIQUES</b>	<b>83</b>
<b>6.2. EXTRACTION DE L'ARN DES TISSUS CONSERVES EN RNA-LATER</b>	<b>84</b>
<b>6.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE LA RT-PCR QUANTITATIVE</b>	<b>84</b>
<b>6.4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU TEST ELISA PAR COMPETITION</b>	<b>85</b>
<b>6.5. LISTE DES ORGANES PRELEVES EN AUTOPSIE</b>	<b>86</b>



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

Figure 1 Les 3 systèmes épidémiologiques de FCO présents en Europe depuis 2007 .....	20
Figure 2 : Distribution des cas de FCO à BTV1 en France au 27 octobre 2008.....	21
Figure 3 : Distribution des cas de FCO à BTV-8 fin 2006 .....	21
Figure 4 : Evolution de l'extension des foyers de FCO à BTV-8 en France durant les années 2007 et 2008.....	22
Figure 5 : Distribution des foyers de BTV et des zones réglementées en France en 2009 .....	23
Figure 6 : Schéma pathgénique du BTV chez les ruminants .....	28
Figure 7 : Les différents mécanismes d'"overwintering" envisageables .....	32
Figure 8 : Schéma représentatif des protéines structurales et de l'ARN double-brin du BTV	34
Figure 9 : Evolution de la température rectale des béliers .....	52
Figure 10 : Evolution du score clinique des béliers .....	53
Figure 11 : Evolution des fréquences cardiaques et respiratoires des béliers .....	53
Figure 12 : Evolution du volume de l'éjaculat des béliers.....	54
Figure 13 : Evolution de la concentration de l'éjaculat des béliers .....	55
Figure 14 : Evolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat des béliers.	55
Figure 15 : Evolution du pourcentage de spermatozoïdes vivants de l'éjaculat des béliers ....	56
Figure 16 : Distance moyenne du spermatozoïde / s ( $\mu\text{m}$ ).....	56
Figure 17 : Pourcentage d'anomalie morphologique des spermatozoïdes.....	57
Figure 18 Evolution des paramètres du sperme par période .....	58
Figure 19 : Evolution de la rt-PCR quantitative des béliers.....	61
Figure 20 : Evolution de la charge virale sanguine des béliers.....	61

Figure 21 : Comparaison entre les Ct des différents tissus(cf. tableau 5) à J6 (moyenne des béliers 2A et 2C), J15 (bélier 2D) et J21 (bélier 2B). .....	64
Figure 22 : Evolution du pourcentage d'inhibition (ELISA Compétition) des béliers .....	65

## TABLEAUX

Tableau 1 : Fréquence des signes cliniques exprimés par les ovins atteints d'août à décembre 2007 dans le département des Ardennes .....	24
Tableau 2 : Fréquence des signes cliniques exprimés par les bovins atteints d'août à décembre 2007 dans le département des Ardennes .....	26
Tableau 3 : Tableau descriptif du "scoring clinique" .....	48
Tableau 4 : Paramètre du spermogramme étudiés .....	49
Tableau 5 : Résultats des rt-PCR quantitative sur tissus [zones grisées : Ct > 40].....	63
Tableau 6 : Résultats des rt-PCR quantitative sur sperme .....	64
Tableau 7 : Résultats des séroneutralisations (ED50/mL de sérum).....	66

## PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Lésions hémorragique de la base de l'artère pulmonaire du bélier 2D .....	59
--	----

# LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>%</b>	Pourcentage
<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>µm/s</b>	micromètre par seconde
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>AANE</b>	Acide amine non essentiel
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>Anotot</b>	Anomalies totales
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATU</b>	Autorisation temporaire d'utilisation
<b>BHK</b>	<i>Baby hamster kidney</i> ou rein de bébé hamster
<b>BTV</b>	<i>Bluetongue virus</i> ou virus de la bluetongue
<b>BTV x</b>	Virus de la bluetongue de sérotype x
<b>CASA</b>	<i>Computer assisted semen analyser</i> ou analyse de semence assistée par ordinateur
<b>CIVD</b>	Coagulation intravasculaire disséminée
<b>Conc</b>	Concentration
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> ou cycle seuil
<b>CTL</b>	Lymphocytes T cytotoxiques
<b>DDSV</b>	Direction départementale des services vétérinaires
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DO<sub>CN</sub></b>	Moyenne des densités optiques des contrôles négatifs
<b>DO<sub>CP</sub></b>	Moyenne des densités optiques des contrôles positifs

<b>ECP</b>	Effet cytopathique
<b>ED50</b>	Effective dose 50 %
<b>EDTA</b>	acide éthylène diamine tétra acétique
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FCO</b>	Fièvre catarrhale ovine
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>INRA</b>	Institut national de la recherche agronomique
<b>J</b>	Jour
<b>MEM</b>	Milieu essential minimum
<b>mL</b>	Millilitre
<b>MOT</b>	Pourcentage de spermatozoïdes mobiles
<b>N L</b>	Nœud lymphatique
<b>OIE</b>	Office international des épizooties
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> ou amplification par la polymérase
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>POD</b>	Peroxydase
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction</i> ou transcription inverse et amplification par la polymérase quantitative
<b>SPZ</b>	Spermatozoïde
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>TCID50</b>	<i>Tissus culture infective dose</i> ou dose infectieuse pour la culture cellulaire
<b>TMB</b>	Tétraméthylbenzidine
<b>UNCEIA</b>	Union Nationale des Coopératives d'Elevage et d'Insémination animale
<b>USA</b>	<i>United States of America</i> ou Etats-Unis d'Amérique

<b>VAP</b>	Paramètre de vitesse en $\mu\text{m/s}$ . Distance moyenne du spz sur le temps de l'analyse.
<b>VIV</b>	Pourcentage de spermatozoïdes vivants
<b>Vol</b>	Volume



# 1. INTRODUCTION

La fièvre catarrhale ovine (FCO) ou maladie de la langue bleue (bluetongue) est une maladie des ruminants, non contagieuse, causée par un virus du genre *Orbivirus* : le virus de la BlueTongue (BTV). Cette maladie n'est pas contagieuse en tant que telle car la transmission du virus entre les animaux a lieu via des piqûres de moucheron, du genre *Culicoïdes*.

Jusqu'en 2006, la grande majorité des pays de l'Union Européenne étaient indemnes de FCO. En août 2006, le virus BTV 8 (sérotypé 8) a fait une intrusion inattendue en Europe du Nord et de l'Ouest. Les années 2007 et 2008 ont été marquées par une extension exceptionnelle du BTV 8 en France, à l'origine de pertes économiques majeures dans les élevages ovins et bovins, de par les répercussions cliniques (baisse de production, avortements, baisse de la fertilité des mâles) et les restrictions de mouvements des animaux mises en place par l'Etat et l'Europe. La manifestation clinique de la FCO chez les bovins, importante lors de cette épizootie, a été une surprise car, depuis sa découverte au début du XXème siècle, la FCO était décrite comme asymptomatique dans cette espèce. Par ailleurs une deuxième spécificité liée au sérotypé 8 a été l'impact de l'infection virale sur la perturbation des fonctions reproductrices des ovins mais aussi des bovins mâles et femelles.

Une campagne de vaccination obligatoire avec des vaccins inactivés a été conduite sur l'ensemble du cheptel ovin et bovin en France depuis 2008. Compte tenu de l'urgence de la situation et de la disponibilité des vaccins contre le BTV-8, la première campagne de vaccination a été réalisée « dans l'urgence » en pleine période d'activité vectorielle et au pic de l'épizootie. Les vaccins utilisés disposés alors d'une simple autorisation temporaire d'utilisation (ATU) sur base des résultats fournis par les fabricants. Ces vaccins avaient une efficacité de protection contre les signes cliniques ou l'hyperthermie associée ou non à une efficacité de protection contre une infection ultérieure. A l'époque peu de données existaient sur la pathogénie du BTV-8 et sur la protection induite par les vaccins concernant les capacités de reproduction des ruminants.

Cette étude présente une première description des conséquences d'une infection à BTV-8 sur la qualité de la semence de béliers reproducteurs. Par ailleurs elle évalue la protection éventuelle d'un vaccin inactivé lors d'une infection à 13 jours post vaccination, soit 8 jours avant la période dite officielle de couverture vaccinale (21 jours post vaccination).

Dans une première partie, l'auteur décrit les grandes lignes de l'épizootie à BTV-8 en Europe et résume les grandes caractéristiques de la FCO. La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale.



## **2.SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2.1. LA FIEVRE CATARRHALE OVINE

### 2.1.1. Epidémiologie descriptive

- **Historique**

La bluetongue est une maladie connue depuis relativement longtemps : elle a été identifiée pour la première fois en Afrique du Sud en 1902. Il est vraisemblable que l'infection était présente depuis des siècles mais qu'elle n'a été révélée qu'à l'occasion de l'importation d'animaux sensibles, des moutons de race Mérinos. La maladie s'est alors répandue en Afrique. Depuis, on considère que la maladie est enzootique dans une grande partie de la zone intertropicale : entre les latitudes 50°Nord et 30° Sud, sur tous les continents (Afrique, Amérique, Asie). Les animaux vivent alors avec la maladie et présentent le plus souvent des formes asymptomatiques de la maladie. En marge de cette zone se trouve une zone d'épizootie à laquelle appartient l'Australie : la distribution de la FCO varie d'année en année et les animaux présentent des signes cliniques.

Avant 1998, on considérait que la maladie pouvait seulement faire des incursions périodiques en Europe (Portugal, Espagne, Grèce, Chypre). Depuis 1998, l'Europe et le pourtour méditerranéen ont subi des incursions multiples : l'Est du bassin méditerranéen est touché en 1998, l'Ouest méditerranéen en 2000 et le Nord de l'Europe en 2006 (Gerbié et al., 2007).

- **Trois systèmes épidémiologiques différents en Europe**

Un système épidémiologique est une association vecteurs / sérotypes du virus / hôtes, nécessaire pour que la circulation virale ait lieu (Gerbié et al., 2007) : la figure 1 présente les trois systèmes présents en Europe.

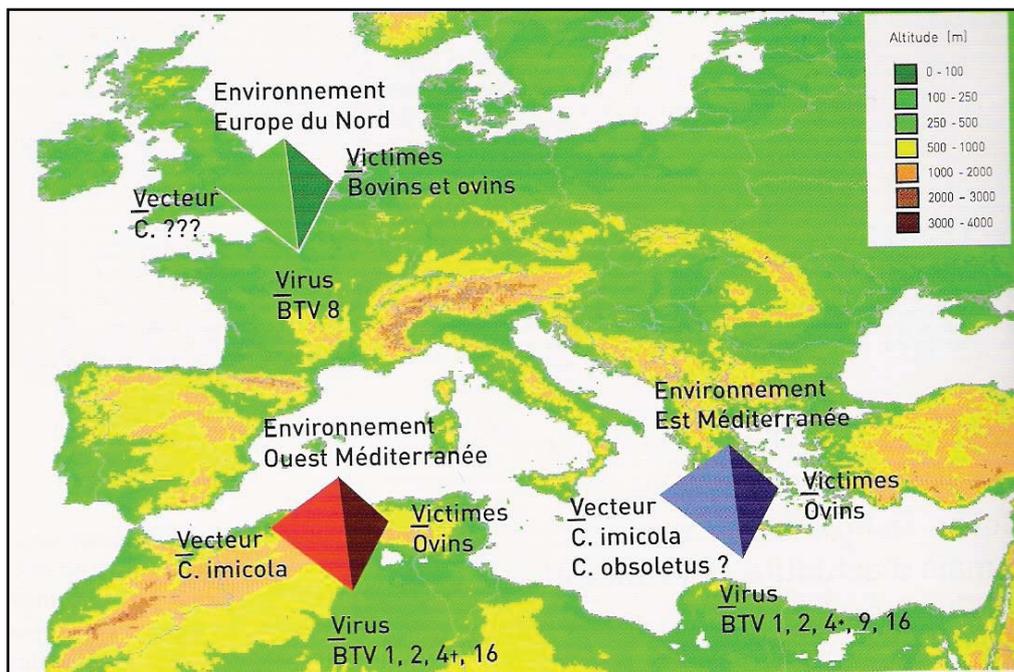


Figure 1 Les 3 systèmes épidémiologiques de FCO présents en Europe depuis 2007 (D'après Gerbié et al., 2007)

En ce qui concerne le système ouest méditerranéen : le BTV sérotype 1 a été détecté en 2006 en Afrique du Nord et en Sardaigne ; en 2007, il était présent en Espagne et dans le Pays Basque Français (3 cas à BTV 1 en France en 2007). Depuis, il a connu une remarquable diffusion vers le nord de la France, au 27 octobre 2008, 3340 cas de FCO à BTV 1 ont été recensés en France : la figure 2 présente leur distribution.

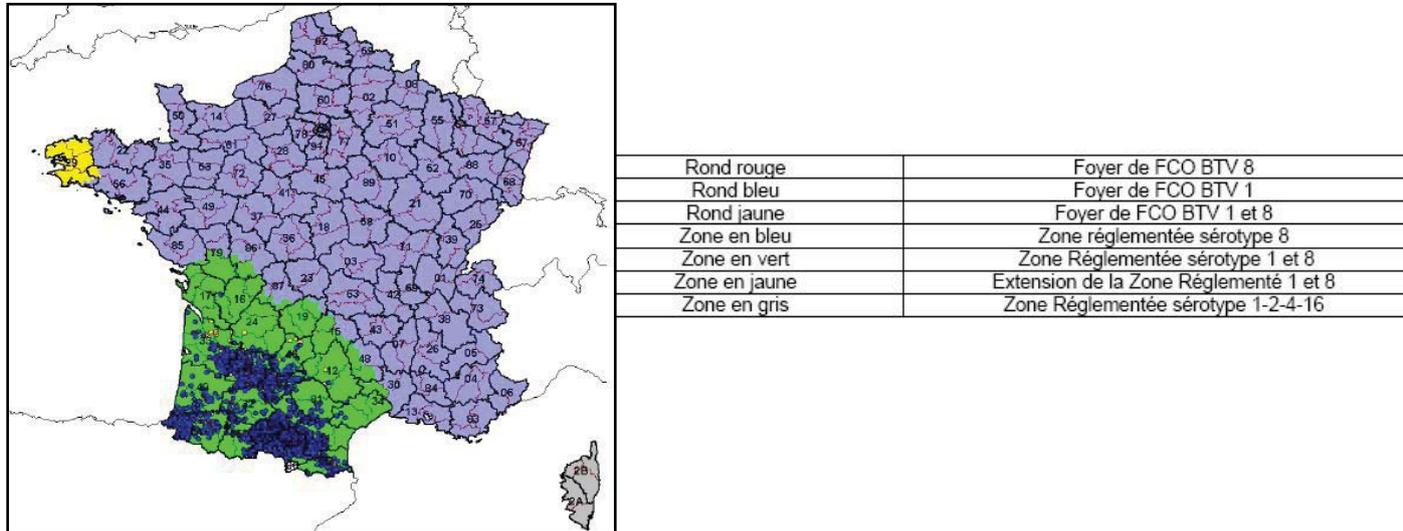


Figure 2 : Distribution des cas de FCO à BTV1 en France au 27 octobre 2008  
(Source : Ministère de l'Agriculture <http://agriculture.gouv.fr>).

- **L'incursion de BTV-8 en Europe du Nord**

C'est en août 2006 que les premiers cas de bluetongue à BTV-8 ont été reportés et confirmés en Europe du Nord : aux Pays-Bas, en Belgique, en Allemagne puis en France (Toussaint et al., 2007 – Thiry et al., 2006). 2297 cas ont été recensés en 2006 ; une dizaine étant identifiée en France.

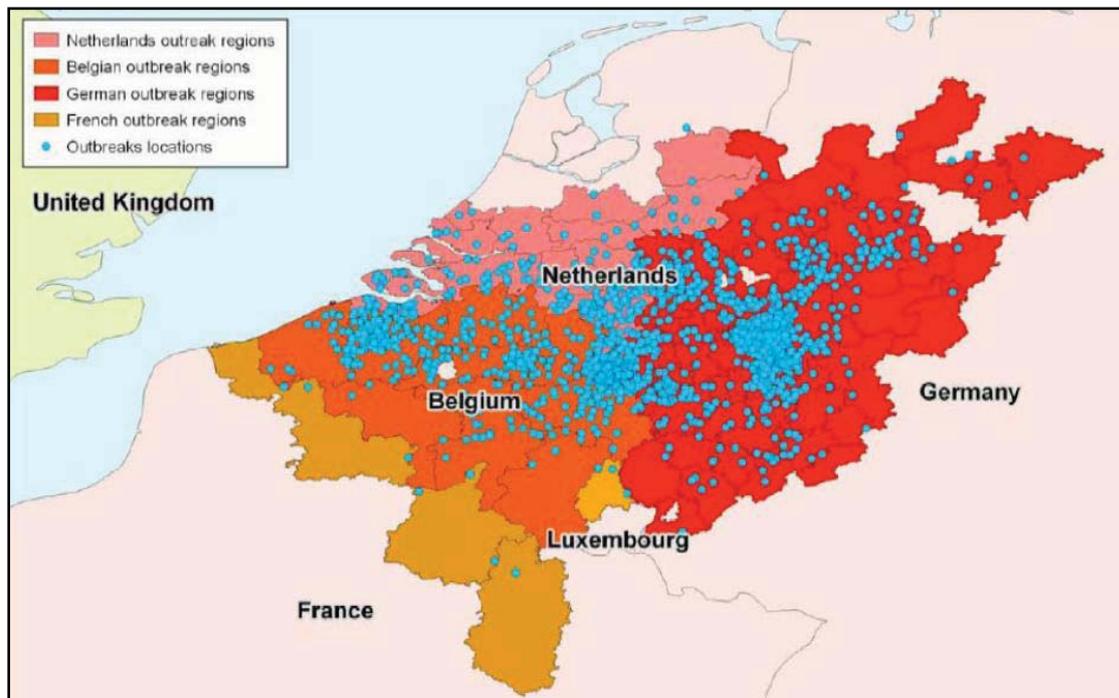


Figure 3 : Distribution des cas de FCO à BTV-8 fin 2006  
(D'après Toussaint et al., 2007)

En 2007, après l'hiver, l'infection virale a connu une forte recrudescence et une dramatique extension en Europe : Plus de 40000 cas ont été recensés en France (15566 cas), Belgique, Allemagne, Pays-Bas, Luxembourg, Danemark, Suisse, République Tchèque et Royaume-Uni. Des animaux infectés ont été importés en Italie.

La diffusion du BTV-8 en France courant 2007 et 2008 a été rapide et intense (figure 4).

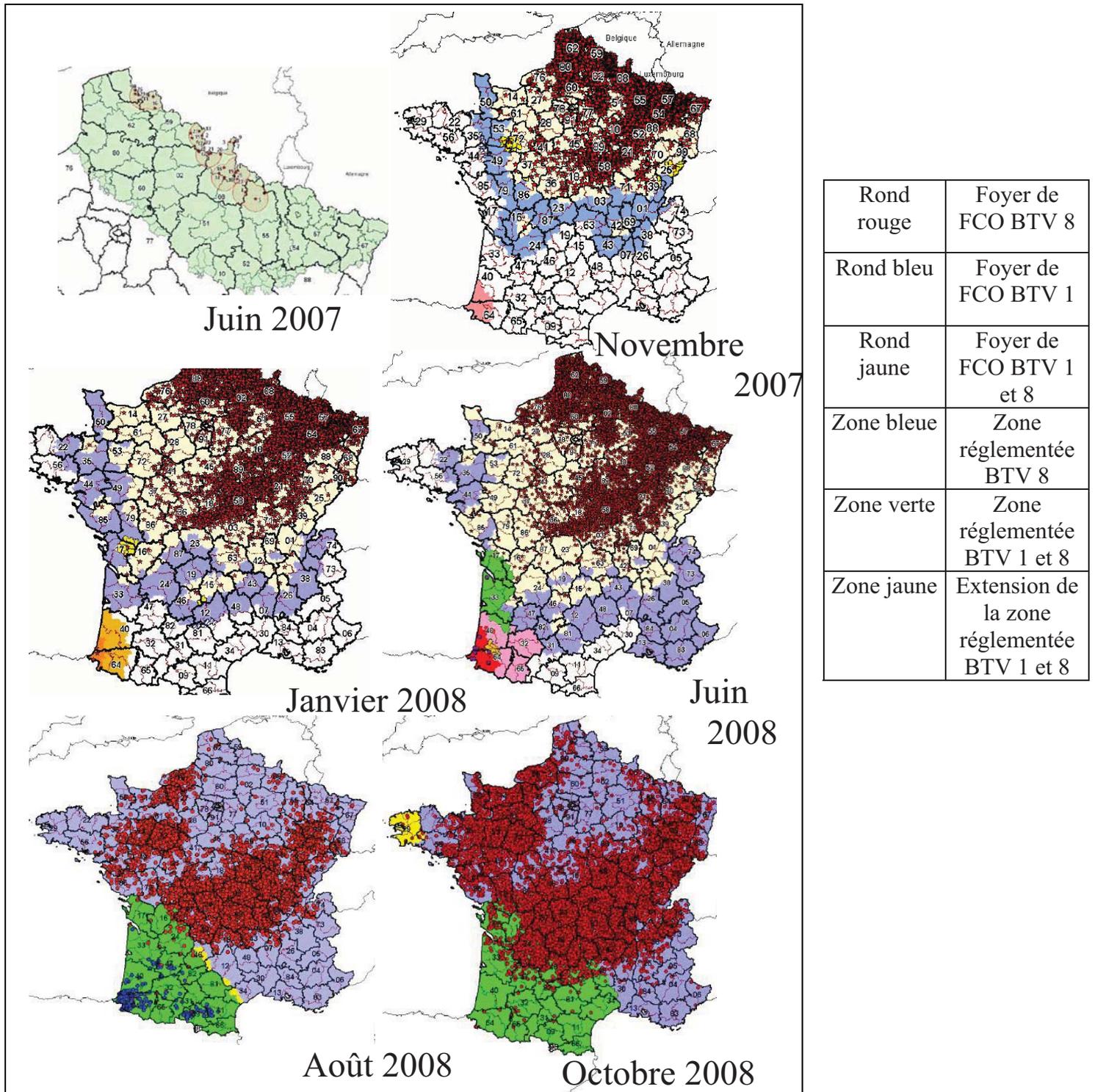


Figure 4 : Evolution de l'extension des foyers de FCO à BTV-8 en France durant les années 2007 et 2008

(Source : Ministère de l'Agriculture <http://agriculture.gouv.fr>)

Ainsi, au 27 octobre 2008, plus de 21000 cas de FCO à BTV 8 étaient recensés pour l'année 2008 en France.

Cette situation sanitaire a amené les autorités françaises et européennes à réglementer certaines zones de France en termes de rassemblement et de transport d'animaux et à mettre en place une vaccination à grande échelle, obligatoire en 2008/2009 et 2009/2010.

Suite à la vaccination et à l'infection naturelle de 2007/2008, seulement 56 foyers de BTV 8 ont été déclarés en 2009 (figure 5).

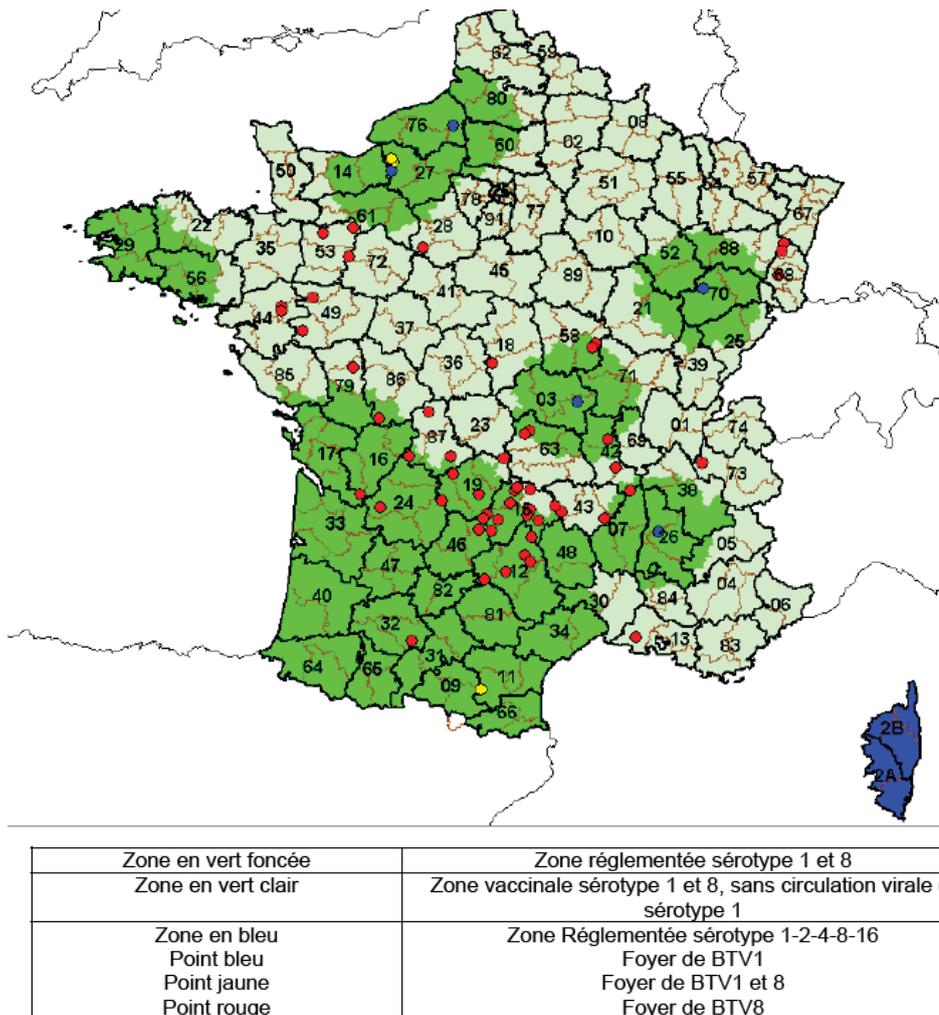


Figure 5 : Distribution des foyers de BTV et des zones réglementées en France en 2009 (Source : Ministère de l'Agriculture <http://agriculture.gouv.fr>)

### 2.1.2. Signes cliniques

Avant l'arrivée de la bluetongue sérotype 8 en Europe du Nord en 2006, on considérait que la maladie affectait principalement les ovins et quelques espèces de ruminants sauvages. Les bovins, les caprins, et la plupart des espèces de ruminants sauvages représentaient la plupart du temps des porteurs sains de la maladie (MacLachlan, 2004). La bluetongue à BTV 8 a cependant été responsable d'une véritable maladie chez les bovins en Europe lors de l'épizootie de 2006 à 2009 (morbidity de 5% environ) (Guyot et al., 2007).

- **Chez les ovins**
  - **Infection naturelle**

Les symptômes de la fièvre catarrhale ovine (sérotypage 8) ont été décrits à partir d'observations naturelles (Elbers et al., 2007 - Bosquet, 2007 - Guyot et al., 2007 - Bernard et al., 2008 – Le Gal et al., 2008 - Saegerman et al., 2009).

La morbidité chez les ovins est estimée à 12 % maximum.

La période d'incubation est de 2 à 6 (maximum 18) jours (Sailleau et al., 2006). Le premier signe est alors un syndrome fébrile, avec une hyperthermie sévère. La phase d'état est ensuite caractérisée par des *signes généraux* (diminution de l'état, anorexie, léthargie, baisse de production laitière) et des phénomènes congestifs (hyperhémie des muqueuses, rarement cyanose de la langue (langue bleue)), œdémateux (œdème de la face et du cou, œdème du scrotum, de la vulve) et hémorragiques (piqueté hémorragique sur la peau, qui peut être localisé (région interdigitée, trayon) ou sur les muqueuses, lésion hémorragique des narines, de la langue) Enfin des ulcères des muqueuses nasales et orales), du jetage nasal, une salivation exacerbée ont été décrits.

Des problèmes locomoteurs surviennent : des boiteries qui peuvent être associées à une inflammation du bourrelet coronaire, à un ulcère interdigité ou à une fragilité (fonte musculaire).

Une dermatite chronique avec de la chute de laine est rare.

Le tableau 1 présente une quantification des signes cliniques observés sur des ovins (n=375) par les vétérinaires dans les départements des Ardennes d'août à décembre 2007, à partir des questionnaires établis par la Direction Départementale des Services Vétérinaires (DDSV) et renseignés par les vétérinaires lors d'une suspicion ou d'une confirmation de FCO (Le Gal et al., 2008)

<b>Signes cliniques</b>	<b>Fréquence (%) (IC 95%)</b>
Amaigrissement	27,7 (23,1-32,3)
Abattement	25,8 (21,3-30,4)
Hyperthermie	25,3 (20,8-29,8)
Congestion buccale	20,5 (16,3-24,7)
Jetage	20,0 (15,8-24,1)
Œdème de la face	20,0 (15,8-24,1)
Ptyalisme	17,6 (13,6-21,5)
Lésions oculaires	15,7 (11,9-19,5)
Lésions podales	17,0 (13,1-20,9)
Raideur	12,5 (9,1-15,9)
Irritation mufle	9,8 (6,8-12,9)
Signes pulmonaires	7,4 (4,7-10,2)
Lésions buccales	6,4 (3,8-8,9)
Cyanose de la langue	1,6 (0,3-2,9)

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

La fréquence des avortements et des mortinatalités est augmentée et des foetus tératogènes (hydranencéphalie) sont décrits.

L'effet de l'infection naturelle par le BTV 8 sur la qualité de sperme de béliers a été étudié par Kirschvink et coll. (2009). La comparaison d'éjaculats de béliers infectés par le BTV-8 et de béliers sains a montré que l'infection a un impact majeur. L'apparence et la couleur sont altérées, la concentration en spermatozoïdes, la motilité des spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes vivants diminuent et le pourcentage de spermatozoïdes anormaux augmente. Le sperme retrouverait une qualité satisfaisante de 63 à 138 jours après l'infection.

Les complications sont d'ordre pulmonaire (pneumonie) ou digestif (diarrhée).

Les maladies intercurrentes peuvent aussi apparaître à l'occasion d'un passage de bluetongue.

La mortalité de la bluetongue chez les ovins est estimée à 5%.

#### ○ Infection expérimentale

Plusieurs infections expérimentales de BTV à des moutons ont été réalisées, par administration de sang infectieux (Backx et al., 2007, MacLachlan et al., 2008) ou de virus passés sur cultures cellulaires (Hamers et al., 2010) ou les deux (Darpel et al., 2007). Des signes cliniques ont été observés : hyperthermie et abattement, œdème de la face, hyperhémie des muqueuses buccale, nasale et oculaire, jetage. Les signes cliniques sont souvent moins sévères lors d'infection expérimentale que sur le terrain. Il convient cependant d'excepter l'inoculation de MacLachlan (MacLachlan et al., 2008), qui a réussi à reproduire des symptômes très sévères (inoculation intraveineuse de sang infectieux).

#### ● Chez les bovins

##### ○ Infection naturelle

« La bluetongue est asymptomatique voire subclinique chez les bovins » : telle était la connaissance scientifique avant l'arrivée du sérotype 8 en Europe du Nord en 2006 (Richards et al., 1988 – MacLachlan, 2004). On pouvait toutefois noter une hyperthermie transitoire, des avortements, et des malformations congénitales (MacLachlan et al., 2008).

Depuis, des observations de terrain ont décrit la présence de signes cliniques chez les bovins infectés par le BTV-8 avec une morbidité de 5% environ et une mortalité de 1%. (Elbers et al., 2007 – Bosquet, 2007 – Guyot et al., 2007 – Le Gal et al., 2008).

Les signes cliniques sont caractérisés par :

- des signes généraux : hyperthermie, abattement, chute de production laitière, perte de poids
- des signes locaux au niveau des membres : œdème en bas des membres, faiblesse musculaire, boiteries, décubitus
- des signes locaux au niveau de la tête : lésions ulcéreuses, nécrotiques et croûtes au niveau du mufle, des naseaux ; ulcères sur la langue, les gencives, hypersalivation ; érythème péri-oculaire, croûtes, larmolement ; œdème de l'auge
- des signes locaux au niveau de la mamelle : érythème et œdème, lésions ulcéreuses et nécrotique des trayons,
- des avortements, des malformations congénitales (MacLachlan et al., 2008 – Vercauteren et al., 2008 – Peters et al., 2008)

Le tableau 2 présente une quantification des signes cliniques observés sur des bovins (n=1297) par les vétérinaires dans les départements des Ardennes d'août à décembre 2007, à partir des questionnaires établis par la Direction Départementale des Services Vétérinaires (DDSV) et renseignés par les vétérinaires lors d'une suspicion ou d'une confirmation de FCO (Le Gal et al., 2008)

<b>Signes cliniques</b>	<b>Fréquence (%) (IC 95%)</b>
Amaigrissement	24,0 (21,6-26,4)
Abattement	25,9 (23,5-28,4)
Hyperthermie	23,1 (20,7-25,4)
Congestion buccale	7,8 (6,3-9,3)
Jetage	19,8 (17,6-22,0)
Œdème de la face	6,7 (5,3-8,1)
Ptyalisme	16,9 (14,8-18,9)
Lésions oculaires	18,1 (15,9-20,2)
Lésions podales	19,7 (16,5-20,9)
Raideur	16,3 (14,3-18,4)
Irritation muflle	22,1 (19,8-24,4)
Signes pulmonaires	9,4 (7,7-11,0)
Lésions buccales	9,4 (7,7-11,0)
Cyanose de la langue	1,5 (0,8-2,1)

**Tableau 2 : Fréquence des signes cliniques exprimés par les bovins atteints d'août à décembre 2007 dans le département des Ardennes**

(D'après Le Gal et al., 2008)

L'effet de l'infection par BTV sur la qualité du sperme de taureaux a fait l'objet d'une publication de Müller et coll. (2009). La comparaison d'éjaculats de taureaux naturellement infectés par BTV-8 et de taureaux sains a montré que, si le volume et la concentration ne sont pas affectés, le pourcentage de motilité diminue et le pourcentage de malformations augmente significativement.

#### ○ Infection expérimentale

Darpel a inoculé expérimentalement du BTV-8 à 4 veaux (Darpel et al., 2007) mais n'a observé presque aucun signe clinique.

### **2.1.3. Lésions nécropsiques**

Les lésions nécropsiques dues à la bluetongue ont été décrites à partir d'expériences et d'observations terrain ; elles concernent essentiellement le mouton, compte tenu de la faible mortalité des bovins. En 1961, Moulton répertoria les lésions de la bluetongue sur des moutons infectés dans la vallée de Sacramento (Californie, USA) (Moulton, 1961). En 1986, Mahrt décrivit les lésions macroscopiques et microscopiques de moutons inoculés expérimentalement avec du BTV17 (Mahrt et al., 1986). Lors de son expérience de 2008, MacLachlan observa des lésions sévères de bluetongue sur des moutons infectés par du BTV4 (MacLachlan et al., 2008). Darpel inocula expérimentalement du BTV-8 à des ovins et des bovins (Darpel et al., 2007). Worwa inocula du BTV-8 à des moutons en 2009 (Worwa et al., 2010). Des articles d'observations terrain de la maladie en Europe du Nord décrivent les lésions présentes (Guyot et al., 2007 – Bernard et al., 2008).

Peuvent être rencontrés à l'autopsie :

- Des œdèmes : sous-cutanés, des poumons, des muscles, des nœuds lymphatiques
- De la congestion : de l'appareil digestif
- Des lésions hémorragiques, des pétéchies, des ecchymoses localisés dans les nœuds lymphatiques, les poumons, le cœur, les muscles squelettiques, la rate, les

reins, la vessie, les muqueuses digestives (buccale, œsophagienne, réticulienne, ruminale, intestinale), la langue, l'aorte, et l'artère pulmonaire. Cette dernière lésion est considérée comme pathognomonique de la bluetongue

- Des lésions nécrotiques des muqueuses digestives (ulcères), de la langue, des muscles squelettiques, du cœur
- Des écoulements pleural et péricardique
- Une atélectasie, une broncho-pneumonie aigue diffuse suppurative
- Une stase sanguine

*Microscopiquement* peuvent être observés :

- œdème, hémorragie et infiltration leucocytaire de la lamina propria de la muqueuse digestive, ulcération des papilles de la muqueuse buccale,
- vacuolisation, gonflement, perte de la striation, fragmentation, infiltration leucocytaire des fibres musculaires squelettiques
- congestion des petits vaisseaux sanguins
- hémorragie de la vasa vasorum dans la media et l'adventice des grosses artères.
- Hyperhémie et œdème des nœuds lymphatiques réactionnels
- Hyperhémie et œdème du derme du bourrelet coronaire
- Infiltration leucocytaire de la peau

Toutefois l'intensité des lésions microscopiques n'est pas forcément corrélée à l'intensité des signes cliniques et lésionnels macroscopiques. Des moutons présentant des formes cliniques sévères ou morts de FCO peuvent ne présenter que des lésions microscopiques modérées (MacLachlan et al., 2009 ; observations personnelles ENVV).

## **2.1.4. Pathogénie**

- **Tropisme tissulaire du virus**

- **Schéma pathogénique**

La pathogénie de la bluetongue a fait l'objet de nombreuses études chez les ovins comme chez les bovins.

En 1976, Pini réalise une expérience d'inoculation de BTV sérotype 10 à des moutons et titre le virus dans différents tissus prélevés (Pini, 1976). Il observe qu'après inoculation, le virus parvient aux nœuds lymphatiques régionaux, puis est disséminé par voie sanguine et/ou lymphatique dans les autres organes lymphatiques, où il se multiplie. Enfin, il atteint par voie sanguine la plupart des tissus : Pini titre le virus dans les amygdales, les poumons, le foie, la rate, les reins, les muscles squelettiques, le myocarde, les muqueuses et la thyroïde.

En 1990, MacLachlan inocule du BTV 10 à des veaux (MacLachlan, 1990). Il réalise des isolations virales dans des tissus de veaux euthanasiés régulièrement et de l'immunohistochimie de ces tissus. Il observe la présence de virus dans les tissus dès le premier jour après inoculation et jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour. Des titres viraux élevés sont présents dans les poumons, les nœuds lymphatiques, le thymus, la rate. En immunohistochimie, il relève que les cellules infectées sont peu nombreuses, mais que leur nature est intéressante : dans la rate, les nœuds lymphatiques et le thymus, ce sont des phagocytes mononuclés ; dans les lèvres ou dans les muscles squelettiques, ce sont des cellules endothéliales.

En 2009, Worwa inocule du BTV-8 à des moutons (Worwa et al., 2010). Des PCR sont positives pour tous les animaux euthanasiés entre J10 et J16 post-infection pour la rate, les poumons, les nœuds lymphatiques préscapulaires, mésentériques, poplités, iliaques. Sur 3 moutons, des PCR positives sont aussi réalisées sur foie, utérus, rein, myocarde, muscle

squelettique, mamelle, cerveau, plaque de Peyer. Sur 3 moutons euthanasiés à 155 jours post-infection, des PCR sont positives pour la rate et les nœuds lymphatiques.

Dans des articles de revue, MacLachlan (MacLachlan, 2004), Barrat-Boyes (Barrat-Boyes et al., 1995) et Schwartz (Schwartz-Cornil et al., 2008) synthétisent le mécanisme de pathogénie de la bluetongue, qui est similaire chez les ovins et les bovins, et probablement toutes les espèces de ruminants. Les étapes sont donc :

- Inoculation cutanée par piqure d'un Culicoides : J 0
- Réplication dans le nœud lymphatique drainant : J 2-3
- Dissémination (voie lymphatique et sanguine) dans les poumons, la rate et les nœuds lymphatiques J3-5 ; Réplication dans les phagocytes mononuclés et les cellules endothéliales : J 4-20
- Dissémination par voie sanguine aux autres tissus et réplication dans les phagocytes mononuclés et les cellules endothéliales
- Association prolongée avec les cellules du sang : en effet, le BTV peut être détecté dans des vésicules intracellulaires des érythrocytes ; le virus ne se réplique pas mais cette association peut persister en présence de titres élevés en anticorps neutralisants : il est donc proposé que, associé aux globules rouges, le BTV soit protégé du système immunitaire.

La figure 6 présente ce schéma pathogénique.

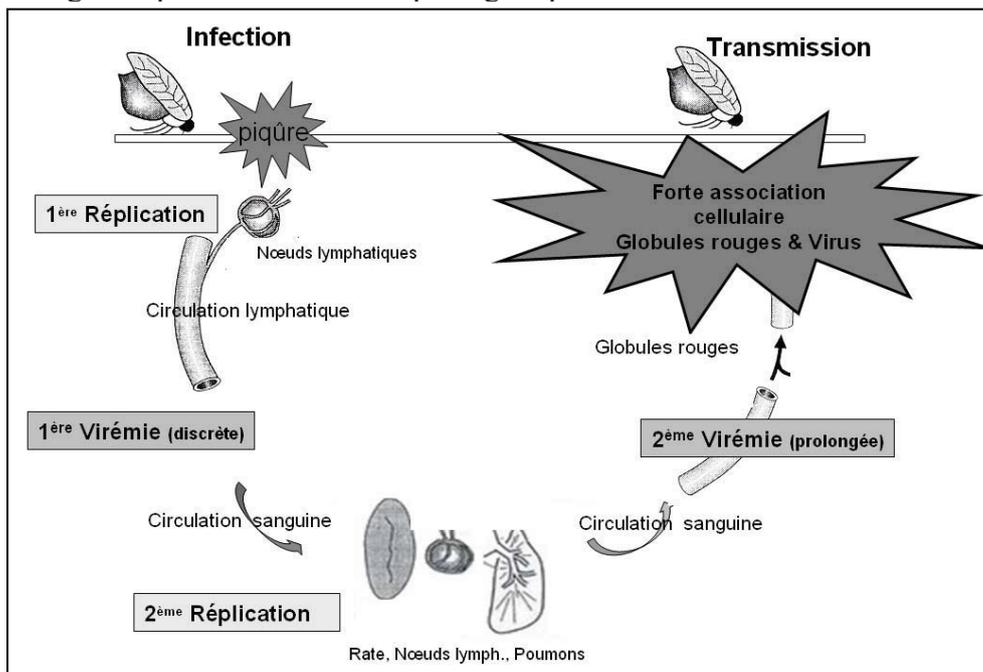


Figure 6 : Schéma pathogénique du BTV chez les ruminants (d'après Barrat-Boyes et al., 1995).

#### ○ Particularité des organes reproducteurs

Les mâles peuvent excréter le virus dans le sperme, mais uniquement en période de virémie. Si, en période de virémie, le virus de la FCO est isolé dans les testicules, les vésicules séminales, la glande bulbo-urétrale, la prostate et l'urètre, c'est la présence de cellules mononuclées ou d'érythrocytes infectés qui est vraisemblablement responsable de l'infection du sperme. Le virus est en effet absent des spermatozoïdes (Osburn, 1994). La présence de virus dans le sperme n'est ainsi pas systématique. Une étude sur le terrain a été réalisée par Manière en 2008 sur des taureaux infectés par le sérotype 8 (Manière, 2008). 11% des animaux testés, soit plus de 14% des animaux positifs en PCR sur le sang étaient positifs

en PCR sur le sperme. Lors d'une infection expérimentale (Bowen et al., 1985), un tiers des taureaux infectés expérimentalement présentaient des éjaculats viropositifs et, dans l'ensemble des éjaculats récoltés chez ces taureaux positifs en période de virémie, seul 1 éjaculat sur 10 présentaient du virus infectieux.

Le BTV peut avoir un tropisme placentaire (Maclachlan et al., 2008 – Saegerman et al., 2009).

- **Virémie**

La présence de virus dans le sang des animaux infectés (virémie) a été recherchée lors de nombreuses études expérimentales. Le virus peut être recherché par isolement viral (culture cellulaire et inoculation d'œufs embryonnés) ou par PCR (recherche du génome viral) (cf. infra). Le virus peut être détecté à partir du troisième jour après l'infection chez le mouton par isolement viral (Koumbati et al., 1998) ou PCR (Darpel et al., 2007 – Backx et al., 2007). Un pic est présent entre 5 et 7 jours post-infection (Darpel et al., 2007 (PCR) – Worwa et al., 2010 (PCR)). En 1991, Foster observe deux pics de virémie (par isolement viral) chez des moutons infectés avec différentes souches de BTV (sérotypes 10, 11, 13, 17) : un premier pic au 6<sup>ème</sup> jour et un second au 10<sup>ème</sup> après infection (Foster et al., 1991).

Le virus peut être isolé dans le sang d'animaux infectés jusqu'à 6 à 8 semaines après l'infection (Richards et al., 1988 -Koumbati et al., 1998 - MacLahlan et al., 1994, Chatzinasiou et al., 2010). Le génome viral peut être détecté par PCR jusqu'à 20 semaines après l'inoculation (MacLahlan et al., 1994 - Chatzinasiou et al., 2010).

- **Pathogénie cellulaire**

Les conséquences cellulaires d'une infection au BTV sont de deux ordres : la mort cellulaire et l'induction d'un processus inflammatoire (Schwartz-Cornil et al., 2008). Des études ont été effectuées sur la pathogénie cellulaire de l'infection au BTV de sérotypes 10 et 17 (Mortola et al., 2003 – Demala et al., 2001 – Barrat-Boyes et al., 1992 – Demaula et al., 2002).

- **Mort cellulaire**

Le BTV induit la mort cellulaire (par nécrose ou apoptose) de cellules de mammifères : ceci a été montré pour les monocytes (Barrat-Boyes et al., 1992), les cellules endothéliales microvasculaires (Demaula et al., 2001). Mortola a démontré que seules les protéines de la capsid externe du BTV, c'est-à-dire VP2 et VP5, peuvent induire cette apoptose (Mortola et al., 2003). Par contre, l'infection des cellules des insectes (Demaula et al., 2007) et des lymphocytes sanguins (Barrat-Boyes et al., 1992) n'induit pas d'effet cytopathique. Le relargage des virions par les cellules infectées peut être effectué selon deux modalités : le bourgeonnement (dominant chez les insectes) ou la perméabilisation de la membrane (dominant chez les mammifères). Ceci peut partiellement expliquer cette différence d'effet cytopathique.

La nécrose des endothéliums vasculaires pourrait être responsable de certains signes cliniques et lésions de la bluetongue mais les résultats sont contradictoires. Certaines études (MacLachlan et al., 2008) reproduisent des signes cliniques sévères de bluetongue sans toutefois identifier d'atteintes majeures des endothéliums cellulaires par immunohistologie.

- **Induction de cytokine et de prostanoïdes**

L'infection des cellules endothéliales microvasculaires bovine et ovine génère la production d'interleukine (1, 6, 8), de cyclooxygénase-2 (Demaula et al., 2002). Ces molécules sont des médiateurs de l'inflammation, qui sont impliquées dans la pathogénèse de fièvres hémorragiques sévères.

L'infection au BTV d'ovins ou de bovins entraîne l'augmentation du rapport plasmatique thromboxane/prostacycline. La thromboxane est un puissant facteur pro-coagulant, la prostacycline est, au contraire, vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. L'augmentation de ce rapport implique donc l'augmentation de la coagulation et la possibilité d'apparition d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), ce qui peut être responsable de certains signes cliniques et lésions de la bluetongue.

- **Facteurs d'expression de la maladie liés à l'hôte**

Tous les ruminants peuvent être infectés par le BTV, mais la maladie ne s'exprime pas équitablement chez tous les individus : certaines races de mouton et certaines espèces de ruminants sauvages sont par exemple plus susceptibles de développer la maladie. Pour de nombreux sérotypes, les bovins sont asymptomatiques (Maclachlan, 2004).

La race ovine jouerait un rôle dans la sensibilité à la bluetongue : des races natives de régions (sub)tropicales, où la bluetongue est endémique, sont considérées comme résistantes, certaines races européennes sont particulièrement sensibles (Mérinos par exemple).

Le statut immunitaire des individus joue aussi un rôle important : Brodie a démontré qu'une immunosuppression augmente la pathogénie du BTV, et exacerbe l'expression de la maladie (Brodie et al., 1998).

Des études expérimentales ont été menées pour comprendre pourquoi la maladie, aux USA, affecte les ovins mais n'affecte pas les bovins, alors que la pathogénie est similaire chez les deux espèces (Demaula et al., 2001 – Demaula et al., 2002). In vitro puis in vivo, la sensibilité des cellules endothéliales à l'infection a été comparée chez les deux espèces. Les principales différences identifiées ont été :

- Une activation des cellules endothéliales (transcription de gènes codant pour des médiateurs de l'inflammation) d'avantage observée chez les cellules bovines que chez les cellules ovines.
- Un rapport thromboxane/prostacycline, qui est indicatif d'une augmentation de la coagulation et d'une possible CIVD, supérieur chez les ovins que chez les bovins.

## **2.1.5. Epidémiologie analytique**

Le BTV est maintenu dans la nature par une série de cycles alternatifs de répllication chez les différentes espèces de ruminants et chez les vecteurs : moucheron du genre *Culicoïdes* (Mellor, 1990). La FCO est une arbovirose (Arthropode Borne Virose), elle n'est donc pas contagieuse directement d'un animal à l'autre. Une transmission vénérienne est possible mais rare (via le liquide séminal), de même qu'une transmission verticale (via le placenta) (Schwartz-Cornil et al., 2008)).

- **Cycle épidémiologique**

Ingéré par un vecteur compétent lors d'un repas sanguin sur un ruminant virémique, le BTV s'attache à la surface luminale des cellules intestinales, infecte ces cellules et s'y réplique. Les virus sont alors relargués via la lame basale dans l'hémolymphe puis atteignent les organes cibles secondaires et notamment les glandes salivaires. La transmission peut avoir lieu lors d'une pique à un ruminant (Mellor, 1990). Ce cycle pathogénique chez le vecteur (de l'infection à la transmission) dure environ 10-15 jours à 25°C et les moucheron infectés le sont à vie (en général quatre semaines).

- **Les vecteurs**

Les *Culicoïdes* appartiennent à la famille des Cératopogonidés, au sous-ordre des Nématocères, à l'ordre des Diptères. Ce sont ainsi des insectes, de type OmoucheronO, c'est-

à-dire avec un corps grêle, allongé, des pattes fines et longues, avec des antennes de 14 à 16 articles. Les ailes sont peu velues, courtes, souvent tachetées, repliées sur l'abdomen au repos. Ces moucheron font 2 à 3 mm de longueur ; les larves ont un habitat terrestre ou aquatique. Ce sont uniquement les femelles qui sont hématophages, cette activité est crépusculaire ou nocturne.

La présence d'un insecte vecteur avéré est une condition nécessaire à la diffusion du BTV mais ce n'est pas suffisant. Il convient de tenir compte d'autres facteurs extrinsèques (température, humidité) ou de facteurs entomologiques (abondance de l'insecte, préférence trophique, taux de survie) : ces facteurs sont inclus dans la notion de capacité vectorielle. La capacité vectorielle mesure le potentiel de transmission du virus en incorporant des données sur la dynamique de la population d'insecte ; elle mesure le nombre moyen d'inoculations probables par hôtes et par unité de temps. La notion de OvecteurO se base aussi sur la compétence vectorielle qui est l'aptitude de l'insecte à s'infecter, amplifier et à transmettre la maladie ; elle est mesurée en laboratoire : c'est la proportion d'insectes chez lesquels le virus est retrouvé dans les glandes salivaires après une période d'incubation dite extrinsèque (7 à 10 jours à 24°C) (Gerbier et al., 2007). Elle est liée à des facteurs génétiques. Dans une espèce de moucheron, la compétence varie selon les individus (Mellor, 1990) ; la compétence de l'espèce n'est donc pas une notion qualitative, mais quantitative.

Ainsi, pour qu'un insecte soit vecteur, il faut qu'il soit compétent, mais aussi que la population d'insecte dans la zone en question en soit capable (Gerbier et al., 2007). Par exemple, les situations suivantes ont pu être observées :

- *Culicoïdes imicola* est peu compétent mais très capable car, notamment, son pic d'abondance des femelles ayant déjà piqué au moins une fois coïncide avec des conditions de température et d'hygrométrie favorables à la transmission
- *C. bolitinos* est plus compétent que *C. imicola* en Afrique du Sud mais apparaît moins capable *in fine* en conditions naturelles.
- *C. sonorensis* est très compétent et très capable aux USA

Pour connaître les vecteurs en cause dans l'épizootie à BTV 8 en Europe du Nord, Meixwinkel a réalisé un "instantané" de la population de *Culicoïdes* présents aux Pays-Bas pendant un mois en automne 2006 (Meixwinkel et al., 2008). Les résultats sont :

- Sur plus de 35000 moucheron capturés, pas un spécimen de *C. imicola*, le principal vecteur de BTV en Europe du Sud n'était présent
- Le complexe Obsoletus, comprenant principalement deux espèces (*C. obsoletus* et *C. scoticus*) était le taxon le plus représenté
- Le complexe Pulicaris était le second taxon quantitativement présent : six espèces le composent ; *C. pulicaris*, la seule espèce du complexe à être un vecteur potentiel de BTV, n'a cependant pas été capturée en grand nombre : son rôle dans l'épizootie à BTV-8 est donc mineur, voire nul.
- *C. dewulfi* est a été capturé significativement ; sa biologie est unique : sa croissance s'effectue dans les bouses de bovins et d'équins. Aussi, ce moucheron est un potentiel nouveau vecteur de BTV en Europe.

#### • Modes de propagation de la maladie

La propagation de la bluetongue d'une zone à l'autre suit schématiquement deux voies : via les mouvements d'animaux ou de produits (semences ou embryons) infectés ou via des insectes infectés. A partir d'un point d'introduction, on constate que la propagation se fait essentiellement de proche en proche. En pratique, dans le cadre d'une propagation locale, il est très difficile de distinguer la part de propagation liée au vol actif d'insectes infectants de celle liée aux mouvements d'animaux dans les zones d'activités de vecteurs infectés. Pour de longues distances de propagation, notamment au-dessus de la mer, de nombreux éléments

laissent penser que la propagation s'effectue préférentiellement par le transport passif, par le vent, d'insectes infectés : la propagation de la FCO depuis la Sardaigne vers la Corse en est un exemple (Gerbier et al., 2007).

L'amplification de la maladie dans la nouvelle zone dépend de plusieurs facteurs : le nombre et la distribution des hôtes susceptibles, la compétence et la capacité des vecteurs locaux à transmettre le virus (Saegerman et al., 2008).

Si la propagation de la maladie s'explique surtout par des modifications des interactions biotiques entre les populations de vecteurs et d'hôtes dans les zones récemment envahies, l'impact des changements climatiques n'est pas négligeable sur les maladies à transmission vectorielle (Purse et al., 2008). Ainsi, par exemple, la hausse des températures et des précipitations peut augmenter l'incidence de la transmission du BTV :

- En augmentant la portée et l'abondance de l'activité des vecteurs
- En augmentant la proportion d'espèces d'insectes compétentes
- En augmentant le taux de développement du virus chez le vecteur
- En favorisant la capacité de transmission d'espèces supplémentaires de *Culicoïdes*

Les modalités d'introduction du sérotype 8 en Europe du Nord resteront peut être inconnues (Thiry et al., 2007). Des études phylogénétiques du virus ont montré que son origine est subsaharienne occidentale (Gerbier et al., 2007).

#### • Mécanismes d'overwintering

La capacité du BTV à ré-émerger après plusieurs mois (typiquement après l'hiver) de non-détection (pas de cas de maladie, ni de virémie ni de séroconversion chez les ruminants) est reconnue : c'est le mécanisme d'"overwintering" (Wilson et al., 2008). Plusieurs possibilités peuvent expliquer cela. La figure 7 les schématise.

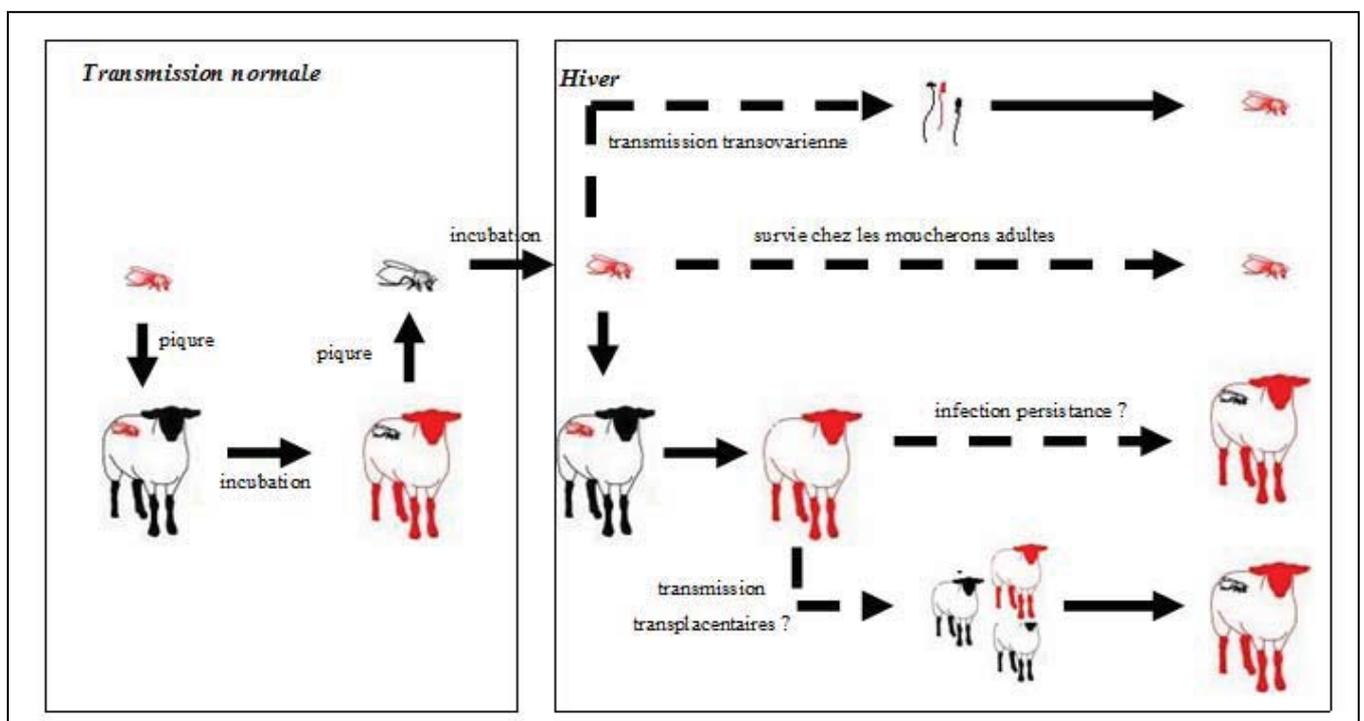


Figure 7 : Les différents mécanismes d'"overwintering" envisageables (d'après Wilson et al., 2008).

Une première hypothèse est celle de la persistance via les vecteurs : les insectes *Culicoïdes*. Celle-ci peut avoir lieu selon deux possibilités : par un passage transovarien et la persistance dans les larves, formes avec lesquelles les moucheron survivent en hiver. Or, si un essai a montré que de l'ARN de BTV pouvait être isolé dans des larves, ce n'est pas le cas du virus entier (White et al., 2005) : en effet, les pores de la membrane vitelline sont trop petits pour laisser passer une particule virale intacte. La deuxième possibilité est la persistance chez les adultes. Les moucheron ont une espérance de vie ne dépassant pas quatre semaines, mais une étude a montré que certains individus pouvaient survivre jusqu'à trois mois à 10°C en laboratoire. Un hiver doux pourrait alors permettre la survie de moucheron infectés et donc la persistance du virus. De plus, il est suggéré que certaines espèces de *Culicoïdes* rentrent à l'intérieur des bâtiments quand la température extérieure commence à baisser (Wilson et al., 2008).

La seconde hypothèse est celle de la persistance via les hôtes ruminants ; celle-ci peut avoir lieu selon deux possibilités : une infection chronique ou un passage transplacentaire. Des études ont montré qu'une infection chronique était possible : certains individus peuvent en effet rester infectieux jusqu'à 2 mois ; ainsi, du BTV a été isolé dans de la peau de mouton plus de 2 mois après son infection (Takamasu et al., 2003). Il a été démontré que le virus a un tropisme placentaire. Les conséquences d'une infection à BTV d'une femelle gravide diffèrent selon le stade de gestation (MacLachlan et al., 2008) :

- Lors de la première moitié : avortements et malformations congénitales
- Lors de la seconde moitié : pas de malformation ; les fœtus peuvent combattre l'infection virale, la virémie a la même durée que lors d'une infection post-natale.

Les animaux peuvent donc naître virémiques. Une infection à un stade intermédiaire, alors que le système immunitaire n'est pas complètement développé, pourrait entraîner une infection prolongée ; certains agneaux infectés in utero pourraient rester virémiques plus de deux mois (Wilson et al., 2008).

## **2.2. LE VIRUS ET LA REPONSE IMMUNITAIRE**

### **2.2.1. Le virus de la Bluetongue**

Le virus de la bluetongue (BTV) est le membre le plus étudié de son genre, il est donc bien connu des virologistes. Nous nous appuyons sur une synthèse de P. Roy [0] et sur un article de revue de Schwartz (Schwartz et al., 2008) pour décrire sa classification, sa structure et son cycle.

- **Classification**

Le BTV est un virus appartenant à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*. Cette famille inclut des pathogènes de vertébrés, d'arthropodes et de plantes. Elle contient entre autre les *Reovirus* et les *Rotavirus*, avec lesquels les *Orbivirus* partagent des similarités de base (virus à ARN double brin segmenté, virion nu). Ce sont dans les détails de leurs structures, de leurs propriétés physicochimiques, de leurs pathogénies et de leurs épidémiologies que se différencient les *Orbivirus*. Les *Orbivirus* sont des « arbovirus » (ARthropod BORne VIRUS – virus dont la transmission d'un animal à un autre est effectuée par un arthropode piqueur) répartis en 19 sérogroupes parmi lesquels le BTV, l'African Horse Sickness virus et l'Epizootic Hemorrhagic Disease virus.

A l'intérieur du sérotype BTV, 24 sérotypes ont été définis sur base de tests de neutralisation croisée.

- **Structure du virion**

Le BTV a été particulièrement étudié à l'aide de techniques de cryo-électromicroscopie et de cristallographie aux rayons X.

Le virion est non-enveloppé et contient 10 segments d'ARN double-brin.

La coque externe (capside) est composée de deux protéines structurales : 60 trimères de VP2 et 120 trimères de VP5.

La coque interne, délimitant le noyau viral, d'un diamètre de 69 nm, est elle-même composée de deux couches concentriques.

- La plus externe est composée de la protéine VP7 organisée en 260 trimères (capsomères) formant un icosaèdre. La structure interne des capsomères comprend un arrangement de cercles, ce qui donna le nom au genre de ce virus : latin *Orbis* (cercle).
- La plus interne est composée de la protéine VP3, organisée en 12 décamères. Cette couche englobe à son tour 3 protéines mineures : VP1, VP6 et VP4 ainsi que les 10 segments d'ARN double-brin.

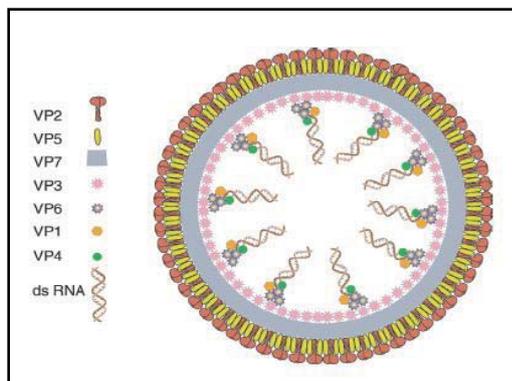


Figure 8 : Schéma représentatif des protéines structurales et de l'ARN double-brin du BTV (D'après Schwartz et al., 2008).

- **Structure du génome**

Le génome du BTV est composé de 10 segments linéaires d'ARN double-brin. Les segments peuvent être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'ordre de migration reflète la taille des segments d'ARN, que l'on peut alors distinguer en petits (S7, S8, S9, S10), moyens (M4, M5, M6) et grands (L1, L2, L3). La longueur du génome est de plus de 19200 paires de bases (pdb). La taille des segments d'ARN varie de 822 pdb pour le plus petit à 3954 pdb pour le plus grand. Neuf segments d'ARN codent chacun pour une protéine (VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6, VP7, NS1, NS2) et un segment (le plus petit) code pour deux protéines (NS3 et NS3A).

Le génome du BTV contient 57% de bases A,U et 43% de C, G.

Comme tout virus à ARN, les souches de BTV circulant dans une zone endémique montrent une remarquable hétérogénéité génétique. Ceci est dû à deux phénomènes : d'une part la dérive génétique et d'autre part les réarrangements viraux lors de co-infection par différents virus (MacLachlan, 1994).

Ainsi, cette variabilité génétique considérable peut être reflétée par des propriétés phénotypiques différentes de chaque souche virale du terrain. En outre, des différences de virulence sont démontrées entre deux souches d'un même sérotype (Waldvogel et al., 1992).

- **Les protéines structurales**

- **VP2**

VP2 est une protéine structurale du BTV, elle appartient à la capsid externe. Elle est codée par le segment nucléotidique L2 et est constituée de 956 acides aminés. Il en existe environ 180 dans chaque particule virale.

Dans l'espace, elle s'organise en trimères, formant des motifs de spirales interloquées.

Elle est responsable de l'attachement au récepteur cellulaire et de l'entrée du virus, via une interaction avec une glycoprotéine de surface. Notons que VP2 a une affinité forte pour la glycoprotéine A, qui est une composante des érythrocytes ; cela peut donc être impliqué dans l'attachement de BTV aux globules rouges. VP2 est aussi une hémagglutinine. Dans la cellule, VP2 s'associe à la vimentine, ce qui permet l'interaction des virus matures avec les filaments intermédiaires de la cellule.

VP2 est responsable de la production d'anticorps neutralisants spécifiques du sérotype (VP5 joue aussi un rôle, mais il est mineur). Elle est donc le principal antigène qui détermine la spécificité sérotypique. Cette protéine est la plus variable entre les sérotypes de BTV. Le séquençage de VP2 montre une variation allant de 29% (BTV-8 et BTV18) à 59% (BTV16 et BTV22) entre sérotypes. Il existe aussi des variations de séquence de VP2 entre différentes souches d'un même sérotype (jusqu'à 30%), d'origines géographiques différentes.

- **VP5**

Comme VP2, VP5 appartient à la capsid externe du BTV. Elle est codée par le segment nucléotidique M5 et est constituée de 526 acides aminés. Environ 360 VP5 sont présentes dans chaque particule virale.

Dans l'espace, elle s'organise en trimères, formant le motif globulaire du virion.

Elle joue un rôle dans la pénétration du virus et est responsable du relargage du noyau viral de l'endosome vers le cytoplasme cellulaire. En effet, VP5 peut connaître différentes conformation en fonction du pH ; certaines peuvent permettre la fusion avec la membrane endosomiale. Cette fusion est inhibée par la présence de VP2.

- **VP3**

VP3 est une protéine majeure de la coque interne du virion. Elle est codée par le segment nucléotidique L3 et est constituée de 901 acides aminés. Il en existe environ 120 dans chaque particule virale.

Elle forme un échafaudage interne pour la disposition de VP7 et interagit avec les trois protéines mineures du noyau viral (VP1, VP4 et VP6). C'est une protéine hydrophobe.

Elle est hautement conservée entre les différents sérotypes de BTV (seulement 9 acides aminés différents entre BTV10 et BTV17).

- **VP7**

VP7 est la protéine la plus abondante du noyau viral. Elle est codée par le segment nucléotidique et est constituée de 349 acides aminés. 780 VP7 sont environ présentes dans chaque particule virale.

Son organisation en capsomère joue un rôle important dans l'intégrité de la structure du noyau viral.

La coque interne du virion n'est pas (ou peu) infectieuse pour les cellules de mammifères, mais elle l'est beaucoup plus pour les cellules de *Culicoides*. VP7 peut en effet permettre l'attachement et la pénétration du BTV aux cellules des insectes, même en l'absence de VP2 et VP5.

Enfin, VP7 étant conservé entre les sérotypes du BTV, elle détermine le sérotype. La majorité des tests ELISA anticorps commerciaux sont ciblés sur cette protéine.

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

Respectivement, VP1, VP4 et VP6 sont codées par les segments nucléotidiques L1, M4 et S9 et sont constituées de 1302, 654 et 328 acides aminés. Parallèlement, leurs ratio dans une particule virale est environ de 12, 24 et 60. Elles sont toutes trois hautement conservées entre les différents sérotypes. Elles forment le « complexe de transcription » du virus : en effet, VP1 est une ARN-polymérase, VP4 catalyse les réactions de coiffage de l'ARN viral (nécessaire à une bonne traduction), VP6 a une activité d'attachement à l'ARN simple-brin et à l'ARN double-brin, d'hélicase et d'ATPase. VP1 a une activité optimale entre 27°C et 37°C, ce qui permet une réplication efficace chez les cellules de mammifères et chez les cellules d'insectes.

- **Les protéines non structurales**

- **NS1**

NS1 est une protéine non structurale du BTV, codée par le segment nucléotidique M6 et constituée de 552 acides aminés. Elle est présente en grande quantité dans chaque particule virale. C'est la protéine la plus synthétisée dans une cellule infectée. En microscopie électronique, on peut observer dans une cellule infectée un grand nombre de tubules spécifiques du virus, composés de polymères de NS1.

- **NS2**

NS2 est codée par le segment nucléotidique S8 et est constituée de 357 acides aminés. C'est la seconde protéine la plus synthétisée dans une cellule infectée. NS2 s'attache à l'ARN simple brin viral et hydrolyse les nucléotides triphosphates en nucléotides monophosphates. NS2 a donc un rôle important dans la réplication du virus. NS2 est aussi le constituant majeur des corps d'inclusion viraux visualisés sur des cellules infectées. L'expression de NS2 est suffisante pour les former. Ces corps d'inclusion interviennent dans la réplication du virus et l'encapsidation de la capsid interne.

- **NS3 et NS3A**

Ces deux protéines sont synthétisées par le segment nucléotidique S10 et composées respectivement de 229 et 216 acides aminés. NS3A est une forme plus courte de NS3.

Ce sont les seules protéines de membrane synthétisées par les *Orbivirus*. Ce sont des porines : elles facilitent le relargage du virus en induisant une perméabilisation des membranes. Aussi, elles s'attachent à une protéine cellulaire (Tsg101), ce qui permet aux particules virales de quitter la cellule hôte par un système de bourgeonnement. Le premier mécanisme est plutôt dominant dans les cellules de mammifères, et le second dans les cellules d'insectes (chez lesquelles le BTV n'induit pas d'effet cytopathique significatif).

NS3 et NS3A ne sont presque pas détectables dans les cellules des mammifères, mais sont fortement présentes dans les cellules des insectes ; leurs rôles sont donc peut être plus importants chez ces dernières.

- **Cycle**

Le BTV interagit avec la surface de la cellule cible par l'attachement de VP2 et de glycoprotéines. Le BTV est internalisé dans des endosomes. VP2 se désolidarise rapidement de la capsid, et le pH acide permet une fusion de VP5 et de la membrane endosomiale. Le virus (isolé de la capsid) peut alors passer vers le cytoplasme cellulaire.

Dans le noyau viral, VP1 transcrit de l'ARN simple brin positif à partir de chacun des dix segments d'ARN double-brin. Cet ARN + est coiffé grâce à l'activité de VP4 et quitte la particule virale via des canaux. Il est alors traduit dans le cytoplasme cellulaire. Cette traduction commence dans les deux heures qui suivent l'infection.

L'ARN viral simple brin est ensuite encapsidé dans une coque composée de VP3 ; une encapsidation correcte (nature et nombre de segments) implique des interactions avec l'hélicase VP6, NS2 et son activité d'attachement, VP1 et VP4. VP1 transcrit alors un brin d'ARN négatif sur chaque segment, formant de l'ARN double-brin.

Si une cellule est infectée par deux BTV différents (souches ou sérotypes), des réarrangements peuvent apparaître.

Une couche de VP7 est ajoutée à cette particule virale, augmentant alors la rigidité et la stabilité du noyau viral. La capsid externe (VP2 et VP5) est ensuite ajoutée dans le cytoplasme cellulaire pour former une particule virale mature.

Ces particules matures sont transportées dans le cytoplasme cellulaire par des microtubules via les interactions entre VP2 et la vimentine. Le relargage des virions est alors effectué, soit par déstabilisation de la membrane, soit par bourgeonnement (rôle de NS3).

La production de particules matures est exponentielle de la 8<sup>ème</sup> à la 24<sup>ème</sup> heure post-infection.

## 2.2.2. La réponse immunitaire contre le BTV

- **Immunité non spécifique**

L'infection par le BTV entraîne la synthèse d'interférons. Ceci a été démontré expérimentalement chez des souris (Jameson et al., 1977) et des moutons (Foster et al., 1991). Les interférons limiteraient la dissémination du virus dans le corps (MacLachlan, 1994), en rendant les cellules infectées, et les cellules voisines (effet paracrine) réfractaires à la multiplication virale. Les interférons augmenteraient aussi l'induction de la réponse immunitaire spécifique.

- **Immunité spécifique**

L'immunité spécifique contre la bluetongue est à la fois à médiation humorale et cellulaire (Schwartz-Cornil et al., 2008).

- **Humorale**

Les ruminants réagissent à l'infection par le BTV en produisant une variété de réponse antivirale.

Des ovins inoculés avec des protéines VP2 (protéines de la capsid externe du virus) produisent des anticorps neutralisants le BTV et sont résistants vis-à-vis d'une infection à un virus du même sérotype (VP2 est la principale molécule du virus spécifique du sérotype). La contribution de VP5 à la réponse immunitaire en anticorps neutralisants n'est pas claire : plusieurs études montrent que VP5 peut directement induire la production d'anticorps neutralisants, mais aucun anticorps monoclonal spécifique de VP5 n'a jusqu'alors été décrit (Laboto et al., 1997). Dans un système d'expression en baculovirus, la présence de VP5 en association avec VP2 induit une réponse plus forte en anticorps neutralisants. Quand les protéines VP2 et VP5 sont exprimés par des vecteurs recombinants poxviraux, l'addition de VP5 à la protéine VP2 n'a aucun effet sur la production d'anticorps neutralisants et la protection des moutons contre une inoculation d'épreuve. (Lobato et al., 1997).

L'addition d'autres protéines virales (protéines du noyau viral ou protéines non structurales) n'augmente pas cette réponse (Roy et al., 1990 – Roy, 2003). Les anticorps contre la protéine VP7 sont utilisés dans les tests de diagnostic sérologique récents (ELISA). Dans l'expérience de Darpel sur le sérotype 8 (Darpel et al., 2007) , les anticorps anti-VP7 sont titrés dans le sang à partir du 7<sup>ème</sup> jour après infection, et un plateau est atteint au 10<sup>ème</sup> jour chez les ovins ; la réponse est un peu plus tardive chez les bovins (entre 8 et 10 jours, avec une phase de plateau à 18 jours post infection).

La protection vis-à-vis d'un virus à sérotype homologue est la plus importante, la contribution des anticorps neutralisants spécifiques à VP2 joue donc un rôle crucial dans l'immunité spécifique au BTV ; cependant, une protection croisée à virus de sérotypes différents peut exister : des expériences de Jeggo l'ont montré (Jeggo et al., 1983). Ceci peut être expliqué par plusieurs phénomènes :

- Des épitopes de VP2 communs entre différents sérotypes
- Le rôle des anticorps anti-VP5
- La présence d'un mécanisme d'immunité spécifique à médiation cellulaire dont la reconnaissance antigénique ne repose pas sur VP2.

- **Cellulaire**

- **Lymphocytes T cytotoxiques**

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) participent à la protection contre le BTV. En effet, le transfert de CTL spécifiques du BTV à de moutons leur confère une immunité partielle (Schwartz-Cornil et al., 2008). Des preuves de la participation de l'immunité à médiation cellulaire dans la protection contre le BTV ont été obtenues sur des souris en laboratoire, et sur des moutons. Sur des souris, des analyses de la réponse en CTL ont montré que les principales sources de reconnaissance des CTL sont les protéines non structurales, suivies de VP3, de VP7, et enfin de VP2 et VP5. Chez les ovins, des CTL spécifiques du BTV ont été décrits et la protection qu'ils engendrent est efficace contre des souches homologues et hétérologues du virus. Des essais avec des virus recombinants ont montré que les protéines immunogènes pour des CTL sont VP2 et NS1 chez le mouton: les CTL VP2-spécifiques n'apportent pas de réaction croisée, contrairement aux CTL NS1-spécifiques.

- **Lymphocytes T TauxiliaireT**

Une protection clinique contre un virus hétérologue est apportée à des moutons par un vaccin recombinant codant pour la protéine VP7 ; les effecteurs immuns responsables sont probablement des lymphocytes T CD4+, ou OhelperO (Wade-Evans et al., 1996).

Les lymphocytes T OhelperO produisent différentes cytokines activant les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages.

- **Immunité du fœtus**

La compétence immunologique vis-à-vis du BTV est acquise dès la moitié de la gestation (MacLachlan, 1994). Les fœtus peuvent produire des anticorps et des interférons. Ainsi, les conséquences d'une infection à BTV d'une femelle gravide diffèrent selon le stade de gestation (MacLachlan et al., 2008) :

- Lors de la première moitié : avortements et malformations congénitales
- Lors de la seconde moitié : pas de malformation ; les fœtus peuvent combattre l'infection virale, la virémie a la même durée que lors d'une infection post-natale.

Les animaux peuvent donc naître virémiques. Une infection à un stade intermédiaire, alors que le système immunitaire n'est pas complètement développé, pourrait entraîner une infection prolongée ; certains agneaux infectés in utero pourraient rester virémiques plus de deux mois (Wilson et al., 2008).

## **2.3. LES MOYENS DE LUTTE**

### **2.3.1. Diagnostic**

Le diagnostic de la bluetongue se base sur l'épidémiologie et la clinique voire l'autopsie, mais, compte tenu d'un diagnostic différentiel comprenant de nombreuses maladies (Guyot et al., 2007), un diagnostic de laboratoire est nécessaire pour confirmer le diagnostic clinique, et pour identifier le sérotype incriminé (Sailleau et al., 2006).

- **Diagnostic différentiel**

- **Chez les ovins**

En France, chez les ovins, il convient de différencier principalement la FCO de l'ecthyma contagieux, en raison des lésions péribuccales de nature papulo-croûteuse ou ulcéralive. Cependant, ces lésions sont observées sur l'ensemble du corps et l'infection ne provoque pas d'œdème.

Les autres maladies intervenant dans le diagnostic différentiel sont :

- la fièvre aphteuse, en raison des lésions buccales et podales qu'elle provoque. Elles sont cependant beaucoup moins prononcées que lors d'un épisode de bluetongue et ne sont pas accompagnées d'œdème.
- Les allergies aux piqûres d'insectes (papules œdémateuses, vésicules et ulcères profonds)
- Les maladies à l'origine d'œdème sous-glossien : par exemple fasciolose, coenurose, strongylose
- Les maladies à l'origine de boiteries : piétin, abcès digité, fourbure, polyarthrite
- Les maladies à l'origine d'hémorragies dans la cavité buccale : intoxication végétale, septicémie, traumatismes mécaniques, dermatoses ulcéralives.

- **Chez les bovins**

Chez les bovins, le diagnostic différentiel inclus :

- le coryza gangréneux
- la photosensibilisation (dont exposition à la sporidesmine)
- la maladie des muqueuses
- la rhinotrachéite infectieuse bovine
- la stomatite mycosique
- la stomatite vésiculeuse
- les maladies à l'origine de boiteries
- la thélite infectieuse bovine

- **Diagnostic de laboratoire**

- **Diagnostic virologique**

Le diagnostic virologique consiste à mettre en évidence le virus (diagnostic conventionnel) ou son génome (diagnostic moléculaire) (Sailleau et al., 2006).

La méthode de choix pour l'isolement du virus est l'inoculation d'œufs de poules embryonnés suivi d'un passage sur culture cellulaire : les prélèvements à effectuer sont : du sang sur EDTA (pendant la phase d'hyperthermie) ou, sur cadavre frais : la rate, le cœur, les nœuds lymphatiques. Une identification du virus peut alors être effectuée par neutralisation virale. Le délai de réponse pour cette méthode est de quinze jours minimum et peut s'étendre jusqu'à un mois.

Le diagnostic moléculaire propose une technique plus rapide : l'amplification génétique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative (en temps réel) : la RT-qPCR. Des essais terrain réalisés en 2006 en Belgique (au début de l'épizootie au sérotype 8) ont montré que cette méthode a une excellente spécificité (98.5%) et une excellente sensibilité (99.5%) (Vandebussche et al., 2007). La réponse est donnée en 48 heures et une identification du sérotype peut être effectuée par une RT-PCR de type.

L'infectiosité du virus, c'est-à-dire la possibilité que l'animal soit contaminant au moment du test, n'est assurée qu'avec un isolement viral. Un résultat positif en PCR n'est pas synonyme d'infectiosité ; on considère qu'avec un Ct<30 le virus est infectieux, avec un Ct entre 30 et 35 il faut confirmer par isolement, et avec un Ct>35 l'animal n'est probablement pas contaminant. Toutefois, ces critères n'ont pas de base scientifique stricte. Dans une étude de protection vaccinale, Hamers et coll. (2009) suggère que le virus BTV ne peut pas être isolé en cultures cellulaires lorsque les charges virales sont inférieures à  $3.14 \log_{10}$  copies. Plus récemment, en comparant l'isolement viral sur œufs embryonnés et différentes techniques de rt-qPCR, il a été montré que les résultats obtenus par PCR (nombre de copies/ml de sang) étaient en moyenne supérieur de 2,9 logs aux résultats de l'isolement (EID50/ml de sang) (Chatzinasiou et al., 2010).

#### ○ Diagnostic sérologique

Plusieurs techniques de diagnostic sérologique ont été mises au point, mais seules deux d'entre elles sont recommandées par l'Office International des Epizooties : l'immunodiffusion sur gélose et l'ELISA (Afshar, 2002). Ces deux méthodes permettent un diagnostic de groupe puisqu'elles sont fondées sur la reconnaissance d'antigènes communs aux 24 sérotypes (protéine VP7) (Sailleau et al., 2006). Les prélèvements à effectuer sont du sang sur tube sec. L'immunodiffusion sur gélose est facile et rapide à effectuer, mais sa sensibilité et sa spécificité sont faibles. L'ELISA de compétition s'est avérée une épreuve sensible et spécifique : les essais terrains belges ont montré que la spécificité est de 98.2% et la sensibilité de 87.8% (Vandebussche et al., 2007).

Une technique ELISA sandwich (double antigène) existe également. Oura et coll. (2009) montre que la sensibilité de cette ELISA est supérieure à la sensibilité de l'ELISA de compétition.

La séroneutralisation sur culture de cellules est utilisée pour identifier l'identité du ou des sérotypes contre lesquels sont dirigés les anticorps, mais son interprétation est souvent délicate.

Un essai de 2007 a permis la validation d'un test ELISA commercial de détection des anticorps anti-BTV dans des échantillons individuels de lait (Kramps et al., 2008).

### **2.3.2. Vaccination**

De nombreux efforts ont été effectués pour développer des vaccins contre la fièvre catarrhale ovine. Deux propriétés majeures sont demandées à un vaccin, sa sécurité et son efficacité. Permettre la distinction entre les animaux vaccinés et les animaux infectés (par un virus sauvage) peut être intéressant en termes d'échanges commerciaux. Des vaccins multivalents peuvent être intéressants dans les zones où plusieurs sérotypes du BTV sont présents.

Il existe deux grands types de vaccins : les vaccins vivants atténués et les vaccins inactivés. Des vaccins de nouvelles générations sont en cours de développement (Savini et al., 2008 – Schwartz-Cornil et al., 2008).

- **Les vaccins vivants atténués**

Des vaccins atténués ont été développés en premier en Afrique du Sud et, plus récemment, en Italie et dans les îles Baléares. Ces vaccins induisent une forte protection, une seule injection est nécessaire pour au moins un an de protection et ils sont peu chers à produire (Hunter et al., 2001; Lacetera et al., 2004; Veronesi et al., 2005; Savini et al., 2008).

Cependant, des défauts d'innocuité ont été enregistrés avec ces vaccins (Young et al., 1964; Osburn et al., 1971; MacLachlan et al., 1985). Des effets secondaires ont en effet été observés tels que des signes cliniques de la maladie, des avortements, une baisse de productivité laitière et une baisse de la qualité de la semence. De plus les animaux vaccinés présentent une période de virémie pendant laquelle ils peuvent transmettre le virus à un autre animal via la pique d'un moucheron vecteur (Veronesi et al., 2005) Une réversion de virulence et des réarrangements entre souches vaccinale et sauvage ont aussi été publiées (Ferrari et al., 2005; Monaco et al., 2006), ce qui peut engendrer l'arrivée de nouvelles souches de virus de virulence inconnue.

Par ailleurs ces vaccins ont été associés à des défauts d'innocuité sur les femelles en gestation. Pour certains d'entre eux, ils étaient responsables d'avortements ou de malformation congénitale. L'atténuation sur cultures cellulaires serait responsable d'une modification du tropisme viral et d'une plus grande sensibilité des tissus fœtaux et nerveux à l'infection virale (MacLachlan et al., 1985).

Enfin les vaccins atténués ne permettent pas la distinction entre animaux vaccinés et infectés.

Pour ces raisons, des vaccins inactivés sont principalement utilisés en Europe.

- **Les vaccins inactivés**

Les vaccins inactivés sont plus difficiles, donc plus chers à produire. Mais ils confèrent aux ruminants une immunité protectrice et sécuritaire (Savini et al., 2008), dont la durée est évaluée à 12 mois post-vaccination. La primovaccination nécessite deux injections, sauf pour quelques vaccins et pour les ovins.

La différenciation animaux vaccinés/animaux infectés est théoriquement possible, compte tenu du fait que le virus inactivé ne contient pas de protéine non-structurale. Des sérologies ELISA contre NS1 ou NS3 sont ainsi en développement. En réalité l'injection successive de vaccins inactivés, aussi purifiés soient-ils, peut entraîner à terme l'induction d'une réponse sérologique contre les protéines non structurales.

Les propriétés d'efficacité/innocuité de ces vaccins ont conduit l'Agence Européenne de la Sécurité Alimentaire à recommander les vaccins inactivés contre la bluetongue. Cependant, ces vaccins ne sont disponibles que contre certains sérotypes. Pour faire face à l'épizootie au sérotype 8 en Europe du Nord, des vaccins inactivés ont été développés et sont actuellement sur le marché français.

Les paramètres d'efficacité pris en compte ont été la réduction des signes cliniques et de la virémie. Plusieurs études ont prouvé l'efficacité des vaccins inactivés à BTV 8 chez les bovins et les ovins (Eschbaumer et al., 2009 – Hamers et al., 2009 – Oura et al., 2009 – Wäckerlin et al., 2010). Cette efficacité semble durer au moins un an.

Dans un essai terrain, Galleau (Galleau et al., 2009) a évalué l'efficacité d'un vaccin inactivé contre le sérotype 8 sur les vaches gravides. Aucune copie du génome viral n'a été détectée sur les animaux vaccinés lors de l'infection naturelle à BTV-8 qui a eu lieu 5 mois

après la vaccination (la quasi-totalité des vaches non vaccinées ont séro-converti et des copies de génomes ont été détectées dans leur sang par RT-PCR). Sur 24 veaux nés de vaches du lot témoin, 10 étaient positifs au test de RT-PCR dans les premiers jours après la naissance. Chez les 21 veaux nés de vaches vaccinées, aucune copie de génome viral n'a été détectée dans le sang dans les premiers jours après la naissance.

L'inconvénient des vaccins inactivés et qu'ils ne protègent que contre le sérotype vaccinal. Des vaccins bivalents ont été commercialisés mais aucune donnée n'existe sur l'efficacité de vaccins multivalents ou sur l'utilisation en commun de plusieurs valences vaccinales.

- **Les vaccins de nouvelles générations**

Plusieurs vaccins recombinants expérimentaux ont été décrits et ils montrent clairement de nombreux bénéfices potentiels (Savini et al., 2008), comme une induction rapide de l'immunité, une possible stratégie polyvalente. Une distinction animaux vaccinés/animaux infectés est possible si le vaccin ne contient pas certains antigènes du BTV.

Un capripoxvirus recombinant exprimant VP7 de BTV 1 a engendré une protection partielle hétérologue (BTV 3) (Wade-Evans et al., 1996).

Un vaccin recombinant, utilisant un poxvirus exprimant VP2 et VP5 a été étudié par Lobato (Lobato et al., 1997) : des anticorps neutralisants ont été titrés et une protection homologue décrite, mais, compte tenu de la non restriction d'hôte du virus, ce vaccin n'a pas été considéré comme assez sécuritaire

Un vaccin recombinant utilisant un canarypoxvirus et exprimant VP2 et VP5 a été récemment décrit et induit une forte immunité protectrice homologue (BTV 17) chez les ovins (Boone et al., 2007). Un avantage est que le canarypoxvirus est déjà utilisé dans plusieurs vaccins recombinants utilisés aux USA et ailleurs.

Un essai vaccinal utilisant comme vecteur un myxoma virus exprimant la protéine VP7 a démontré que ce virus a la capacité d'induire une réponse humorale et cellulaire dans l'espèce ovine, mais aucune protection clinique n'a été observée (Caruso, 2009).

Le virus myxomateux exprimant la protéine VP2 du BTV-8 induit une forte réponse immunitaire et protège cliniquement les ovins contre une inoculation d'épreuve hautement virulente à BTV-8. La protection virologique n'était que partielle.

Une autre approche de vaccination vectorisée est celle des "virus like particle (VLP)" : des protéines structurales du BTV produites par un baculovirus et qui s'auto-assemblent en particules, à l'origine de la réaction immunitaire. Ces VLP stimulent une réponse immunitaire forte et durable, à l'origine d'une protection clinique homologue (Noad et al., 2003, Roy et al., 1992). Ces vaccins, uniquement constitués de protéines, sont considérés comme sécuritaires. En incluant différentes protéines VP2, les VLP peuvent être des vaccins multivalents.

Enfin, des modifications génétiques du BTV peuvent permettre la production de vaccins vivants non virulents (Boyce et al., 2008).

### **3.ETUDE EXPERIMENTALE**

### **3.1. OBJECTIF**

La vaccination obligatoire, en France, des ovins et des bovins contre le BTV-8 durant l'année 2008 a été pratiquée avec des vaccins inactivés qui ne bénéficiaient que d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Les laboratoires ont prouvé l'efficacité clinique des vaccins, chez les ovins, à partir de 3 semaines après l'injection de primovaccination. En l'absence de suffisamment de vaccins disponibles, la vaccination a été réalisée en commençant par le nord-est du pays, et en se dirigeant vers le sud-ouest, tout-à-fait en parallèle de la propagation de la maladie elle-même. Dans la mesure où la vaccination a été pratiquée en pleine épizootie, l'apparition de la maladie sur des animaux préalablement vaccinés a été souvent mal comprise par les éleveurs. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'un vaccin inactivé lorsque l'infection virale apparaissait précocement, avant la date officielle de couverture vaccinale.

En outre, dans les ATU puis les AMM des vaccins anti BTV, la protection clinique est évaluée sur base de la réduction de l'hyperthermie et/ou des signes cliniques majeurs de la bluetongue. Ces vaccins n'ont aucune indication de protection des fonctions de reproduction des animaux. Le deuxième objectif de cette étude visait donc à évaluer l'impact d'une infection par BTV sur la qualité du sperme de béliers reproducteurs.

### **3.2. MATERIEL ET METHODES**

#### **3.2.1. Virus et cultures cellulaires**

- **Cultures cellulaires**

Les cellules utilisées pour amplifier et titrer le virus ont été des fibroblastes de rein de bébé hamster BHK 21 (n°ATCC = CCL10). La culture de ces cellules a été effectuée en étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture de base était composé de 500 ml de Milieu Essentiel Minimum (MEM) contenant des sels de Earle et de la L-glutamine 1X, de 5 ml d'acides aminés non essentiels (AANE) 100X, de 5 ml de pénicilline à 10000 U/ml et de streptomycine à 10000 U/ml. Les cellules ont été entretenues en flacons de 175 cm<sup>2</sup>. Pour chaque passage, ces cellules ont été trypsinées sur un tapis confluent, puis diluées en milieu MEM de base contenant en plus 10 % de sérum de veau fœtal.

- **Souche virale**

La souche virale utilisée est une souche de virus de la bluetongue sérotype huit (BTV-8) isolée en Allemagne en 2007.

Cette souche virale a été mise en culture sur des flacons de 25 cm<sup>2</sup> (F25) de culture cellulaire préparés 48 heures auparavant : 1 ml d'inoculum a été déposé dans chaque F25, une agitation douce a été effectuée pendant deux heures à 37°C. L'inoculum a alors été retiré et remplacé par 5 ml de milieu complet à 3% de sérum de veau fœtal (SVF) + 1% de fungizone. 24 heures plus tard, le milieu a de nouveau été changé. On a vérifié l'effet cytopathique : il était de 100% au bout de 48 heures. Une congélation à -80°C a alors eu lieu.

Trois passages successifs en culture cellulaire ont été réalisés afin d'amplifier le titre viral. Pour cela, les flacons précédents ont été rapidement décongelés (bain marie à 37°C) et 1 à 2 ml de ces suspensions cellulaires infectés ont été déposés dans des F25 de culture cellulaire. Les opérations « adsorption 2H 37°C sur l'agitateur bidirectionnel », « élimination

de l'inoculum et remplacement par du milieu complet 3% de SVF » et « changement de milieu au bout de 24 heures » ont été répétées.

- **Titration du virus**

L'inoculum ainsi obtenu a été décongelé rapidement et maintenu à 4°C. Des dilutions au dixième en série ont été effectuées (les concentrations allant de inoculum pur à 10<sup>-5</sup>, en milieu complet sans sérum). Sur des plaques de 24 puits, 200 µl de ces dilutions ont été déposés à raison de 4 à 8 puits par point de dilution. Les plaques ont été incubées 2 heures à 37°C sous CO<sub>2</sub>. L'inoculum a ensuite été enlevé et remplacé par 1 ml de milieu complet contenant 3% de SVF. Le milieu a à nouveau été changé au bout de 24 heures.

Quatre jours plus tard, ces cultures virales ont été fixées : pour cela : le surnageant de culture des puits a été éliminé, et chaque puit a été rincé avec du PBS (phosphate buffered saline) sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>. La nappe cellulaire a ensuite été recouverte par un fixateur (90% d'acétone et 10 % d'eau distillée, maintenu froid à -20°C). L'acétone est un solvant organique qui dénature les lipides et perméabilise la membrane plasmique. Les plaques ont été conservées 15 min à -20°C, l'acétone a été éliminée et les plaques séchées. La fixation a ainsi figé les structures dans un état stable analysable. Les plaques ont ainsi pu être révélées par immunocytochimie.

Pour le titrage du virus, 200 µl d'un anticorps appartenant à un sérum polyclonal d'un bovin infecté à BTV ont été distribués dans chaque puits. Après une incubation d'une heure à 37°C, l'anticorps a été éliminé et les puits rincés 2 fois avec du PBS. Le conjugué secondaire (anticorps anti IgG bovines) et marqué à la peroxydase a été distribué à raison de 200 µl par puit. Une incubation de 30 minutes à 37°C a eu lieu, et les plaques ont été rincées comme précédemment (avec du PBS). 200 µl de substrat (Amino Ethyl Carbazole) ont été distribués dans chaque puit, puis une incubation de 10 minutes à température ambiante a eu lieu. Enfin, les puits ont été rincés au PBS deux fois et du PBS a finalement été ajouté dans les puits. Les plaques ont ainsi pu être lues au microscope : numération des plages de lyses bien individualisées. Le titre viral a été exprimé en TCID<sub>50</sub> selon la méthode de Spearman-Kärber.

- **Préparation de l'inoculum viral**

L'inoculum a été préparé par injection sous cutanée de 4 moutons avec 10 ml de virus BTV-8 titrant à 5.10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml. La virémie a été suivie par RT-PCR en temps réel (voir infra). Cent millilitres de sang par mouton ont été récupérés six jours après l'infection sur deux moutons présentant des Ct de 21,4 et 22,8. La conservation du sang a été effectuée à +4°C pendant 2 jours. Un inoculum témoin a été réalisé avec des moutons injectés avec 10 ml de milieu de culture cellulaire. Du sang vironégatif a été récupéré à J6 sur les deux animaux inoculés.

### **3.2.2. Schéma expérimental**

- **Animaux**

Douze ovins mâles de race Lacaune, âgés de 18 à 24 mois, réformés de deux centres de sélection Lacaune ont été utilisés. Quatre béliers avaient été vaccinés contre le BTV-8 treize jours avant l'infection expérimentale. Le vaccin utilisé est un vaccin inactivé utilisable en une injection dans l'espèce ovine.

L'essai a eu lieu dans les unités expérimentales de niveau 2 de biosécurité du centre INRA de Nouzilly. Les animaux ont été répartis en 2 lots isolés dans 2 unités physiquement séparées : les animaux témoins, non infectés (n=4 – groupe 1), et les animaux infectés (n=8, 4 non vaccinés – groupe 2, 4 vaccinés – groupe 3).

- **Infection des moutons**

Huit béliers ont été infectés avec le BTV 8 par voie sous cutanée et par voie intradermique. Par voie sous cutanée les animaux ont reçu 10 ml de sang provenant d'un animal virémique dont la charge virale avait été estimée à un Ct de 21,4 par RT-qPCR. Par voie intradermique, les animaux ont reçu 3x1 mL d'une suspension de virus passé en cultures cellulaires BHK-21 et titrant à  $3 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml. Après inoculation, le titre de la suspension cellulaire a été vérifié à une valeur de  $1,2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml et le sang a été vérifié par PCR à un Ct de 22.

Les 4 animaux non infectés (groupe 1) ont reçu respectivement les mêmes volumes de milieu de culture cellulaire et de sang provenant d'un animal non infecté.

Le jour de l'infection a été considéré comme le jour zéro (J0).

- **Suivi clinique**

Un examen clinique biquotidien a été réalisé par le même opérateur jusqu'à l'euthanasie des individus, avec pour le matin un relevé des fréquences cardiaques et respiratoires, de la température rectale et des signes cliniques sur une grille de notification (cf. annexe – paragraphe 6.1) et pour la fin d'après-midi un relevé des fréquences cardiaques et respiratoires, et de la température rectale.

- **Euthanasies**

Trois animaux ont été euthanasiés à J6, à l'aide d'une anesthésie générale sous pentobarbital sodique 15 mg/kg et d'une saignée. Il s'agissait d'un animal témoin (mouton 1C) et deux animaux infectés non vaccinés (moutons 2A et 2C).

Trois animaux ont été euthanasiés à J15 : un bélier non infecté (1D), un bélier infecté vacciné (3D), un bélier infecté non vacciné (2D) et les 6 derniers béliers ont été euthanasiés à J20 selon le même protocole.

- **Prélèvements**

- **Sang**

Des prélèvements sanguins ont été effectués, sur tous les animaux tous les deux jours de J0 à J18 sur tubes EDTA pour la quantification de la charge virale et sur tubes secs pour la sérologie. Les tubes EDTA ont été conservés à -80°C et les tubes secs ont été centrifugés puis les sérums aliquotés et conservés à -20°C.

- **Sperme**

Une récolte de sperme a été effectuée sur tous les béliers 2 fois avant l'inoculation (J-5 et J-1) et deux fois par semaine pendant toute la durée de l'expérience (J3, J7, J10, J15, J17, J21). La semence a été récoltée à l'aide d'un vagin artificiel après préparation sexuelle sur femelle en chaleurs.

- **Prélèvements nécropsiques**

Lors des autopsies, des prélèvements ont été effectués (liste : annexe – paragraphe 6.5) : deux types de conservation étaient réalisés, l'une en milieu formol, pour les analyses histopathologiques et l'autre dans du conservateur d'ARN (RNAlater, Quiagen, France) pour les analyses virologiques.

### 3.2.3. Analyses

- **Clinique**

Un score clinique est défini par animal et par jour selon le tableau 3.

- **Fonction de reproduction**

Le suivi de la fonction de reproduction a été réalisé en collaboration avec l'UNCEIA (Union Nationale des Coopératives d'Elevage et d'Insémination animale).

L'analyse de sperme fût effectuée sur le site de l'INRA de Nouzilly. Les paramètres pris en compte sont présentés dans le tableau 4.

Compte tenu du faible nombre de béliers et du refus de saut de certains béliers, il a été décidé de regrouper les données de quantité et qualité du sperme en périodes. La période A correspond aux prélèvements réalisés avant infection à J-5 et J-1, la période B aux prélèvements réalisés lors des 10 premiers jours post infection (J3, J7 et J10) et la période C correspond aux prélèvements réalisés à J14, J17 et J21. Il a été vérifié auparavant l'absence d'effet du prélèvement à temps t sur le prélèvement à temps t+1.

Pour le groupe 3 (et pour toutes les périodes), les données du bélier 3A n'ont été prises en compte.

Signe clinique		score
Comportement	normal	0
	apathique	1
	déprimé	2
	prostré	3
Œdèmes	face	1
	auge	1
	testicules	1
	cornée+iris	
Congestion	légère	2
	sévère	4
Locomotion	Boiterie	2
	Raideur	2
Respiratoire	jetage nasal léger	1
	jetage nasal important, croûtes	2
	dyspnée	1
	toux	1
Digestif	diarrhée	1
Oculaire	larmoiement S	1
	larmoiement MP	1
	conjonctivite	1
Cavité buccale	hypersalivation	1
	stomatite légère	2
	stomatite sévère	4
Température	40 à 41	2
	41 à 42	3
	>42°C	4

**Tableau 3 : Tableau descriptif du "scoring clinique"**

Paramètres	Signification	Technique
Vol	volume de l'éjaculat. ml	Tube gradué
Conc	Concentration de l'éjaculat. Md/ml	hématimètre
VIV	% de spermatozoïdes vivants	cytomètre
VAP	Paramètre de vitesse en $\mu\text{m/s}$ . Distance moyenne du spz sur le temps de l'analyse.	CASA*
MOT	% de spz mobiles	CASA*
Anotot	% anomalies morphologiques totales	microscope

**Tableau 4 : Paramètre du spermogramme étudiés**

\*CASA : Computer assisted semen analyser (analyse de semence assistée par ordinateur)

- **Histopathologie**

Les prélèvements en formol ont été conditionnés en cassette dans le mois qui a suivi les autopsies. Une déshydratation à l'éthanol et un enrobage de paraffine ont ensuite eu lieu. Ces prélèvements ont été le support d'analyses histopathologiques, effectuées sur des coupes des tissus prélevés, après coloration à l'Hémalum-Eosine.

- **Virologie**

Le suivi virologique a été réalisé par RT-PCR sur les prélèvements de sang (EDTA), sur sperme (4 jours de prélèvements : J-1, J3, J10, J21), et sur les prélèvements post-mortem (conservés avec RNA-later).

L'extraction de l'ARN du substrat est une étape préliminaire à la RT-PCR. Pour le sang et le sperme, elle a été effectuée pour à l'aide du kit Nucleospin RNA Virus (réf. 740956.250 Macherey Nagel), selon le protocole détaillé en annexe (paragraphe 6.3). Pour les tissus conservés avec RNA-later, elle a été effectuée à l'aide du kit Nucleospin RNA II (réf. 740956.250 Macherey Nagel) selon le protocole détaillé en annexe (paragraphe 6.2).

La RT-PCR est une technique qui associe une transcription inverse de l'ARN (RT, reverse-transcriptase) à une amplification génétique (PCR, polymersae chain reaction). L'ADN complémentaire est synthétisé par une ADN polymerase ARN dépendante (la transcriptase inverse) et est amplifié par PCR quantitative (ou PCR en temps réel). La PCR quantitative mesure la charge virale, en mesurant le nombre d'amplicons (portion d'ADN définie par un couple d'amorces) produits au cours de la réaction : cette quantité est proportionnelle au nombre de copies présentes dans le tube au début de la réaction. La RT-PCR utilisée a été celle du Kit Taqvet® Blue-Tongue Virus all genotypes (LSI<sup>ND</sup>, Lissieu, France), selon le protocole détaillé en annexe (paragraphe 6.3), avec le thermolyseur Applied 7000 (Biosystem Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). Ce kit est ciblé sur le gène L1, codant pour la protéine VP1. Les résultats ont été analysés avec le logiciel SDS v1.2.

Les résultats de la RT-PCR quantitative ont été exprimés en Ct, pour "Cycle Threshold", ou en nombre de copies d'ARN après quantification par rapport à une gamme plasmidique d'un plasmide contenant l'amplicon généré par la PCR LSI Taqvet (plasmide aimablement fourni par E. Sellal, LSI, Lissieu, France).

- **Sérologie**

Le suivi de la réponse immunitaire a été réalisé d'une part par l'étude de la réponse en anticorps anti-VP7 et d'autre part par séroneutralisation.

- **ELISA Compétition**

La mise en évidence d'anticorps dirigés contre la protéine VP7 du BTV a été réalisée avec le test ELISA de compétition ID Screen® Blue Tongue Competition (ID-Vet, Montpellier, France). Les étapes de réalisation du test sont décrites en annexe (paragraphe 6.4).

Les cupules sont sensibilisées avec la protéine VP7 du BTV. Les anticorps anti-VP7, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps qui masque les épitopes de la protéine VP7. Un conjugué anti-VP7 marqué à la peroxydase (POD) est ensuite distribué dans les cupules. Il se fixe sur les épitopes de la VP7 restés libres, formant un complexe antigène-conjugué-POD. Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TétraMéthylBenzidine – TMB). La coloration qui en résulte est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester.

- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage de la réaction avec l'acide sulfurique.

- En présence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration.

La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

Le test est validé si :

- la valeur moyenne de densité optique des contrôles négatifs ( $DO_{CN}$ ) est supérieure à 0,7

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

Les résultats de l'ELISA de compétition sont exprimés en pourcentage de compétition, ou pourcentage d'inhibition.

$$\% \text{ inhibition} = DO_{\text{échantillon}} / DO_{CN} \times 100$$

Les échantillons présentant un pourcentage de compétition

- inférieur ou égal à 35% sont considérés comme positifs

- supérieur à 35 % et inférieur ou égal à 45% sont considérés comme douteux

- strictement supérieur à 45% sont considérés comme négatifs.

- **Séroneutralisation**

La séroneutralisation consiste à évaluer l'aptitude d'un sérum à bloquer la capacité infectieuse d'un inoculum. Cette aptitude peut être analysée par exemple en vérifiant la disparition de l'effet cytopathique (ECP) d'un virus en présence de dilutions croissantes du sérum à tester. Si cette inhibition est obtenue, on conclut à la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum.

Pour cela des dilutions décroissantes d'un facteur 2 ont été réalisées pour chaque sérum testé. Brièvement les dilutions ont été mises en contact avec du BTV-8 à quantité de

virus constant (150 UFP par 105 cellules) pendant une heure à 37°C. Le mélange sérum/BTV-8 a été déposé (100 µl) en quadriplate sur cellules Vero (105 cellules). Après 2 heures d'absorption, le milieu est remplacé par un milieu de culture DMEM + 1% pénicilline-streptomycine + 3% de SVF. Les puits sont analysés 5 jours après pour leur effet cytopathique ou non. Le titre en anticorps neutralisant est calculé et exprimé en ED50/ml selon la technique de Spearman-Kärber.

### **3.2.4. Analyses Statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées pour les données de température rectale, charge virale sanguine (déterminée par rt-PCR quantitative) et paramètre du sperme, en utilisant le logiciel Systat 10 (Systat Software, SPSS, Richmond, CA).

Après transformation logarithmique, l'effet des facteurs « groupe » et « jour » a d'abord été évalué avec un modèle partiellement hiérarchique à trois facteurs (splitplot). Si l'interaction « groupe » et « jour » était significative, des comparaisons multiples entre groupes ont été effectuées avec un test de Tuckey pour chaque jour post-infection. Les données ont été définies statistiquement significatives si la valeur p était inférieure à 0,05.

Les mêmes analyses ont été effectuées pour la comparaison des paramètres du sperme regroupés en périodes (cf. supra).

### 3.3. RESULTATS

Dans les figures présentées, les graphiques de données par groupe présentent la moyenne arithmétique +/- l'écart type des valeurs.

#### 3.3.1. Signes cliniques

Les animaux infectés non vaccinés (groupe 2) ont tous présenté de l'hyperthermie. En moyenne la fièvre a démarré au 4<sup>ème</sup> jour post-infection, un pic (41,5°C) a eu lieu au 7<sup>ème</sup> jour post-infection et les animaux sont redevenus normotherme au 13<sup>ème</sup> jour post-infection.

Les animaux contrôles non infectés et non vaccinés (groupe 1) n'ont présenté aucune hyperthermie ni signes cliniques lors de l'expérimentation (Figure 9) Un bélier infecté vacciné (bélier n°3B) a été en hyperthermie le 1<sup>er</sup> jour post infection, cette hyperthermie n'a pas duré (bélier normotherme à J2) et aucun autre signe clinique n'a été observé. Un deuxième bélier vacciné et infecté (3A) a présenté une hyperthermie de 4 jours, similaire à celle observée chez les 4 béliers infectés non vaccinés. Les deux autres béliers n'ont pas présenté d'hyperthermie.

L'élévation de température du groupe 2 est statistiquement significative :

- par rapport au groupe 1, des jours 6 ( $p < 0,001$ ) à 9 ( $p = 0,03$ ).
- par rapport au groupe 3, des jours 6 ( $p = 0,001$ ) à 8 ( $p = 0,005$ ).

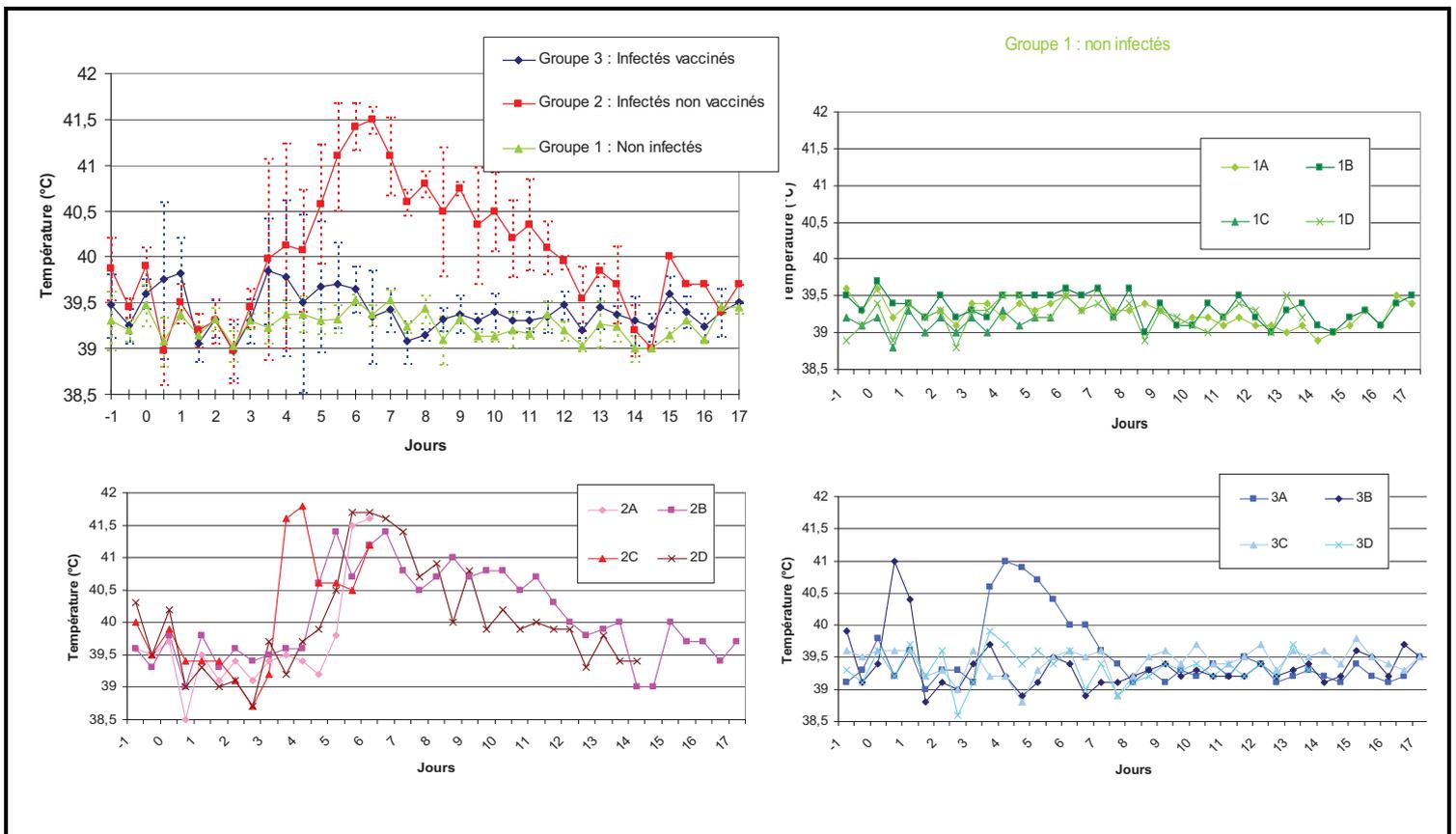


Figure 9 : Evolution de la température rectale des béliers

Les signes cliniques observés ont été caractérisés par de l'œdème, une congestion de la face et du scrotum et des lésions hémorragiques (pétéchies et suffusions) sur la peau. Les béliers infectés non vaccinés ont présenté ces symptômes du 4<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> jour post-infection (Figure 10). Pour le groupe infecté et vacciné, le bélier 3A se différencie des 3 autres béliers du groupe par la présence d'un score clinique similaire à celui observé chez les béliers non vaccinés. Les béliers 3D et 3B ont présenté de légers signes cliniques avec des scores inférieurs à 3, et le bélier 3C est resté sain.

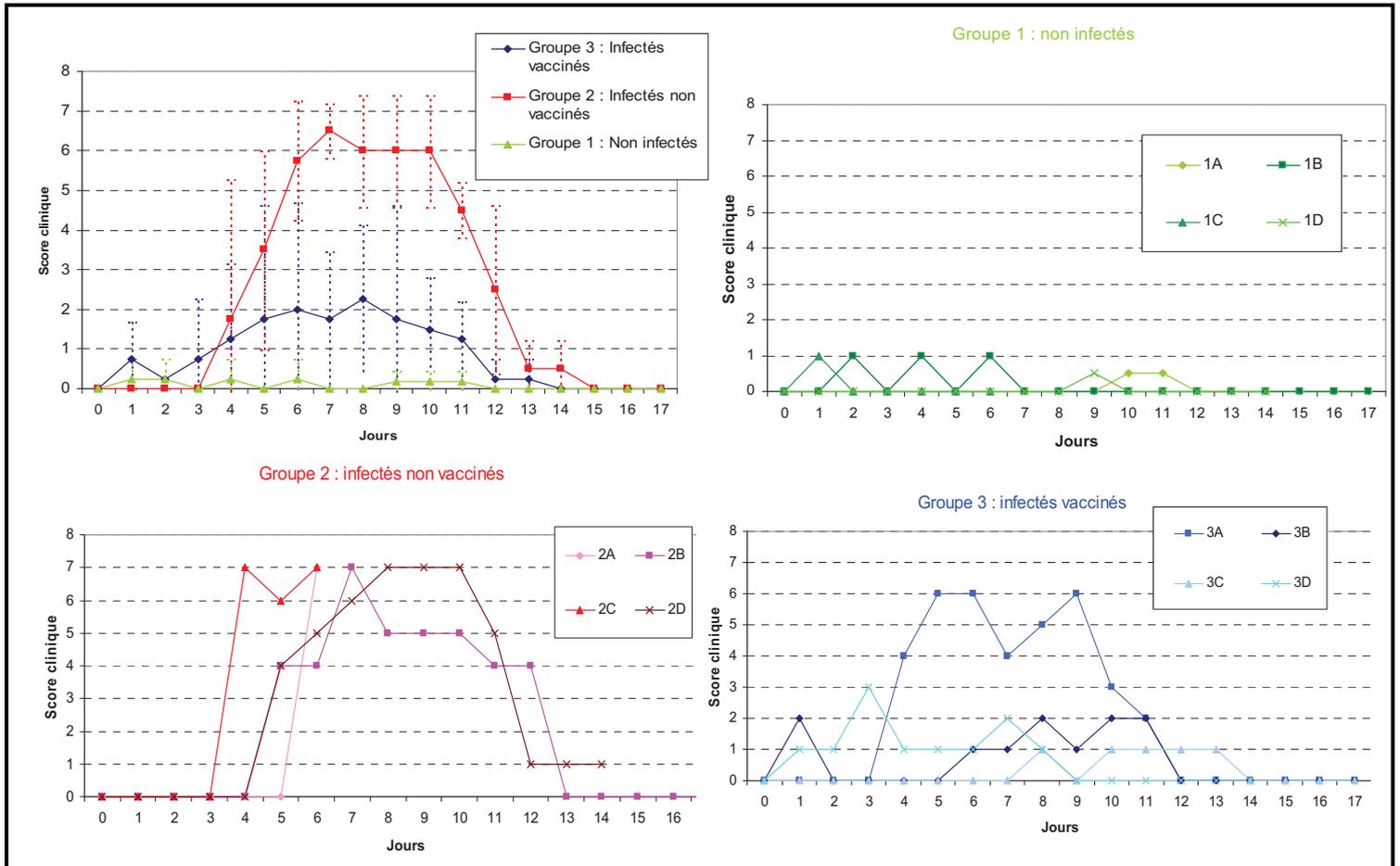


Figure 10 : Evolution du score clinique des béliers

Les fréquences cardiaques et respiratoires n'ont pas évoluées de façon significative pour tous les animaux testés (figure 11).

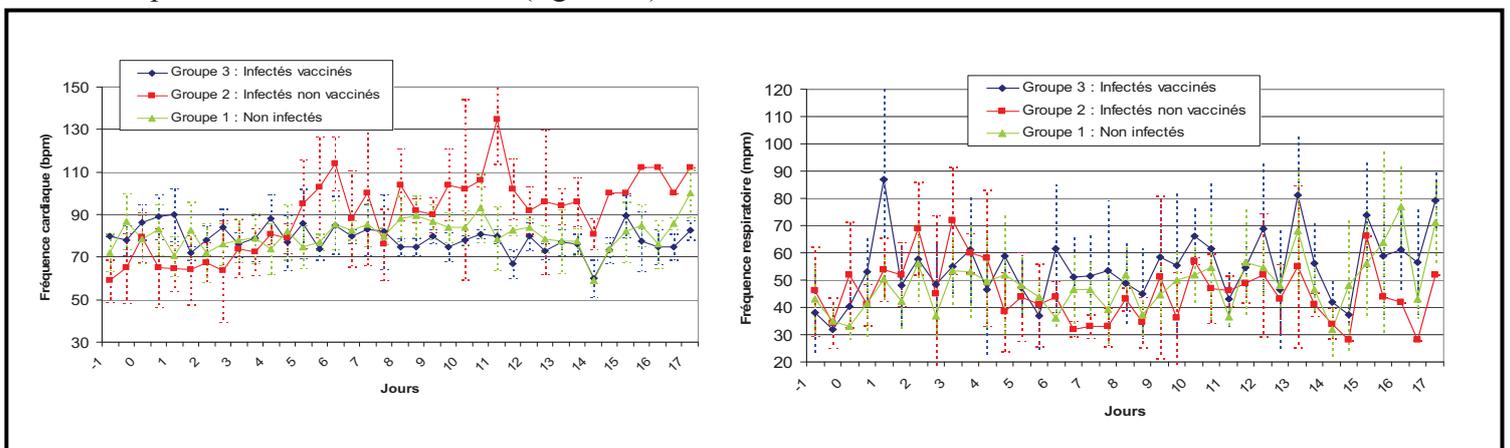


Figure 11 : Evolution des fréquences cardiaques et respiratoires des béliers

### 3.3.2. Quantité et qualité du sperme.

L'évolution des paramètres étudiés est présentée dans les figures 12 à 17. Plusieurs refus de sauts ont eu lieu, à J7, pour les béliers 2B et 2D ; à J10, pour le bélier 2D, probablement en raison de l'état d'abatement des animaux.

Le volume de l'éjaculat ne semble pas modifié par l'infection à BTV-8 (figure 12). La concentration de l'éjaculat semble légèrement modifiée (figure 13), tandis que les valeurs de pourcentage de spermatozoïdes vivants (figure 15), pourcentage de spermatozoïdes mobiles (figure 14), distance moyenne parcourue par les spermatozoïdes (figure 16) déclinent fortement, de même que le pourcentage d'anomalies totales augmente fortement (figure 17), à partir de J15 chez les béliers infectés non vaccinés et chez le bélier infecté vacciné 3A.

Compte tenu de l'absence d'effet groupe sur la période d'infection expérimentale, il n'a pas été possible de comparer les groupes 2 à 2 pour chaque jour post infection.

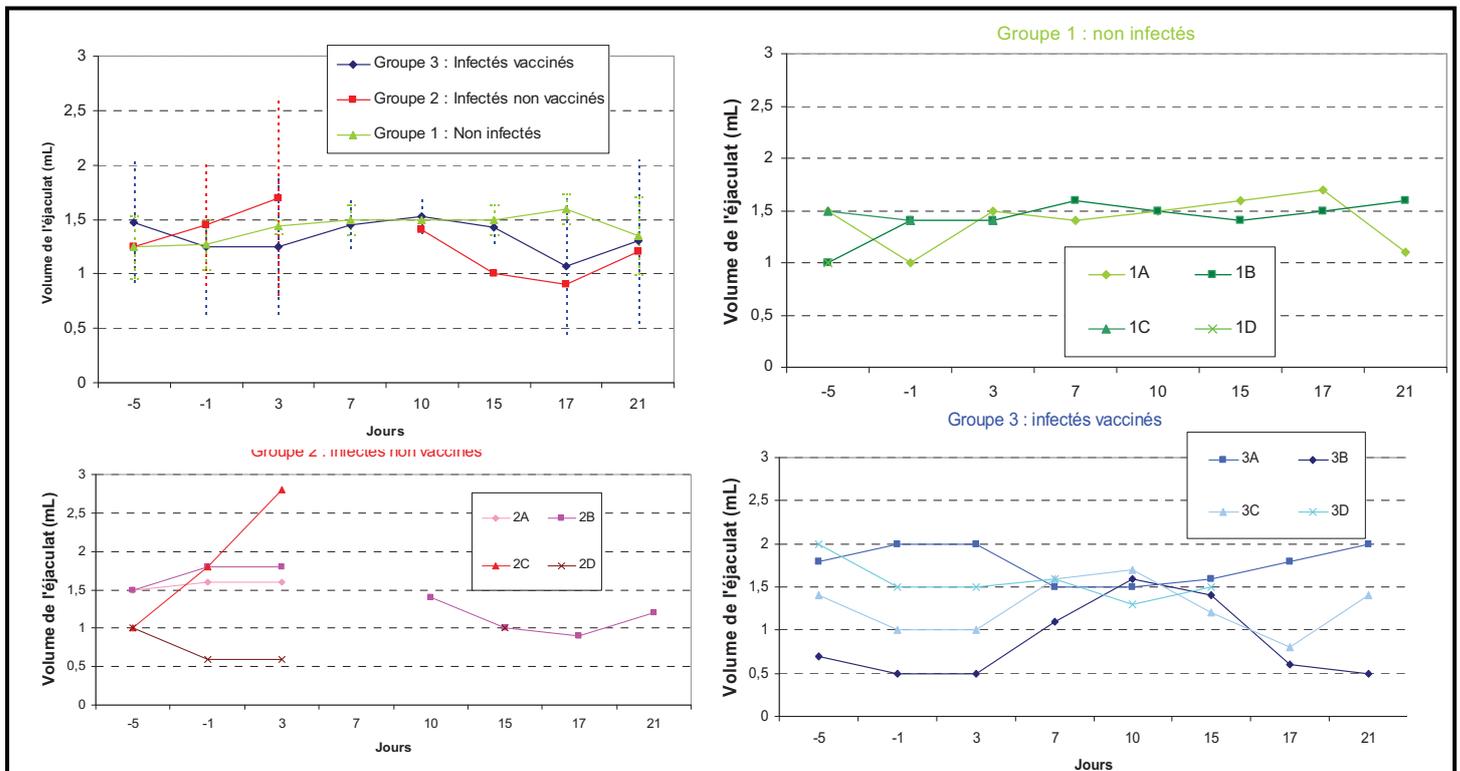


Figure 12 : Evolution du volume de l'éjaculat des béliers.

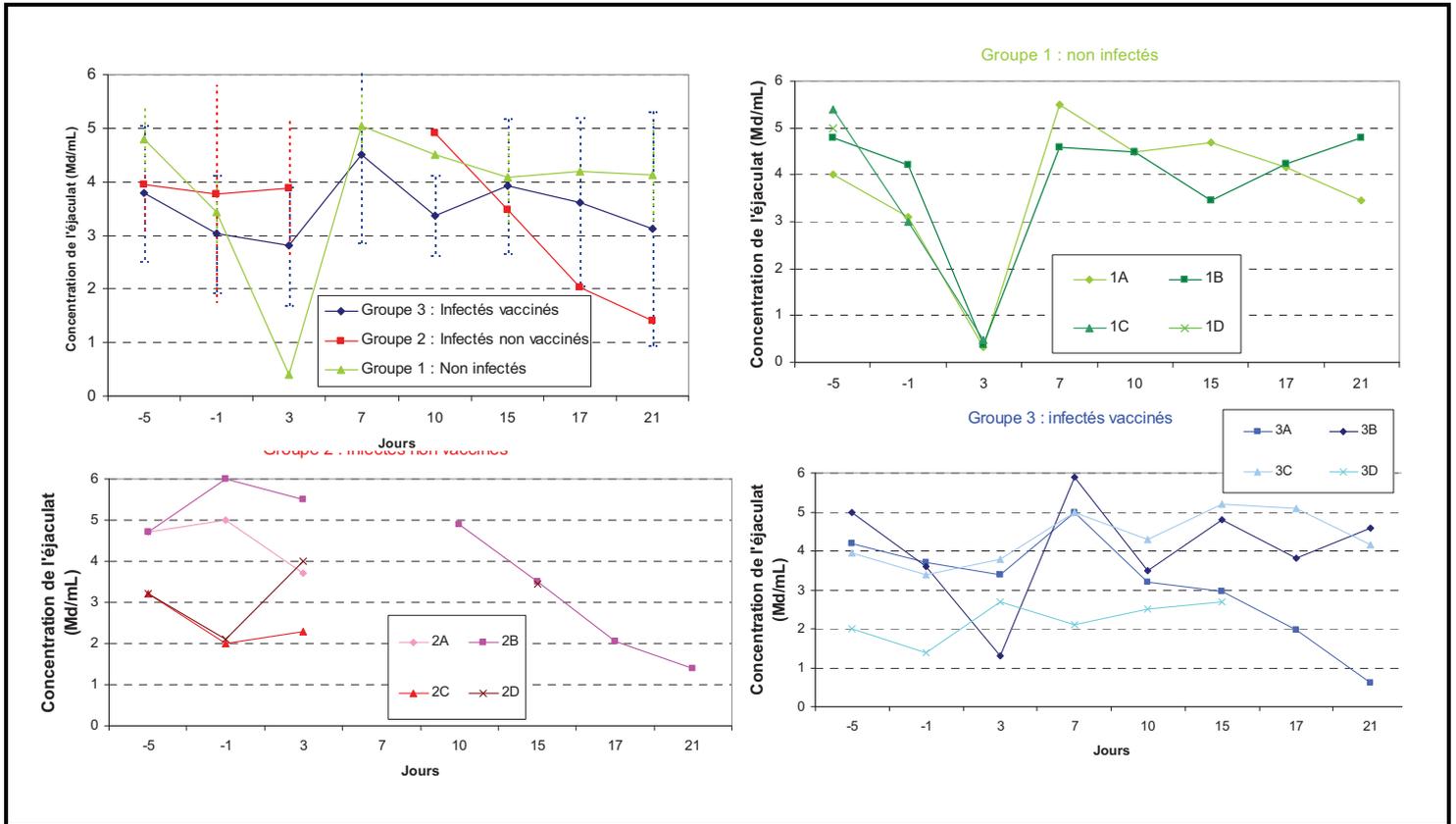


Figure 13 : Evolution de la concentration de l'éjaculat des bœliers

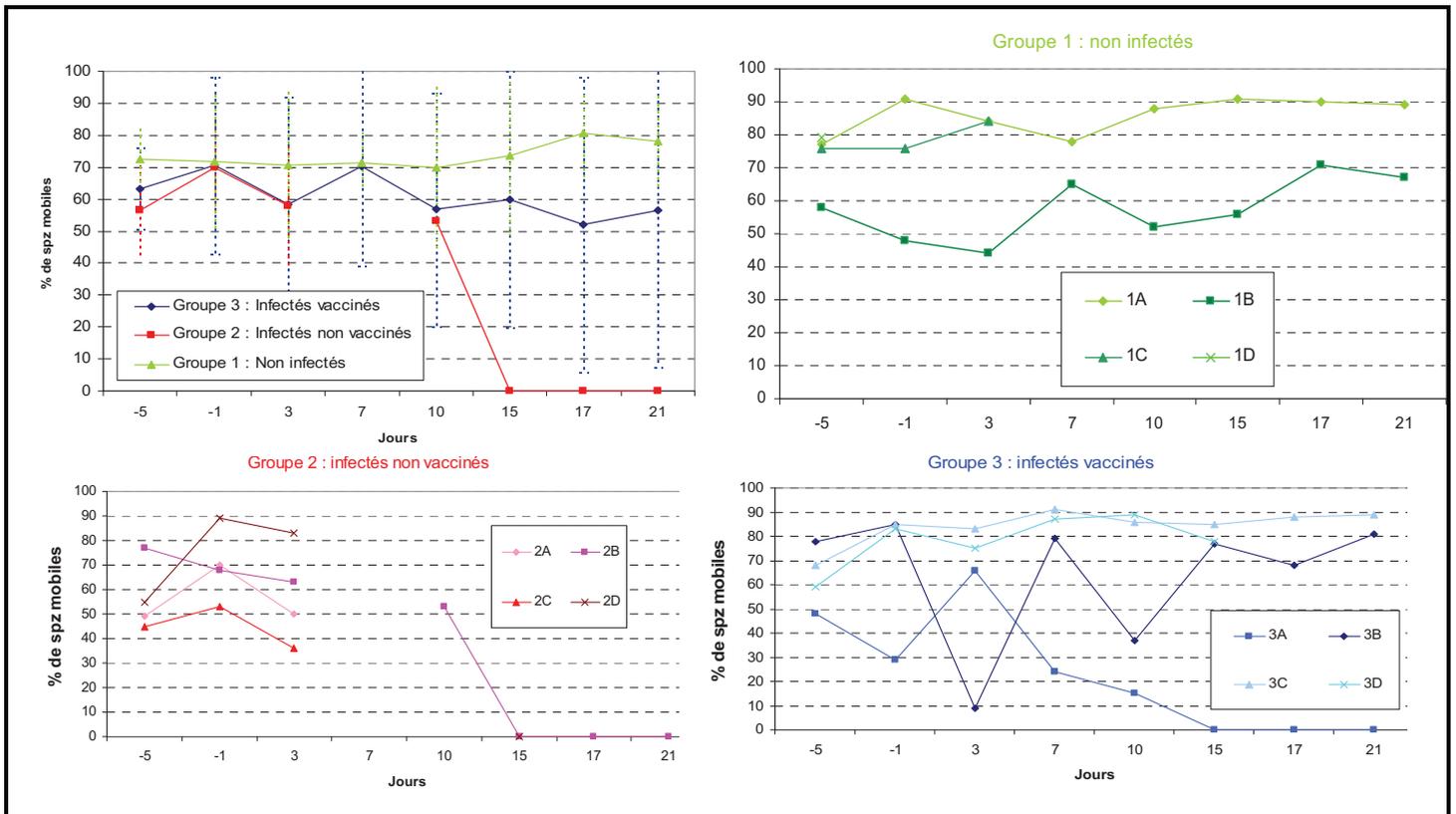


Figure 14 : Evolution du pourcentage de spermatozoïdes mobiles dans l'éjaculat des bœliers

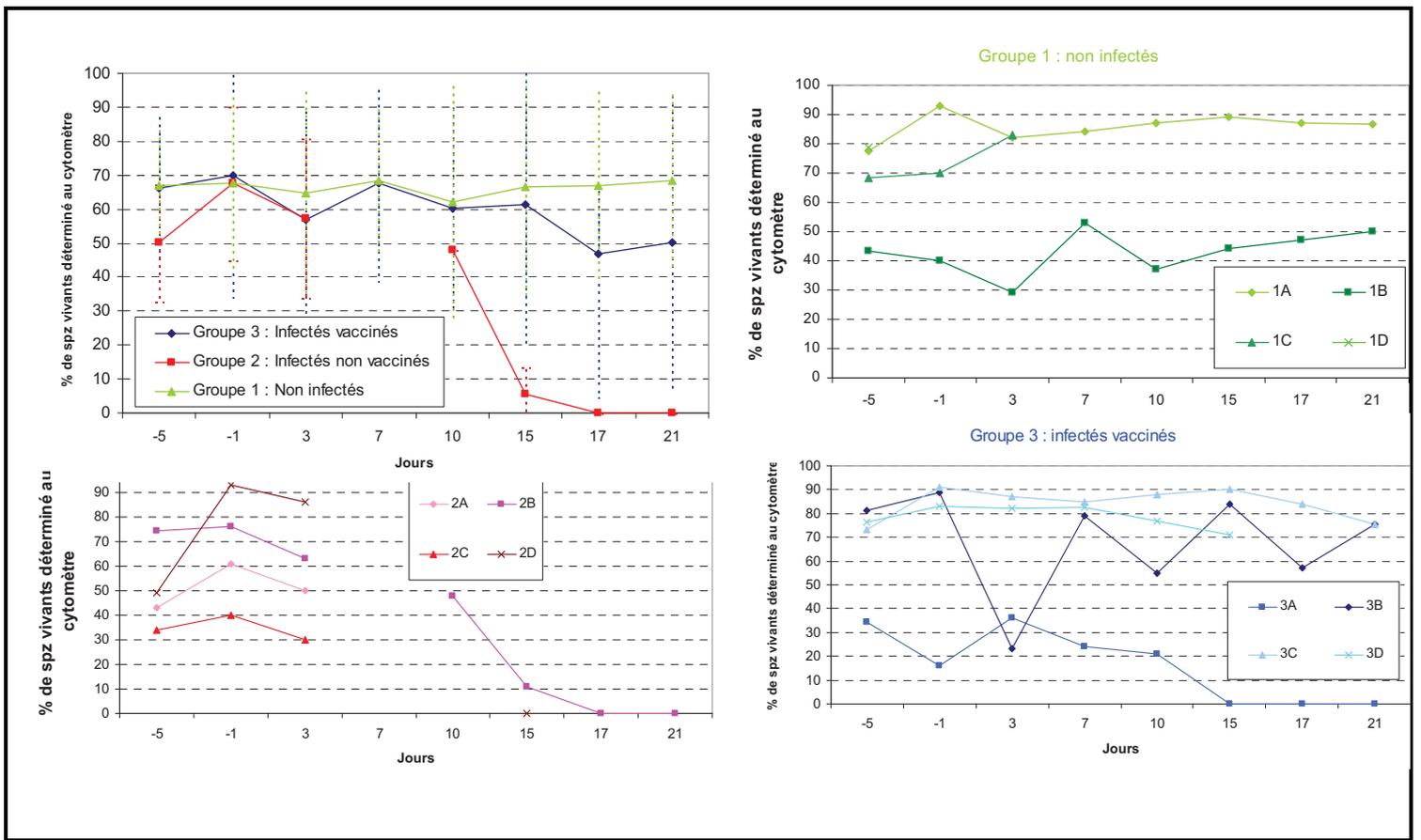


Figure 15 : Evolution du pourcentage de spermatozoïdes vivants de l'éjaculat des béliers

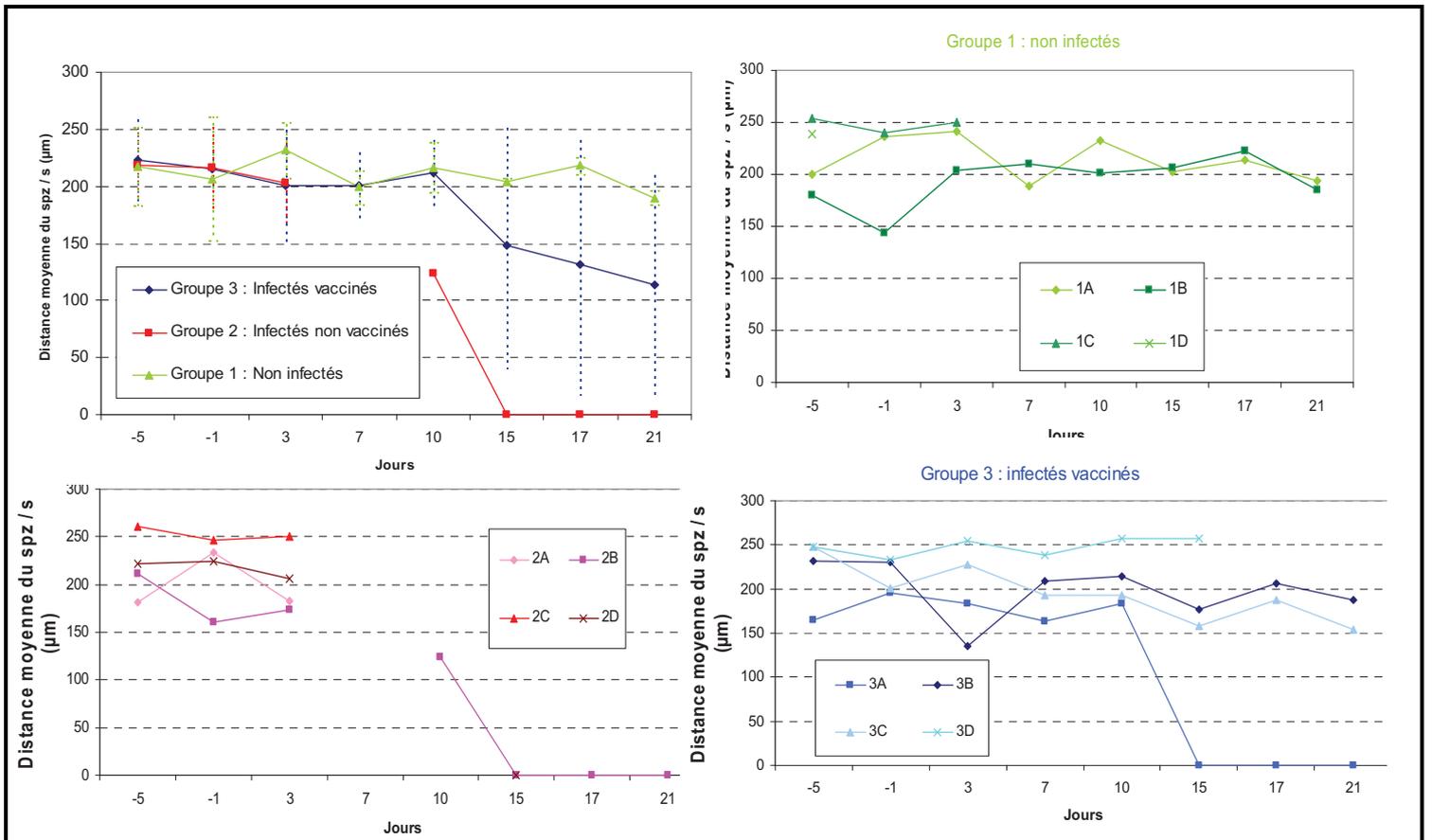
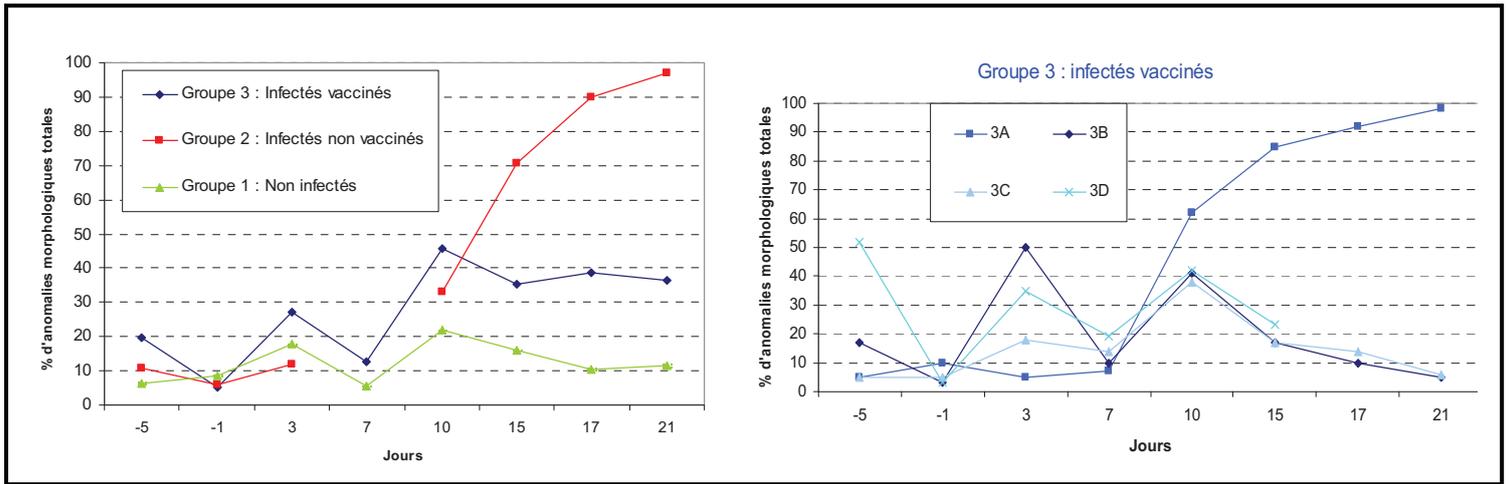


Figure 16 : Distance moyenne du spermatozoïde / s ( $\mu\text{m}$ )



**Figure 17 : Pourcentage d'anomalie morphologique des spermatozoïdes**

En reprenant les analyses statistiques par périodes A (J-5 et J-3) , B (J3, J7 et J10) et C (J14, J17 et J21), des différences statistiquement significatives sont présentes pour le pourcentage de spermatozoïdes vivants, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles et la distance moyenne des spermatozoïdes / s entre le groupe 2 et les autres groupes (groupe 1 et groupe 3 sans 3A) pour la période C ( $p < 0,02$ ) (Figure 18).

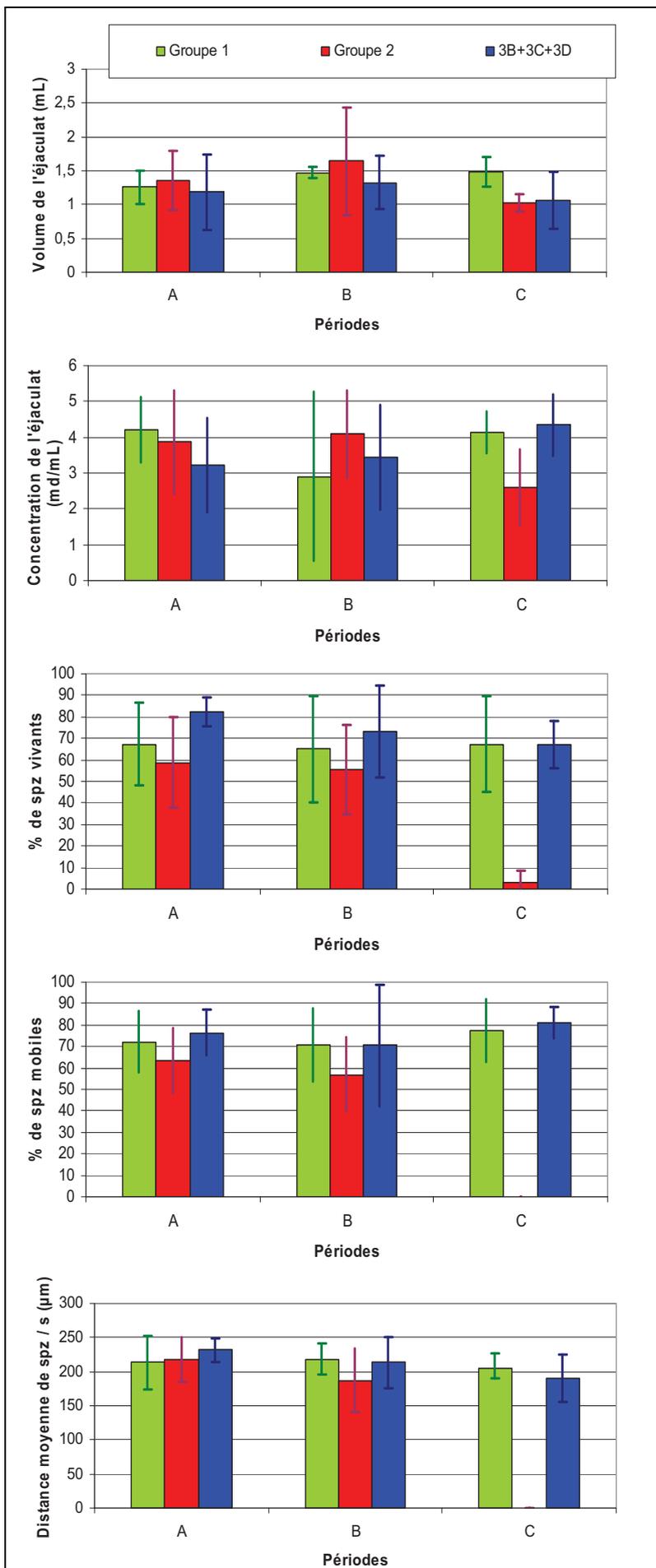


Figure 18 Evolution des paramètres du sperme par période

### 3.3.3.Lésions

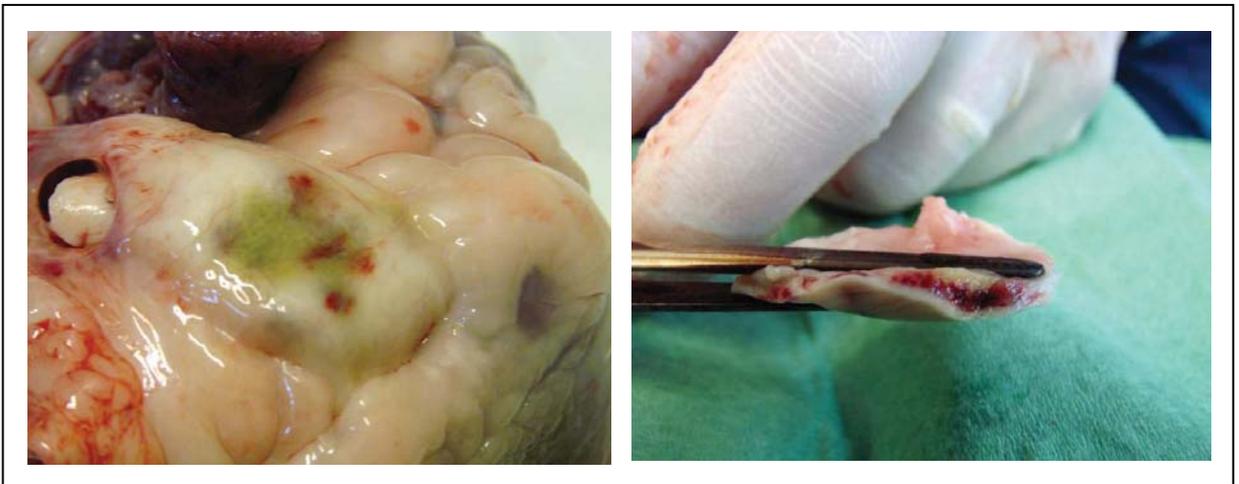
- **Macro**

Deux béliers du groupe 2 (2A et 2C) ont été euthanasiés à J6, un bélier du groupe 2 et un bélier du groupe 3 à J15 (2D et 3D), le reste des animaux à J20.

A J6, les béliers 2A et 2C ont présenté un léger œdème pulmonaire avec des lésions d'atélectasie principalement localisées dans les lobes crâniens et médians des poumons. Une réaction inflammatoire du nœud lymphatique pré scapulaire, drainant le territoire où les inoculations ont été réalisées, a été observée pour les 2 moutons.

A J15, le bélier 3D ne présentait aucune lésion macroscopique, le bélier 2D présentait un œdème pulmonaire avec présence d'une faible quantité de liquide type transsudat dans la cavité thoracique. Une lésion hémorragique, considérée comme pathognomonique a été observée sur la base de l'artère pulmonaire du bélier 2D (photographie 1).

Aucune lésion d'intérêt nécropsique n'a été observée lors des autopsies réalisées à J21



**Photographie 1 : Lésions hémorragiques de la base de l'artère pulmonaire du bélier 2D.**

- **Micro**

Des 3 béliers euthanasiés à J6, aucune lésion microscopique d'intérêt n'a été observée sur les tissus du mouton 1C, non infecté, et sur le mouton 2A, infecté non vacciné. Ont été observés sur le mouton 2C, infecté non vacciné, quelques infiltrats inflammatoires à cellules mononuclées (lymphocytes, macrophages, plasmocytes), d'intensité légère, dans le chorion des muqueuses buccales.

Des 3 béliers euthanasiés à J15, aucune lésion microscopique d'intérêt n'a été observée sur les tissus du mouton 1D, non infecté.

Des lésions étaient présentes sur le mouton 2D, infecté non vacciné caractérisées par :

- une vascularite lymphocytaire d'intensité légère dans les muqueuses buccales et du palais
- des hémorragies parenchymateuses focales, de l'œdème périlobulaire avec quelques cellules inflammatoires (lymphocytes, plasmocytes, macrophages, quelques neutrophiles) et des infiltrats périvasculaire et périlobulaire (lymphocytes, plasmocytes, d'intensité modérée dans les poumons
- une hémorragie focale extensive d'intensité marquée dans la média de l'artère pulmonaire.

Quelques infiltrats périvasculaires de cellules mononuclées (lymphocytes, macrophages, plasmocytes) dans le chorion des muqueuses buccales, réticulaire et ruminale ont été observés sur le mouton 3D, infecté vacciné

Sur les 6 béliers euthanasiés à J21, aucune lésion macroscopique n'a été observée.

### 3.3.4. Virologie

- **Sang**

Des copies du génome du BTV ont été détectées dans le sang des béliers infectés non vaccinés à partir du 2<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> jour post-infection. Les résultats sont présentés dans les figures 19 et 20, exprimés respectivement en Ct et en logarithme décimal des copies d'ARN par ml de sang. Les deux figures montrent que les béliers infectés et non vaccinés ont répliqué le BTV dans le sang. Le pic de virémie a eu lieu au 8<sup>ème</sup> jour post-infection et les béliers étaient encore positifs en PCR le jour de leur euthanasie. Les moutons non infectés sont restés négatifs. Deux moutons infectés et vaccinés ont été virémiques : le bélier 3A, positif à partir du 2<sup>ème</sup> jour jusqu'à la fin de l'expérience avec un pic de 45480 copies /ml (Ct = 25) au 6<sup>ème</sup> jour, et le bélier 3D, positif du jour 4 à 10 avec des charges virales inférieures (159 copies/ml de sang, Ct = 33,4 au minimum).

Les différences de charge virale (nombre de copies en log10) sont statistiquement significatives :

- entre les groupes 2 et 1, à partir du jour 4 ( $p < 0,01$ ) et jusqu'au jour 18 ( $p = 0,001$ )
- entre les groupes 2 et 3, à partir du jour 4 ( $p < 0,001$ ) et jusqu'au jour 18 ( $p = 0,016$ ), à l'exception du jour 16 ( $p = 0,117$ ).
- entre les groupes 1 et 3 pour les jours 4 ( $p = 0,019$ ) et 6 ( $p = 0,016$ ). Ces différences s'expliquent par la variabilité individuelle observée dans le groupe 3.

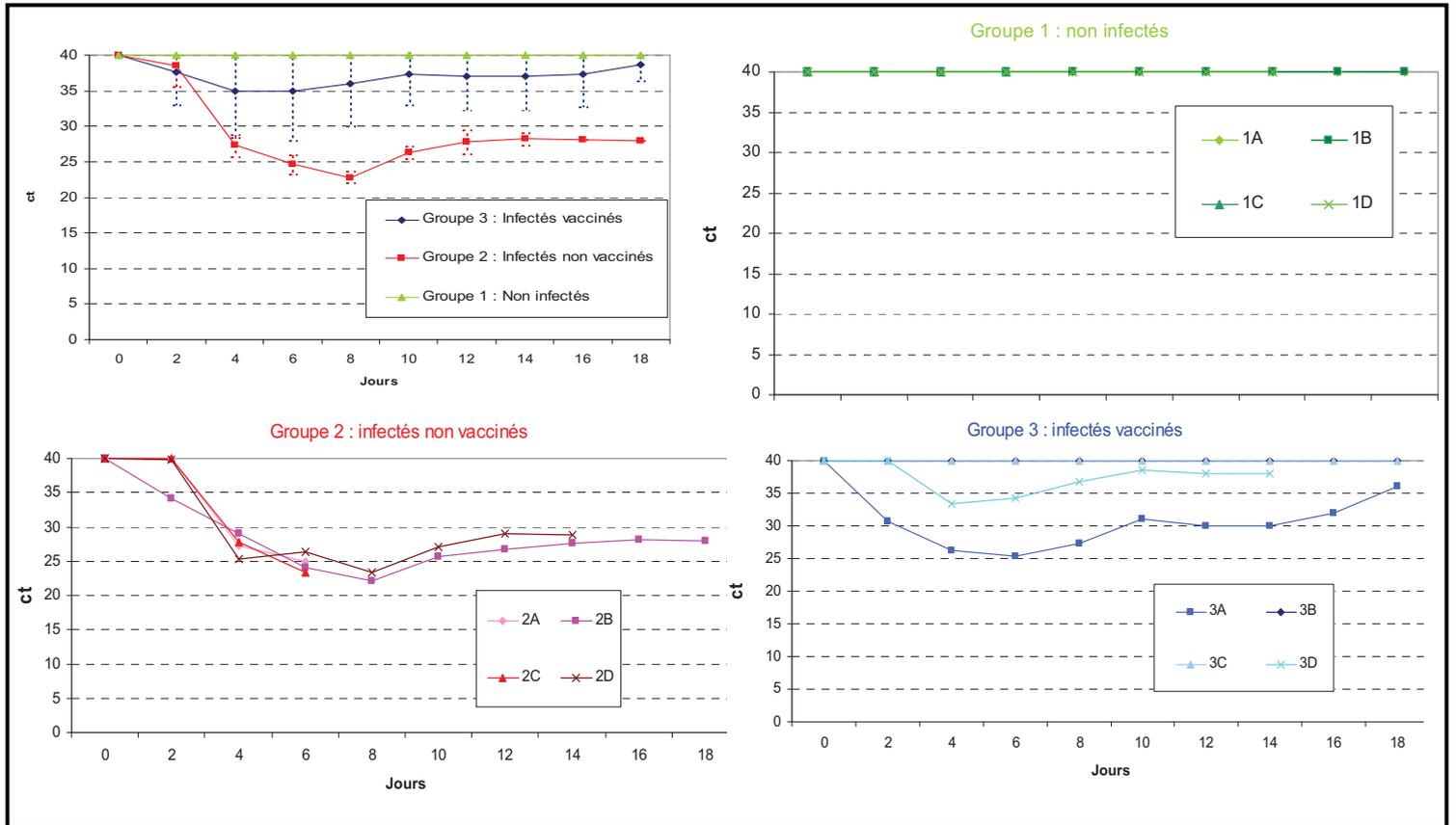


Figure 19 : Evolution de la rt-PCR quantitative des bédiers

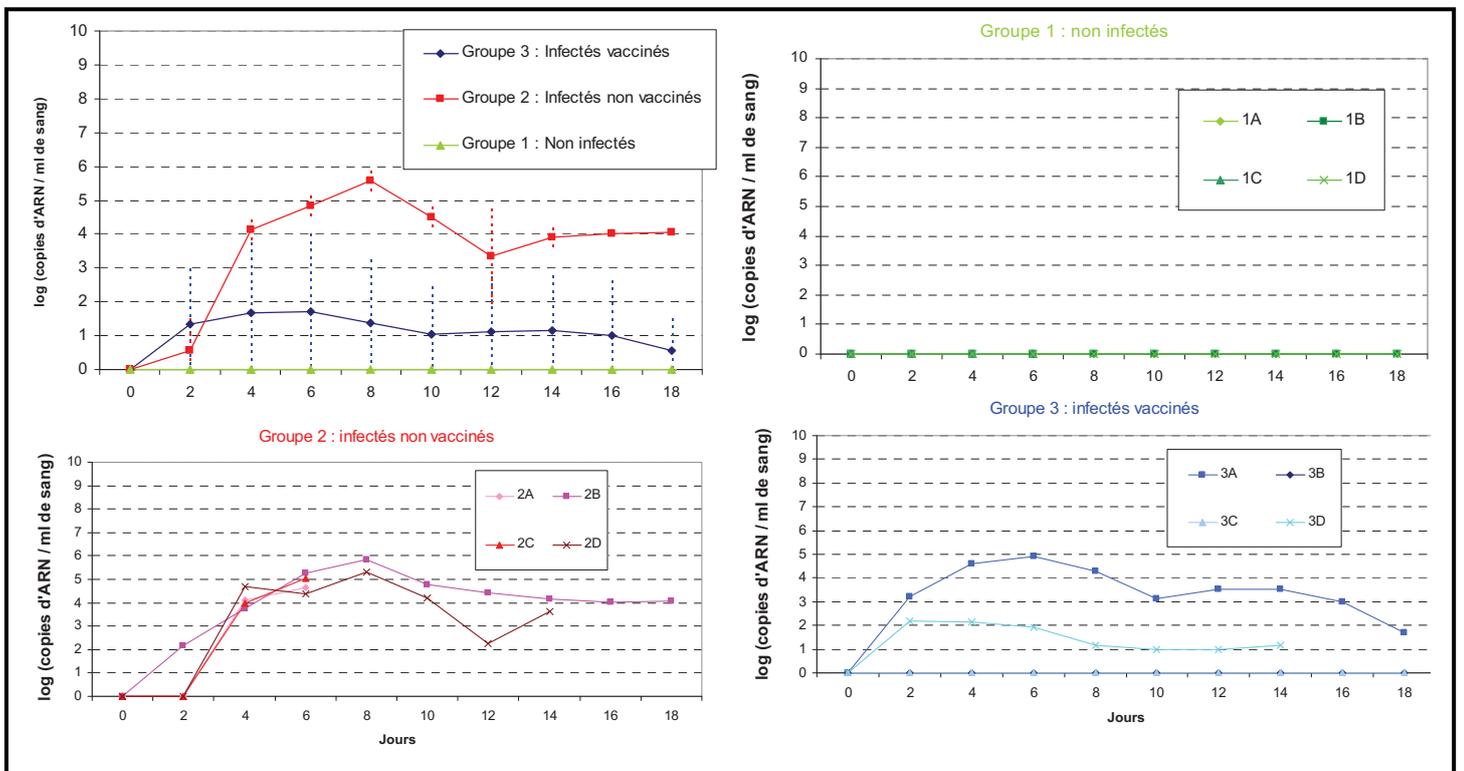


Figure 20 : Evolution de la charge virale sanguine des bédiers

- **Tissus**

Les résultats des PCR sur tissus, exprimées en Ct, sont présentés dans le tableau 5. Ces PCR sont négatives pour tous les tissus des béliers témoins et deux béliers infectés vaccinés (3B et 3C) euthanasiés à J21. Les béliers 3A et 3D présentaient des charges virales faibles (Ct élevés) lors de leur euthanasie à J21 et J15.

Dans le groupe 2 (infectés non vaccinés), tous les béliers étaient positifs pour la plupart des tissus testés, avec, pour les béliers euthanasiés à J6, des Ct compris entre 24 et 34 et, pour les béliers euthanasiés à J15 et J21, des Ct compris entre 30 et 39 (figure 21).

	groupe 1	2A	2B	2C	2D	3A	3B	3C	3D
<i>Euthanasie</i>		J6	J21	J6	J15	J21	J21	J21	J15
1 Peau		29,7		28,9	34,2				
2 Langue		24,3	36,08	27,3	33,2	38,97			
3 Muqueuse buc lèvres		24,3		29,5	30,2	38,89			
4 Poumon lobe cranial		27,4	35,72	28,1	32,2				38,7
5 Poumon lobe intermédiaire		27,9	33,92	28,8	32,1	36,31			38,3
6 Poumon lobe caudal		25,3	35,98	26,4	31,8				36,7
7 Artère pulmonaire (base)		29,4	35,48	30,4					
8 Aorte (base)		28,3	34,29	33,4	38,7				
9 Cœur myocarde :			35,44	27,8	34,5	38,35			
10 Cœur endocarde		24,9	34,83			34,30			
11 Muscle squelettique		26,6	38,01	32,5	36,7				
12 Rate		27,3	30,57	24,5	27,1	30,69			
13 Rein		30,1	38,42	33,7	35,7				32,5
14 Nœud lymph. préscapulaire		23,3	34,22	29,3	33,2	34,58			25,4
15 N L tracheobronchique		34,1	34,42	33,1	30,4	39,08			37,2
16 N L retro pharyngiens			37,61		33,5	36,78			
17 Cerveau		30,8		28,3	38,7				
18 Ampoule séminale		38,5	37,19	34,8					36
19 Queue épидидyme		28,8	32,42	26,6	33,2	34,97			34
20 Tête épидидyme		28,9		29,3	34,4				29,1
21 Vésicule séminale		31	32,48	34,5		39,61			35,7
22 Corps épидидyme		29,5	34,14	28,3	32,9	37,60			36,7
23 testicule		24,1	29,8	28,4	26,8	29,54			22,9

Tableau 5 : Résultats des rt-PCR quantitative sur tissus [zones grisées : Ct > 40]

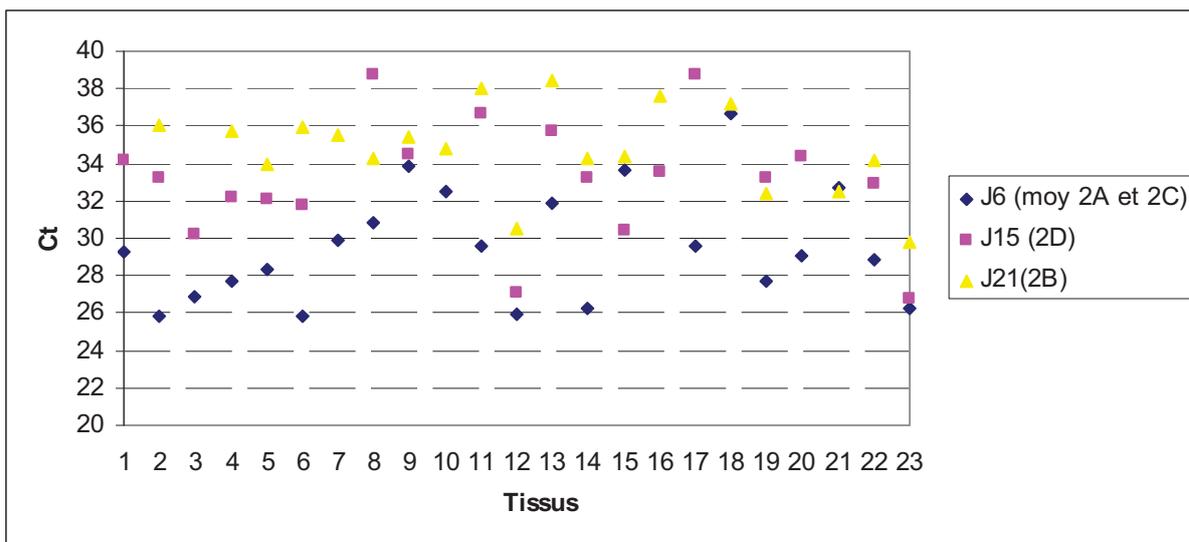


Figure 21 : Comparaison entre les Ct des différents tissus(cf. tableau 5) à J6 (moyenne des béliers 2A et 2C), J15 (bélier 2D) et J21 (bélier 2B).

- Spermé

Seuls 2 résultats de PCR sur spermé ont été positifs : bélier 2B à J21 et bélier 3A à J21.

		J-1	J3	J10	J21
Groupe 1 - non infectés		Nég	Nég	Nég	Nég
Groupe 2 - infectés non vaccinés					
	2A	Nég	Nég		
	2B	Nég	Nég	Nég	29,7
	2C	Nég	Nég		
	2D	Nég	Nég		
Groupe 3 - infectés vaccinés					
	3A	Nég	Nég	Nég	37,7
	3B	Nég	Nég	Nég	Nég
	3C	Nég	Nég	Nég	
	3D	Nég	Nég	Nég	Nég

Tableau 6 : Résultats des rt-PCR quantitative sur spermé

### 3.3.5. Sérologie

- **Elisa compétition**

Les béliers du groupe 1 sont restés séronégatifs lors de l'expérimentation.

Les béliers du groupe 2 (infectés non vaccinés) ont presque tous changé de statut : le bélier 2A, euthanasié à J6, n'avait pas séroconverti. Le bélier 2C et les béliers 2B et 2D ont séroconvertis à J6, J8 et J8 respectivement.

Parmi les béliers du groupe 3 (infectés vaccinés), 3 étaient séropositifs à J0 : les béliers 3B, 3C et 3D. Le bélier 3A était douteux à J0, il est passé sous la barre des 35% d'inhibition à J4.

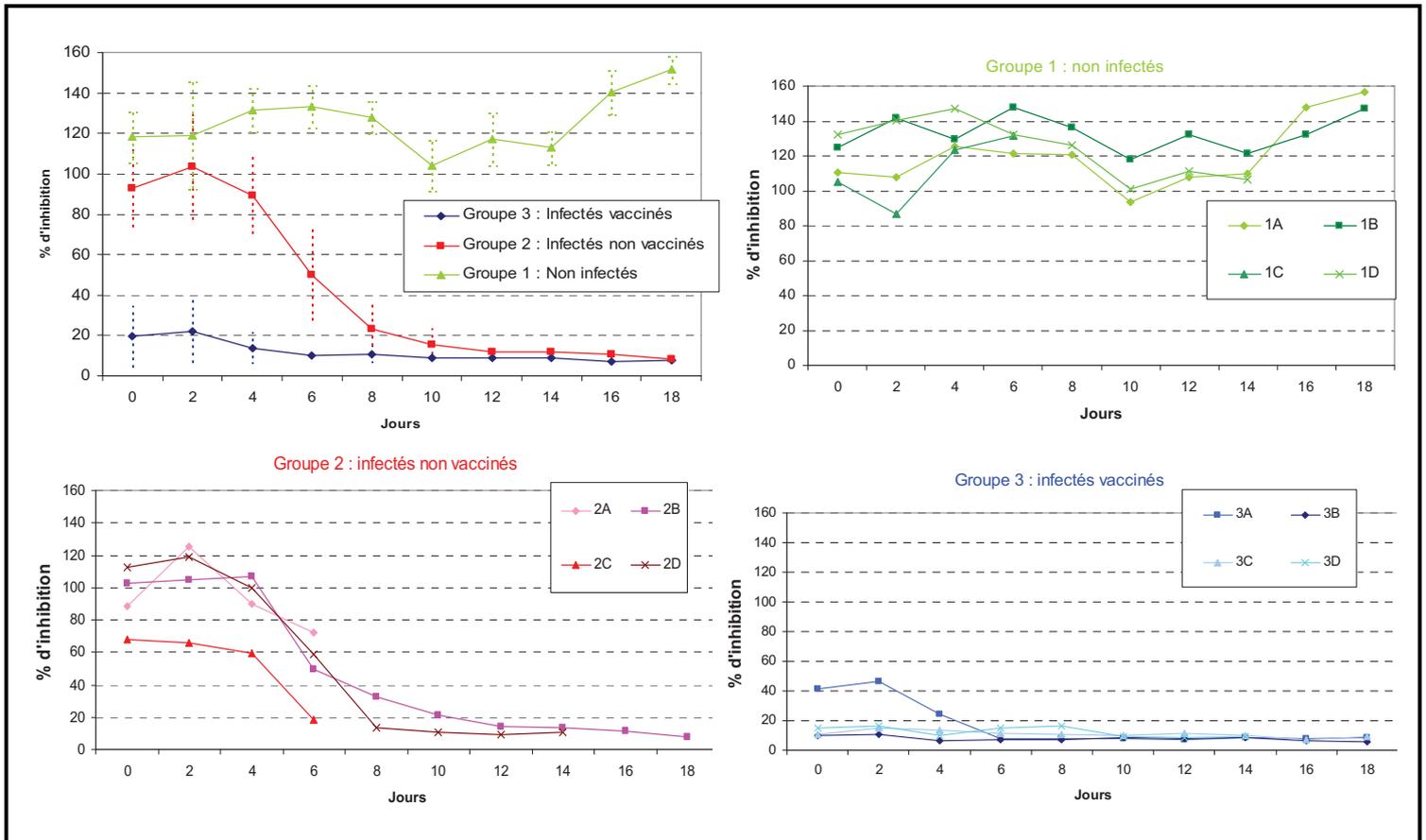


Figure 22 : Evolution du pourcentage d'inhibition (ELISA Compétition) des béliers

- **Séroneutralisation**

A J0, les béliers non vaccinés (groupe 1 et 2) n'avaient aucun anticorps neutralisants. Parmi les béliers vaccinés, le bélier 3A n'avait pas d'anticorps neutralisant, les 3 autres béliers en avaient : 112 ED50/ml pour 3B et EC, 63 ED50/mL pour 3D.

A J6, les béliers non infectés et les béliers infectés non vaccinés n'avaient pas d'anticorps neutralisants. Les 4 béliers infectés vaccinés en avaient, mais en quantité hétérogène : 3A et 3D en avaient moins de moitié moins que 3B et 3C.

A J12, les béliers non infectés n'avaient toujours aucun anticorps neutralisants. Les 2 béliers infectés non vaccinés encore présents commençaient leur production, tandis que les 4 béliers infectés vaccinés en avaient toujours plus, mais toujours en quantité hétérogène.

A J18, les béliers non infectés n'avaient aucun anticorps neutralisants, le bélier 2B, seul représentant du groupe 2, en avait 632 ED50/mL et les béliers infectés vaccinés en avaient toujours plus (cf. tableau 7).

		J0	J6	J12	J18
Groupe 1	1A, 1B, 1C, 1D	0	0	0	0
Groupe 2	2A	0	0		
	2B	0	0	40	632
	2C	0	0		
	2D	0	0	160	
Groupe 3	3A	0	252	893	2518
	3B	112	743	743	2518
	3C	112	632	4508	6224
	3D	63	263	2517	

**Tableau 7 : Résultats des séroneutralisations (ED50/mL de sérum)**

### 3.4. DISCUSSION

Lors de l'épizootie à BTV-8 de 2008, la vaccination obligatoire de masse des ruminants a été pratiquée en parallèle de la propagation de la maladie en France, en saison estivale et automnale, lors de la période d'activité maximale des vecteurs. La raison majeure fut la disponibilité limitée des vaccins inactivés contre le BTV-8. Cette vaccination d'urgence a entraîné de nombreuses situations épidémiologiques, souvent mal comprises par les éleveurs. L'apparition de signes cliniques après vaccination a notamment suscité la suspicion des éleveurs vis-à-vis des vaccins utilisés, alors que la maladie était due très probablement à une infection naturelle intervenue avant l'apparition de la protection (21 jours post-vaccination d'après les autorisations temporaire d'utilisation).

Par ailleurs, si les vaccins disposaient d'une autorisation temporaire d'utilisation pour protéger contre les signes cliniques et contre la virémie, il n'existait pas d'indication de protection des fonctions de reproduction.

Cette étude avait pour objectif d'évaluer le devenir et les conséquences cliniques *sensu lato* de l'infection par le BTV-8 sur des animaux en cours ou non de protection vaccinale. La faible disponibilité en béliers reproducteurs non infectés, non vaccinés, et surtout entraînés à donner régulièrement leur sperme ne nous a pas permis d'avoir un nombre suffisamment important d'animaux par groupe ; ainsi, peu de résultats sont apparus statistiquement significatifs.

Par ailleurs, il était prévu de réaliser un abattage séquentiel d'animaux pour évaluer la distribution virale chez l'hôte à différents temps après infection. Compte tenu du faible nombre d'animaux présents au départ, il aurait été plus opportun d'annuler ces euthanasies séquentielles, d'autant plus qu'une erreur d'euthanasie (un bélier du groupe 2 en lieu et place d'un bélier du groupe 3) s'est produite à J6 au sein des unités expérimentales de Tours.

En ce sens, les résultats présentés sont plus une observation d'une situation possible où la variabilité statistique des résultats représente probablement 95% des cas observables dans les conditions naturelles. Par ailleurs cette première expérimentation menée par notre équipe de recherche avait aussi pour objectif de poser les premières bases d'un modèle d'infection expérimentale à BTV-8. Ces données nous ont permis par la suite d'affiner ce modèle qui est maintenant totalement opérationnel.

Les signes cliniques obtenus par l'infection des béliers non vaccinés sont, par leur cinétique (début au 4<sup>ème</sup> jour post-infection, pic au 7<sup>ème</sup> jour post-infection environ, arrêt au 13<sup>ème</sup> jour post-infection) et par leur nature (hyperthermie sévère, œdème et congestion de la face et du scrotum, pétéchies et suffusions) semblables à ceux obtenus lors d'autres infections expérimentales de BTV-8 (Darpel et al., 2007 - Backx et al., 2007 – Worwa et al, 2010). Si l'on compare par rapport aux données obtenues sur le terrain (Elbers et al., 2008), les signes cliniques observés correspondent à ceux les plus fréquemment rencontrés sur les moutons. Toutefois, certains signes cliniques (amaigrissement rapide et intense, difficultés respiratoires, stomatite ulcéro-hémorragique) correspondant aux formes graves de la maladie n'ont pas pu être observés. La plupart des infections expérimentales, y compris celles utilisées pour valider certains vaccins commerciaux, n'ont pas permis de reproduire de tels signes cliniques.

De nombreux paramètres peuvent influencer la sévérité d'un modèle d'inoculation d'épreuve, tels que la virulence naturelle de la souche utilisée, son atténuation potentielle lors de passages en cultures cellulaires, les voies d'inoculation et la réceptivité des animaux hôtes.

La souche BTV-8 utilisée dans cette étude a été obtenue lors d'un épisode sévère de bluetongue chez des moutons en Allemagne en 2008. Elle a subi un nombre minimal de passages en cultures cellulaires (n=5) puis a été « réadaptée » au mouton avant son utilisation. Il avait en effet été montré qu'un nombre conséquent de passages en cultures cellulaires du BTV était associé à une perte de sa virulence et une modification de son tropisme tissulaire (tropisme pour le tissu nerveux et passage transplacentaire, Franchi et al., 2008). D'autres études ont cependant montré qu'un nombre limité de passages en cultures cellulaires n'altérerait pas la virulence du BTV (Dal Pozzo et al., 2009).

Nous avons choisi, pour l'inoculation du matériel viral, la voie sous-cutanée (sang infectieux) et intradermique (virus à faible de nombres de passages en culture cellulaire) car ce sont les voies qui miment le plus fidèlement la voie d'infection naturelle. Un modèle d'inoculation d'épreuve à BTV-2 par voie intradermique avait d'ailleurs fait preuve d'efficacité (données non publiées, Merial). Par la suite des modèles utilisant la voie intraveineuse et la voie intradermique de virus BTV préalablement amplifié chez le mouton ont permis de reproduire des formes sévères de la maladie (MacLachlan et al., 2008). Parallèlement notre équipe a aussi établi un nouveau modèle d'inoculation par voie intraveineuse qui, lui aussi, a permis d'observer des signes cliniques plus sévères

La race ovine Lacaune, utilisée dans cette expérience, est une race sensible à l'infection par le BTV, au vu des observations de terrain.

Par comparaison avec les autres études d'infection expérimentale, les lésions nécropsiques, macroscopique et microscopique, ont par contre été moins nombreuses et moins sévères dans notre expérimentation. En effet, elles n'ont été mises en évidence que sur 2 béliers infectés non vaccinés. Une hémorragie à la base de l'artère pulmonaire n'a été observée que sur 1 bélier, quant Worwa la retrouvait sur 20 des 24 moutons infectés (Worwa et al., 2010). La nature des lésions présentes dans notre étude (infiltration inflammatoire des muqueuses digestives, vascularite des muqueuses buccales, œdème pulmonaire périlobulaire avec infiltration inflammatoire périvasculaire et péribronchiolique, hémorragie à la base de l'artère pulmonaire) est par contre semblable à ce qui avait été décrit précédemment.

Les résultats des analyses sérologiques (ELISA compétition - séroneutralisation) et virologiques (rt-PCR quantitative sur sang) des béliers infectés non vaccinés confirment les résultats obtenus récemment par d'autres études d'infection expérimentale de BTV-8 (Darpel et al., 2007 – Backx et al., 2007).

Les anticorps anti-VP7 sont détectés à partir du 8<sup>ème</sup> jour post-infection et restent détectable jusqu'à l'euthanasie des béliers (21<sup>ème</sup> jour maximum). Les anticorps neutralisants ne sont détectés qu'à partir du 12<sup>ème</sup> jour post-infection.

Le virus est détecté dans le sang des béliers infectés non vaccinés dès le 4<sup>ème</sup> jour post-infection, un pic est observé autour du 8<sup>ème</sup> jour post-infection et la PCR est positive jusqu'à l'euthanasie des béliers (21<sup>ème</sup> jour maximum). La durée de la virémie chez les petits ruminants est estimée à 2-7 semaines lorsque du virus infectieux est recherché et à plus de 3 mois lorsque le génome est recherché par rt-PCR quantitative (Chatzinasiou et al., 2010). La corrélation entre PCR et infectiosité n'est pas clairement établie. Dans une étude de protection vaccinale, Hamers et coll. (2009) suggère que le virus BTV ne peut pas être isolé en cultures cellulaires lorsque les charges virales sont inférieures à 3.14 log<sub>10</sub> copies. Toutefois ces résultats dépendent étroitement des techniques utilisées. Plus récemment, en comparant l'isolement viral sur œufs embryonnés et différentes techniques de rt-qPCR, il a été montré que les résultats obtenus par PCR (nombre de copies/ml de sang) étaient en moyenne supérieur de 2,9 logs aux résultats de l'isolement (EID50/ml de sang) (Chatzinasiou et al., 2010). Les décisions réglementaires de dépistage reposent sur des estimations sans bases

scientifiques strictes. Elles estiment qu'avec un  $Ct < 30$  le virus est infectieux, avec un  $Ct$  compris entre 30 et 35 il est nécessaire de confirmer l'infectiosité par isolement viral, et avec un  $Ct > 35$  l'animal n'est probablement pas contaminant. Dans notre étude, en considérant les charges virales et le fait que nous avons utilisé une technique rt-PCR connue pour être très sensible, il est très probable que les béliers infectés non vaccinés étaient infectieux à partir de J4 et jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Les PCR sont positives sur la plupart des tissus des béliers infectés non vaccinés (euthanasiés à J6, J15 et J21). Lors d'une infection expérimentale à BTV-8, Worwa a obtenu des résultats positifs en PCR sur les poumons, la rate, les amygdales, les nœuds lymphatiques de tous les moutons infectés euthanasiés à J10 ou J16 (Worwa et al., 2010). Cependant, l'isolement de virus infectieux à partir de ces tissus n'a pas été possible. D'après Hamblin, le titre de virus dans les tissus au 12<sup>ème</sup> jour post-infection est considérablement plus faible qu'au 7<sup>ème</sup> jour (Hamblin et al., 1998). La comparaison des  $Ct$  dans les différents tissus des béliers non vaccinés euthanasiés à J6, J15 et J21 de notre étude, suggère la même conclusion. En effet, les  $Ct$  observés dans les tissus des 2 béliers infectés et euthanasiés à J6 laissent supposer qu'une grande majorité des tissus étaient infectieux. Par contre, à J15 et J21, les  $Ct$  obtenus auraient nécessité de réaliser des isolements viraux pour confirmer ou infirmer leur statut infectieux. Les données de la littérature suggèrent que les cellules mononuclées sanguines sont infectées à partir de J3-J4 et les endothéliums à partir de J7-J8. Toutefois, l'infection de ces 2 types cellulaires reste transitoire : par immunohistochimie, la détection du virus dans les tissus diminue dès le 10<sup>ème</sup> jour post-infection (MacLachlan et al., 2009). Dans notre étude il n'a pas été réalisé d'immunohistochimie et il n'est donc pas possible de déterminer la nature des cellules infectées. Cependant on peut supposer que la positivité de la grande majorité des tissus à J6 est due à la présence de cellules mononuclées sanguines infectées.

Les résultats de PCR sur sperme des béliers infectés non vaccinés (1 seul résultat positif, à J21) sont cohérents avec les résultats précédemment décrits (Bowen et al., 1985). Il est en effet acquis que le génome du virus peut être détecté dans le sperme lorsqu'un animal est virémique mais que cela n'est pas systématique.

L'épreuve infectieuse une semaine avant la période officielle de couverture vaccinale des béliers vaccinés nous apporte différentes informations sur les propriétés du vaccin, qui, dans les conditions réglementaires, a une couverture officielle de protection à 21 jours après l'injection vaccinale.

Avec une inoculation d'épreuve réalisée 13 jours post vaccination une protection clinique efficace a été observée pour 3 des 4 béliers. Une hyperthermie sévère et des signes cliniques ont en effet été observés sur le bélier 3A. Ce bélier était le seul bélier vacciné sur lequel aucun anticorps neutralisant n'a été détecté à J0. Il semble que dans cette étude la protection soit corrélée à la présence d'anticorps neutralisants le jour de l'inoculation, avec les réserves émises quant au faible nombre d'animaux testés. Des résultats similaires ont été observés par Oura et coll. (2009), lors d'une validation de l'efficacité de différents vaccins inactivés. Le bélier 3A, vacciné 13 jours avant l'épreuve virulente, n'est pas pour autant immunologiquement naïf, puisque des anticorps neutralisants sont détectés dans son sang à partir de J6, contrairement aux béliers non vaccinés, chez qui ils ne sont détectés qu'à partir de J12. Cela suggère un priming de la réponse immunitaire par la vaccination chez cet animal, qui, inoculé après 21 jours post vaccination, aurait probablement été protégé.

Pour le bélier 3D, si aucun signe clinique n'a été observé sur cet animal, des lésions microscopiques ont été mises en évidence (infiltrat inflammatoire des muqueuses digestives). Notons que, sans que la différence soit significative, les anticorps neutralisants présents à J0 chez bélier 3D étaient moins nombreux que chez les béliers 3B et 3C.

Parallèlement la protection virologique n'a été efficace que pour 2 des 4 béliers : le bélier 3A a connu une virémie dès J2 avec un pic à J6 (Ct = 25,3), les PCR ont été positives sur la plupart de ces tissus et sur son sperme le jour de son euthanasie. Toutefois si les PCR sur sang semblent indiquer que cet animal a été contagieux, les résultats sur tissus et sur sperme sont moins équivoques avec des Ct le plus souvent supérieurs à 30. Pour le bélier 3D, il est très difficile de dire si cet animal était contagieux. Les résultats de rt-PCR indiquent que les charges virales sont inférieures aux charges minimales considérées comme associées à l'infectiosité. Toutefois la démonstration scientifique d'une absence d'infectiosité pour cet animal n'a pas été réalisée dans cette étude. Parallèlement les charges virales tissulaires étaient plus faibles.

Pour les 2 derniers béliers vaccinés (3B et 3C), la vaccination a prévenu l'apparition de signes cliniques et la circulation de virus dans le sang et les organes. L'hyperthermie relevée sur le bélier 3B n'est en effet certainement pas imputable à la fièvre catarrhale ovine : d'une part cette hyperthermie a été très transitoire (1 jour) et le mouton n'a jamais eu de signes clinique de FCO, d'autre part ses rt-PCR sur sang ont toujours été négatives.

Intéressons nous maintenant à l'impact de notre infection expérimentale sur la fonction de reproduction et de l'éventuelle protection apportée par les vaccins inactivés.

L'analyse des éjaculats des béliers infectés non vaccinés est particulièrement intéressante. Elle consolide en effet l'impact négatif important de la FCO sur la fertilité des mâles. Les trois refus de sauts (deux béliers à J7 et un bélier à J10), imputables à un état d'abatement sévère des animaux, confirme que la FCO semble responsable, en face clinique, d'une diminution de la libido. Les paramètres qualitatifs des éjaculats prélevés à partir de J15 sont détériorés de façon importante (pourcentage de spermatozoïdes vivants nul, pourcentage de spermatozoïdes mobiles nul, distance parcourue par les spermatozoïdes en une seconde nul, anomalies totales supérieure à 70%). Les paramètres quantitatifs ne sont pas ou peu modifiés : le volume ne semble pas affecté (avec toutes difficultés de lecture du volume, sur tube gradué, de la semence de bélier) et la concentration ne l'est que faiblement.

Compte tenu du faible nombre de béliers testés et des refus de sauts, ces résultats n'étaient pas statistiquement significatifs par jour de collecte. Il a ainsi été décidé de regrouper les données des béliers de chaque groupe en 3 périodes. Ce rassemblement en période a augmenté la puissance des résultats : sur la période C, la semence du groupe 2 est significativement altérée par rapport au groupe 1 (% de spz vivants, % de spz mobiles, distance moyenne / s).

Ces résultats sont cohérents avec les résultats de Kirhvink (Kirhvink et al., 2009) qui a démontré que la bluetongue était responsable d'une altération majeure de la semence de béliers naturellement infectés pas le BTV-8. Son étude repose sur l'analyse de 167 éjaculats provenant de 79 béliers, entre 5 et 138 jours post-maladie. La concentration de la semence, la mobilité des spermatozoïdes, le pourcentage de spermatozoïdes vivants sont significativement dégradés. Les béliers ne retrouveraient une semence normale qu'après 63 à 138 après la maladie. Son étude terrain n'a pas permis de préciser le délai infection / altération de la semence. Notre étude suggère que ce délai est d'environ 2 semaines.

Le sperme du bélier 3A a été fortement altéré à partir de J15, contrairement aux spermatozoïdes des béliers 3B, 3C et 3D. Seul l'éjaculat prélevé à J3 sur le bélier 3B était de mauvaise qualité, mais il est très probable que cela soit imputable à l'hyperthermie transitoire qui a eu lieu deux jours plus tôt. Cette dégradation du sperme ne s'est en outre pas répétée : les éjaculats prélevés à partir de J7 étaient de bonne qualité.

Compte tenu du fait que le bélier 3A était le seul bélier à n'avoir pas été correctement protégé cliniquement par sa vaccination 13 jours avant l'infection, et pour répondre à la question « le vaccin, qui protège des signes cliniques, protège-t-il de l'altération du sperme ? », il a été décidé d'exclure ce bélier 3A du groupe 3 pour la présentation des paramètres du sperme par périodes. Il est apparu que les paramètres de qualité du sperme de ce groupe 3B+3C+3D, vaccinés, infectés, cliniquement protégés, étaient significativement conservés par rapport au groupe 2, infectés non vaccinés, où l'altération fonctionnelle du sperme était évidente. Ces résultats suggèrent donc qu'une protection de la fonction de reproduction est assurée par la vaccination. Il faut toutefois rester prudent sur ce critère qui n'a pas été évalué dans le cadre d'une inoculation d'épreuve réalisée sur un grand nombre d'animaux 3 semaines après la vaccination.

L'altération de la semence due à la FCO peut être liée à l'hyperthermie engendrée par la maladie, à des micro-lésions vasculaires du système reproducteur, ou à des troubles fonctionnels dus à la présence de virus dans les tissus. Notre infection expérimentale n'a pas permis de retrouver de lésions microscopiques des testicules ou de l'épididyme. L'hyperthermie sévère, observée du 4<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> jour post-infection, semble pouvoir expliquer en partie l'altération de la semence observée dans notre étude jusqu'à l'euthanasie des animaux (J21). Mais une hyperthermie de quelques jours ne peut probablement pas expliquer une modification du sperme pendant plus de deux mois, telle que décrite lors d'infection naturelle. Par rt-qPCR, si le virus n'a été qu'exceptionnellement détecté dans le sperme des béliers infectés, il a été systématiquement retrouvé dans les testicules et dans l'épididyme des béliers infectés. Il est possible que l'altération de la qualité du sperme soit en partie également due à des troubles fonctionnels de l'appareil reproducteur, plus ou moins liée à la présence du virus. Il aurait alors pu être intéressant d'effectuer des analyses immunohistochimiques des testicules et de l'épididyme pour identifier le type cellulaire infecté et explorer cette hypothèse. Cependant, notons qu'avec cette hypothèse, les résultats du bélier 3D sont difficiles à expliquer (ce dernier était protégé cliniquement et ne présentait pas d'altération de la qualité du sperme alors que du BTV-8 a été détecté dans son appareil reproducteur par rt-PCR quantitative à son euthanasie).



## 4. CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer la protection induite par une vaccination contre une épreuve d'inoculation environ 1 semaine avant la date officielle de protection, soit 2 semaines après la vaccination.

Les résultats montrent qu'une protection clinique et virologique existe dès le 13<sup>ème</sup> jour post vaccination sur une partie de la population des moutons vaccinés.

Les résultats ont confirmé l'impact négatif majeur de la FCO sur les fonctions reproductrices des béliers. En effet, les paramètres du sperme ont été détériorés à partir du 15<sup>ème</sup> jour post-infection sur tous les animaux malades. Le sperme des deux béliers correctement protégés par la vaccination n'a pas été altéré, ce qui suggère que la protection du vaccin, utilisé contre les signes cliniques et l'infection virale, est associée à une protection contre une altération de la qualité de la semence.

Des études parallèles, qui sont actuellement en cours, étudient l'impact de la FCO chez les brebis.

Direction de l'Enseignement et de la Vie Universitaire

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que  
**Mr Jean-Sébastien VIVILLE**  
a été admis(e) sur concours en : 2005  
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 Juillet 2009  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

**Mr Jean-Sébastien VIVILLE**

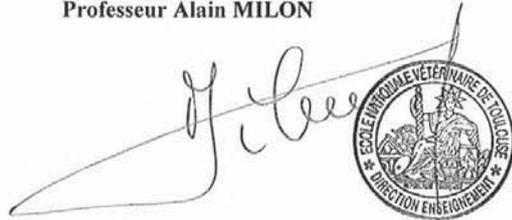
intitulée :

« Efficacité d'un vaccin inactivé contre une inoculation d'épreuve à BTV8 réalisée sur des béliers reproducteurs  
une semaine avant la période officielle de couverture vaccinale : Etude clinique, virologique et impact sur la  
qualité de la semence. »

**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 :** 04/10/2010  
**Le Président**  
de l'Université Paul Sabatier  
Professeur Gilles FOURFANIER



## 5. BIBLIOGRAPHIE

AFSHAR A., (2002) – Bluetongue : Laboratory diagnosis, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volume 17, Issues 3-4, August-November 1994, Pages 221-242

BACKX A., HEUTINK C.G., VAN ROOIJ E.M.A., VAN RIJN P.A., (2007) – Clinical signs of bluetongue virus serotype 8 infection in sheep and goats, *The Veterinary Record*, 161, 591-593

BARRAT-BOYES S.M., MACLACHLAN N.J., (1995) – Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle, *JAVMA*, Vol 206, No. 9, May1, 1995

BARRAT-BOYES S.M., ROSSITTO P.V., SCOTT J.L., MACLACHLAN N.J., (1992) - Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells, *Journal of General Virology*, (1992) 73, 1953-1960

BERNARD A., BENOIT-VALIERGUE H., LEROY I., (2008) – Observation clinique : un épisode de fièvre catarrhale ovine dans le département de l'Yonne : étude sur le terrain dans l'élevage ovin du Centre d'application de l'E.N.V.A. à Champignelles, *Le Nouveau Praticien Vétérinaire élevage et santé*, février/avril 2008, 11-17

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

BOWEN R.A., HOWARD T.H., PICKETT B.W., (1985) – Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected bulls, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 178, 91-96

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

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

CARUSO A., (2009) – Evaluation de la protéine VP7 pour la protection des ovins vis-à-vis du virus bluetongue (BTV) lors d'un essai vaccinal utilisant le vecteur poxvirus SG33, *Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire*, 2009 – TOU 3 – 4107

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

DAL POZZO F., DE CLERCQ K., GUYOT H., VANDEMEULEBROUCKE E., SARRADIN P., VANDENBUSSCHE F., THIRY E., SAEGERMAN C., (2009) – Experimental reproduction of bluetongue virus serotype 8 clinical disease in calves, *Vet. Microbiol.*, 2009 May, 136 (3-4), 352-358

DARPEL K.E., SHAW A.E., KGOSANA L., MÜLLER-DOBLIES U.U., TAKAMATSU H-H., MELLOR P.S., MERTENS P.P.C., OURA C.A.L., (2007) – Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe, *The Veterinary Record*, 161:253-261 (2007)

DEMAULA C.D., JUTILA M.A., WILSON D.W., MACLACHLAN N.J., (2001) – Infection kinetics, prostacycline release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells, *Journal of General Virology*, (2001) 82, 787-794

DEMAULA C.D., LEUTENEGGER C.M., BONNEAU K.R., MACLACHLAN N.J., (2002) – The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue, *Virology*, 296, 330-337 (2002)

ELBERS A.R.W., BACKX A., EKKER H.M., VAN DER SPEK A.N., VAN RIJN P.A., (2007) – Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in the Netherlands, *Veterinary Microbiology*, 129 (2008) 156-162

ESCHBAUMER M., HOFFMANN B., KÖNIG P., TEIFKE J.P., GETHMANN J.M., CONRATHS F.J., PROBST C., METTENLEITER T.C., BEER M., (2009) – Efficacy of three inactivated vaccines against Blue Tongue virus serotype 8 in sheep, *Vaccine*, 27, 4169-4175

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

FOSTER N.M., LUEDKE A.J., PARSONSON I.M., WALTON T.E., (1991) – Temporal relationship of viraemia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains, *Am J Vet Res*, Vol 52, No 2, February 1991

FRANCHI P., MERCANTE M.T., RONCHI G.F., ARMILLOTTA G., ULISSE S., MOLINI U., (2008) - Laboratory tests for evaluating the level of attenuation of bluetongue virus, *J. Virol. Methods*, 2008 Nov., 153 (2), 263-265

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

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

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

HAMBLIN C., SALT J.S., GRAHAM S.D., HOPWOOD K., WADE-EVANS A.M., (2008) – Bluetongue virus serotype 1 and 3 infection in Poll Dorset sheep, *Aust. Vet. J.*, 76, 622-629

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

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

JAMESON P., SCHOENHERR C.K., GROSSBERG S.E., (1977) -Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice, *Infection and Immunity*, Apr 1978, p 321-323

JEGGO M.H., GUMM I.D., TAYLOR W.P., (1983) - Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types, *Res Vet Sci.*, 1983 Mar, 34(2) : 205-11

JEGGO M.H., WARDLEY R.C., TAYLOR WP., (1984) – Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection, *Res Vet Sci*, 1984, 36 : 81-86

KIRKLAND P.D., MELVILLE L.F., HUNT N.T., WILLIAMS C.F., DAVIS R.J., (2004) – Excretion of bluetongue virus in cattle semen : a feature of laboratory-adapted virus, *Vet. Ital.*, 40(4), 497-501

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

KOUMBATI M., MANGANA O., NOMIKOU K., MELLOR P.S., PAPADOPOULOS O., (1998) – Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats, *Veterinary Microbiology*, 64(1999) 277-285

KRAMPS J.A., VAN MAANEN K., MARS M.H., POPMA J.K., VAN RIJN P.A., (2008) – Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus (BTV)-specific antibodies in individual milk samples of Dutch dairy cows, *Veterinary Microbiology*, 130 (2008) 80-87

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

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

LOBATO Z.I.P, COUPAR B.E.H, GRAY C.P., LUNT R., ANDREW M.E., (1997) – Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59(1997) 293-309

MACLACHLAN N.J., (1994) – The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, Vol 17, No. 3/4, pp 197-206, 1994

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

MACLACHLAN N.J., CRAFFORD J.E., VERNAU I.A., GODDARD A., GUTHRIE A.J., VENTER E.H., (2008) – Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep, *Vet Pathol* 45:310-315 (2008)

MACLACHLAN N.J., DREW C.P., DARPEL K.E., WORWA G., (2009) – The pathology and pathogenesis of bluetongue, *J. Comp. Path.*, 141 (2009), 1-16

MACLACHLAN N.J., JAGELS G., ROSSITTO P.V., MOORE P.F., HEIDNER H.W., (1990) – The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves, *Vet Pathol*, 27:223-229 (1990)

MACLACHLAN N.J., NUNAMAKER R.A., KATZ J.B., SAWYER M.M., AKITA G.Y., OSBURN B.I., TABACHNICK W.J., (1994), Detection of bluetongue virus in the blood of inoculate calves : comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides varipennis*, *Arch Virol.*, 1994 ;136(1-2) :1-8

MACLACHLAN N.J., OSBURN B.I., (2008) – Induced brain lesions in calves infected with bluetongue virus, *The veterinary Record*, 162:490-491 (2008)

MACLACHLAN N.J., OSBURN B.I., GHALIB H.W., STOTT J.L., (1985) – Bluetongue virus-induced encephalopathy in fetal cattle, *Vet. Pathol.*, 1985 Jul, 22(4), 415-417

MAHRT C.R., OSBURN B.I., (1986) – Experimental bluetongue virus infection of sheep : effect of vaccination : Pathologic, immunofluorescent and ultrastructural studies, *Am J Vet Res*, Vol 47, No 6, June 1986, 1198-1203

MANIERE J., (2008) – Fièvre Catarrhale Ovine : inquiétudes et rumeurs sur la fertilité des taureaux en élevage allaitant dans la Nièvre, *Le Nouveau Praticien Vétérinaire élevage et santé*, avril 2008, 9-10

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

MELLOR P.S., (1990) – The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors, *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990; 162:143-61

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

MORTOLA E., NOAD R., ROY. P., (2003) – Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells, *Journal of Virology*, March 2004, Vol. 78, No. 6, 2875-2883

MOULTON J.E., (1961) – Pathology of Bluetongue of Sheep, *J.A.V.M.A.*, Vol.138, No 9, 493-498

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

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

OSBURN B.I., (1994) – The impact of bluetongue virus on reproduction, *Comp. Immun. Microbiol. Infect.*, 17 (1994), 189-196

OSBURN B.I., SILVERSTEIN A.M., PRENDERGAST R.A., JOHNSTON R.T., PARSHAL C.J. Jr., (1971) - Experimental viral-induced congenital encephalopathies. I. Pathology of hydranencephaly and porencephaly caused by bluetongue vaccine virus, *Lab. Invest.*, 1971 Sept., 25(3), 197-205

OURA C.A.L., WOOD J.L.N., SANDERS A.J., BIN-TARIF A., HENSTOCK M., EDWARDS L., FLOYD T., SIMMONS H., BATTEN C.A., (2009) – Seroconversion, neutralising antibodies and protection in bluetongue serotype 8 vaccinated sheep, *Vaccine*, 27 (2009), 7326-7330

PETERS M., MÖSENFECHEL S., JACOBSEN B., BEINEKE A., WOLSTEIN P., (2008) -Bluetongue virus serotype 8-associated brain malformations in two calves, *Dtsch Tierarzt Wochenschr.*, 2008 Aug ; 115 (8): 298-303

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

PURSE B.V., BROWN H.E., HARRUP L., MERTENS P.P.C., ROGERS D.J., (2008) – Invasion of bluetongue and other Orbivirus infections into Europe : the role of biological and climatic processes, *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2008, 27(2), 427-42

RICHARDS R.G., MACLACHLAN N.J., HEIDNER H.W., FULLER F.J., (1988) – Comparison of virologic and serologic responses of lambs and calves infected with bluetongue virus serotype 10, *Veterinary Microbiology*, 18 (1988) 233-242

ROY P., (2003) – Nature and Duration of Protective Immunity to Bluetongue Virus Infection, *Dev Biol. Basel*, Karger, 2003, Vol 114, pp 169-183

ROY P., (2007) – Orbiviruses, *Field's Virology*, Fifth Edition, Edited by David M. Knipe, 1835-1864

ROY P., URAKAWA T., VAN DIJK A.A., ERASMUS B.J., (1990) – Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep, *Journal of virology*, May 1990, p 1998-2003

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

SAEGERMAN C., BERKVEN S. D., MELLOR P.S., (2008) – Bluetongue Epidemiology in the European Union, *Emerg Infect Dis Journal*, Volume 14, Number 4-April 2008

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

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

SCHWARTZ-CORNIL I., MERTENS P.P.C., CONTRERAS V., HEMATI B., PASCALE F., BRERAD E., MELLOR P.S., MACLACHLAN N.J., ZIENTARA S., (2008) - Bluetongue virus : virology, pathogenesis and immunity, *Vet. Res.* (2008) 39 :46

TAKAMASU H., MELLOR P.S., MERTENS P.P.C., KIRKHAM P.A., BURROUGHS J.N., PARKHOUSE R.M.E, (2003) – A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of insect vector, *J Gen Virol*, 84 (2003), 227-235

THIRY E., (2008) – Les vaccins contre la FCO protègent-ils le foetus ?, *Le point vétérinaire*, Juillet-août 2008, N°287, 11

THIRY E., GAUTHIER J-F., (2007) – La fièvre catarrhale ovine est-elle installée durablement ?, *Le Point Vétérinaire*, N°281, Décembre 2007

THIRY E., SARGERMAN C., GUYOT H., KIRTEN P., LOSSON B., ROLLIN F., BODMER M., CZAPLICKLI G., TOUSSAINT J-F., DE CLERCQ K., DOCHY J-M., DUFEY J., GILLEMANN J-L., MASSEMAN K., (2006) – Bluetongue in northern Europe, *The Veterinary Record*, September 2, 2006

TOUSSAINT J-F., SAILLEAU C., MAST J., HOUDART P., CZAPLICKI G., DEMEESTERE L., VANDENBUSSCHE F., VAN DESSEL W., GORIS N., BREARD E., BOUANAADJA L., THIRY E., ZIENTARA S., DE CLERCQ K., (2007) – Bluetongue in Belgium, 2006, *Emerging Infectious Diseases*, Vol 13, No 4, April 2007

VANDEBBUSSCHE F., VANBINST T., VERHEYDEN B., VAN DESSEL W., DEMEESTERE L., HOUDART P., BERTELS G., PRAET N., BERKVENNS D., MINTIENS K., GORIS N., DE CLERCQ K., (2007) – Evaluation of antibody-ELISA and real-time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006, *Veterinary Microbiology*, 129 (2008) 15-27

VERCAUTEREN G., MIRY C., VANDENBUSSCHE F., DUCATELLE R., VAN DER HEYDEN S., VANDEMEUEBROUCKE E., DELEEUW I., DEPREZ P., CHIERS K., DE CLERCQ K., (2008) – Bluetongue virus serotype 8-associated hydranencephaly in calves, *Transbound Emerg Dis.*, 2008 Sep; 55(7), 293-8

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

WALDVOGEL A.S., ANDERSON G.A., PHILLIPS D.L., OSBURN B.I., (1992) - Infection of bovine fetuses at 120 days gestation with virulent and avirulent strains of bluetongue virus serotype 11, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* Vol 15, No.1, pp.53-63

WHITE D.M., WILSON W.C., BLAIR C.D., BEATY B.J., (2005) – Studies on overwintering of bluetongue virus in insects, *J Gen Virol*, 86 (2005), 453-462

WILSON A., DARPEL K., MELLOR P.S., (2008) – Where does bluetongue virus sleep in the winter? , *PLoS Biol.*, 2008 August ; 6(8) : e210

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

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

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

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



## 6.ANNEXES

### 6.1. Grille de notification des signes cliniques

	J0	J1	J2	J3	J4
température					
rythme respiratoire					
rythme cardiaque					
<b>jetage oculaire</b> 0= absent 1= séromuqueux 2= purulent					
<b>jetage nasal</b> 0= absent 1= séromuqueux 2= purulent					
<b>ptyalisme</b> 0 absent 1 modéré 2 important					
<b>cyanose de la langue</b>					
<b>lésions du museau et chanfrein</b> - nature - extension					
<b>lésions cavité buccale</b> - nature - extension					
<b>lésions podales</b> (bourrelet coronaire)					
<b>amaigrissement</b> (0 absent, 1 modéré, 2 marqué, 3 sévère)					
<b>diarrhée</b>					
<b>toux</b>					
<b>Autres</b>					

## **6.2. Extraction de l'ARN des tissus conservés en RNA-later**

- **Homogénéisation**

- Décongeler les tissus conservés à -20°C. Eliminer le RNA later
- Peser environ 30 mg et déposer dans les tubes céramiques (Lysing Matrix D MP Bio) du broyeur de cellules (Précellys) avec 600 µl de RA1 (kit Nucléospin RNA II Macherey Nagel).
- Bien refroidir les tubes.
- Procéder au broyage : cycle **6500 3X5**. déposer les tubes dans la glace dès la sortie du broyeur.

- **Extraction**

- Centrifuger les tubes céramiques 1 minute à 11.000 g
- Reprendre 350 µl de surnageant dans un microtube de 1.5 ml
- Ajouter 350 µl d'éthanol (70 %), homogénéiser par inversion
- Déposer le lysat (700 µl) dans un tube RNA II bleue
- Centrifuger 30 secondes à 11.000 g
- Changer le tube de collection
- Ajouter 350 µl de tampon MDB sur la membrane
- Centrifuger 1 minute à 11.000 g
- Ajouter 200 µl de tampon de lavage RA2 et centrifuger 30 s à 11 000 g .Changer le tube de collection.
- Déposer 600 µl de tampon de lavage RA 3 et centrifuger 30 s à 11 000 g. Eliminer l'éluât et remettre le tube de collection.
- Déposer 250µl de tampon de lavage RA 3 et centrifuger 2 mn à 11 000 g.
- Placer la colonne dans un microtube de 1,5 ml identifié et déposer 60 µl d'eau RNase free et centrifuger 1 minute à 11 000 g.

## **6.3. Protocole expérimental de la RT-PCR quantitative**

(Kit Taqvet® Blue-Tongue Virus all genotypes, LSI<sup>ND</sup>, Lissieu, France).

- **Extraction de l'ARN (kit Nucleospin RNA Virus – réf. 740956-250 Macherey Nagel)**

- Distribuer 560 µL de tampon RAV1-carrier dans un microtube de 1,5 mL.
- Ajouter dans le microtube 100 µL de substrat (sang, broyat de tissu)
- Vortexer immédiatement et pendant 15 secondes. Incuber 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger rapidement le tube avant ouverture
- Ajouter dans le tube 560 µL d'éthanol 100%. Vortexer immédiatement et pendant 15 secondes. Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le lysat de l'échantillon
- Prendre une colonne du kit Nucleospin RNA Virus (colonne bleue)
- A l'aide d'une pipette, transférer 360 µL du lysat de l'échantillon sur la colonne. Boucher. Centrifuger 1 minute à 10000g.
- A l'aide d'une pipette, transférer le reste de l'échantillon sur la même colonne. Boucher. Centrifuger 1 minute à 10000g.

- Distribuer 500  $\mu\text{L}$  de BufferRAW dans chaque colonne. Boucher. Centrifuger 1 minute à 10000g.
- Distribuer 630  $\mu\text{L}$  de Buffer RAV3 (reconstitué) dans chaque colonne. Boucher. Centrifuger 1 minute à 10000g.
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Distribuer 50  $\mu\text{L}$  d'eau RNAase-free du kit Nucleospin RNA Virus. Boucher la colonne
- Incuber 1 minute à température ambiante.
- Centrifuger 1 minute à 10000g pour éluer. Jeter la colonne. Conserver le microtube à 0°C si l'amplification est réalisée tout de suite, ou à -20°C.

- **Dénaturation des ARN viraux**

- Mettre, dans une plaque 96 puits, 1  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimethylsulfoxyde) et ajouter 10  $\mu\text{L}$  de chaque ARN par puit
- Sceller les puits avec des barrettes de bouchons de tailles correspondantes
- Centrifuger la plaque.
- Chauffer pendant 3 minutes à 95°C dans le thermocycleur, puis déposer la plaque dans la glace pilée ou sur un bloc réfrigéré (4°C) jusqu'à utilisation

- **Amplification** sur un thermolyseur ABI 7000. Analyse des résultats avec le logiciel SDS v1.2

#### **6.4. Protocole expérimental du test ELISA par compétition**

##### **(ID Screen® Blue Tongue Competition - ID-Vet, Montpellier, France)**

- Homogénéiser tous les réactifs par retournement à température ambiante (21°C +/- 5°C)
- Distribuer
  - 50  $\mu\text{L}$  de contrôle positif dans les cupules A1 et B1
  - 50  $\mu\text{L}$  de contrôle négatif dans les cupules C1 et D1
  - 50  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon à tester dans les cupules restantes
- Incuber 20 minutes à 21°C
- Préparer le conjugué anti-VP7-PO 1x en diluant le conjugué anti-VP7-DO 10x au 1/10<sup>ème</sup> en Tampon de dilution 2
- Sans vider et sans laver la plaque, distribuer 100  $\mu\text{L}$  de conjugué anti-VP7 1x dans chaque cupule
- Incuber 15 minutes à 21°C
- Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300  $\mu\text{L}$  de solution de lavage. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages
- Distribuer 100  $\mu\text{L}$  de solution de révélation dans chaque cupule
- Incuber 10 minutes à 21°C à l'obscurité
- Distribuer 100  $\mu\text{L}$  de solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction
- Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

## **6.5. Liste des organes prélevés en autopsie**

Peau  
Langue  
Muqueuse buccale  
Poumon lobe cranial  
Poumon lobe intermédiaire  
Poumon lobe caudal  
Artère pulmonaire (base)  
Aorte (base)  
Cœur myocarde :  
Cœur endocarde  
Muscle squelettique  
Rate  
Rein  
Noeud lymphatique. préscapulaire  
N L tracheobronchique  
N L retro pharyngiens  
Cerveau  
Ampoule séminale  
Queue épидидyme  
Tête épидидyme  
Vésicule séminale  
Corps épидидyme  
Testicule

Toulouse, 2010

**NOM : VIVILLE**

**Prénom : Jean-Sébastien**

**TITRE** : Efficacité d'un vaccin inactivé contre une inoculation d'épreuve à BTV-8 réalisée sur des béliers reproducteurs une semaine avant la période officielle de couverture vaccinale : étude clinique, virologique et impact sur la qualité de la semence.

**RESUME** :

Cette étude a permis d'une part d'évaluer l'impact de l'infection à BTV-8 sur la qualité de la semence de béliers reproducteurs et d'autre part d'évaluer la protection clinique et virologique d'un vaccin inactivé contre une infection expérimentale précoce à BTV-8 réalisée avant la période officielle de couverture vaccinale.

La première partie du mémoire présente le contexte de l'étude et une synthèse bibliographique précise sur la fièvre catarrhale ovine, le virus BTV et les moyens de lutte disponibles.

L'étude expérimentale, décrite dans la deuxième partie, a permis de reproduire un modèle d'infection à BTV-8, avec des signes cliniques de FCO chez des béliers. La totalité des paramètres de qualité de la semence est affectée de manière importante par l'infection du virus BTV-8 dès le 15<sup>ème</sup> jour post infection alors que le volume et la concentration du sperme semblent peu affectés.

A 13 jours post vaccination, une protection partielle a été observée chez les béliers vaccinés : 2 béliers sur 4 sont apparus totalement protégés contre les signes cliniques, l'altération de la qualité du sperme et l'infection virale, un bélier était partiellement protégé et le dernier animal est apparu réceptif et sensible à la maladie. Ces résultats suggèrent que la protection du vaccin, utilisé contre les signes cliniques et l'infection virale, est associée à une protection contre une altération de la qualité de la semence.

**MOTS-CLES** : BTV8, FCO, infection, vaccin, sperme

---

**ENGLISH TITLE**: Efficiency of an inactivated vaccine against a BTV8 challenge performed one week before the official time of the vaccinal protection on reproductive rams : clinical and virological study, and impact on semen quality.

**ABSTRACT** :

This study aims first, to evaluate the impact of a BTV8 infection on quality of reproductive rams' semen, and secondly, to test the clinical and virological protection of a inactivated vaccine against an early BTV8 challenge, performed one week before the official time of the vaccinal protection.

The first part of this work presents the context of the study and an acute bibliographic synthesis on Bluetongue disease, BT Virus, and available control measures.

The experimental work, described in the second part, allowed to reproduce a BTV8 infection model, with bluetongue symptoms on rams. All of the semen quality parameter have been majorly affected by the BTV8 infection, starting 15 days after the challenge, whereas the semen volume and concentration seemed less affected.

13 days post vaccination, a partial protection of the vaccinated rams has been observed: 2 of the 4 rams seem to be efficiently protected against clinical signs, viral infection and semen quality alteration, one ram was partially protected and the last one appeared to be responsive and sensitive. These results suggest that the vaccinal protection, used against clinical signs and viral infection, is associated to a protection against semen

**KEYWORDS** : BTV8, Bluetongue, infection, vaccine , semen