



## 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 : 4965](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/4965)

**To cite this version :**

CALVALIDO, Jérôme. *Pouvoir pathogène et variabilité génétique du BTV-1 responsable de l'épizootie de fièvre catarrhale ovine en 2008 dans le Sud-Ouest de la France*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Toulouse 3, 2011, 129 p.

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

---

# POUVOIR PATHOGÈNE ET VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DU BTV-1 RESPONSABLE DE L'ÉPIZOOTIE DE FIÈVRE CATARRHALE OVINE EN 2008 DANS LE SUD-OUEST DE LA FRANCE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**CALVALIDO Jérôme**  
Né, le 12 mai 1986 à PARIS (75)

---

**Directeur de thèse : M. Gilles MEYER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jacques IZOPET**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Gilles MEYER**  
**M. Gilles FOUCRAS**

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

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

Directeur : M. A. MILON

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

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. 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. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*  
M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*  
M. FRANCO Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*  
M. MARTINEAU Guy, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. TOUTAIN Pierre-Louis, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 1°  
CLASSE**

M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*  
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. 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. 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. PICAVET 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

Mle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
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*  
Mle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
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*  
Mle **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*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PRIYMENKO 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. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

### ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*  
Mle **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 a nous a confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,  
Pour son soutien, sa patience et sa gentillesse,  
Et surtout pour sa zen attitude,  
Sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie des ruminants*

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

# DEDICACES

**A mes parents, à ma famille**, pour votre amour et votre soutien constants qui m'ont permis d'accomplir ma vocation.

**A mon frère Laurent**, qui a été mon modèle et une source de motivation constante pour les études.

**A Miramar**, LA colocation de l'ENVT, qui a marqué des générations de vétos depuis 40 ans, qui m'a fait connaître les 4 meilleures années de ma vie. Tellement de choses vont me manquer : l'amiante, les jeux du couteau, le Get de Papy, le voisin aigri et son homme-femme, la vieille voisine et Boubou, les PV de 7h30 du mat', Los Piquillos, la Sidreria, les entrecôtes de chez Arné, les coups de klaxon du traiteur d'en face, les troubabas de l'école d'infographie, les pharmaciennes physiquement intelligentes.

**A mes colocataires** : à **Fixou** et sa roussitude, sa panse et sa capacité à Héroder des journées entières avec Raguette ; à **Gued** qui a fait souffler sur la maison le Mistral de la Canebière et de ses cagarelles, à sa chichine généreuse ; à **Martichou**, son nez et ses mollets d'acier, sa capacité à enchaîner des à-fond de sympathie jusqu'à l'hydrolyse ; à **Mumu** et son pelage auriculaire, son Roquefort à Penicillium Roqueforti et son usage très personnel des pots de Nutella ; à **Braguette** pour sa sociabilité, son grand cœur vis-à-vis des hérissons, et ses guili-wili ; à feu Lili, aux serpents qui servent à rien, aux souris et autres mites qui ont échoué dans leur tentative d'invasion de la maison. Ces cinq années ont marqué ma vie, vous allez tous me manquer.

**A mes colocataires à mi-temps**, Florence, Sophie et Puce, qui ont su s'adapter à la finesse et à la poésie des conversations de la maison.

**A Evence** et son humour nul que je subis depuis 7 ans et qui va me suivre jusqu'au Québec.

**A Michou**, le plus beau des Michous, le Lucky Luke de la gêne, qui rougit plus vite que son ombre, à ses talents de danseur (on croirait parfois qu'il a le Diable au corps...).

**Au Château** : à Gaston, ses pectoraux, ses déclarations d'amour à Jolie maman, et sa 406 essence qui nous lâche sans raison sur l'autoroute ; à Lazagne, son intelligence légendaire en boum, son strabisme alcoolique, et la charrette qu'il traîne quand il court ; à Germain, mon partenaire de thèse, qui m'a aidé à survivre aux attaques féroces de 273 ; à Manon, et Nanar, mon groupe de clinique de la mort ; à Julie pour sa capacité à supporter les imbécilités de Germain.

**A Pinpin** pour sa gérontophilie ; tu m'as dit que j'étais ton modèle dans la vie, je t'en remercie...

**A Ed le dég'**, la plus grande menace que l'ENVT ait jamais connue, le père fouettard des poulottes. Nos parties de chasse en boum me manqueront.

**A tous les autres copains**, Pap'Jav' qui croit encore qu'il est bon en Médecine et au Beer-Pong, Retournard le snake qui aime prendre « l'air » sur la terrasse du cercle, Lulu et sa prothèse de prépuce en Surimi ; Ben Cuq le Ben Cuq pour sa gayté; et Trapou, ses plantes vertes et son pot de chanvre.

**A toutes les autres copines**, Emilie, La Ceup, la mère Auriol, Fraselle, Mammouth's, Aline, Morgane.

**A mes poulots 1<sup>ière</sup> génération (les mal brimés)** : La Bouille (Arnold, Lili, Le King, Cheylan, Charrouin), **la Stabu** (Muhlach, Lecroq, Hugues, Roumégous, Loïc), Bla, Alex, Filou la rascasse, Mémé Dornier et tous les autres, vous êtes moches mais on s'est bien marré pendant 3 ans.

**A mes poulots 2<sup>ième</sup> génération** : aux futurs Miramariens Fages le musclé, Gozlan le gitan, Le Fat, Mr Miami et Bastareaud bon poulot ; à Cuquemelle et Darty. Même remarque que les précédents.

**Aux bannis du Cercle**, le Belge, Bala, Françou, Ximun, Greg, Raph, Durbec, Arthur, papa Zein, restez vous-mêmes, bêtes, lourds, mais surtout idiots.

**Au VRC** : Arnold, FX, Hugues, Greg, Bala, Muhlach, Lecroq, Laz, Alex, Kuca, Charron, Dusart, Charrouin, Darty, Cuquemelle, Stouf, Mathieu Guillaume, Moreau, Roumégous, Rivière la Machine, Bastareaud bon poulot, Dell-Omini, Mézard, Tibor, les Chiros, et les autres que j'ai oubliés.

**A mes docs**, Taquet, Léni, Babar, La Dub, Ronsard, Cariou, Brice, Gros Ben, Jean-Marie, Foufoune, Crado, Bouss, Mado, Majida, Marie, Walou, Milou, Leroy, Forclos, Serman, et tous ceux que j'oublie, c'est vous qui m'avez brimé, qui m'avez enseigné l'esprit de l'école, mille mercis.

**A Lulu et Colette**, qui ont quitté l'ENVT chacun à leur manière, mais qui resteront éternellement dans nos cœurs.

**A tous les vieux** : Iban qui croit encore que Biarritz a une équipe de rugby, Jean-Luc pour son ténia, Roger pour ses apéros d'Anat mémorables et sa panse, Daste pour sa finesse.

**A la Section paloise**, le Top 14 dans un an, le Brennus dans deux ans, merci de m'avoir fait vibrer pendant toutes ces années.



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>PARTIE I : LA FIEVRE CATARRHALE OVINE ET SON APPARITION EN EUROPE DEPUIS 2006 .....</b>	<b>19</b>
<b>I - Le Bluetongue Virus (BTV) et sa pathogénie .....</b>	<b>21</b>
A – Structure du virus .....	21
1 – La capsid externe .....	22
2 – La nucléocapside .....	22
3 – Le core viral .....	23
4 – Les protéines non structurales .....	23
B – Le génome viral .....	24
1 – Organisation du génome viral .....	24
2 – Les mécanismes de la variabilité génétique du virus .....	25
a. <i>Les réassortiments génétiques</i> .....	26
b. <i>Les mutations génétiques</i> .....	27
c. <i>La recombinaison intragénique</i> .....	28
3 – Variabilité génétique du gène L2 des 24 sérotypes du BTV .....	29
4 – L'Europe, point de convergence des deux topotypes géographiques majeurs ..	30
C – Cycle de multiplication .....	31
D – Dissémination, tropisme cellulaire et réservoir .....	32
E – Réaction inflammatoire et réponse cellulaire .....	33
F – Réponse immunitaire .....	35
1 – La réponse immunitaire à médiation humorale .....	35
2 – La réponse immunitaire à médiation cellulaire .....	37
3 – L'immunité chez le jeune vis-à-vis du BTV .....	38
<b>II – La maladie et les moyens de lutte .....</b>	<b>39</b>
A – Les signes cliniques .....	39
1 – La forme aiguë .....	39
a. <i>Les symptômes généraux chez l'adulte</i> .....	39
b. <i>Les troubles de la reproduction</i> .....	42
2 – La forme subaiguë ou fruste .....	45
3 – La forme inapparente .....	45
4 – La reproduction de la maladie et les modèles expérimentaux .....	45
B – Diagnostic .....	47
1 – Diagnostic épidémio-clinique .....	47
2 – Diagnostic différentiel .....	47
3 – Diagnostic de laboratoire .....	48
a. <i>Diagnostic virologique</i> .....	48
b. <i>Diagnostic sérologique</i> .....	48
C – Prophylaxie .....	49
1 – Prophylaxie sanitaire .....	49
2 – Prophylaxie médicale .....	50
a. <i>Les vaccins actuels</i> .....	51

b. <i>Les vaccins émergents</i> .....	54
c. <i>Les vaccins du futur : les vaccins à virus « défectueux »</i> .....	54
<b>III – L'épizootie de Fièvre catarrhale ovine dans l'Union européenne</b> .....	<b>55</b>
A – Une maladie « exotique » qui a envahi l'Europe en 2006 .....	55
1 – Historique et situation mondiale avant 2006 .....	55
2 – L'épizootie de Fièvre catarrhale ovine à sérotype 8 .....	57
3 – L'épizootie de Fièvre catarrhale ovine à sérotype 1 .....	60
4 – Le Sud-Ouest de la France, épïcentre de l'épizootie à BTV-1 .....	63
B – Les raisons d'une propagation aussi fulgurante et massive .....	65
1 – Les mécanismes d'infection .....	65
a. <i>Transmission vectorielle</i> .....	65
b. <i>Autres modes de transmission</i> .....	67
2 – La sensibilité des animaux à la maladie .....	67
a. <i>La forte sensibilité des races européennes domestiques</i> .....	67
b. <i>La faune sauvage, réservoir du virus</i> .....	68
3 – Saisonnalité de la maladie et phénomène d'Overwintering .....	69
<b>PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>73</b>
<b>I – Objectifs</b> .....	<b>74</b>
<b>II – Matériel et méthodes</b> .....	<b>74</b>
A - Cultures cellulaires .....	74
B - Isolement du virus BTV-1 à partir d'échantillons de terrain .....	75
1 – Nature et traitement des échantillons .....	75
2 – Isolement viral .....	75
3 – Nature et caractérisation des virus isolés .....	76
a. <i>Caractérisation par immunohistochimie</i> .....	76
b. <i>Caractérisation par RT-qPCR</i> .....	76
4 – Amplification et conservation des isolats viraux .....	77
C – Etude phylogénétique des souches isolées .....	77
1 – Sélection des isolats viraux .....	77
2 – Sélection des amorces pour l'amplification et le séquençage du gène L2 .....	78
3 – Extraction de l'ARN viral et RT-PCR .....	80
4 – Séquençage et analyse des séquences du gène L2 .....	80
D – Etude du pouvoir pathogène de la souche LVD-4508 .....	81
1 – Protocole expérimental .....	81
a. <i>Sélection des animaux utilisés et formation des groupes</i> .....	81
b. <i>Protocole de vaccination</i> .....	81
c. <i>Inoculation d'épreuve</i> .....	81
2 – Suivi clinique .....	82
3 – Suivi virologique .....	84
4 – Suivi sérologique .....	84
a. <i>Tests ELISA</i> .....	84
b. <i>Test de séroneutralisation</i> .....	86
E - Analyses statistiques .....	86

<b>III – Résultats .....</b>	<b>87</b>
A – Obtention et identification des isolats de terrain .....	88
B – Analyse comparative du gène L2 des différents isolats .....	87
C – Caractérisation du pouvoir pathogène de la souche LVD-4508 du BTV-1 et efficacité du vaccin Zulvac 1 .....	92
1 – Validation du modèle d'épreuve et protection vaccinale clinique .....	92
2 – Suivi de l'infection virale et protection vaccinale .....	96
3 – Evaluation de la réponse humorale .....	98
a. <i>Résultats des tests ELISA</i> .....	98
b. <i>Résultats des tests de séroneutralisation</i> .....	99
 <b>IV – Discussion .....</b>	 <b>101</b>
- Le BTV-1 est resté génétiquement stable lors de l'épizootie de 2007-2008 .....	101
- La souche isolée LVD-4508 du BTV-1 est fortement pathogène chez le mouton .....	103
- Le vaccin Zulvac 1 protège partiellement, mais de manière significative, les moutons contre l'inoculation d'épreuve .....	108
- Efficacité des tests sérologiques pour différencier animaux infectés et vaccinés .....	111
 <b>Conclusion Générale .....</b>	 <b>113</b>
 <b>Bibliographie .....</b>	 <b>114</b>
 <b>Annexes .....</b>	 <b>128</b>
- Séquence du gène L2 et de la protéine VP2 de la souche LVD4508 du BTV-1 .....	128

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

<b>Figure 1</b> : Schéma structural du BTV .....	21
<b>Figure 2</b> : Dessin représentant l'organisation de l'ARN dans le noyau du BTV .....	25
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique d'un réassortiment génétique entre deux souches de BTV .....	26
<b>Figure 4</b> : Les catégories de mutations ponctuelles et leurs conséquences .....	28
<b>Figure 5</b> : La recombinaison intragénique entre deux segments de nucléotides .....	29
<b>Figure 6</b> : Arbre phylogénétique montrant les liens de parenté entre les séquences nucléotidiques des gènes L2 des 24 sérotypes du BTV .....	30
<b>Figure 7</b> : Cycle de réplication du BTV .....	32
<b>Figure 8</b> : Schéma pathogénique du BTV chez les ruminants .....	33
<b>Figure 9</b> : Réactions de neutralisation croisées entre les différents sérotypes de la FCO .....	35
<b>Figure 10</b> : Les différents nucléotypes de la FCO regroupés par proximité antigénique .....	36
<b>Figure 11</b> : Schéma explicatif des tests sérologiques basés sur l'utilisation des protéines non structurales du BTV, dans le cadre de la stratégie DIVA .....	53
<b>Figure 12</b> : Les différents mécanismes d'Overwintering envisageables .....	71

## PHOTOGRAPHIES

<b>Photographie 1</b> : Photographies des manifestations cliniques de la FCO .....	41
<b>Photographie 2</b> : Photographies des lésions fréquemment observées à l'autopsie .....	42
<b>Photographie 3</b> : Photographie d'hydranencéphalie de veau nouveau-né .....	43
<b>Photographie 4</b> : Photographie de <i>Culicoides</i> spp. ....	65
<b>Photographie 5</b> : Effet cytopathique de l'isolat LVD4508 sur cellules BHK21, confirmé par immunohistochimie .....	87

<b>Photographie 6 : Manifestations cliniques observées chez les animaux infectés non vaccinés .....</b>	<b>93</b>
---	-----------

## **TABLEAUX**

<b>Tableau 1 : Fréquence des signes cliniques exprimés par les ovins et bovins atteints d'août à décembre 2007 dans le département des Ardennes .....</b>	<b>40</b>
<b>Tableau 2 : Troubles de la reproduction causés par la FCO chez les ovins à viande et les bovins .....</b>	<b>43</b>
<b>Tableau 3 : Effets de l'infection in-utero du fœtus bovin par le virus de la FCO en fonction du stade de gestation .....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau 4 : Les foyers de FCO en Europe entre 1998 et 2005 .....</b>	<b>56</b>
<b>Tableau 5 : Nombre de foyers de FCO à sérotype 8 notifiés par pays entre 2006 et 2007...</b>	<b>57</b>
<b>Tableau 6 : Isolats sélectionnés pour l'étude phylogénétique .....</b>	<b>78</b>
<b>Tableau 7 : Amorces sélectionnées pour le séquençage de L2 .....</b>	<b>79</b>
<b>Tableau 8 : Grille de scores cliniques .....</b>	<b>83</b>
<b>Tableau 9 : Résultats des RT-qPCR, exprimés en Ct pour les 3 trousse de diagnostic, pour les échantillons de terrain .....</b>	<b>88</b>
<b>Tableau 10 : Substitutions synonymes et non synonymes entre la séquence L2 de la souche LVD4508 et les souches MOR et ALG .....</b>	<b>91</b>
<b>Tableau 11 : Résultats qualitatifs des tests ELISA pour les 2 groupes infectés .....</b>	<b>99</b>
<b>Tableau 12 : Résumé des protocoles expérimentaux mis en place dans trois études cliniques récentes .....</b>	<b>105</b>

## **CARTES**

<b>Carte 1 : Les routes d'introduction des différents sérotypes de la FCO en Europe et dans le bassin méditerranéen depuis 1998 .....</b>	<b>57</b>
<b>Carte 2: Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/7/2006 et le 30/12/2006 .....</b>	<b>57</b>
<b>Carte 3: Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/7/2007 et le 30/12/2007 .....</b>	<b>58</b>
<b>Carte 4 : Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/1/2008 et le 21/12/2009 .....</b>	<b>59</b>

<b>Carte 5</b> : Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/5/2009 et le 14/09/2010 .....	59
<b>Carte 6</b> : Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/7/2006 et le 30/12/2006 .....	60
<b>Carte 7</b> : Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/1/2007 et le 30/12/2007 .....	61
<b>Carte 8</b> : Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/1/2008 et le 21/12/2009 .....	62
<b>Carte 9</b> : Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/5/2009 et le 14/09/2010 .....	63
<b>Carte 10</b> : Evolution du nombre de foyers de FCO à BTV-1 en France entre 2007 et 2010 .....	64
<b>Carte 11</b> : Dates de reprise de l'activité des Culicoïdes en France en 2009 .....	70

## GRAPHIQUES

<b>Graphique 1</b> : Diversité des Culicoïdes capturés en France métropolitaine (continent et Corse) par le réseau de surveillance entomologique au cours de l'année 2009 .....	66
<b>Graphique 2</b> : Comparaison du gène L2 de LVD-4508 avec celui des souches de BTV-1 précédemment isolées .....	90
<b>Graphique 3</b> : Comparaison du gène L2 de la souche LVD-4508 avec celui des souches de référence des autres sérotypes .....	91
<b>Graphique 4</b> : Scores cliniques moyens après inoculation d'épreuve .....	94
<b>Graphique 5</b> : Evolution des températures rectales moyennes pour les trois groupes d'agneaux .....	95
<b>Graphique 6</b> : Températures rectales individuelles des agneaux du groupe <i>Vac BTV-1</i> ....	96
<b>Graphique 7</b> : Détection du virus BTV-1 par RT-qPCR dans le sang des agneaux après inoculation d'épreuve .....	97
<b>Graphique 8</b> : Suivi de la virémie individuelle pour les groupes <i>BTV-1</i> et <i>Vac BTV-1</i> par RT-PCR .....	98
<b>Graphique 9</b> : Titres moyens en anticorps neutralisants après inoculation d'épreuve .....	100
<b>Graphique 10</b> : Scores cliniques obtenus après infection par le BTV-1 ou le BTV-8 .....	106

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>A</b>	Adénine
<b>AANE</b>	Acides Aminés Non Essentiels
<b>ACK</b>	Tampon de lyse des globules rouges
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AFSSA</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire et des Aliments
<b>AGID</b>	Agar Gel ImmunoDiffusion
<b>AHSV</b>	African Horse Sickness Virus
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATU</b>	Autorisation Temporaire d'Utilisation
<b>BHK-21</b>	Baby Hamster Kidney 21, ou cellule de bébé Hamster 21
<b>BoHV-1</b>	<i>Bovine herpesvirus 1</i> ou Herpèsvirus bovin 1
<b>BTV</b>	<i>Bluetongue virus</i> ou Virus de la bluetongue
<b>BVDV</b>	Bovine Viral Diarrhea Virus, ou virus de la Diarrhée Bovine Virale
<b>Ct</b>	Cycle threshold ou Cycle-seuil
<b>C</b>	Cytosine
<b>DIVA</b>	Distinction between Infected and Vaccinated Animals, ou distinction entre animaux infectés et vaccinés
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium ou Milieu minimum essentiel de Eagle modifié Dubelco/vogt
<b>dNTP</b>	DésoxyNucléotide Tri-Phosphate
<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>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>EID<sub>50</sub></b>	50% Egg Infectious Dose, ou dilution permettant l'infection de 50% des œufs inoculés
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority, ou Autorité européenne de sécurité des aliments
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ENVT</b>	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
<b>FCO</b>	Fièvre catarrhale ovine
<b>G</b>	Guanine
<b>IBR</b>	Infectious bovine rhinotracheitis ou Rhinotrachéite infectieuse bovine
<b>ID</b>	Intra-Dermique
<b>IL-6</b>	Interleukine 6
<b>IPI</b>	Infecté immunotolérant
<b>IV</b>	Intra-Veineux
<b>J</b>	Jour
<b>kb</b>	1000 paires de bases
<b>LTCD8+</b>	Lymphocyte T Cluster de Différenciation 8, lymphocyte T cytotoxique
<b>LVD</b>	Laboratoire Vétérinaire Départemental
<b>LT <math>\gamma\delta</math></b>	Lymphocyte avec un récepteur fait d'une chaîne $\gamma$ et d'une chaîne $\delta$

<b>mL</b>	Millilitre
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NS2</b>	Non structural protein 2 ou protéine non structurale 2
<b>OIE</b>	Office international des épizooties
<b>ONCFS</b>	Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage
<b>PBS</b>	Phosphate buffererd saline ou Tampon phosphate salin
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction ou Amplification par la polymérase
<b>pi</b>	Post-infection
<b>POD</b>	Peroxydase
<b>REG</b>	Reticulum Endoplasmique Granuleux
<b>RGD</b>	Tripeptide arginine-glycine-aspartate
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction ou transcription inverse et amplification quantitative par la polymérase
<b>SC</b>	Sous-Cutané
<b>Gène L2</b>	Gène codant la protéine VP2
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>T</b>	Thymine
<b>TCID<sub>50</sub></b>	Tissue Culture Infective Dose 50, ou dilution induisant une infection de 50% des puits
<b>Tmax</b>	Température maximale, ou pic d'hyperthermie
<b>TMB</b>	Tetra-Méthyle-Benzidine
<b>U</b>	Uracile
<b>VP2</b>	Viral protein 2 ou Protéine virale 2
<b>°C</b>	Degré Celsius



# INTRODUCTION

La Fièvre Catarrhale ovine (FCO) ou maladie de la langue bleue est une arbovirose virale qui touche toutes les espèces de ruminants. Elle est due au virus bluetongue (BTV), un orbivirus de la famille des *Reoviridae*, transmis par la piqûre de moucheron appartenant au genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae). On compte 24 sérotypes du BTV répartis dans le monde entier, avec de faibles niveaux de protection croisée, d'où une prophylaxie très difficile à mettre en œuvre. Jusqu'en 2006, l'Europe était peu concernée par la maladie, seules quelques régions du pourtour méditerranéen étaient occasionnellement touchées. A partir d'août 2006, l'Europe a été envahie en quelques mois par les sérotypes 1 et 8, occasionnant d'importants dégâts dans les troupeaux et des pertes économiques énormes. Ainsi aux Pays-Bas ces pertes sont estimées à 30 millions d'euros en 2006 et 50 millions d'euros en 2007. Des campagnes de vaccination massives à travers tout le continent ont permis d'endiguer l'épizootie, sans parvenir toutefois à éradiquer le virus.

Plusieurs études se sont intéressées aux relations phylogénétiques entre les différentes souches du BTV, en comparant les séquences nucléotidiques de centaines d'isolats à travers le monde. Les chercheurs se sont rendus compte que le virus ne cesse d'évoluer par l'intermédiaire de mutations, réassortiments génétiques, recombinaisons. Ces mécanismes permettent au virus de s'adapter très rapidement à un nouvel environnement ou un nouvel hôte. Ces études phylogénétiques sont donc fondamentales pour étudier la dynamique du BTV, l'origine de sa diversité, facilitant ainsi la recherche pour tenter d'éradiquer la maladie.

Dans cette étude nous avons cherché à caractériser le BTV-1 qui est apparu en France en 2008. Pour cela nous avons isolé plusieurs souches dans le Sud-Ouest en 2008 provenant de ruminants d'espèces différentes. Nous avons alors procédé à l'analyse phylogénétique de la séquence codant VP2, la protéine à l'origine du sérotypage, en la comparant à celle d'autres souches provenant du monde entier dans le but d'établir son origine et son parcours. Enfin nous avons caractérisé le pouvoir pathogène de cette souche et sa réponse face à des animaux préalablement protégés par un vaccin inactivé utilisé sur le terrain pendant les campagnes de prophylaxie (Zulvac BTV-1, Fort Dodge).

Dans une première partie nous décrivons l'épizootie de FCO qui a frappé l'Europe en 2006 ainsi que les grandes caractéristiques de la maladie. La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale.



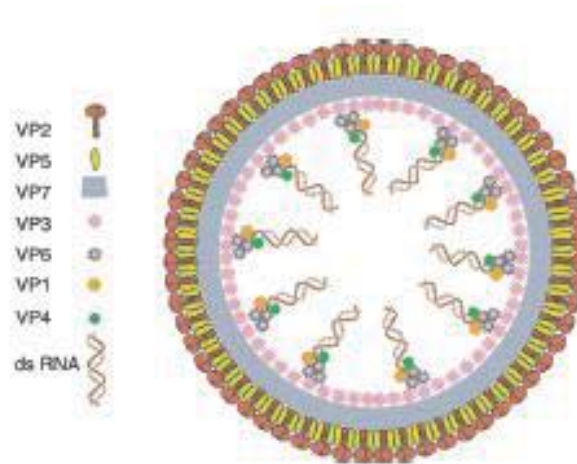
**PARTIE I :**  
**LA FIEVRE CATARRHALE**  
**OVINE ET SON APPARITION EN**  
**EUROPE DEPUIS 2006**



# I – Le virus bluetongue (BTV) et sa pathogénie

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 autres 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 physico-chimiques, 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 séroroupe BTV, 24 sérotypes ont été définis sur la base de tests de neutralisation croisée.

## A – Structure du virus (cf figure 1)



**Figure 1** : Schéma structural du BTV

(D'après [Schwartz-Cornil et al. 2008])

Le BTV est un virus non-enveloppé avec un génome contenant environ 19 200 paires de bases, composé de 10 segments linéaires d'ARN bicaténaires. Ces fragments sont empaquetés dans une coque protéique de forme icosaédrique, constituée de trois couches [Grimes et al. 1998].

## 1 – La capside externe

La capside externe est constituée de deux protéines, VP2 et VP5 :

- VP2 est codée par le gène L2 et formée de 956 acides aminés. On en retrouve 180 dans une particule virale. Seule, elle est responsable de l'entrée du virus dans les cellules des mammifères. Une fois dans la cellule, VP2 s'associe à la vimentine, cette interaction est nécessaire pour la sortie des particules virales [Bhattacharya et al. 2007]. Elle a également une grande affinité pour la glycophorine A, l'un des composants membranaires des érythrocytes, permettant la fixation des particules virales sur ces derniers [Hassan et al. 1999]. Enfin VP2 est le déterminant majeur du sérotype viral, et l'antigène à l'origine de la synthèse des anticorps neutralisants sérotype-spécifiques ainsi que de la réponse lymphocytaire T cytotoxique.
- VP5 est codée par le segment nucléotidique M5 et contient 526 acides aminés. Chaque particule virale en dénombre environ 360. Elle est impliquée dans la pénétration cellulaire par différents mécanismes : fixation cellulaire (dans une moindre mesure par rapport à VP2), et perméabilisation membranaire à l'origine du largage des particules virales du compartiment endosomal vers le cytoplasme [Hassan et al. 2001].

## 2 – La nucléocapside

Elle est formée de VP3 et VP7 (la plus externe) et responsable de l'intégrité du core viral.

- VP7 possède 349 acides aminés, et chaque particule virale en contient environ 780. Elle a une organisation en capsomères et joue donc un rôle important dans la structure et le maintien du core. De plus il existe en son sein un tripeptide nommé RGD (arginine-glycine-aspartate), qui permet l'attachement du virus aux cellules des Culicoïdes [Tan et al. 2001].
- VP3 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 core.

### 3 – Le core viral

A l'intérieur du core viral, on retrouve les 10 segments d'ARN ainsi que trois protéines mineures, très conservées entre les différents sérotypes et qui forment un complexe de réplication et de transcription. Ces trois enzymes sont rattachées à la couche de VP3 à chaque apex de l'icosaèdre, et interagissent entre elles et avec VP3 [Nason et al. 2004] :

- VP1 est une ARN-polymérase, codée par le segment nucléotidique L1, et composée de 1302 acides aminés. Elle est présente en faible quantité dans chaque particule virale (12 copies). Elle a une activité optimale entre 27 et 37°C, autorisant la réplication chez les vecteurs et les mammifères, et serait seule responsable de l'activité de réplication du BTV [Boyce et al. 2004].
- VP4 est une enzyme de coiffage des brins d'ARNm, permettant leur stabilisation et une traduction efficace [Sutton et al. 2007]. Elle est codée par le segment M4, constituée de 654 acides aminés et chaque virus en compte 24.
- VP6 est une hélicase qui catalyse le déroulement des brins d'ARN [Stauber et al. 1997], mais de récentes études suggèrent qu'elle est également active très tôt dans le processus de réplication, et jouerait un rôle dans l'assemblage du virus [Matsuo et al. 2009]. Elle est codée par S9, formée de 328 acides aminés, et on en dénombre 60 dans une seule particule virale.

### 4 – Les protéines non structurales

Le BTV contient trois protéines non structurales dont le rôle n'est pas encore totalement déterminé, mais qui semblent participer au contrôle de la réplication, de la maturation et de l'exportation virale :

- NS1 : codée par le segment M6 et constituée de 552 acides aminés, c'est la protéine la plus synthétisée au sein des cellules infectées. On peut ainsi observer dans le cytoplasme de ces dernières d'abondantes structures tubulaires, constituées de polymères de NS1. Son rôle n'est pas encore totalement élucidé.
- NS2 est codée par le segment nucléotidique S8 et constituée de 357 acides aminés. C'est l'un des composants majeurs des corps d'inclusion présents au sein des cellules infectées, véritables usines d'assemblage des virions. Une étude récente a même montré que NS2 était nécessaire et suffisante pour la formation de ces corps d'inclusion, et un acteur clé de la réplication et de l'assemblage des particules virales [Kar et al. 2007]. Elle est de plus soupçonnée d'être impliquée dans le recrutement de l'ARNm viral pour l'encapsidation [Butan et al. 2010].
- NS3 et NS3A sont codées par le segment S10 et constituées respectivement de 229 et 216 acides aminés. Ce sont les seules protéines de membrane synthétisées par les *Orbivirus* dans les cellules infectées. Elles seraient responsables du trafic intracellulaire et du relargage des virions [Celma et al. 2009], grâce à deux mécanismes : une activité viroporine permettant la création de pores hydrophiles dans la membrane cellulaire lipophile [Han et al. 2004] ; et la liaison à une protéine cellulaire (Tsg101), qui permet aux particules virales de quitter la cellule hôte par un système de bourgeonnement. On pense que le premier mécanisme est prédominant dans les cellules des mammifères, chez qui les effets cytopathiques sont majeurs. Au contraire la prédominance du second mécanisme expliquerait le peu d'effets cytolytiques retrouvés chez les insectes. D'ailleurs une étude a montré que NS3 et NS3a sont peu présentes chez les mammifères, contrairement aux moustiques chez qui elles sont surexprimées [Guirakhoo et al. 1995]. Cette surexpression orienterait le relargage des virions vers le mécanisme d'exocytose peu délétère pour les cellules.

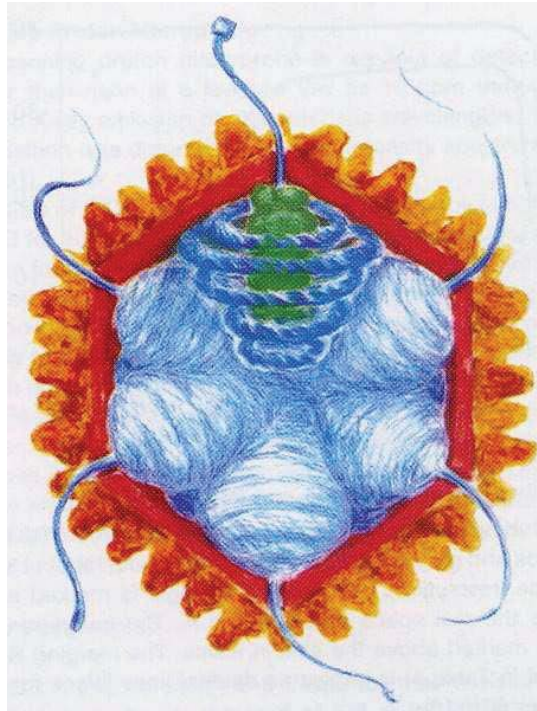
## **B – Le génome viral**

### 1 – Organisation du génome viral (cf figure 2)

Le génome viral est composé de 19219 paires de base, répartis en 10 segments d'ARN double-brin. Ceux-ci sont organisés en suite de coques concentriques régulières, liés avec les



VP3 de la couche interne de la capside interne au niveau des 5 axes de symétrie. Cela constitue, avec les protéines « mineures », les complexes transcriptionnels. L'ARN de la couche la plus externe s'écarterait en spirale autour des complexes transcriptionnels en effectuant deux tours avant d'être limité par l'ARN voisin et passerait alors à l'intérieur pour former la coque concentrique d'ARN suivante.



**Figure 2 :** Dessin représentant l'organisation de l'ARN dans le noyau du BTV. L'ARN (en bleu) s'enroule autour du complexe transcriptionnel (en vert) au niveau des 5 axes de symétrie (D'après [Gouet et al. 1999])

## 2 – Les mécanismes de la variabilité génétique du virus

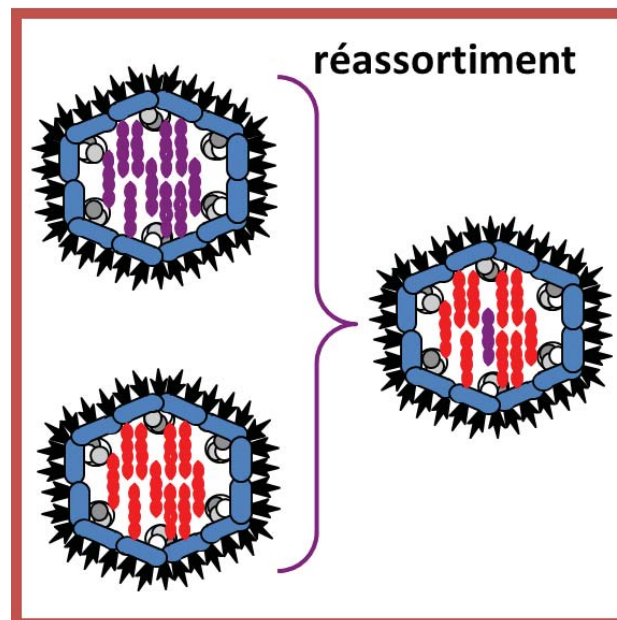
Les virus à ARN existent comme une population hétérogène et changeante de variants qui restent très apparentés, mais qui sont caractérisés par une ou plusieurs séquences génomiques dominantes : on parle de quasi-espèces. L'apparition constante de ces quasi-espèces confère aux virus à ARN une évolution rapide et une adaptabilité significative sur le terrain, permettant la sélection des variants les mieux préparés à chaque nouvel environnement et type d'hôte.

Le BTV est un parfait exemple de cette variabilité génétique, avec ses 24 sérotypes et des souches différentes au sein de chaque sérotype, en fonction des régions du monde. Deux

principaux mécanismes sont à l'origine de cette variabilité génétique : les réassortiments, et les mutations. Un troisième mécanisme, la recombinaison intragénique, semble jouer un rôle mais de nouvelles études sont nécessaires pour confirmer son importance.

a. Les réassortiments génétiques

Une propriété génétique fondamentale des Orbivirus, liée à la nature segmentée du génome, est la possibilité pour deux virus distincts infectant la même cellule d'échanger des segments d'ARN porteurs de gènes homologues. Ce phénomène, appelé réassortiment génétique, génère des virus réassortants dont le génome est une mosaïque des segments des deux virus parentaux (cf figure 3).



**Figure 3** : Représentation schématique d'un réassortiment génétique entre deux souches de BTV  
(D'après [Saegerman et al. 2009])

Par contre ce phénomène n'est pas à l'origine de la diversité des sérotypes : les segments ne sont pas modifiés mais simplement échangés, et conservent donc l'expression génétique parentale. Enfin le réassortiment génétique n'est possible qu'entre virus du même genre et génétiquement proches, excluant la possibilité de réassortiments entre le BTV et d'autres virus animaux.

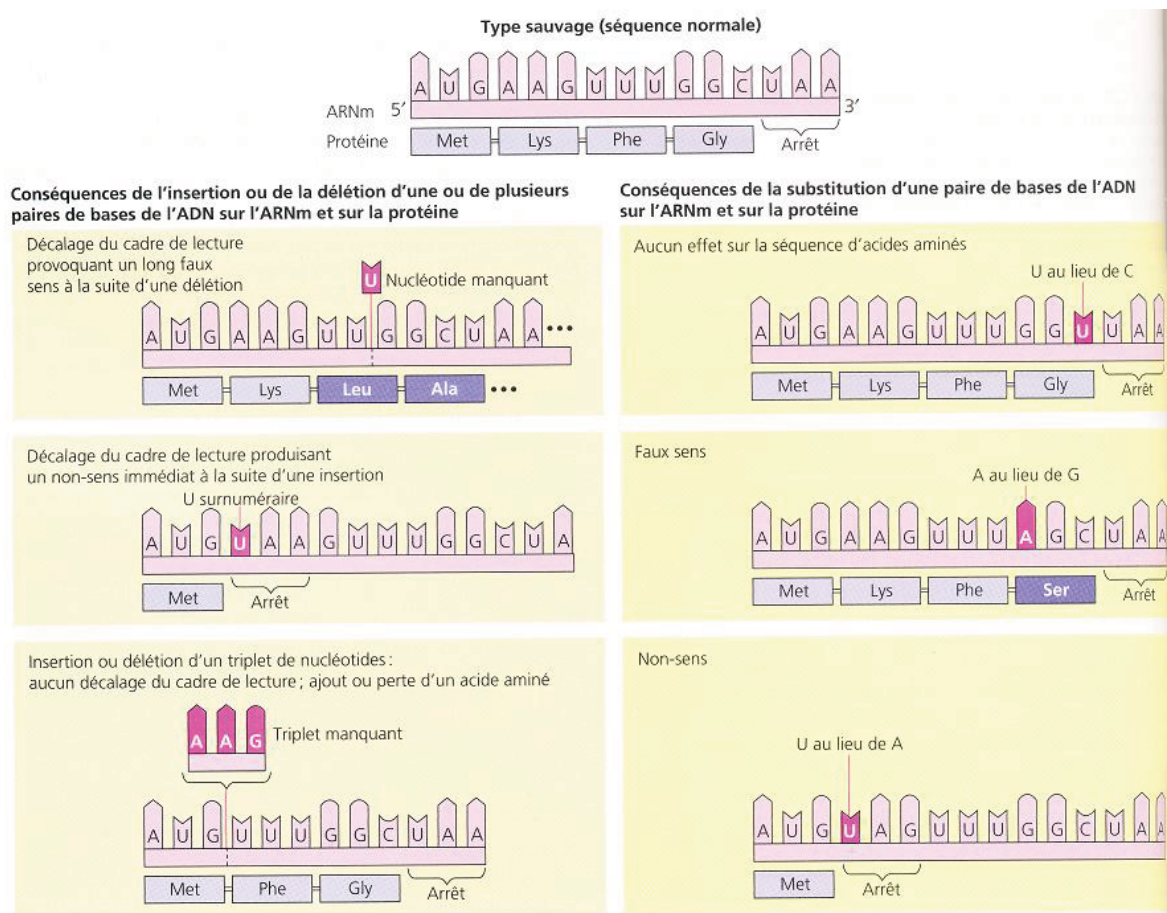
Ce réassortiment a été mis en évidence sur le terrain à plusieurs reprises dans le cas du BTV, on citera par exemple le cas de la souche ITL2002 de BTV-16, isolée comme son nom l'indique en Italie en 2002 : son séquençage et la comparaison avec d'autres souches isolées précédemment dans la région ont permis de montrer qu'elle était issue du réassortiment entre une souche de BTV-16 et de BTV-2 [Batten et al. 2008].

#### b. Les mutations génétiques

La réplication du BTV est caractérisée par des taux de mutations élevés :  $10^{-5}$  à  $10^{-3}$  erreurs par nucléotide copié [Bonneau et al. 2001], ce qui pour un génome de 10kb représente entre 0.1 et 10 mutations par virion descendant [Domingo et al. 1997]. Le génome du BTV, avec ses 19kb, en contiendrait donc à chaque cycle le double. Ceci s'explique par le fait qu'il y a production de beaucoup de virions en peu de temps, et que l'ARN polymérase est non seulement très imprécise, mais aussi dépourvue de fonction de relecture efficace. Plusieurs types de mutations dites spontanées sont alors susceptibles d'apparaître (cf figure 4):

- La substitution : c'est l'échange d'une base par une autre. Si l'échange reste entre purines ou entre pyrimidines on parle de transition ( $A \leftrightarrow G$ ,  $C \leftrightarrow T/U$ ), par contre si c'est entre une purine et une pyrimidine on parle de transversion ( $A \leftrightarrow C$ ,  $C \leftrightarrow G$ ,  $G \leftrightarrow T/U$  or  $T/U \leftrightarrow A$ ). Certaines substitutions sont dites silencieuses, car la redondance du code génétique fait en sorte qu'elles n'ont aucun effet sur la protéine synthétisée. D'autres changements touchant un seul nucléotide peuvent aboutir au remplacement d'un acide aminé par un autre sans avoir d'effets notables sur la protéine synthétisée : soit le nouvel acide aminé a des propriétés semblables à celles de l'ancien, soit la séquence exacte des acides aminés d'une certaine région de la protéine n'est pas essentielle aux fonctions de celle-ci. Par contre il arrive que l'altération d'un seul acide aminé dans une région essentielle de la protéine ait des répercussions importantes sur l'activité de cette dernière, soit en bien, soit en mal. Enfin il se peut que ces altérations transforment un codon d'acide aminé en signal d'arrêt prématuré : on parle de mutation non-sens, et cela conduit presque toujours à la synthèse de protéines non-fonctionnelles.
- L'insertion est une mutation par addition d'une ou plusieurs bases surnuméraires au sein de la séquence.
- La délétion est une mutation par perte d'une ou plusieurs bases de la séquence.

L'insertion et la délétion ont généralement des conséquences beaucoup plus importantes que la substitution puisqu'il y a un décalage du cadre de lecture chaque fois que le nombre de nucléotides insérés ou enlevés n'est pas un multiple de trois : on a alors une séquence de codons totalement différente, avec une séquence de terminaison le plus souvent prématurée, et une protéine non-fonctionnelle.

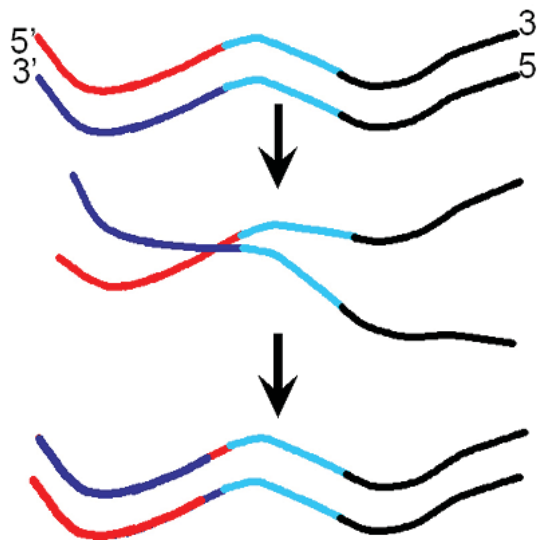


**Figure 4 :** Les catégories de mutations ponctuelles et leurs conséquences

(D'après Campbell, N. A., et Reece, J. B., *Biologie*, © 2004, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., fig. 17.24, p. 348. Reproduction autorisée par l'éditeur)

### c. La recombinaison intragénique

C'est un processus par lequel deux régions d'ADN portant des séquences nucléotidiques similaires (« homologues ») se les échangent, par un jeu moléculaire de « coupures-soudures » (cf figure 5).



**Figure 5** : La recombinaison intragénique entre deux segments de nucléotides

(D'après [Makadiya 2007])

Cheng-Qiang He et coll. [He et al. 2010] ont montré que des recombinaisons intragéniques se sont produites au sein de souches de BTV présentes sur le terrain, et que ces virus mosaïques sont parfois devenus prédominants. Les insectes semblent d'ailleurs plus permissifs vis-à-vis de ces mécanismes que les mammifères. Mais la prévalence des recombinaisons homologues semble néanmoins assez faible en ce qui concerne le BTV, de nouveaux travaux restent nécessaires pour établir leur importance dans la diversité génétique du BTV [79].

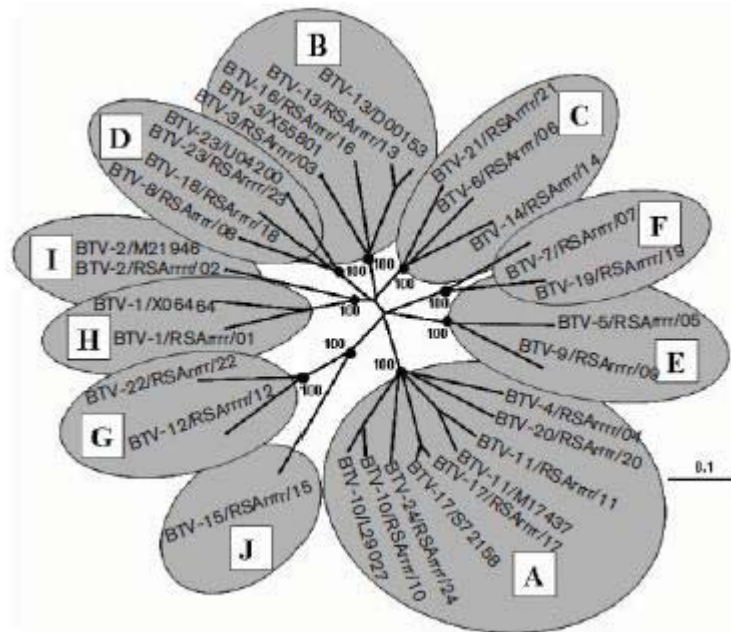
### 3 – Variabilité génétique du gène L2 des 24 sérotypes du BTV

VP2 est la protéine la plus variable du génome, et contient la majorité des épitopes qui interagissent avec les anticorps neutralisants, ce qui en fait le déterminant majeur du sérotype viral. Les études phylogénétiques du BTV reposent toutes sur des analyses comparatives du gène L2. Dans quelques publications les gènes codant NS3 et VP1 sont aussi étudiés. Une étude établissant une comparaison phylogénétique entre les 24 souches de références mais aussi entre 200 isolats provenant du monde entier a montré une corrélation parfaite entre la variation du gène L2 et le sérotype [Maan et al. 2007]. De plus les auteurs ont démontré l'existence de 10 lignées évolutives différentes, identifiées en nucléotides A à J (cf figure 6).



A l'intérieur de chacun des nucléotypes, les séquences du gène L2 présentent moins de 35% de différences, et les cadres ouverts de lecture ainsi que les régions non codantes sont uniformes en longueur.

Ainsi le BTV-1 appartient au groupe H tandis que le BTV-8 appartient au groupe D.



**Figure 6 :** Arbre phylogénétique montrant les liens de parenté entre les séquences nucléotidiques des gènes L2 des 24 sérotypes du BTV (D'après [Maan et al. 2007])

#### 4 - L'Europe, point de convergence des deux topotypes géographiques majeurs

L'épizootie européenne actuelle est en passe de bouleverser l'équilibre évolutif qui s'était créé jusqu'à présent. En effet, en séquençant le gène L2 des différentes souches isolées sur le terrain aux quatre coins du monde, les chercheurs ont pu identifier des sous-groupes, liés principalement par leur origine géographique : on parle de topotypes. Or deux topotypes géographiques majeurs sont à l'origine de l'incursion européenne de la FCO :

- un groupe de l'Est, avec des souches de BTV-1, 9 et 16 venant d'Inde, de Malaisie et d'Australie
- un groupe de l'Ouest, avec des souches de BTV-1, 2, 4, 8 venant d'Afrique et d'Amérique [Saegerman et al. 2008].

A ces deux groupes s'est ajouté le "relargage" de souches vaccinales atténuées sur le terrain, comme en Italie en 2002, avec la détection d'une souche vaccinale de BTV-2 chez des animaux non vaccinés [Ferrari et al. 2005]. Au final l'Europe, avec l'arrivée des topotypes de l'Ouest, de l'Est, et de souches vaccinales « incontrôlées », est en train d'offrir des possibilités de mutation et de réassortiment sans précédent pour le BTV.

## **C – Cycle de multiplication** (cf figure 7)

Le BTV va se lier aux cellules de l'hôte via l'interaction entre les trimères de VP2 et les glycoprotéines à la surface des cellule-cibles. Il est alors endocyté, via un processus clathrine-dépendant [Forzan et al. 2007]. VP2 se dissocie ensuite de la capsid externe, puis l'acidification de l'endosome induit la fusion de VP5 avec sa membrane, permettant le largage du core de la particule virale dans le cytoplasme.

Le lieu de la réplication est commun à tous les Orbivirus, à savoir le cytoplasme. A l'intérieur du noyau va se dérouler une transcription des molécules d'ARN, grâce à l'ARN polymérase (VP1). Les ARNm ainsi formés vont être « coiffés » par VP4 puis migrer dans le cytoplasme. Ils vont ensuite être traduits pour la synthèse de protéines virales.

En parallèle, une partie des ARNm synthétisés grâce à VP1 va aller directement dans les corps d'inclusion viraux. Là l'assemblage des virions va se dérouler grâce aux différentes enzymes virales : VP6, NS2, VP1 et VP4. Pour obtenir une particule virale complète, VP1 va induire la réplication des 10 segments d'ARN, afin d'obtenir un génome à ARN double-brin. Enfin l'interaction entre VP2 et la vimentine permet le transport des particules vers la périphérie de la cellule infectée [Bhattacharya et al. 2007]. La sortie des virions se fait grâce à NS3 qui provoque, suivant son degré d'expression, soit un bourgeonnement viral soit la création de pores membranaires souvent fatals pour la cellule.

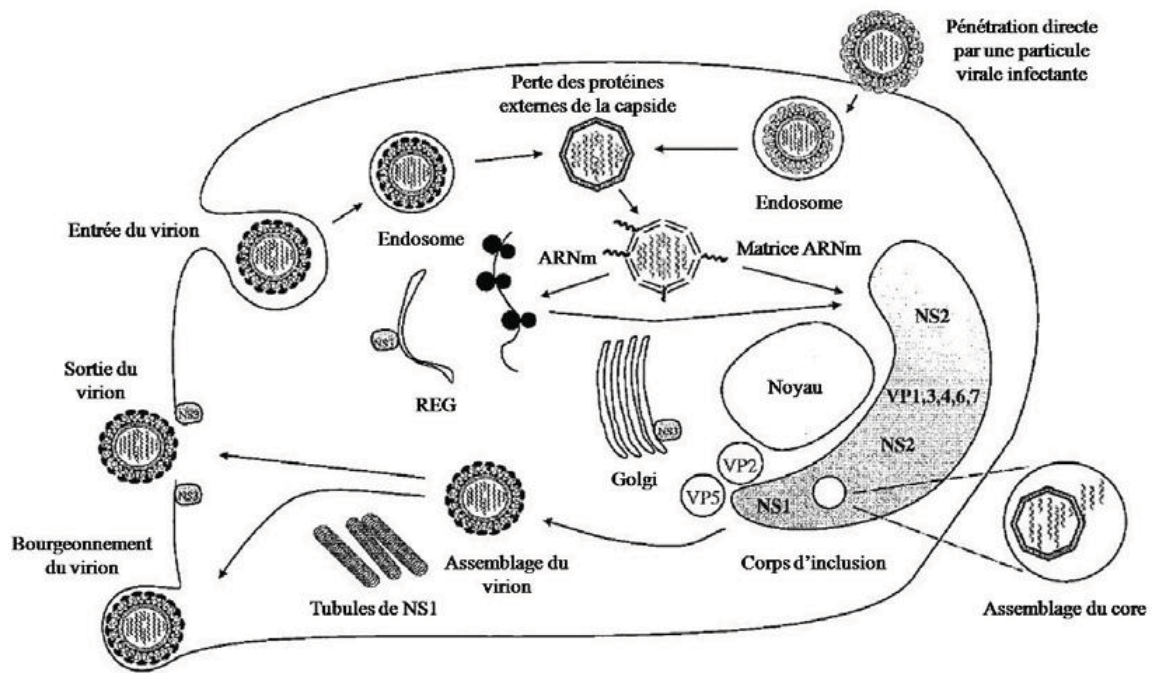


Figure 7 : Cycle de réplication du BTV

(D'après [Roy 1996])

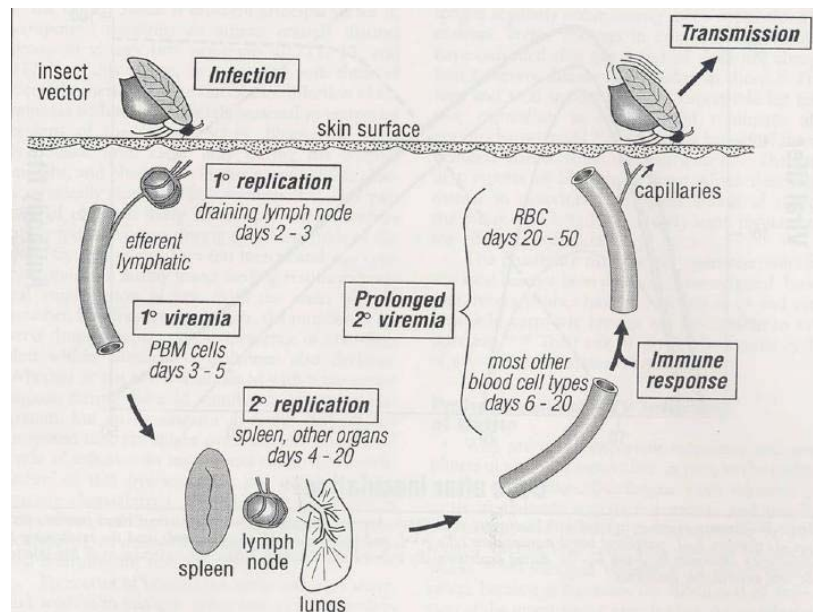
## D – Dissémination, tropisme cellulaire et réservoir (Cf figure 8)

Une femelle culicoïde injecte le BTV lors d'un repas sanguin. Celui-ci va alors se répliquer dans les nœuds lymphatiques de drainage des sites d'inoculation, et ce pendant les 2-3 premiers jours. Puis il va essaimer vers des sites secondaires, principalement les poumons et la rate, où il va se répliquer dans les cellules endothéliales et les phagocytes mononucléés [Barratt-Boyes et al. 1994]. Le virus peut circuler par voie sanguine et lymphatique. Il semble que les cellules de la lignée lymphocytaire  $\gamma\delta$  T soient aussi impliquées dans la circulation du virus, une étude ayant montré que des cellules  $\gamma\delta$  T provenant de moutons infectés, et cultivées avec des fibroblastes cutanés, pouvaient induire une lyse cellulaire [Takamatsu et al. 2003].

Enfin le BTV peut se loger dans les plaquettes et les replis membranaires des érythrocytes, à l'abri de l'action des anticorps neutralisants. Cette propriété expliquerait la persistance de la virémie : il peut ensuite être détecté dans le sang par isolement viral jusqu'à 63 jours chez les bovins, pour seulement 45 jours chez les ovins, ce qui suggère le rôle de réservoir important des bovins dans la circulation du BTV. De récentes études ont même



montré que de l'ARN viral peut être retrouvé jusqu'à 222 jours post-infection [Katz et al. 1994] chez les bovins.



**Figure 8 :** Schéma pathogénique du BTV chez les ruminants  
(D'après [Barratt-Boyes et al. 1995])

## E – Réaction inflammatoire et réponse cellulaire

Les signes cliniques et lésionnels ne sont pas seulement dus aux effets cytopathiques provoqués par la répllication du BTV (création de pores membranaires), mais aussi à un processus inflammatoire intense et parfois complètement dérégulé [Schwartz-Cornil et al. 2008].

On sait que les protéines de la capsid externe du virus, à savoir VP2 et VP5, suffisent à induire la mort de lignées cellulaires par apoptose [Mortola et al. 2004]. Cela concerne notamment les cellules endothéliales, monocytes, plaquettes et lymphocytes  $\gamma\delta$  T. Ce mécanisme explique en partie les signes cliniques constatés sur les animaux infectés : thromboses, infarcti, ulcères et hémorragies. Or l'infection des cellules endothéliales est transitoire, et n'est significative que pendant une dizaine de jours [Mahrt et al. 1986] [Darpel et al. 2009], alors que certains animaux meurent plus de deux semaines après l'infection. Le virus seul ne peut être à l'origine de tous les symptômes rencontrés et de leur persistance : aussi de récentes études suggèrent que des médiateurs vasoactifs, produits par les plaquettes, les monocytes, les cellules dendritiques et endothéliales infectées, contribuent au

dysfonctionnement des cellules endothéliales et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, à l'origine des œdèmes sous-cutanés et pulmonaires caractéristiques de la FCO [DeMaula et al. mai 2002 et juillet 2002]. Ces médiateurs sont entre autres l'Interleukine 1 (IL-1), IL-6, IL-8, cyclo-oxygénase-2, la nitric oxyde synthase, les prostacyclines et le thromboxane. Les cinq premiers marqueurs cités ont d'ailleurs été impliqués dans la pathogénie d'autres fièvres hémorragiques virales dont les symptômes sont très proches de ceux de la FCO.

La prostacycline a des propriétés vasodilatatrices et anti-coagulantes, tandis que le thromboxane est un puissant facteur pro-coagulant. Le rapport thromboxane/prostacycline semble très intéressant pour comprendre la différence de sensibilité entre ovins et bovins : en effet chez les bovins le ratio thromboxane/prostacycline est plus faible, ce qui expliquerait en partie leur plus faible sensibilité aux lésions thrombotiques et microvasculaires [DeMaula et al. mai 2002].

Plus généralement, on pense que le dysfonctionnement des endothéliums vasculaires joue un rôle central dans l'expression de la maladie, et qu'il est plus marqué chez les ovins, avec plus de cytolysse et moins d'activation de médiateurs de l'inflammation [Maclachlan et al. 2009].

Un autre mécanisme de défense non spécifique est la production d'interféron. Cette substance présente chez les animaux infectés par le virus se fixe sur les cellules adjacentes et leur confère la propriété d'éviter l'infection virale. L'interféron limiterait donc la dissémination du virus dans l'organisme mais n'influencerait pas la durée de persistance de celui-ci [Maclachlan 1994].

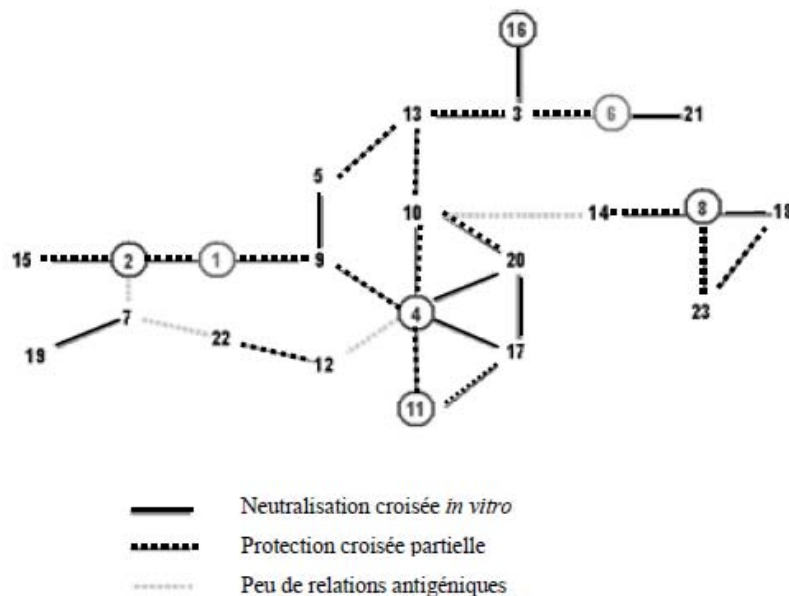
Enfin les cellules NK sont capables de façon non spécifique de détruire les cellules infectées. Elles empêchent donc la réplication virale. Les cellules phagocytaires sont attirées vers le site d'infection par un chimiotactisme déclenché par la réaction inflammatoire. Elles ont une capacité de phagocytose et d'opsonisation (phagocytose facilitée par la présence d'anticorps et de facteurs du complément sur l'antigène à éliminer) qui permettent d'éliminer les cellules infectées.

## F – La réponse immunitaire

### 1 – La réponse immunitaire à médiation humorale

Le virus de la FCO entraîne une réponse humorale neutralisante rapide envers les protéines virales de la capsid, en particulier VP2 (spécifique du sérotype) et VP5 [Schwartz-Cornil et al. 2008].

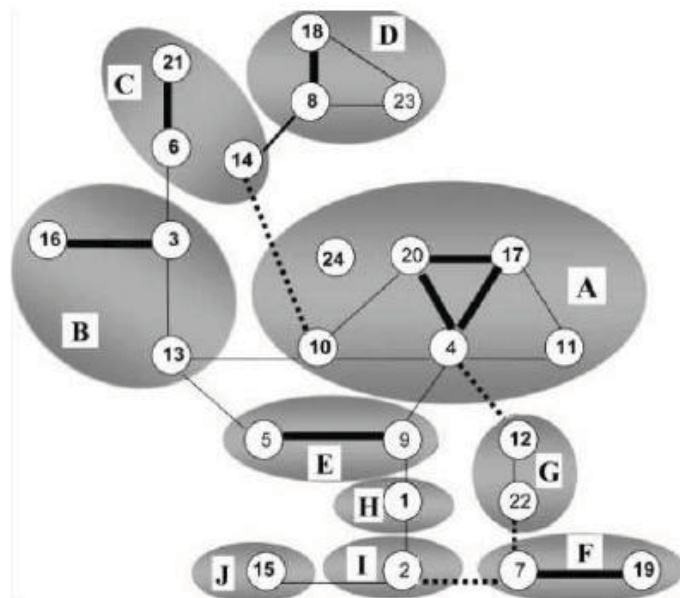
Les anticorps neutralisants sont détectables au bout de deux semaines environ, persistent à des taux élevés pendant 3 mois, et resteraient protecteurs pendant au moins une année. Même si la durée d'immunité post-infectieuse est longue, elle n'est pas encore précisée pour les sérotypes 1 et 8 en France, mais est probablement supérieure à celle induite par voie vaccinale. La réponse dirigée contre la protéine VP2 a une action neutralisante sur le virus. Il s'agit d'une protection homologe (spécifique du sérotype), elle est majoritaire. Il faut noter que même si la protéine VP2 est la principale cible de la neutralisation par les anticorps, il semble exister une protection croisée, même si elle n'est que partielle. Une population infectée par un des sérotypes de la FCO et naïve pour un autre peut ainsi être partiellement protégée contre le second virus. Ainsi un schéma résumant les réactions de neutralisations croisées *in vitro* entre les différents sérotypes de la FCO a été établi [Erasmus 1990] (cf figure 9).



**Figure 9** : Réactions de neutralisation croisées entre les différents sérotypes de la FCO

(D'après [Erasmus 1990])

Ce schéma est à mettre en relation avec les résultats d'une récente étude qui s'est intéressée aux relations phylogénétiques entre les gènes L2 des 24 sérotypes [Maan et al. 2007] (cf figure 10).



**Figure 10 :** Les différents nucléotypes du BTV regroupés par proximité antigénique (D'après [Maan et al. 2007])

En effet on constate une forte corrélation entre les séquences nucléotidiques et les phénomènes de protection croisée : plus deux gènes sont proches, plus la protection croisée sera importante entre les deux sérotypes.

VP2 n'est pas pour autant la seule et unique cible de l'immunité humorale : des anticorps non neutralisants sont aussi synthétisés contre diverses protéines virales. Par exemple, la séroconversion vis-à-vis de VP7 a lieu en même temps que l'apparition des signes cliniques (6 à 7 jours après inoculation). Cette réponse immunitaire sert notamment de marqueur support aux tests de dépistage de la FCO par méthode ELISA.

## 2 – La réponse immunitaire à médiation cellulaire

L'immunité cellulaire apparaît lors de l'infection par le virus sauvage ou lors d'une vaccination à l'aide d'une souche atténuée. Il est probable que lors de l'utilisation de vaccins inactivés, cette réponse soit moins importante ; ce phénomène est pour l'instant peu étudié. La réponse cellulaire à l'infection virale joue un rôle dès les stades précoces de l'infection. En effet, dès le 6<sup>ième</sup> jour post-infection, on note une présence importante de lymphocytes TCD8<sup>+</sup> dans les nœuds lymphatiques drainant la région d'inoculation [Maclachlan 1994]. Cette concentration élevée est retrouvée à 14 jours dans le sang de l'animal. Ces cellules spécifiques ont un rôle cytolytique important et peuvent lyser les cellules infectées par le virus et, par ce biais, limiter sa réplication. Contrairement à la réponse humorale, il a été démontré que la réponse cellulaire par les lymphocytes T cytotoxiques pouvait être partiellement efficace contre plusieurs sérotypes [Andrew et al. 1995] [Schwartz-Cornil et al. 2007], mais leur rôle exact dans la protection croisée est encore mal connu.

Une étude anglaise a permis de démontrer *in vitro* que les cibles majoritaires des lymphocytes T cytotoxiques étaient les protéines non structurales (NS1 à 3) puis, dans une moindre mesure, et dans un ordre décroissant : les protéines mineures de la capsid interne (VP1,3 et 6), puis les protéines VP2 et VP5 de la capsid externe, et enfin VP7 de la capsid interne. Les LTCD8<sup>+</sup> semblent être les acteurs majeurs de l'action cytotoxique, puisque leur neutralisation expérimentale diminue la capacité lytique de l'hôte de 81 à 87%, ce qui n'est pas le cas avec les TCD4<sup>+</sup> par exemple [Jones et al. 1996].

En résumé la réponse immunitaire adaptative dirigée contre le BTV est le résultat de l'interaction entre des cellules présentatrices d'antigènes, des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes B producteurs d'anticorps. Une troisième catégorie de lymphocytes va jouer le rôle de médiateur de cette réponse immunitaire : les lymphocytes TCD4 auxiliaires. Ils n'ont aucune capacité cytotoxique directe ni d'activité phagocytaire, mais ils interagissent, par le biais de cytokines, avec les autres catégories de lymphocytes pour initier et amplifier leur action. D'où leur nom d'auxiliaires. Ils sont essentiellement dirigés contre les protéines VP2, VP5 et VP7.

### 3 – L'immunité chez le jeune vis-à-vis du BTV

L'épizootie de 2006 a permis de mettre en évidence la capacité du BTV de traverser la barrière placentaire pour infecter le fœtus dans environ 10% des cas [De Clercq et al. 2008]. La particularité du placenta des ruminants est qu'il ne permet pas le passage d'immunoglobulines de la mère vers le fœtus. Celui-ci acquiert donc seul une certaine maturité immunitaire lors de la première moitié de la gestation : vers 95 jours pour l'agneau, 140 jours pour le veau, si bien que les ruminants naissent immunocompétents. Les conséquences d'une infection du fœtus par le BTV dépendent donc largement du stade de gestation. Ainsi une infection avant la maturité immunitaire du fœtus permet une réplication virale sans résistance et provoque des lésions importantes [Osburn et al. 1994], alors qu'une infection tardive entraînera une virémie sans conséquences graves.

En revanche une infection à un stade intermédiaire est plus aléatoire, et source de polémiques au sein de la communauté scientifique : en effet quelques études dont une récente semblent suggérer l'existence de veaux naissant immunotolérants. Ainsi De Clercq et al. (2008) ont mis en évidence la naissance de trois veaux en bonne santé viropositifs mais séronégatifs, à la manière des veaux IPI infectés par le BVDV. La prévalence de tels animaux était de 2,4% dans cette étude, pourcentage comparable aux 0,8-2% d'immunotolérants au BVDV. On peut alors légitimement se demander si de tels animaux apparemment en bonne santé ne peuvent pas constituer une source de persistance de l'infection au sein des troupeaux.

Cependant, contrairement aux infectés immunotolérants du BVDV, les trois individus en question présentaient des titres viraux assez faibles, peut-être insuffisants pour demeurer infectieux, d'ailleurs l'ingestion de colostrum a permis d'éliminer le virus chez deux d'entre eux, les données manquant pour le troisième. Cela traduirait plutôt une infection chez le fœtus immunocompétent à un stade avancé de gestation.

Il est néanmoins nécessaire d'approfondir les investigations concernant ces animaux immunotolérants afin d'avoir une idée du risque qu'ils représentent au sein des élevages. A noter que les études citées concernent uniquement le BTV-8, aucune étude à l'heure actuelle n'a pu confirmer ces phénomènes avec le BTV-1.

## **II – La maladie et les moyens de lutte**

### **A – Les signes cliniques**

La phase d'incubation dure de 2 à 18 jours [Bozzetti 2007] puis, suivant la souche virale, l'espèce et la sensibilité individuelle, on peut assister à différentes formes de la maladie.

#### **1 – La forme aiguë**

##### **a. Les symptômes généraux chez l'adulte**

On distingue trois phases successives qui peuvent parfois se chevaucher :

- Une phase fébrile avec hyperthermie et altération de l'état général qui apparaît généralement après 6 à 8 jours d'incubation : la température varie entre 40 et 42°C.
  
- Une phase d'état, 24 à 48h après (cf tableau 1 et photographie 1) : on constate une inflammation des muqueuses buccales, nasales et oculaires : c'est la phase catarrhale proprement dite.

Les ovins présentent une conjonctivite avec larmoiement associé, du jetage séreux voire hémorragique, avec formation de croûtes autour des narines, dus à une rhinite ; une stomatite avec érosions, ulcères et hypersalivation ; un œdème généralisé de la face et, pour les plus sévèrement touchés un œdème pulmonaire entraînant une détresse respiratoire et des signes de cyanose, donnant à la langue un aspect bleuté caractéristique : c'est de là que provient le nom anglophone de la maladie : bluetongue. Après une semaine on peut également observer une émaciation sévère, des boiteries consécutives à une atteinte podale (coronite, pododermatite), des raideurs, des douleurs et des torticolis suite à une atteinte musculaire (myosite). Lors d'infection de troupeaux laitiers les éleveurs ont pu constater une forte chute de la production laitière (en moyenne de 10 à 15%, jusqu'à 40% chez certains animaux [Afssa 2010]), qui peut durer plusieurs semaines.

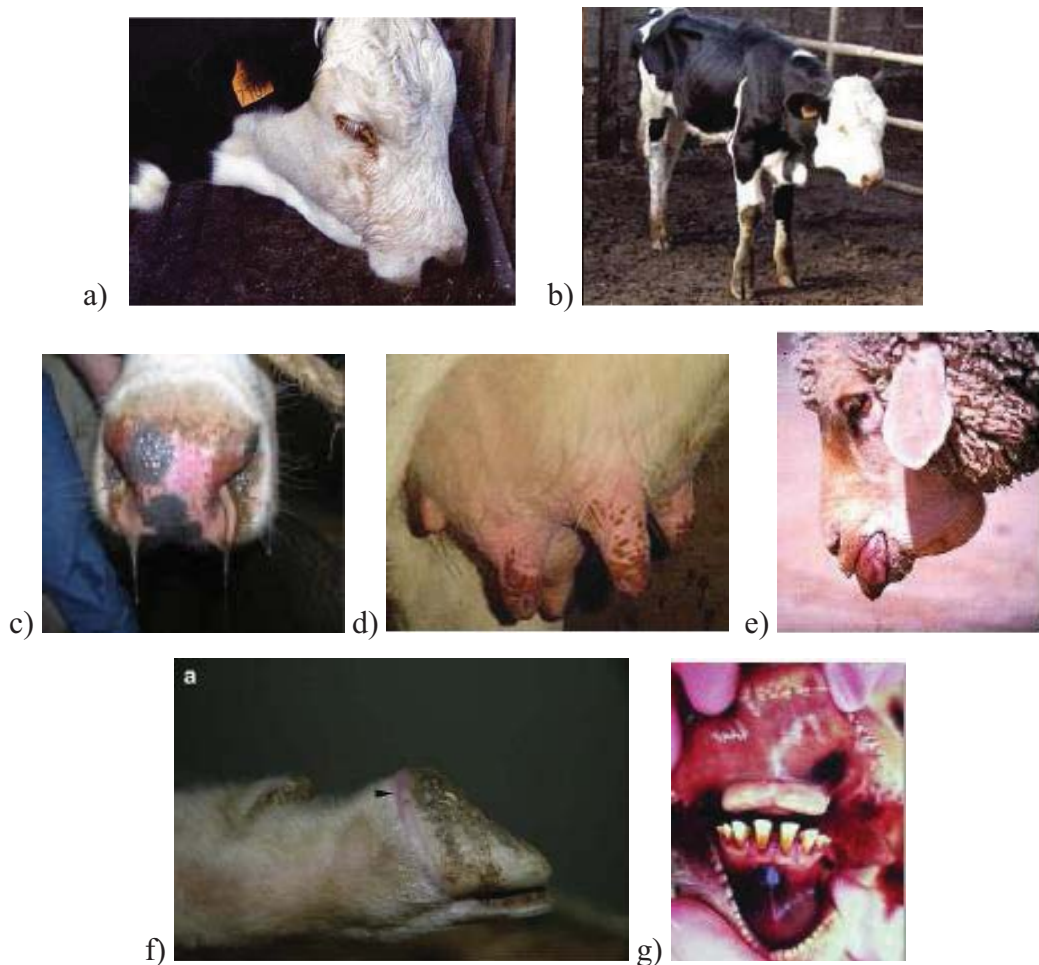
Les bovins peuvent présenter les mêmes signes cliniques que les ovins mais généralement de moindre intensité. Ils présentent en outre des ulcérations au niveau des trayons.

Signes cliniques	Ovins (n=375) (IC 95 %)	Bovins (n=1 297) (IC 95 %)
Amaigrissement	27,7 (23,1-32,3)	24,0 (21,6-26,4)
Abattement	25,8 (21,3-30,4)	25,9 (23,5-28,4)
Hyperthermie	25,3 (20,8-29,8)	23,1 (20,7-25,4)
Congestion bouche	20,5 (16,3-24,7)	7,8 (6,3-9,3)
Jetage	20,0 (15,8-24,1)	19,8 (17,6-22,0)
Œdème de la face	20,0 (15,8-24,1)	6,7 (5,3-8,1)
Ptyalisme	17,6 (13,6-21,5)	16,9 (14,8-18,9)
Lésions podales	17,0 (13,1-20,9)	19,7 (16,5-20,9)
Lésions oculaires	15,7 (11,9-19,5)	18,1 (15,9-20,2)
Raideur	12,5 (9,1-15,9)	16,3 (14,3-18,4)
Irritation mufle	9,8 (6,8-12,9)	22,1 (19,8-24,4)
Signes pulmonaires	7,4 (4,7-10,2)	9,4 (7,7-11,0)
Lésions buccales	6,4 (3,8-8,9)	9,4 (7,7-11,0)
Cyanose de la langue	1,6 (0,3-2,9)	1,5 (0,8-2,1)

**Tableau 1** : Fréquence des signes cliniques exprimés par les ovins et bovins atteints d'août à décembre 2007 dans le département des Ardennes

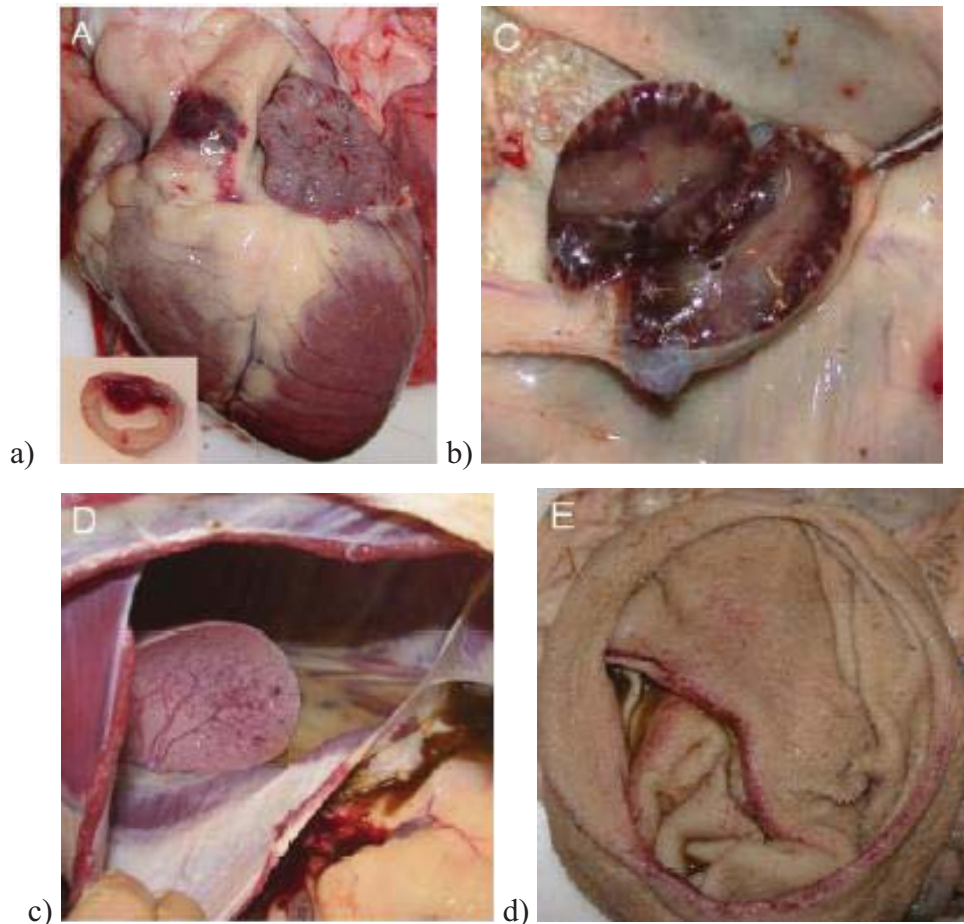
(D'après [Afssa 2010])





**Photographie 1 :** Photographies des manifestations cliniques de la FCO: a) œdème de l'auge et larmoiement, b) émaciation (Source : [Bosquet 2007]) ; c) congestion et érosion du mufle avec jetage purulent (Source : [Van Aert et al. 2008]), d) ulcérations de trayons (Source : [Derksen et al. 2007]), e) congestion, protrusion et cyanose de la langue, f) hémorragies buccales en nappe (Source : [Baudoux et al. 2003])

➤ Phase terminale : mort en 8 à 10 jours ou convalescence de plusieurs semaines. A l'autopsie (cf Photographie 2) on peut retrouver, outre les lésions visibles décrites précédemment, des ulcérations des muqueuses du tractus gastro-intestinal supérieur (œsophage, pré-estomacs ; des nœuds lymphatiques œdémateux et hémorragiques ; des hémorragies et pétéchies dans le tissu sous-cutané, à la base de l'artère pulmonaire (hémorragie sous-intimale, pathognomonique de la maladie) ; un œdème pulmonaire et des effusions péricardiques et pleurales ; de l'œdème au niveau des fascias des muscles de la paroi abdominale et de la nuque, en particulier autour du ligament nuchal ; une nécrose du squelette et du muscle cardiaque (le muscle papillaire du ventricule gauche est très caractéristique).



**Photographie 2 :** Photographies des lésions fréquemment observées à l'autopsie : a) hémorragie sous-intimale à la base de l'artère pulmonaire et en miniature coupe transversale de l'artère pulmonaire au niveau de la lésion, b) nœud lymphatique mésentérique hypertrophique et hémorragique, c) épanchement thoracique, d) ulcérations au niveau du rumen

### b. Les troubles de la reproduction

La FCO peut entraîner de graves troubles de la reproduction en provoquant des lésions au niveau du fœtus, de l'appareil reproducteur de la femelle et du mâle (cf tableau 2).

Ovins	Bovins
• Avortements	• Avortements
• Agnelages prématurés	• Vêlages prématurés
• Mauvaise préparation à l'agnelage	• Mauvaise préparation au vêlage
• Mort-nés	• Mort-nés
• Malformations du nouveau-né	• Malformations du nouveau-né
• Étalement des mises-bas	• Avortons avec malformations
• Infertilité transitoire des mâles (3 à 4 mois)	• Anœstrus
	• Infertilité des mâles

**Tableau 2 :** Troubles de la reproduction causés par la FCO chez les ovins à viande et les bovins  
(D'après [Afssa 2010])

- Le BTV peut traverser la barrière placentaire et avoir des conséquences diverses sur la gestation et le fœtus : lésions tératogènes (hydranencéphalie, cf Photographie 3) et méningoencéphalite, avec troubles du comportement associés comme ataxie, tremblements...), avortements, retards de croissance, infection post-natale persistante, ou aucune anomalie évidente.



**Photographie 3 :** Photographie d'hydranencéphalie de veau nouveau-né  
(D'après [Wouda et al. 2008])

En fait, tout dépend du moment de l'infection : la période critique pour ces lésions tératogènes semble se situer entre 70 et 130 jours, les plus sévères apparaissant entre 70 et 85 jours [Maclachlan et al. 2000].

Les animaux infectés dans la deuxième moitié de gestation ne développeront pas de malformations, ils peuvent naître virémiques asymptomatiques ou avec des déficits mineurs, mais ils parviennent généralement à se débarrasser du virus grâce à la prise

de colostrum et à leur propre immunité, en l'espace de 2-3 mois [Maclachlan et al. avril 2008].

Le tableau 3 résume les effets prouvés d'une infection sur le fœtus en fonction du stade de gestation.

Stade de gestation	Lésions macroscopiques	Conséquences cliniques	Statut immunitaire
Avant 70 jours		Mortalité embryonnaire ou fœtale	
Entre 70 et 85 jours	Malformation du SNC (Hydranencéphalie)	Avortement ou naissance avec graves troubles du comportement et de la locomotion entraînant un décès rapide ou l'euthanasie	Virologie : - (ou+) Sérologie -
Entre 85 et 130 jours	Nécrose cérébrale massive, malformations du système nerveux central (hydranencéphalie ou encéphalopathie cavitaire, destruction du cervelet et du tronc cérébral)	Avortement ou naissance avec troubles du comportement et de la locomotion variables	Virologie : - (ou +) Sérologie -
Après 130 jours	Destruction sélective des cellules gliales entraînant kystes cérébraux, dilatation des ventricules latéraux	Naissance d'un veau asymptomatique ou avec des déficits mineurs	Virologie : + (ou -) Sérologie - (si avant 175 jours) Sérologie + (si après 175 jours)
Près du terme	Encéphalite modérée, absence de malformations	Naissance d'un veau normal	Virologie positive

**Tableau 3 :** Effets de l'infection in-utero du fœtus bovin par le virus de la FCO en fonction du stade de gestation  
(D'après [Germanique 2010])

- Chez la mère on peut constater un allongement de l'intervalle vêlage-fécondation, un taux de réussite en première IA détérioré, et un accroissement de l'âge au premier vêlage. En effet l'augmentation de la température interne influe sur les taux d'hormones circulantes, la qualité des gamètes et le développement précoce de l'embryon. Les effets attendus sont très proches de ceux entraînés par un stress thermique. Les autres phénomènes dus à la pathogénie du virus permettant d'expliquer une baisse de la fertilité des femelles sont encore mal connus.
- Chez le mâle, on a constaté des baisses de performance de reproduction majeures pour le bélier [Kirschvink et al. 2007], avec des infertilités transitoires allant jusqu'à 3-4

mois. Chez les taureaux en période de monte, on a noté une infertilité transitoire d'une durée de 6 à 8 semaines. Là encore l'hyperthermie sévère altérerait la qualité de la semence, tout comme les lésions vasculaires liées à la réplication virale. La guérison clinique survient dans 75% des cas, et dans un quart des cas l'évolution se fait de manière irréversible vers l'atrophie testiculaire et la stérilité.

## 2 – La forme subaiguë ou fruste

Elle concerne les ovins en zone d'enzootie, est fréquente chez les bovins. On retrouve les symptômes décrits précédemment mais d'intensité moindre, avec essentiellement des troubles de la reproduction, des baisses de la production laitière avec une courte phase d'hyperthermie associée.

## 3 – La forme inapparente

On l'observe chez les caprins, la plupart des espèces de ruminants sauvages, elle est fréquente chez les bovins dont la morbidité atteint à peine 5%, et on peut la retrouver chez les ovins dans les zones enzootiques.

## 4 – La reproduction de la maladie et les modèles expérimentaux

Plusieurs infections expérimentales ont tenté de reproduire la maladie afin d'en étudier les mécanismes physiopathologiques. Plusieurs protocoles ont été essayés, avec plus ou moins de succès. En ce qui concerne le type d'inoculum tout d'abord, on en retrouve deux principaux :

- administration de sang infectieux : après le prélèvement initial, un ou deux passages sur des animaux sont réalisés avant de constituer l'inoculum final. Une étude a réussi par cette méthode à induire une forme très sévère de la maladie chez 100% des animaux infectés [Maclachlan et al. mai 2008].
- administration de virus passé sur culture cellulaire : une tentative pour isoler le virus directement sur des cellules BHK-21 (cellules de rein de bébé hamster) à partir d'un

prélèvement sanguin positif a échoué. En revanche l'isolement sur œufs de poulet embryonnés ou sur des lignées cellulaires de *Culicoides sonorensis*, à partir de prélèvements sanguins positifs ont réussi. Plusieurs passages ultérieurs sur BHK-21 ont permis d'obtenir des inocula infectieux qui ont su reproduire les symptômes de la maladie [Darpel et al. 2007]. Malgré tout, les passages répétés sur culture cellulaire peuvent atténuer la virulence du virus et provoquer des manifestations cliniques plus modérées que les souches sauvages. Par contre il est possible, après culture cellulaire, de faire quelques passages sur animaux sains afin de recouvrer la virulence du virus. Les titrages utilisés et les quantités injectées sont variables, aucun consensus n'existe à l'heure actuelle.

La voie d'administration utilisée diffère là encore selon les études, avec trois voies principales :

- la voie intraveineuse : la plus utilisée, que ce soit à partir de sang infectieux ou de virus passé sur culture cellulaire, elle a su reproduire la maladie de manière comparable à une infection naturelle [Maclachlan et al. mai 2008].
- la voie sous-cutanée/intradermique : souvent utilisées en parallèle, ce sont les voies qui se rapprochent le plus de celle d'une infection naturelle (piqûre de *Culicoïde*), elles aussi ont fait la preuve de leur efficacité [Darpel et al. 2007] [Worwa et al. 2010].
- La voie orale : une étude récente a montré que l'ingestion par un veau sain de colostrum sain, dans lequel du sang infecté par le BTV a été ajouté, peut engendrer l'infection du veau [Backx et al. 2009].

On le voit les modèles expérimentaux utilisés pour comprendre la physiopathologie de la FCO sont nombreux et variés : plusieurs voies d'infection, plusieurs types d'inoculum, avec la possibilité de les combiner. Les différentes tentatives pour tenter de reproduire la maladie ont eu plus ou moins de réussite et à l'heure actuelle aucun protocole de référence n'a réussi à s'imposer.



## **B – Diagnostic**

### 1 – Diagnostic épidémio-clinique

Il se fait en identifiant les signes cliniques ainsi que les lésions décrites plus haut. Il faut s'assurer également que l'on se situe dans une zone où le virus et les vecteurs sont présents. La seule lésion « pathognomonique » est l'hémorragie sous-intimale à la base de l'artère pulmonaire.

### 2 – Diagnostic différentiel

Différentes maladies peuvent faire penser à la FCO, en voici les principales [Bozzetti 2007, OIE 2011]:

- Ecthyma contagieux qui donne des lésions péri-buccales mais sans œdème, et les vésiculo-pustules sont réparties sur l'ensemble du corps
- Fièvre aphteuse qui se manifeste également par de l'hyperthermie, des lésions buccales et podales (aphtes et cloques) mais moins prononcées que la FCO et sans œdèmes associés
- Stomatite vésiculaire qui provoque des lésions buccales et sur le trayon
- BVD qui se manifeste par une hyperthermie prononcée, une stomatite ulcéro-nécrotique, de la congestion, des ulcères interdigités, des signes oculaires et des avortements, mais les ulcères sont généralement caractéristiques (en coup d'ongle), on a une diarrhée mucoïde parfois hémorragique que l'on ne retrouve pas avec la FCO, et il n'y a pas d'œdèmes ni d'autres hémorragies
- IBR qui provoque jetage, stomatite avec ulcères et ptyalisme, conjonctivite avec épiphora, polypnée, hyperthermie et avortements mais pas d'œdèmes ni d'hémorragies, et l'atteinte respiratoire est souvent légère
- Pneumonie pour les symptômes respiratoires
- Photosensibilisation
- Polyarthrite pour les boiteries et l'hyperthermie
- Peste des petits ruminants dans les zones tropicales, beaucoup plus agressive avec une évolution rapide et 90% de mortalité.

### 3 – Diagnostic de laboratoire

#### a. Diagnostic virologique

Le diagnostic de laboratoire est indispensable pour confirmer l'infection d'un animal. La technique standard utilisée consiste à inoculer par voie intraveineuse à des œufs de poule embryonnés de 9-11 jours des échantillons prélevés chez l'animal suspect : sang sur EDTA chez l'animal vivant ; rate, cœur et nœuds lymphatiques sur l'animal mort. Trois jours plus tard on récupère les embryons puis on les broie et on les inocule à des cellules en culture. Au bout de quatre à cinq jours apparaît un effet cytopathique caractéristique, le virus est alors isolé et typé par neutralisation virale, grâce aux 24 sérums hyper-immuns spécifiques de chaque sérotype [Bozzetti 2007, Zientara et al. 2002]. L'inconvénient de cette technique est le délai de réponse, qui est de 15 jours.

Aussi d'autres outils moléculaires ont été développés pour améliorer la rapidité de diagnostic, comme la qRT-PCR (Real-time Retro-transcriptase-Polymerase Chain Reaction) : le génome viral peut être spécifiquement détecté en 48h. De plus, une étude de terrain, réalisée en Belgique en 2006, a montré l'excellente sensibilité (99,5%) et spécificité (98,5%) de cette méthode [Vandebussche et al. 2008]. Par contre l'inconvénient de ce type de technique est la production de grandes quantités d'oligonucléotides amplifiés susceptibles de contaminer le laboratoire, et ainsi la création de réactions faussement positives [Zientara et al. 2002]. De plus seul l'isolement viral permet de s'assurer du pouvoir infectieux du virus identifié, et ainsi différencier les animaux « infectieux » des autres.

#### b. Diagnostic sérologique

Les anticorps peuvent être détectés une dizaine de jours après le début de l'infection, grâce à un prélèvement de sang sur tube sec. L'OIE recommande deux techniques [OIE 2011], fondées sur la reconnaissance d'antigènes communs aux 24 sérotypes, qui permettent donc un diagnostic de groupe [Sailleau et al. 2006] :

- Immunodiffusion sur gélose (AGID) : simple et rapide à mettre en œuvre, c'est une procédure standard pour les mouvements internationaux de ruminants. Mais un des inconvénients majeurs de cette technique est son manque de spécificité, en effet elle



peut détecter des anticorps d'autres Orbivirus, ce qui a motivé le développement de procédures ELISA.

- ELISA de compétition : développé pour pouvoir détecter spécifiquement les anticorps anti-VP7 du BTV et s'affranchir des réactions croisées avec les autres Orbivirus. Comme pour la qRT-PCR, une étude de terrain a montré l'efficacité de ce test : la sensibilité est de 87,8% et la spécificité de 98,2%, ce qui en fait un test très fiable [Vandebussche et al. 2008]. Mais le problème de cette méthode est son manque de sensibilité pour détecter les anticorps chez les animaux vaccinés [Oura et al. 2009], tout simplement car ceux-ci développent des anticorps anti-VP2 et anti-VP5, et non contre VP7.
- ELISA sandwich (double antigène) : cette méthode est utilisée pour détecter les titres en anticorps des animaux vaccinés. Elle est plus efficace que l'ELISA de compétition [Oura et al. 2009].

## **C – Prophylaxie**

La FCO est une maladie réputée contagieuse au sens de l'article 223.21 du Code Rural. Les réglementations nationale et communautaire prévoient la mise en œuvre d'un ensemble de mesures de police sanitaire en cas d'apparition de la maladie sur le territoire national.

### **1 – Prophylaxie sanitaire**

En zone indemne comme en zone enzootique, il est fondamental de contrôler les mouvements d'animaux en provenance de pays infectés, afin d'éviter l'extension et la pérennisation de la maladie. Ce contrôle doit prendre en compte les durées extrêmes de virémie (40 jours pour les ovins et 100 jours pour les bovins), et de procéder à des dépistages sérologiques.

La surveillance entomologique est assurée par un piégeage des arthropodes. Des prélèvements sur bovins sentinelles ainsi que des enquêtes sérologiques et entomologiques sont organisées durant les périodes d'activité des Culicoïdes.

La lutte vectorielle est limitée : des insecticides en pour-on, spray ou douches, administrés régulièrement aux animaux, peuvent réduire les piqûres mais c'est très contraignant pour une efficacité toute relative.

L'abattage est une solution de moins en moins acceptée et disproportionnée par rapport à la menace, mais peut être applicable sur des foyers très restreints dans les zones limitrophes aux zones d'enzootie. Ainsi cette méthode a permis l'éradication de la maladie au sud de l'Espagne et dans l'île de Lesbos [Caruso 2009].

Au final, compte tenu du caractère vectoriel de la maladie, la prophylaxie sanitaire demeure inefficace pour la contrôler. La vaccination est actuellement le meilleur moyen de prévention.

## 2 – Prophylaxie médicale

La vaccination a déjà fait ses preuves en France depuis l'arrivée du BTV en Corse en 2000. En effet dès l'apparition du virus, les services vétérinaires ont décidé la mise en œuvre d'une campagne de vaccination agressive : un vaccin monovalent à virus atténué contre BTV-2 a été utilisé. Avec succès puisque, après deux campagnes successives en 2000 et 2001 et près de 78% des moutons vaccinés, il n'a plus été ré-isolé depuis le 8 novembre 2001 [Gerbier et al. 2004].

En 2003 et 2004 l'île a connu des épizooties de BTV-4 et BTV-16 : la vaccination a été reconduite contre ces deux sérotypes mais elle a été arrêtée en décembre 2004 suite à des signes évocateurs de la maladie dans des troupeaux vaccinés. Une mauvaise atténuation du vaccin semblait être en cause.

Aussi depuis 2004 ce sont les vaccins inactivés qui sont préconisés, plus sûrs et tout aussi efficaces. Suite à l'apparition des sérotypes 1 et 8 en France métropolitaine en 2006, les autorités ont rendu la vaccination obligatoire au cours des campagnes prophylactiques de 2008-2009 et 2009-2010. Seuls des vaccins inactivés « monosérotypes » sont utilisés, mais des vaccins nouvelle génération, permettant de vacciner contre plusieurs sérotypes, sont à l'étude.

#### a. Les vaccins actuels

##### ➤ Les vaccins vivants atténués :

Mis au point par Onderstepoort Biological Products en Afrique du Sud, ce type de vaccin a été longtemps utilisé pour contrôler la maladie en Afrique du Sud mais aussi en Corse, aux Baléares et en Italie. Peu onéreux, il fournit une solide protection aux animaux pendant un an, et ce après seulement une injection. Malheureusement le vaccin vivant atténué présente de nombreux inconvénients non négligeables :

- Dans certaines espèces très sensibles au virus, il n'est pas totalement sûr.
- L'atténuation du virus est difficilement contrôlable, on peut donc voir apparaître certains des signes cliniques propres à la maladie : avortements, lésions tératogènes, baisse de la production laitière et de la qualité de la semence.
- On a pu parfois constater une virémie qui durait plus de deux semaines chez des animaux vaccinés [Veronesi et al. 2005], avec le risque d'une transmission aux vecteurs. Ceci peut potentiellement conduire à deux phénomènes graves : le retour à la virulence et un réassortiment génétique avec une souche sauvage, donnant naissance à de nouvelles souches de BTV avec une virulence modifiée.
- Un vaccin vivant atténué ne permet pas de distinguer les animaux vaccinés de ceux qui sont infectés : c'est la stratégie DIVA (Distinction between Infected and Vaccinated Animals), recherchée pour tout vaccin mis au point.

Pour toutes ces raisons de nouvelles stratégies vaccinales ont été mises au point, et notamment en Europe lors de l'apparition de la FCO en 2006, les vaccins vivants atténués ont été remplacés par des vaccins inactivés.

##### ➤ Les vaccins inactivés :

Ils induisent une immunité protectrice spécifique chez les espèces de ruminants cibles : la réponse est humorale et cellulaire, mais le rôle et l'importance de cette dernière sont mal connus. La durée de protection engendrée demande à être précisée, mais dure au moins un an. Elle est supérieure après deux injections comparativement à une seule et supérieure chez les ovins comparativement aux bovins. L'efficacité de tels vaccins a été étudiée et démontrée en laboratoire, dans des conditions extrêmement sévères, avec des

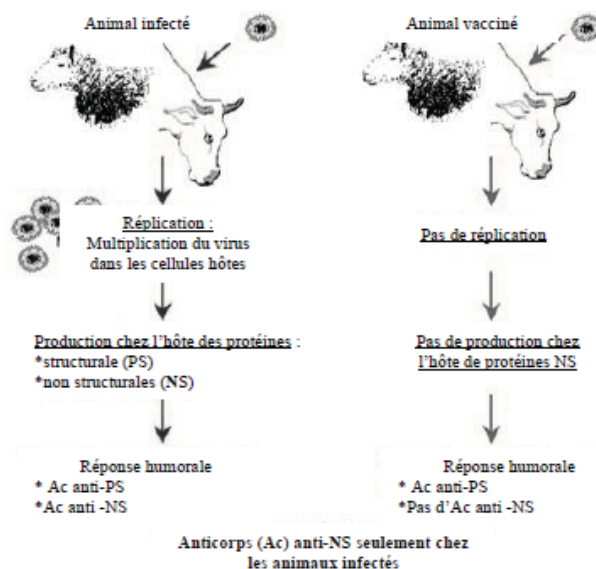
quantités de virus utilisées pour éprouver les animaux vaccinés très largement supérieures à ce qu'un ruminant peut recevoir même après de multiples piqûres par des moucheron infectés. Sur le terrain ils ont également prouvé leur efficacité : après une vaccination généralisée du cheptel français en 2008, le nombre de foyers a considérablement chuté en 2009.

En matière de virémie les études montrent que les vaccins permettent de réduire ou d'annuler la détection du virus au niveau sanguin par PCR après épreuve virulente. Néanmoins, dans la mesure où la limite de détection de la RT-PCR n'est pas clairement établie et où la dose infectante de virus pour le vecteur n'est pas connue, il est difficile de se prononcer sur la capacité de la vaccination à bloquer totalement la propagation du virus.

En ce qui concerne le fœtus chez un animal gestant, il n'existe pas de données expérimentales. On peut simplement penser que la diminution de la virémie devrait, selon le même principe, limiter voire empêcher l'atteinte du fœtus.

Un des inconvénients majeurs des vaccins inactivés est qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens pour différencier des animaux infectés des animaux vaccinés. Des méthodes ELISA fondées sur la reconnaissance de protéines non structurales sont actuellement en développement. En effet, seule la réplication virale permet la reconnaissance des protéines NS1, NS2 et NS3 par l'organisme, or les vaccins inactivés purifiés sont en grande partie (voire totalement pour les vaccins hautement purifiés) débarrassés de ces protéines. Les animaux vaccinés ne doivent donc théoriquement pas développer d'anticorps anti-protéines structurales (cf figure 11).

Des études en cours consistent à mettre en contact ces trois protéines successivement avec des sérums de ruminants, naïfs, vaccinés ou infectés. Les résultats actuels démontrent que la réponse face aux protéines NS dépend de leur type, de l'espèce testée, des individus, des vaccins utilisés, du nombre d'injections effectuées par animal. Pour l'instant il semblerait que NS1 et NS3 soient des candidates possibles [Zientara et al. 2010] [Barros et al. 2009].



**Figure 11 :** Schéma explicatif des tests sérologiques basés sur l'utilisation des protéines non structurales du BTV, dans le cadre de la stratégie DIVA

(D'après [Zientara et al. 2010])

Récemment, des retours de terrain en Espagne font état d'effets secondaires post-vaccinaux variables, parfois mortels, chez une proportion non négligeable de moutons vaccinés simultanément contre le BTV-1 et 8 (Zulvac 1 et 8, Fort Dodge) [Gonzalez et al. 2010]. Trois groupements de défense sanitaire, comptant en tout 100 troupeaux, soit 65 430 animaux au total, se sont plaints de la vaccination : sur les 100 troupeaux, 24 ont rapporté des effets secondaires. Deux processus pathologiques ont été décrits :

- un processus aigu (0,4% des animaux vaccinés), avec des symptômes 2 à 8 jours après la seconde injection, incluant apathie, ataxie, cécité, avortements dans le dernier tiers de gestation, et la mort dans 36,6% des cas.
- Un processus chronique (1,58% des animaux vaccinés), avec cachexie progressive, perte de laine, et protéinurie aboutissant à des glomérulopathies chroniques.

Aucune preuve à ce jour n'existe quant à la responsabilité du vaccin dans l'ensemble de ces troubles, mais la suspicion reste très forte, d'autant que la plupart des autres étiologies ont été écartées. En France, des réactions probantes ont été observées dans la proportion de 0,005% seulement, ce chiffre étant analogue pour les deux vaccins [RFSA 2009]. Ce nombre est relativement faible au regard du nombre de vaccinations effectuées et n'implique aucune remise en cause du ratio bénéfice/risque de la vaccination.

Enfin le dernier inconvénient majeur de ces vaccins est qu'ils ne ciblent qu'un seul sérotype à la fois, ce qui pose beaucoup de problèmes : en France, où deux sérotypes sont présents, les animaux doivent ainsi recevoir quatre injections à quelques semaines d'intervalle seulement, entraînant d'importants problèmes de logistique et de stress chez les animaux. Pourtant ils constituent actuellement le meilleur compromis, et sont recommandés par l'EFSA (European Food Safety Authority) pour le contrôle de la maladie en Europe. Ce n'est que récemment, en mars 2011, que Merial a obtenu l'AMM pour un vaccin inactivé bivalent contre les sérotypes 1 et 8.

#### b. Les vaccins émergents

##### ➤ Les vaccins sous-unitaires :

Ce sont des particules virales mais sans le matériel génétique. Ce sont des vaccins prometteurs car forcément inoffensifs, et de plus la protéine VP2 de plusieurs souches peut y être intégrée, offrant l'espoir de créer un vaccin multivalent [Roy et al. 1994]. Ils respectent en outre la stratégie DIVA, car ne contiennent aucune protéine non-structurale.

##### ➤ Les vaccins recombinants :

En ce qui concerne la FCO, le virus de la Vaccine, les canarypox et capripoxvirus ont été testés. La piste la plus prometteuse concerne les poxvirus : les canarypoxvirus sont déjà utilisés à travers le monde pour la vaccination contre d'autres maladies, et ce sans danger. Le génome du BTV est intégré au virus vecteur, de manière à ce que les cellules infectées expriment les protéines immunogènes. De plus récemment il a été montré que l'injection de canarypoxvirus exprimant VP2 et VP5 à sa surface permettait d'obtenir de forts taux d'anticorps neutralisants. En combinant plusieurs VP2, on pourrait obtenir un vaccin multivalent. Enfin ce type de vaccin respecte la stratégie DIVA. Mais à ce jour la production de tels vaccins reste onéreuse, pour une protection qui peine encore à égaler celle des vaccins inactivés, et avec toujours la nécessité de plusieurs injections.

#### c. Les vaccins du futur : les vaccins à virus « défectueux »

Ils sont basés sur la production de BTV à qui on a enlevé un ou plusieurs gènes essentiels à sa réplication. Ce virus modifié est alors amplifié sur des cultures de cellules à qui

on a intégré le gène manquant, de manière à permettre la réplication du virus. L'injection de ces virus défectueux à des animaux sains va agir à deux niveaux :

- D'une part les particules virales vont agir comme des immunogènes directs, comme les autres vaccins.
- D'autre part, les particules virales vont pénétrer dans les cellules et produire des protéines virales à l'exception de celles du gène manquant, tout comme les vaccins recombinants. Le gène manquant étant essentiel à la réplication, les cellules infectées ne vont pas protéger le virus, et sont donc inoffensifs.

Dans la théorie les vaccins à virus défectueux combinent donc les meilleurs aspects des vaccins actuels et des vaccins émergents. Des études sont en cours pour démontrer leur efficacité, mais cela prendra du temps. A l'heure actuelle, seules quelques étapes du développement de ces vaccins ont été réalisées avec succès, à savoir la production de virus défectueux, de cellules complémentées avec le gène défectueux en question, et la multiplication du virus uniquement sur ces lignées.

### **III – L'épizootie de Fièvre catarrhale ovine dans l'Union européenne**

#### **A – Une maladie « exotique » qui a envahi l'Europe en 2006**

##### **1 – Historique et situation mondiale avant 2006**

Les premiers cas de FCO ont été décrits au 19<sup>ième</sup> siècle sur des moutons Merinos sensibles importés d'Afrique du Sud. Au début du 20<sup>ième</sup> siècle la maladie s'est rapidement répandue en Afrique, grâce notamment à l'introduction d'espèces non indigènes particulièrement sensibles au virus. Elle est très vite devenue endémique sur presque tous les continents, entre les latitudes 40°S et 53°N, causant des pertes économiques mondiales estimées en 1996 à 3 milliards de dollars par an.

Jusqu'en 1998 l'Europe a été épargnée, avec seulement quelques incursions sporadiques en Espagne, au Portugal, en Grèce et à Chypre.

Puis de 1998 à 2005, au moins 6 souches appartenant à 5 sérotypes différents (BTV-1, BTV-2, BTV-4, BTV-9 et BTV-16) se sont installées durablement dans le bassin méditerranéen, dont quelques Etats européens (cf tableau 4). En France, seule la Corse a été touchée avec l'apparition de foyers de BTV-2, BTV-4 et BTV-16.

Country	Year of first outbreak	BTV serotype(s)	Main suspected or identified vector(s)
Albania	2002	9	<i>Culicoides obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Bosnia-Herzegovina	2002	9	ND
Bulgaria	1999	9	<i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Croatia	2001	9, 16	<i>C. obsoletus</i> , <i>C. scoticus</i>
Cyprus	2003	16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> ,
Former Yugoslav Republic of Macedonia	2001	9	ND
France (Corsica)	2000	2, 4, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. pulicaris</i> , <i>C. obsoletus</i>
Greece	1998	1, 4, 9, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i>
Italy	2000	1, 2, 4, 9, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Kosovo	2001	9	ND
Montenegro	2001	9	ND
Portugal	2004	2, 4	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Serbia	2001	9	ND
Spain	2000	2	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>
Turkey	1998	4, 9, 16	<i>C. imicola</i> , <i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>

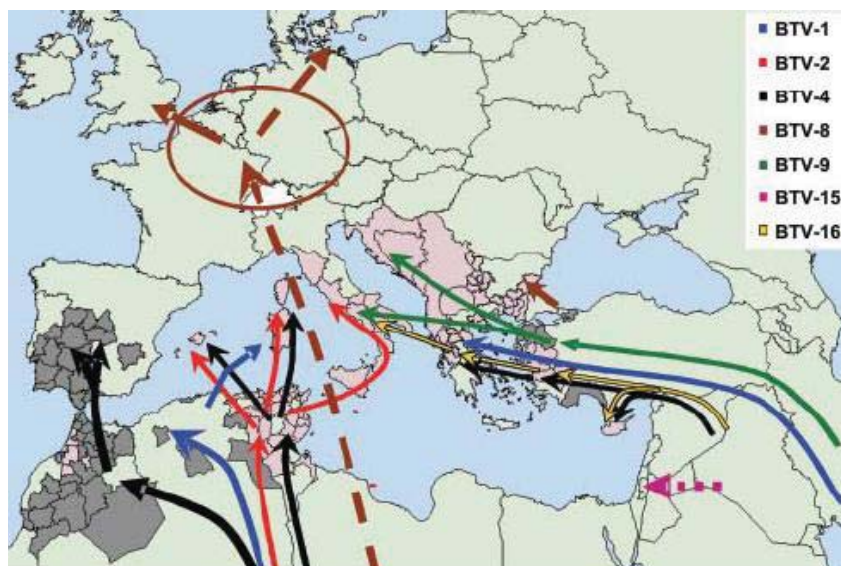
**Tableau 4 :** Les foyers de FCO en Europe entre 1998 et 2005

(D'après Saegerman et al. 2008)

L'origine de cette propagation rapide n'est pas très claire, mais en étudiant les données épidémiologiques, on s'est rendu compte que la propagation du virus s'est faite en deux « vagues » différentes [Saegerman et al. 2008] :

- la première concerne la partie Est du bassin, avec quatre sérotypes identifiés (BTV-1, BTV-4, BTV-9, BTV-16). Ces souches sont arrivées du Proche, Moyen, ou Extrême-Orient, on parle de rameau asiatique.
- La seconde concerne la partie Ouest du bassin, avec là aussi quatre sérotypes isolés (BTV-1, BTV-2, BTV-4, BTV-16) : c'est le rameau africain. (Cf carte 1)





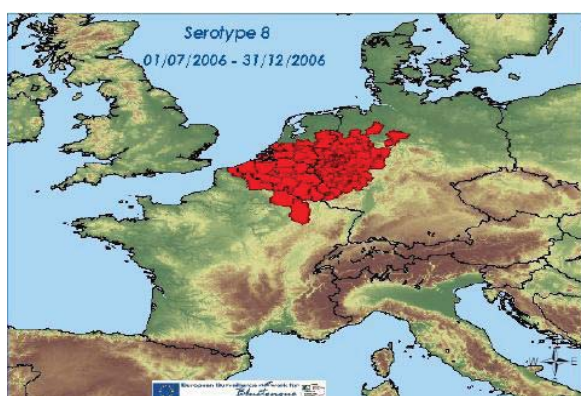
**Carte 1 :** Les routes d'introduction des différents sérotypes de la FCO en Europe et dans le bassin méditerranéen depuis 1998

(D'après Saegerman et al. 2008)

## 2 – L'épizootie de Fièvre catarrhale ovine à sérotype 8

La véritable expansion du virus en Europe continentale a été observée à partir de l'été 2006 avec le sérotype 8 : contre toute attente ce dernier a été identifié en août dans la région de Maastricht, au sein d'un troupeau de 28 moutons Mergelland dans lequel un agneau et une brebis ont présenté des signes cliniques.

Dans la foulée l'Allemagne et la Belgique ont notifié chacun plusieurs centaines de foyers, tandis que la France et le Luxembourg ont été relativement épargnés, avec respectivement six et cinq cas en 2006 (cf carte 2 et tableau 5).



**Carte 2 :** Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/7/2006 et le 30/12/2006

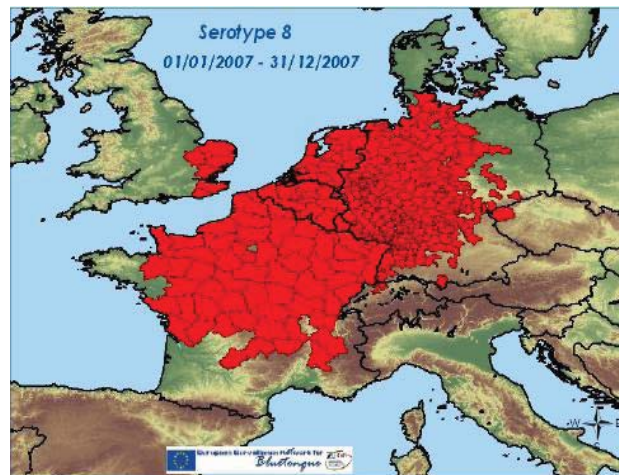
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

Pays	Nombre de foyers notifiés en 2006	Nombre de foyers notifiés en 2007
Allemagne	885	20276
France	6	14264
Belgique	695	6598
Pays-Bas	456	6442
Luxembourg	5	1315
Royaume-Uni	-	67
Suisse	-	5
Danemark	-	1
République tchèque	-	1
<b>Total</b>	<b>2047</b>	<b>48969</b>

**Tableau 5 :** Nombre de foyers de FCO à sérotype 8 notifiés par pays en 2006 et 2007

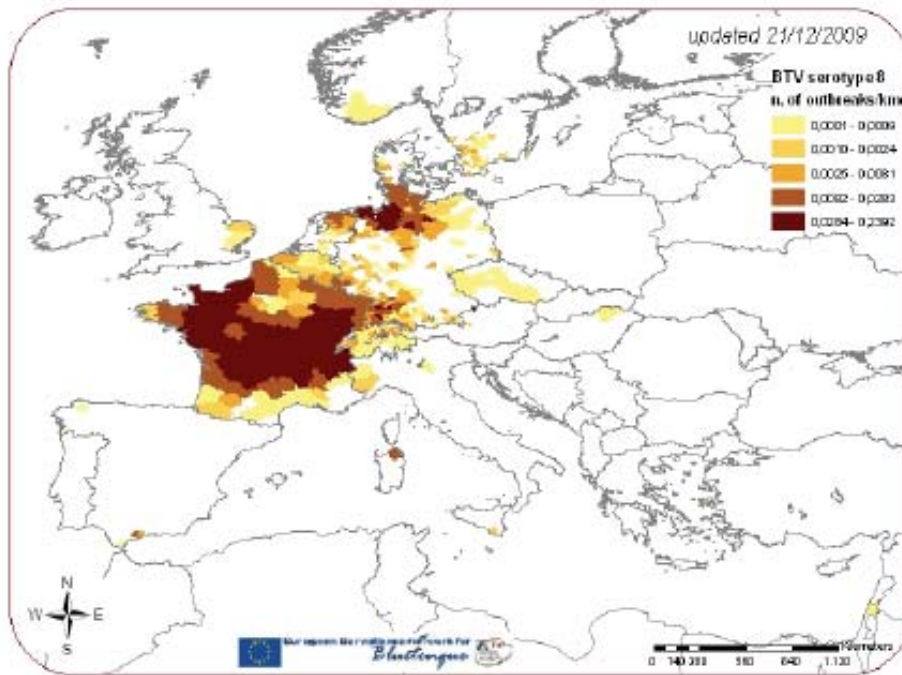
(D'après rapport ADNS, Commission européenne)

En 2007, malgré les mesures de restriction des mouvements d'animaux mis en place, le sérotype 8 gagnait de nouveaux territoires (Royaume-Uni, Danemark, République Tchèque, Suisse, Espagne), mais la grande majorité des foyers détectés concernait quatre pays : la France, l'Allemagne, la Belgique et les Pays-Bas. L'épidémie de 2007 peut même être considérée comme l'une des épidémies infectieuses animales les plus étendues jamais enregistrées en Europe (cf carte 3).



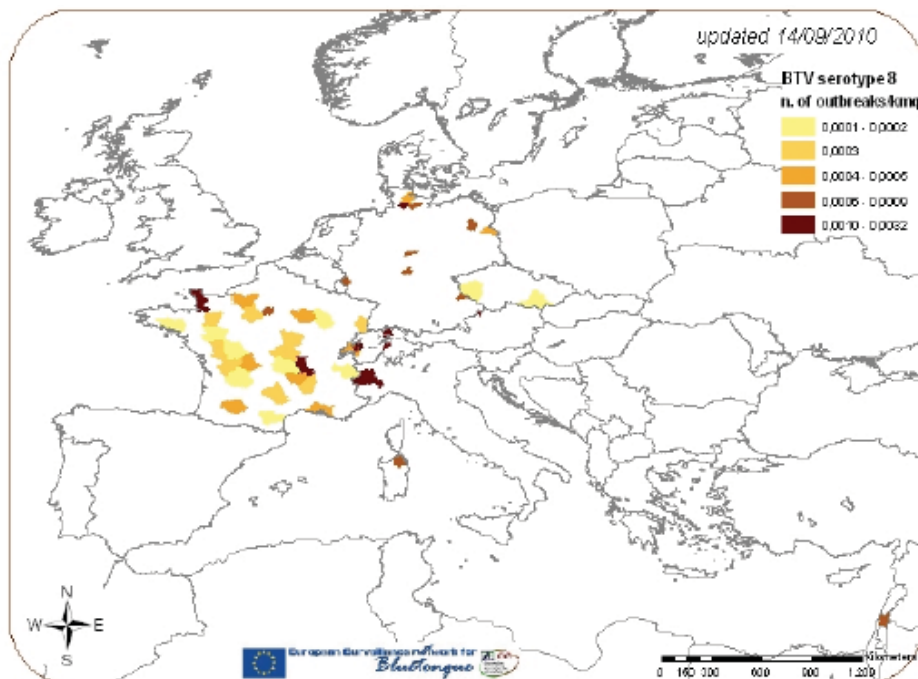
**Carte 3 :** Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/7/2007 et le 30/12/2007  
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

En 2008, grâce à la mise sur le marché de vaccins inactivés contre les sérotypes 1 et 8, des campagnes de vaccination massives ont été lancées en Belgique, Danemark, France, Allemagne, Italie, Luxembourg, Suisse, Pays-Bas et Royaume-Uni : la maladie a alors marqué le pas dans la plupart des pays avec au plus quelques centaines de cas. La France, en revanche, est restée durement touchée : elle aura totalisé près de 27 000 cas dans 86 départements en 2008, sur les 30000 recensés en Europe (cf carte 4). Cela est dû au fait que les vaccins sont arrivés au compte-goutte, en pleine période d'activité vectorielle. De plus la vaccination s'est faite en fonction des zones réglementées, et n'a été rendue obligatoire sur tout le territoire français qu'à partir de l'hiver 2008-2009.



**Carte 4 :** Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/1/2008 et le 21/12/2009  
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

Depuis l'épizootie semble contrôlée, puisque de mai 2009 à septembre 2010, moins d'une centaine de foyers ont été recensés en Europe, dont 46 en France (cf carte 5) [EUBTNET 2010].



**Carte 5 :** Répartition géographique des régions touchées par le BTV-8 entre le 1/5/2009 et le 14/09/2010  
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

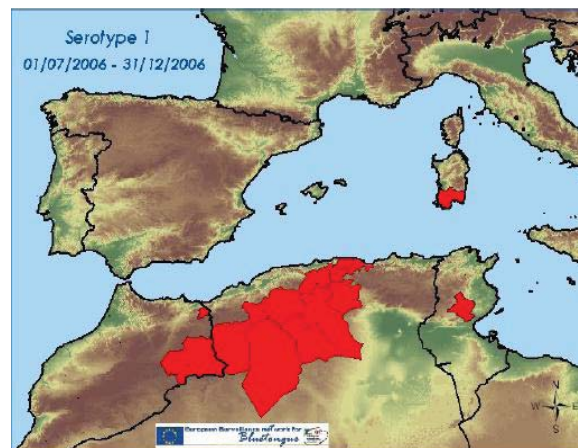
Un premier bilan épidémiologique permet de dégager trois profils épizootiques parmi les 14 pays atteints :

- Les cinq pays touchés dès 2006, moins la France, ont connu un pic de la maladie en 2007 puis une nette diminution de l'incidence en 2008.
- Les pays touchés en 2007, dans lesquels l'épizootie est restée limitée.
- La France, elle, bien que touchée dès 2006 et fortement atteinte en 2007, a vu l'incidence de la maladie augmenter encore en 2008, comptabilisant 90% des foyers européens cette année-là.

Parallèlement à l'épizootie à BTV-8, l'Europe a été touchée par un second sérotype, le BTV-1 : couramment isolé en Afrique du Nord, son expansion européenne dès 2006 s'est faite cette fois très classiquement.

### 3 – L'épizootie de Fièvre catarrhale ovine à sérotype 1

En 2006 le virus a d'abord été détecté en Algérie en juillet, puis en Italie et au Maroc en octobre, et enfin en Tunisie en novembre (cf carte 6). La mortalité allait de 12% à 40%.

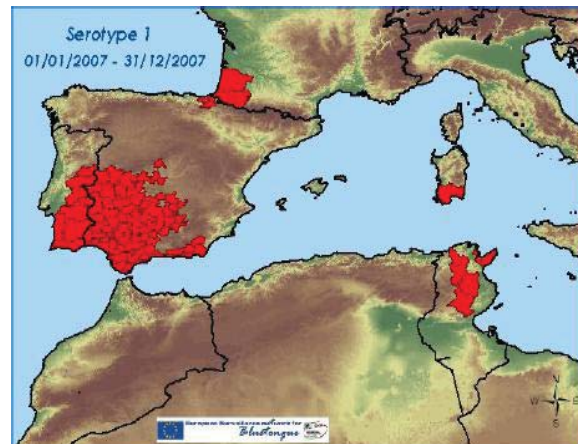


**Carte 6 :** Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/7/2006 et le 30/12/2006  
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

En 2007, outre la Tunisie et l'Italie, le Portugal et l'Espagne ont été touchés. Ces trois derniers pays ont alors entamé une campagne de vaccination contre le BTV-1. La France



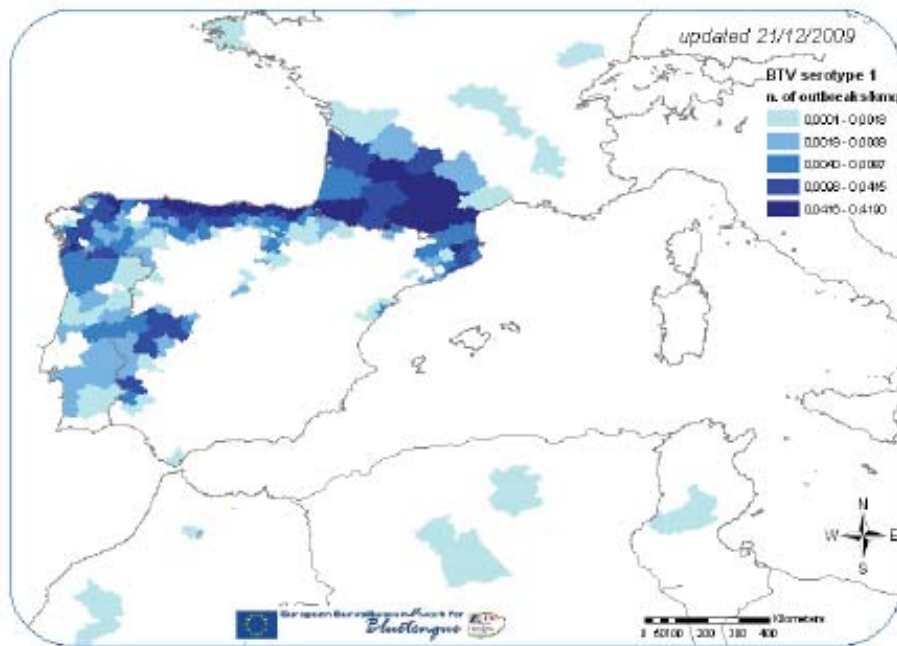
quant à elle a vu apparaître 3 foyers à partir de novembre, dans le Sud-Ouest, dont deux concernaient des petits ruminants (cf carte 7).



**Carte 7** : Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/1/2007 et le 30/12/2007  
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

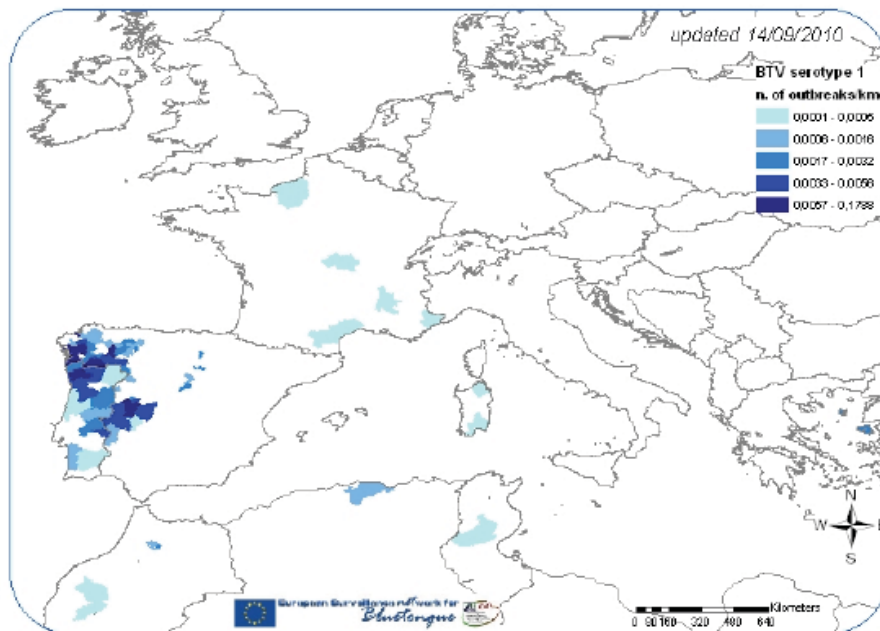
En 2008 le Portugal et l'Algérie comptaient moins d'une centaine de cas, alors que l'expansion du BTV-1 s'accélérait vers le Nord avec plus de 2000 cas en Espagne et près de 4400 cas en France. La campagne de vaccination lancée en France à l'hiver 2007-2008 ne concernait malheureusement que les départements déjà touchés en 2007, et n'a pas permis de ralentir la progression du virus.

Par contre la campagne 2008-2009, rendue obligatoire sur tout le territoire français, a entraîné une nette diminution de l'incidence de la maladie : seulement 9 foyers en 2009, dispersés dans toute la France. La même année l'épidémie s'est atténuée en Espagne (1375 cas), tandis que le Portugal a vu son nombre de cas augmenter (130 cas). Dans le reste du Bassin méditerranéen, la Grèce, le Maroc et la Tunisie ont recensés quelques foyers isolés (cf carte 8).



**Carte 8 :** Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/1/2008 et le 21/12/2009  
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

Enfin entre janvier et septembre 2010 seulement 8 nouveaux foyers ont été détectés en France dans 6 départements : en Seine-Maritime, dans l'Eure, l'Allier, la Drôme, l'Hérault et l'Aude. A la mi-septembre 2010 l'Espagne et le Portugal ont déjà plusieurs centaines de cas alors que la Grèce, l'Italie, le Maroc et la Tunisie sont dans la même situation que la France avec moins de 10 cas (cf carte 9). [EUBTNET 2010]



**Carte 9 :** Répartition géographique des régions touchées par le BTV-1 entre le 1/5/2009 et le 14/09/2010  
(D'après <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>)

En ce qui concerne la France, le Sud-Ouest a été le véritable épicode de l'épizootie à BTV-1, concentrant l'immense majorité des foyers de 2007 à 2008. L'étude de l'évolution de la maladie dans cette région permet de comprendre la dynamique de la souche que l'on a isolée en 2008.

#### 4 – Le Sud-Ouest de la France, épicode de l'épizootie à BTV-1

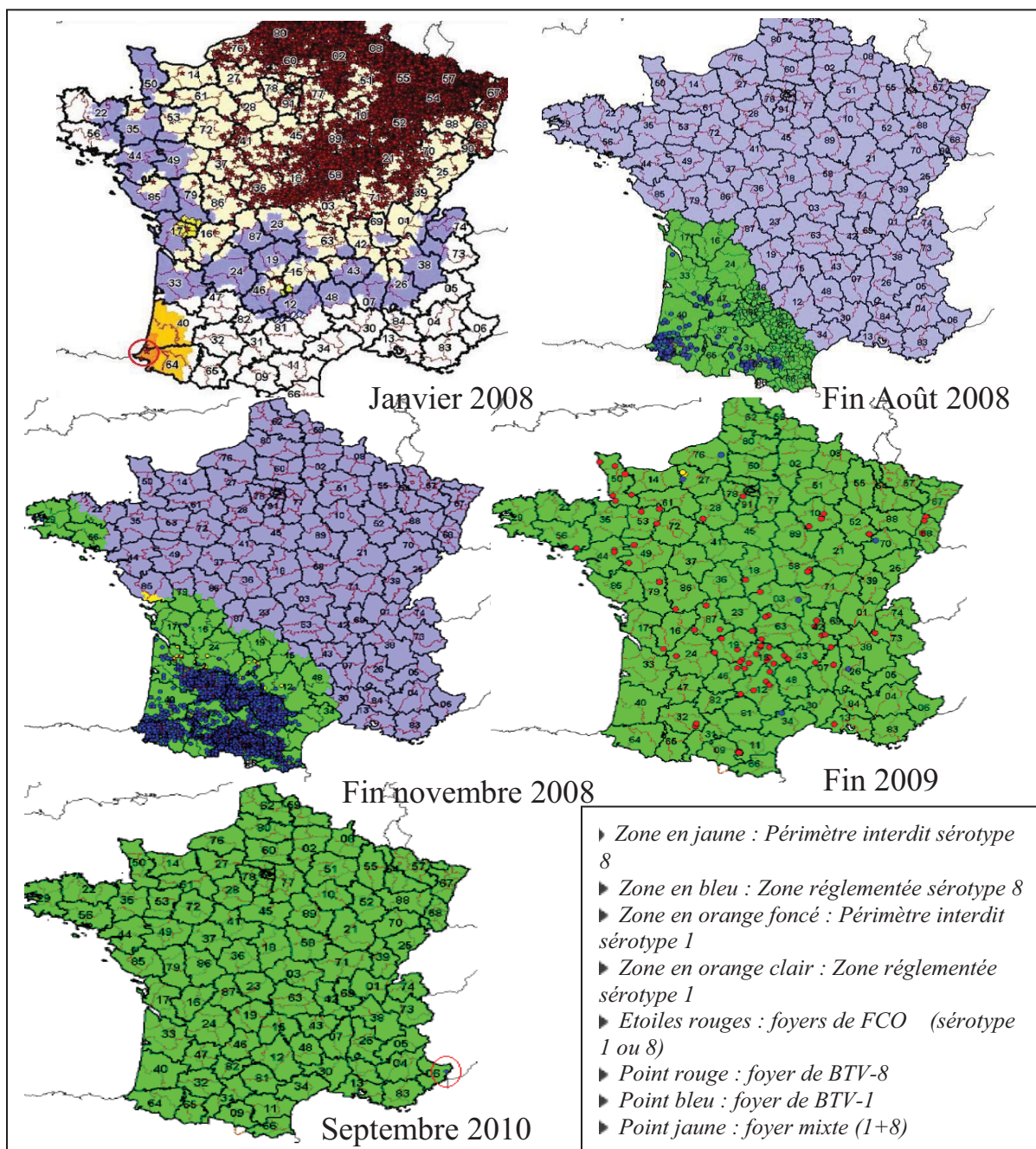
(Cf. carte 10)

C'est en novembre 2007 que les trois premiers foyers français sont détectés dans les départements des Landes et des Pyrénées-Atlantiques. Puis cet épisode s'est arrêté en hiver pour reprendre au printemps 2008 sous forme d'une vague épizootique qui a concerné 19 départements, et qui est restée localisée dans le Sud-Ouest malgré une incursion en Bretagne. Les taux d'incidence cumulée les plus forts ont été observés dans l'Ariège (34% des troupeaux), et la Haute-Garonne (31% des troupeaux). Cela pourrait s'expliquer par la proximité avec les premiers départements atteints et l'absence de vaccination précoce. A l'inverse, les départements ayant bénéficié de campagnes de vaccination en 2008 (Gers,

Landes et Hautes-Pyrénées) ont été faiblement touchés à l'exception des Pyrénées-Atlantiques.

En 2009 aucun cas de FCO à sérotype 1 n'a été détecté dans le Sud-Ouest de la France, pour moins d'une dizaine dans le reste du pays.

On constate que, contrairement au BTV-8, qui s'est répandu comme une traînée de poudre dans toute la France, le BTV-1 a été plus facilement contrôlé, du fait de son arrivée tardive, un an après le sérotype 8, alors que les moyens de prophylaxie commençaient déjà à être à l'œuvre. Cela illustre bien l'intérêt d'une mise en œuvre précoce et généralisée de la vaccination pour prévenir l'arrivée d'une épizootie.



Carte 10 : Evolution du nombre de foyers de FCO à BTV-1 en France entre 2007 et 2010



## **B – Les raisons d’une propagation aussi fulgurante et massive**

### 1 – Les mécanismes d’infection

#### a. Transmission vectorielle

La FCO est transmise par la piqûre d’un insecte déjà infecté par le virus. A l’heure actuelle on considère que seuls les membres du genre *Culicoides* sont réellement des vecteurs biologiques : ce sont des diptères hématophages (uniquement la femelle), appartenant à la famille des *Ceratopogonidae* (cf Photographie 4). Seules les femelles peuvent transmettre le virus : la matière virulente principale est le sang, et la virémie apparaît rapidement après l’inoculation. Elle est importante entre le 3<sup>ième</sup> et le 7<sup>ième</sup> jour, et dure en moyenne entre 5 et 30 jours, mais peut persister jusqu’à 45 jours chez les ovins, et jusqu’à 60 jours chez les bovins [RFSA 2010].

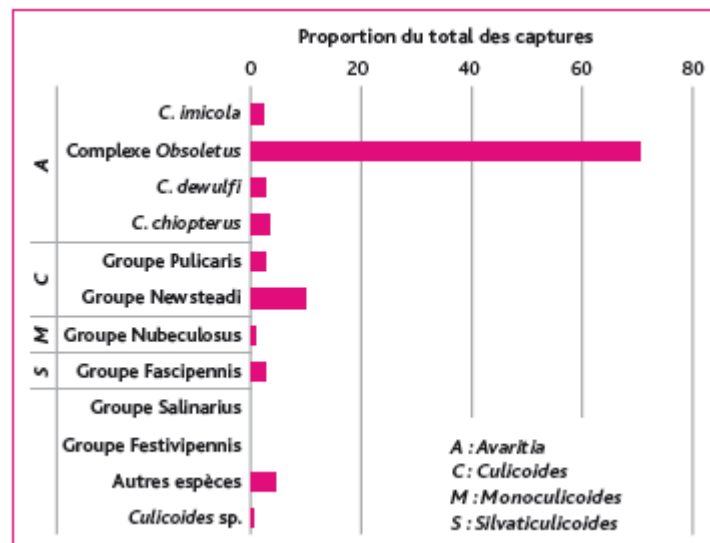


**Photographie 4 :** Culicoides spp

(D’après [www.FCO-info.org](http://www.FCO-info.org))

Sur plus de 1400 espèces répertoriées dans le monde, seules 17 ont été incriminées dans la transmission du BTV. *C. imicola* a longtemps été considéré comme le seul vecteur biologique du virus. Cependant depuis quelques années on a constaté l’apparition de foyers à des périodes où *C. imicola* n’était pas présent: en 2002, en Sicile, à l’endroit où la maladie est apparue, seuls *C. obsoletus* et *C. pulicaris* ont été identifiés [Caracappa et al. 2003], et du virus BTV de sérotype 2 a été découvert chez des *C. pulicaris* non gorgées. En France de

nombreuses espèces de Culicoïdes sont présentes (cf graphique 1), et *C. obsoletus* ainsi que *C. dewulfi* sont mentionnés comme vecteurs potentiels de la FCO [Afssa 2010].



**Graphique 1 :** Diversité des Culicoïdes capturés en France métropolitaine (continent et Corse) par le réseau de surveillance entomologique au cours de l'année 2009 (D'après [Afssa 2010])

Cette adaptation d'espèces locales constitue un des facteurs pouvant expliquer la rapidité de l'expansion du virus en Europe. On peut identifier trois autres facteurs principaux:

- la dispersion passive des Culicoïdes : des vents d'altitude associés à des températures permettant la survie de l'insecte peuvent les transporter sur plusieurs centaines de kilomètres. Ainsi lors de la reprise de l'activité vectorielle au printemps 2008 les vents dominants Ouest-Est (Tramontane) ont probablement favorisé la dispersion passive des Culicoïdes à l'origine de la vague épizootique qui a touché tout le quart Sud-Ouest. Les moyens de transport humains peuvent aussi participer à ces déplacements sur de grandes distances.
- la dispersion active, qui reste très locale (quelques centaines de mètres), mais suffit pour la contamination de tout un troupeau.
- le commerce et le déplacement d'animaux virémiques ou de leurs semences [Bozzetti 2007].

## b. Autres modes de transmission

Durant la phase de virémie, une transmission transplacentaire a été prouvée uniquement pour le sérotype 8 : une étude a montré un taux de 10% d'infection transplacentaire chez les veaux nouveaux-nés de mères infectées par le BTV-8 [De Clercq et al. 2008]. Le virus peut aussi être présent dans le colostrum, et contaminer le nouveau-né [Mayo et al. 2010]. Ces deux voies de transmission ont d'ailleurs récemment été reproduites expérimentalement toujours avec le BTV-8 [Backx et al. 2009].

Un autre mode de transmission, plus rare, est la voie vénérienne [Parsonson 1990] : le virus est assez résistant, notamment au froid, il est donc bien conservé dans les paillettes utilisées pour l'insémination artificielle, une transmission « iatrogène » par ce mode de reproduction est donc possible et a été démontrée artificiellement [Bowen et al. 1982].

## 2 – La sensibilité des animaux à la maladie

### a. La forte sensibilité des races européennes domestiques

La plupart des ruminants domestiques sont réceptifs au BTV, c'est-à-dire qu'ils peuvent être infectés par le virus. Mais tous ne développent pas de symptômes (on parle de sensibilité), et même au sein d'une espèce il y a une différence de sensibilité individuelle : un animal immunodéprimé sera beaucoup plus sensible, mais les individus vivant en zones enzootiques le seront moins que ceux qui n'ont jamais rencontré le virus. Par exemple les races africaines adaptées y résistent très bien. Par contre, les races européennes améliorées et standardisées génétiquement, c'est-à-dire plus productrices de viande ou de lait mais plus faibles quant à leur résistance immunitaire y sont très sensibles. C'est ce qui explique en partie l'atteinte majeure des cheptels européens et la dissémination éclair du virus.

De manière générale, jusqu'à l'apparition des sérotypes 1 et 8 en Europe on considérait que les ovins étaient très sensibles à la maladie, avec des taux de morbidité pouvant atteindre 50 à 75% et des taux de mortalité de 20-50% voire 70% alors que chez les bovins et les caprins prédominaient des formes inapparentes. La souche de BTV-1 présente actuellement en Espagne a provoqué quant à elle chez les ovins des taux de morbidité et de

mortalité similaires à ceux du BTV-8, à savoir respectivement 6,3% et 2,2%. Les chèvres ont présenté 2,7% de morbidité pour 1,2% de mortalité [Allepuz et al. 2010]. En France, la mortalité a atteint 10% chez les ovins, et des formes chroniques avec séquelles ont été observées dans 30% des cas.

En ce qui concerne les bovins, plusieurs enquêtes en France ont montré une forte variabilité des taux de morbidité au sein des élevages avec le BTV-8 : dans les élevages enquêtés, laitiers ou allaitants, le taux de morbidité des vaches en production a varié de 0 à plus de 97 %. Dans 60 % des élevages laitiers et 40 % des élevages allaitants enquêtés, le taux de morbidité est resté inférieur à 10 %. Dans 11 % des élevages laitiers et 28 % des élevages allaitants, la FCO a touché plus de 50 % des vaches. Le taux de mortalité, lui, est estimé à 2%. Dans les 58 élevages ovins enquêtés, le taux de morbidité des brebis a varié entre 15 % et 90 % du cheptel. Dans les trois productions, la morbidité apparente des adultes a été supérieure à celle des jeunes [Afssa 2010].

Si les sérotypes 1 et 8 semblent avoir la même virulence chez les petits ruminants, on a constaté que le BTV-1 l'était beaucoup moins chez les bovins. De même le BTV-1 a provoqué moins de mortalité chez les petits ruminants que le BTV-2 lors de son incursion en Italie en 2000 [Allepuz et al. 2010]. En plus d'une sensibilité inter et intra-espèce, il semble qu'il y ait des différences de virulence entre sérotypes.

Mais pour Maclachlan et al. (2009) c'est le génotype de la souche et non le sérotype qui caractérise la virulence d'une souche. Il cite pour exemple le BTV-4 qui ne semble peu voire pas virulent en Amérique, alors qu'une souche du même sérotype a provoqué 100% de mortalité en Afrique du Sud lors d'une infection expérimentale [Maclachlan et al. mai 2008].

#### b. La faune sauvage, réservoir du virus

Des travaux préalables dans différents pays européens ont montré que le cerf élaphe, le daim et le mouflon méditerranéen étaient les espèces "en nature" avec la plus forte prévalence sérologique vis-à-vis du BTV-8. Une enquête a été réalisée par l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage (ONCFS) et l'ENVT, au cours de la saison 2008-2009, qui a concerné 1 331 ruminants sauvages capturés ou chassés sur 14 départements différents. Aucun de ces animaux ne présentait de signes cliniques ou de lésion interne pouvant faire suspecter l'infection. Pourtant, les virus de la FCO semblent avoir largement circulé chez le cerf, avec une séroprévalence globale de l'ordre de 41 %, pouvant varier selon les zones de 8 % à plus

de 70 % [RFSA 2010]. Toutes les populations de cerfs de l'enquête étaient positives. Par contre il n'est pas possible de calculer de prévalence au plan national car les effectifs de la population de cerfs en France ne sont pas connus. Ces analyses confirment aussi la présence du BTV-1 dans les Pyrénées et du BTV-8 dans les territoires du reste de la France.

Les chevreuils sont nettement moins concernés : la séroprévalence moyenne dans la population de l'enquête était de 1%. Les mouflons, qui sont des ovins au plan génétique, faisaient s'attendre à un fort taux d'infection, or la séroprévalence était de 2%. Ils sont probablement protégés par l'altitude de leur habitat, qui n'est pas fréquentée par les Culicoïdes vecteurs du BTV. De même, 1% des isards ont été trouvés séropositifs, aucun chamois et aucun bouquetin [RFSA 2010].

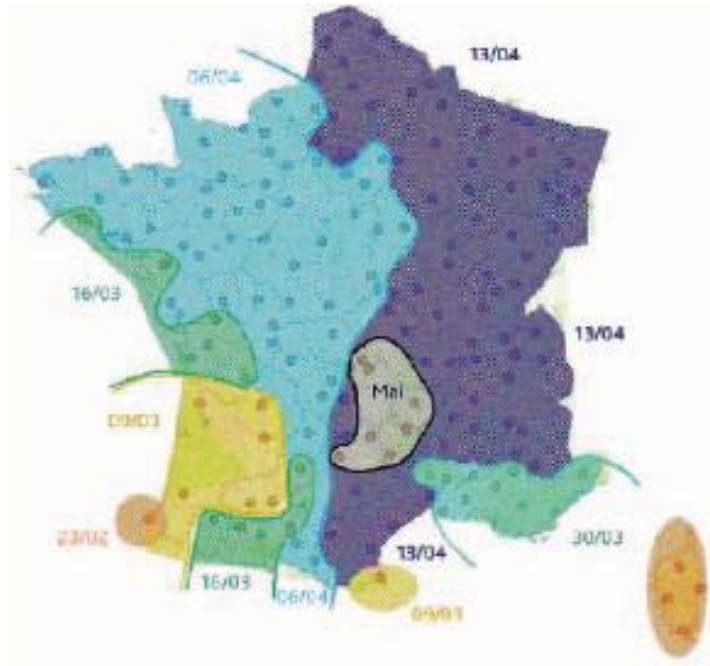
D'autres travaux sont en cours pour préciser le rôle de réservoir de la faune sauvage, en particulier sur les Culicoïdes qui se nourrissent sur les ruminants sauvages en forêt. Des captures ont été réalisées en zone forestière, pour évaluer si ce sont les mêmes espèces que celles présentes en zone d'élevage. Actuellement on considère que l'infection des cervidés par le BTV est surtout une conséquence de l'infection chez les ruminants domestiques. Le rôle de la faune sauvage dans la persistance de la maladie n'est pas établi.

### 3 – Saisonnalité de la maladie et phénomène d'Overwintering

L'épizootie qui frappe l'Europe depuis 2006 a clairement mis en lumière le caractère saisonnier de la maladie : les premiers foyers apparaissent au printemps, on constate un pic à la fin de l'été (août-septembre-octobre), puis elle disparaît fin novembre-début décembre. Ce cycle est étroitement lié à celui des principaux vecteurs de la maladie, à savoir les Culicoïdes.

En France un réseau d'épidémiosurveillance s'est mis en place dès 2002 en Corse afin d'étudier leur activité. Ce réseau s'est progressivement étendu au Sud-Est de la France en 2003, au département des Pyrénées-Atlantiques en 2005, au Nord-Est en 2006, jusqu'à concerner l'ensemble du territoire français en 2009 [Afssa 2010]. Ainsi en 2009 la reprise de l'activité des Culicoïdes est constatée dès février dans l'extrême sud-ouest du territoire, début mars pour un petit quart sud-ouest, mi-mars pour la façade atlantique, fin mars pour l'ouest de la zone méditerranéenne, début avril pour la moitié ouest et mi-avril pour le reste du territoire (cf carte 11). Des pics d'activité sont constatés en juillet, en août ou en septembre suivant les

espèces concernées et les régions. Enfin le nombre d'insectes capturés diminue peu à peu à partir de novembre pour être quasi-nul fin décembre.

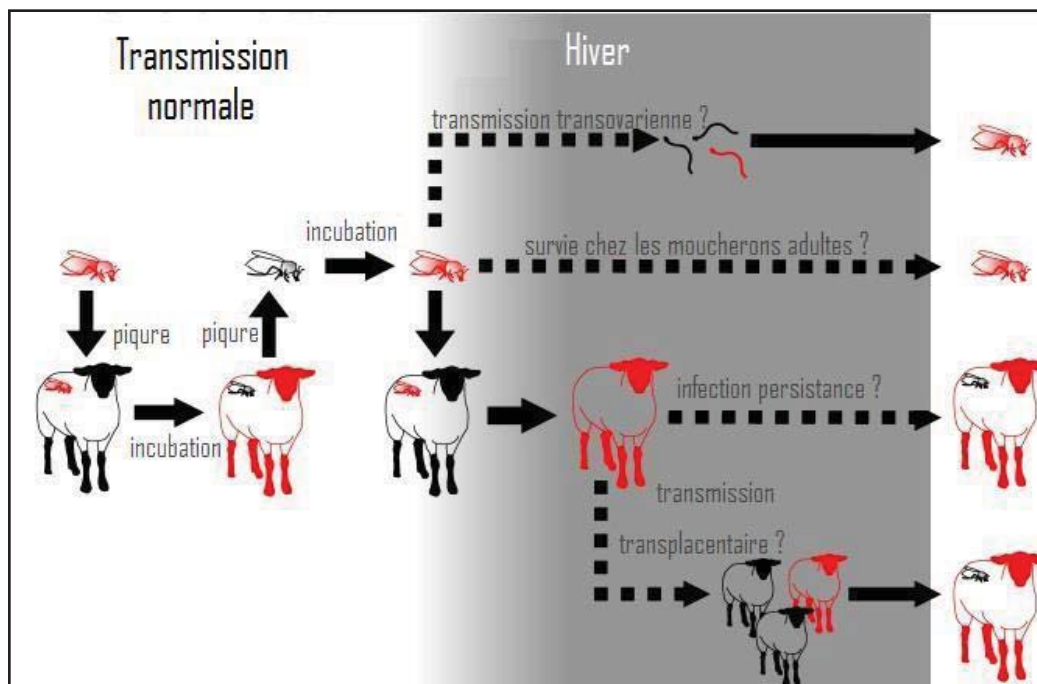


**Carte 11** : Dates de reprise de l'activité des culicoïdes en France en 2009  
(D'après [Afssa 2010])

Les Culicoïdes ne sont donc pas actifs toute l'année, en effet la température joue un rôle important dans la capacité vectorielle : ils ne sont généralement pas actifs en-dessous de  $13^{\circ}\text{C}$  et au-dessus de  $35^{\circ}\text{C}$ , et meurent rapidement à  $-3^{\circ}\text{C}$ . La réplication virale elle-même à  $15^{\circ}\text{C}$  n'est pas suffisante pour une éventuelle transmission et, à  $10^{\circ}\text{C}$ , aucune réplication n'est détectée [Albina et al. 2007]. Des modèles suggèrent même que le virus ne pourrait survivre plus de 100 jours à des conditions hivernales hostiles [Schwartz-Cornil et al. 2008]. Ainsi théoriquement, en Europe du Nord, il y a une période d'absence des vecteurs entre janvier et mars, et sans transmission virale entre mi-décembre et mi-avril [Darpel et al. 2008]. Le virus ne devrait donc pas pouvoir passer l'hiver.

Pourtant l'épizootie de 2006 nous a montré que le virus était capable de survivre aux hivers parfois rudes des pays européens, et ce en l'absence des vecteurs biologiques : c'est ce que l'on appelle couramment « Overwintering ». Plusieurs hypothèses ont depuis été émises (cf figure 12) :

- la persistance du virus au sein des vecteurs par passage transovarien et la persistance dans les larves. Or si une étude 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].
  - La persistance chez les adultes. Les moucheron ont une espérance de vie ne dépassant pas quatre semaines, mais on a montré que certains individus pouvaient survivre jusqu'à trois mois à 10°C en laboratoire. Un hiver doux ou la mise à l'abri dans des bâtiments pourrait alors permettre la survie de moucheron infectés.
  - L'infection persistante de certains animaux : on sait que certains individus peuvent rester infectieux jusqu'à deux mois, et que certaines lignées lymphocytaires, les  $\gamma\delta$  T, ainsi que les érythrocytes peuvent jouer le rôle de réservoir cellulaire [Brodie et al. 1998].
  - La transmission transplacentaire, qui a été démontrée pour le BTV-8 (cf plus haut)
- A l'heure actuelle les trois dernières hypothèses semblent les plus crédibles, mais aucune ne s'est encore imposée comme responsable de la recrudescence virale après l'hiver.



**Figure 12** : Les différents mécanismes d'overwintering envisageables

(D'après [Wilson et al. 2008])





# **PARTIE II :** **ETUDE EXPERIMENTALE**

## **I - Objectifs**

L'arrivée du BTV-1 en France en novembre 2007 a suscité une vive inquiétude dans le monde agricole, qui faisait déjà face à une épizootie de BTV-8.

Peu, voire pas, de données existaient alors sur l'origine du virus BTV-1 présent et son réel pouvoir pathogène. Par ailleurs un vaccin inactivé contre le BTV-1 était commercialisé à l'époque mais son efficacité avait été évaluée contre une souche d'épreuve isolée en Afrique du Nord en 2006.

Les objectifs de ce travail étaient de mieux caractériser le virus BTV-1 présent dans le Sud-Ouest à partir de 2007 et d'évaluer la protection induite par un vaccin commercial contre une souche circulante de BTV-1. Pour le premier objectif nous nous sommes intéressés à retracer l'origine phylogénétique du virus, en séquençant le gène codant VP2 de différents isolats de terrain provenant de plusieurs espèces de ruminants. Dans un modèle d'infection expérimentale, nous avons par la suite étudié le pouvoir pathogène de ce virus chez le mouton, espèce la plus sensible à l'infection par le BTV. Disposant d'un modèle d'épreuve expérimental, nous avons testé l'efficacité d'un vaccin commercialisé sur une nouvelle souche de BTV-1, isolée lors de l'épizootie en France en 2007-2008.

## **II – Matériels et méthodes**

### **A – Cultures cellulaires**

Les cellules de fibroblastes de rein de bébé hamster BHK 21 (n°ATCC = CCL10) ont été utilisées pour cultiver le BTV. Ces cellules ont été entretenues à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> en milieu de culture composé de 500 mL de Milieu Essentiel Minimum modifié par Dubellico (DMEM) additionné de 5 ml d'acides aminés non essentiels (AANE) 100X, de 5 mL de pénicilline à 10000 U/mL, de streptomycine à 10000 U/mL. Lors de l'entretien des cellules, 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) sont ajoutés au milieu DMEM base.

## **B - Isolement du virus BTV-1 à partir d'échantillons de terrain**

### 1 – Nature et traitement des échantillons

Les isolats de virus ont été obtenus lors de l'épizootie à BTV-1 sévissant dans le Sud-Ouest de la France en 2008, à partir de prélèvements de sang sur EDTA ou de rates. Ces prélèvements provenaient de différentes espèces de ruminants incluant des ovins, caprins, bovins, un cerf, trois lamas et un yack. Ils ont été aimablement envoyés le plus rapidement possible à l'ENVT sous couvert du froid positif par le laboratoire vétérinaire départemental de l'Ariège, la fédération de chasse de l'Ariège ou les confrères praticiens.

Les leucocytes ont été récupérés à partir des sangs frais EDTA à leur arrivée, selon le protocole suivant: le sang est dilué au 1/3 en tampon hypertonique ACK ( $\text{NH}_4\text{CL}$ , 0,15 M ;  $\text{KHCO}_3$ , 1mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,1 mM) pendant 5 minutes à température ambiante pour lyser les globules rouges. Après centrifugation (5 min, 2500 tours par minute) la fraction leucocytaire est lavée 2 fois en milieu PBS, puis reprise dans 2 mL de PBS. Avant conservation à  $-80^\circ\text{C}$ , les leucocytes sont comptés et aliquotés en microtubes de 1,5 mL à raison de  $10^6$  cellules par mL. Pour les rates, un broyat a été réalisé selon les méthodes classiques en milieu DMEM base (3 mL). Chaque broyat est filtré sur gaze puis le milieu est récupéré et conservé à  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2 – Isolement viral

L'isolement viral a été réalisé à partir des leucocytes sanguins ou broyats de rate sur cellules BHK-21. Les échantillons non dilués et dilués au  $1/5^e$ ,  $1/20^e$ ,  $1/50^e$  et  $1/100^e$  dans du milieu DMEM base ont servi à infecter des cellules BHK-21 réparties en plaques à 6 puits ( $10^6$  cellules/puits). Les échantillons (500  $\mu\text{L}$  des différentes dilutions) ont été mis en présence des BHK-21 pendant 2 heures à  $37^\circ\text{C}$ . Le milieu d'infection est ensuite enlevé et remplacé par du milieu DMEM base additionné de 4% de sérum de cheval. Un effet cytopathique est recherché pendant 7 jours post-infection. En l'absence d'effet cytopathique, trois passages en aveugle sont réalisés en cellules BHK-21 au maximum pour chaque échantillon. Pour cela, les cellules infectées de 7 jours ont subi 2 cycles de congélation/décongélation à  $-80^\circ\text{C}$ , puis on utilise 500  $\mu\text{L}$  de la solution cellulaire comme

inoculum pour infecter des cellules BHK-21 fraîches selon le même protocole que précédemment.

### 3 – Nature et caractérisation des virus isolés

#### a. Caractérisation par immunohistochimie

La confirmation de la présence de virus BTV a été obtenue par immunohistochimie sur les cellules présentant un effet cytopathique. Pour cela une partie des cellules infectées est fixée en présence d'acétone 90%, maintenu à -20°C, pendant 15 minutes. Après élimination de l'acétone, les cellules sont conservées à -80°C. La détection du virus BTV a été réalisée de la façon suivante : le marquage primaire a été réalisé pendant une heure à 37°C à l'aide d'un sérum polyclonal standard (dilution 1/50<sup>ième</sup>) provenant d'un bovin infecté par le BTV. Le sérum a ensuite été éliminé et les puits rincés 2 fois avec du PBS. Le conjugué secondaire (anticorps anti IgG bovines, DAKO, dilution 1/100<sup>ième</sup>), marqué à la peroxydase, a été distribué à raison de 200 µL par puits pendant 30 minutes à 37°C. Après trois rinçages des plaques avec du PBS, 200 µL de substrat (Amino Ethyl Carbazole, DAKO) ont été distribués dans chaque puits, 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 optique. Les contrôles sont les suivants : des cellules BHK21 seules marquées selon le même protocole (témoin négatif), des cellules infectées par une souche de référence du BTV-1 et marquées selon le même protocole (contrôle positif) et des cellules infectées par une souche de référence du BTV-1 marquées uniquement par le conjugué et sans marquage par le sérum polyclonal anti-BTV (témoin négatif).

#### b. Caractérisation par RT-qPCR

Les isolats sélectionnés par immunohistochimie ont ensuite été caractérisés par 3 trousse commerciales de RT-PCR en temps réelle. La première (Taqvet BTV all genotypes, Lsi, Lissieu, France) détecte les 24 sérotypes de BTV en ciblant le gène L1 codant l'ARN polymérase virale. Les 2 autres trousse (Taqvet BTV-1 et Taqvet BTV-8, Lsi, Lissieu,

France) détectent spécifiquement le BTV-1 ou le BTV-8 en ciblant le gène codant la protéine VP2.

Par ailleurs une RT-PCR (kit BVDV panpesti, Lsi, Lissieu, France) ciblant les virus de la diarrhée virale bovine (BVD) et de la maladie des frontières (BDV) a été utilisé pour confirmer l'absence de contaminations des cellules par un pestivirus.

#### 4 – Amplification et conservation des isolats viraux

Les isolats viraux ont été amplifiés sur cellules BHK21 en milieu DMEM + 4% de sérum de cheval, à raison de 4 à 7 passages selon les échantillons. Brièvement, les virus ont été cultivés dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> (F25) de cellules BHK-21. A chaque passage, 1 mL d'inoculum viral 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 4% de sérum de cheval + 1% de fungizone. L'effet cytopathique est vérifié à chaque passage. Ils ont été conservés à -80°C pour chaque passage en cultures cellulaires.

### **C – Etude phylogénétique des souches isolées**

#### 1 – Sélection des isolats viraux

Parmi les virus BTV-1 isolés lors de l'épizootie, 8 isolats ont été sélectionnés pour une analyse phylogénétique du gène L2, codant la protéine VP2 de la couche externe. Ces isolats proviennent de prélèvements de mouton, chèvre, vache, lama, yack et cerf. (Tableau 6). Ils ont été séquencés à partir des prélèvements d'origine, sans passages en cultures cellulaires.

Référence	Echantillon	Origine
LVD4508	Sang EDTA	Ovin
80052-Reich	Sang EDTA	Ovin
08-1018	Sang EDTA	Bovin
08- 1063	Sang EDTA	Bovin
60006	Sang EDTA	Caprin
08-1091	Rate	Lama
08-1130	Rate	Yack
31-228	Rate	Cerf

**Tableau 6 :** Isolats sélectionnés pour l'étude phylogénétique

## 2 – Sélection des amorces pour l'amplification et le séquençage du gène L2

Pour l'étude phylogénétique, nous avons choisi de séquencer le gène L2 codant la protéine variable VP2. Cette protéine est en effet responsable de la production d'anticorps neutralisants et elle est à l'origine de la définition des sérotypes du BTV, sur la base de réactions de séroneutralisation croisée. Le gène L2 (2880 nucléotides) est le plus variable entre les sérotypes de BTV. Différentes amorces (20 à 24 mers) chevauchantes ont été dessinées pour amplifier le gène L2, en partant des séquences BTV-1 déjà disponibles dans les banques de données (Tableau 7, en noir). Pour pallier des trous existants dans la séquence, pour corriger les séquences des amorces utilisées et pour affiner la lecture, des amorces spécifiques ont été dessinées à partir des séquences obtenues au cours de ce travail (Tableau 7, en rouge).

Les amorces en rouge ont été sélectionnées à partir de la séquence du gène L2 de la souche BTV-1 MOR200606 (PUBMED 18570969) et vérifiées sur les séquences obtenues de la souche BTV 1 LVD-4508. Les amorces sélectionnées sont décrites dans le tableau.

	Nom	Position sur le gène L2	Séquence	PCR (longueur du fragment amplifié en nt)
L	S2s1P	1-24	GTAAAATAGTAGCGGATGGAATG	528
	S2s4M	528-508	TATTCGTACTAGGTGATTTC	
A		495-515	AAGGGGTGTTTGCATACGAG	638
		1132-112	TCCGATGCAATTAAGGTTCC	
B		1074-1094	ACACGAGTGTGGTGGTCAAA	479
		1552-1532	GTTACGCCTTCGTTGGTTGT	
C		1318-1338	CCACCCGGGAGATAACCTAT	890
		2207-1987	GGCGCTGTTTAACCCATTTA	
D		1983-2003	GCGGACCATGAACTTGAAT	819
		2801-2781	ACACACCCGATGAGACACAA	
T	S2BT1P1	2203-2220	GCGCCACCGTAGTGCAGG	737
	S2BT1P2	2245-2265	CATTGTATTTTTTGGTAGGCG	
	S2BT1M1	2940-2921	GTAAGTCTAATAGTGCGCG	
	S2BT1M2	2922-2902	GGATCTGCGGTCAAGCAGATC	

**Tableau 7 :** Amorces sélectionnées pour le séquençage de L2. En noir amorces déduites des banques de séquence, en rouge amorces déduites des banques et corrigées sur les séquences obtenues. Les amorces déduites des séquences des banques ont été relues et corrigées si besoin

Différentes combinaisons de couples d'amorces ont permis d'amplifier l'ensemble du génome : les amorces de PCR ont été également utilisées pour le séquençage des fragments chevauchants L, A, B, C, D sauf les amorces S2BT1P2 - S2BT1M2 qui sont spécifiquement utilisées pour le séquençage de l'extrémité 3' T.



### 3 – Extraction de l'ARN viral et RT-PCR

L'ARN viral a été extrait à partir des prélèvements d'origine ou, en cas de résultats négatifs, au 3<sup>ième</sup> passage en cultures cellulaires en utilisant le kit Nucleospin RNA virus (Machery Nagel ref 740956.250), selon le protocole du fournisseur, à partir de 100µL de solution de rate broyée ou de leucocytes. L'amplification a été réalisée en utilisant le kit One-step RT-PCR (Qiagen) selon le protocole du fournisseur, avec 5µL d'ARN. Les étapes de transcription inverse et de polymérisation ont été réalisées dans le même tube et avec un seul couple d'amorce. Le kit One-step contient un mélange d'enzymes : les enzymes de transcription inverse Omniscript et Sensiscript qui permettent une réaction sensible (< à 50 ng d'ARN) et spécifique ; et La HotStarTaq DNA Polymerase. Cette Taq ADN polymérase est une enzyme chimiquement modifiée pour être inactive pendant l'étape de transcription inverse, puis activée par la chaleur lors de l'amplification de l'ADN complémentaire (ADNc).

Le programme de PCR est le suivant :

- 30 min à 50°C pour la transcription inverse
- 15 min à 94°C pour une destruction des transcriptases inverses et une activation de l'ADN polymérase
- 35 cycles d'amplification (30s à 94°C ; 30s à 56°C, 30s à 72°C), avec une élongation de 10 min à 72°C

Les produits obtenus ont été directement envoyés à séquencer sans purification.

### 4 – Séquençage et analyse des séquences du gène L2

Le séquençage a été réalisé par la société Millegen (Labège, France). La réaction de séquençage se fait selon la méthode de Sanger, grâce au kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) sur des séquenceurs automatiques à capillaires ABI 3130 XL ou 3730XL (Applied Biosystems). Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel Lasergene-DNA Star et des programmes SeqMan et SeqTree. L'alignement des séquences a été réalisé via le programme Clustal V du logiciel DNA Star (Multiple alignment parameters Gap penalty 15, Gap length penalty 6.66, Delay divergent seqs 30%, DNA transition weight 0.5). Les arbres phylogénétiques ont été construits via le programme Tree.

## D – Etude du pouvoir pathogène de la souche LVD-4508

### 1 – Protocole expérimental

#### a. Sélection des animaux utilisés et formation des groupes

Quatorze agneaux mâles de race Lacaune, âgés de 3-5 mois, provenant d'un élevage indemne de FCO, ont été sélectionnés pour l'expérimentation. Les animaux ont été vérifiés indemnes d'infection à BTV par RT-qPCR (Taqvet all genotypes, LSi) et par séroneutralisation (cf infra) jusqu'au début de l'expérimentation (J0). L'essai a eu lieu dans les unités expérimentales de niveau 2 de l'ENVT. Trois groupes ont été définis, un groupe *sentinelles* (4 agneaux) non vacciné et non infecté, un groupe *BTV-1* (5 agneaux) non vacciné et infecté par la souche LVD4508 du BTV-1 et un groupe *Vac BTV-1* (5 agneaux) vacciné contre le BTV-1 et infecté par la souche LVD-4508. Les animaux ont été répartis dans deux loges séparées physiquement, deux moutons sentinelles étant répartis dans chaque loge.

#### b. Protocole de vaccination

La vaccination a eu lieu grâce à deux injections à 21 jours d'intervalle. Le premier jour de vaccination est considéré comme le début de l'expérimentation : le jour 0 (J0). Les animaux ont été vaccinés au moyen du vaccin BTV-1 Zulvac 1 ovins (Fort Dodge) selon les recommandations du fabricant, soit à raison de 2 ml par voie sous-cutanée dans l'encolure. Ce vaccin contient la souche BTV-1/ALG 2006/01E1 inactivée avec une charge virale  $> 10^{6,7}$  TCID<sub>50</sub> par dose vaccinale.

#### c. Inoculation d'épreuve

##### ➤ **Amplification de la souche virale d'épreuve BTV-1 LVD-4508 :**

La souche virale utilisée est la souche BTV-1 LVD-4508, isolée au laboratoire en 2008. Aucun clonage biologique n'a été réalisé. Des tests de détection ont montré l'absence de contamination par les pestivirus BVDV et BDV. Cette souche virale a été utilisée au 6<sup>ième</sup> passage en cellules BHK21 pour la préparation de l'inoculum. Elle titrait à  $9.10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL. Brièvement, le titre viral a été obtenu par infection de cellules BHK21 en plaques 96 puits

avec des dilutions successives (ordre 10) de virus. Six puits ont été infectés pour chaque dilution et le titre viral a été calculé selon la méthode de Spearman-Kärber, correspondant à la dilution induisant un effet cytopathique de 50% des puits. Le titre est exprimé en TCID<sub>50</sub>/mL (Tissue Culture Infective Dose).

➤ **Préparation de l'inoculum viral :**

L'inoculum a été préparé par injection sous-cutanée de 2 moutons avec 10 mL du virus BTV-1 (6<sup>ième</sup> passage en cellules BHK-21) titrant à  $9.10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL. La virémie a été suivie tous les jours par RT-PCR en temps réel (Kit Taqvet BTV all genotypes, Lsi, France). Six jours après l'infection (pic de virémie), 500mL de sang par mouton ont été récupérés dans une poche commerciale de transfusion et conservés à +4°C pendant 2 jours. Les sangs avaient un Ct de 22,6 et 23,7 correspondant respectivement à  $5,4 \times 10^6$  et  $1,9 \times 10^6$  copies d'ARN/mL de sang. Le mélange des deux sangs a ensuite été utilisé pour inoculer deux moutons indemnes d'infection à BTV, par voies sous-cutanée (10 mL) et intraveineuse (2mL). Le sang d'un des deux moutons a été récupéré 6 jours plus tard (pic de virémie) et a servi d'inoculum pour l'expérimentation. Cet inoculum avait un Ct de 21,8 correspondant à  $8,39 \times 10^6$  copies d'ARN viral/mL de sang. Un inoculum témoin a été réalisé avec des moutons infectés avec 10 mL de milieu de culture cellulaire. Du sang vironégatif a été récupéré à J6 sur les deux animaux inoculés.

➤ **Inoculation d'épreuve :**

L'inoculation d'épreuve a eu lieu à J45, soit 24 jours après la deuxième injection de vaccin, par voies sous-cutanée (15 mL) et intraveineuse (2 mL), pour les groupes *BTV-1* et *Vac BTV-1*. Les animaux ont été euthanasiés en fin d'expérimentation (J66) sauf un animal qui a été euthanasié à J60 pour des raisons éthiques, à l'aide d'une anesthésie générale sous pentobarbital sodique (15 mg/kg) et d'une saignée. Un examen nécropsique a été réalisé.

## 2 – Suivi clinique

Un suivi clinique a été réalisé de J42 à J65 par le même examinateur deux fois par jour. Le suivi clinique comprenait une mesure de la température et la notation des signes cliniques selon une grille utilisée par la majorité des équipes de recherche travaillant sur la

FCO en France. Un score final est attribué à chaque mouton pour chaque jour selon le tableau suivant (Tableau 8) :

<b>Signes cliniques</b>	<b>interprétation</b>	<b>Score</b>
Comportement	normal	0
	apathique	1
	déprimé	2
	prostré	3
Œdèmes	face	1
	auge	1
	Testicules./vulve	1
	paupière	1
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
Amaigrissement		1 à 3
TOTAL		

**Tableau 8** : Grille de scores cliniques

### 3 – Suivi virologique

Le suivi virologique a été réalisé sur tous les animaux à J-5, J0, J21, J43 afin d'identifier une infection par une souche sauvage puis tous les deux jours de J45 (inoculation d'épreuve) à J65. Après extraction de l'ARN à partir des prélèvements sanguins (EDTA) à l'aide du kit Nucleospin Macherey Nagel (Düren, Allemagne), la détection du BTV a été réalisée à l'aide d'une RT-PCR quantitative sur le gène L1 du BTV au moyen du kit Taqvet all genotypes (LSI, Lissieu, France) avec le thermocycleur Applied Biosystem 7000 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA). Ce kit est ciblé sur le gène L1, très conservé entre les différents sérotypes du BTV, qui code l'ARN polymérase virale. Le seuil de détectabilité est estimé par le fabricant à 7 copies d'ARN viral. 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. La gamme est obtenue à partir d'un plasmide contenant l'amplicon généré par la PCR LSI Taqvet (aimablement fourni par E. Sellal, LSI, Lissieu, France). Le protocole expérimental est expliqué à l'annexe 1. Les résultats ont été analysés avec le logiciel SDS v1.2.

### 4 – Suivi sérologique

Le suivi de la réponse immunitaire humorale a été réalisé à J-5, J0, J21, J43, puis tous les 2 jours de J45 à J66 d'une part par détection par ELISA des anticorps dirigés contre la protéine VP7 ou contre la protéine non structurale NS1, et d'autre part par séroneutralisation.

#### a. Tests ELISA

Deux tests ELISA ont été utilisés :

➤ Le premier est un ELISA dit de compétition qui détecte les anticorps dirigés contre la protéine VP7 du BTV (test ID Screen® Blue Tongue Competition (ID-Vet, Montpellier, France)). Ce test permet de détecter tous les sérotypes du BTV, la protéine VP7 étant une protéine très conservée.

Les puits sont sensibilisés avec la protéine VP7. Les anticorps anti-VP7, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps qui masque les épitopes de la VP7. Un conjugué

anti-VP7 marqué à la peroxydase (POD) est distribué dans les puits. 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 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. Ainsi, plus grande est la teneur en anticorps de l'échantillon, plus faible est la quantité de conjugué anti-VP7 marqué qui sera capable de se lier aux antigènes du puits, d'où le terme de « compétition ».

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. 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.

➤ Le second test utilisé est un ELISA de compétition qui détecte les anticorps dirigés contre la protéine non structurale NS1 du BTV. Ce test, de fabrication récente, permet en théorie de séparer les animaux infectés des animaux vaccinés (stratégie DIVA). En effet la pureté des vaccins inactivés contre la FCO implique théoriquement l'absence de protéines non structurales dans la préparation vaccinale et donc l'absence d'induction d'une réponse anticorps contre cette protéine. Un animal positif à l'ELISA VP7 et négatif à l'ELISA NS est donc un animal vacciné non infecté.

L'interprétation des résultats se fait de la manière suivante :

- < 40% de compétition : test positif
- Entre 40% et 60% de compétition : test douteux
- > 60% de compétition : test négatif

## b. Test de séroneutralisation

La séroneutralisation consiste à évaluer l'aptitude d'un sérum à bloquer la capacité infectieuse d'un inoculum (anticorps anti-VP2). Elle détecte donc les anticorps neutralisants, anti-VP2 pour la FCO. Le test utilisé était un test de neutralisation à quantité de virus constante. Pour cela des dilutions décroissantes d'un facteur 2 des sérums à tester ont été réalisées. Brièvement les dilutions ont été mises en contact avec du BTV-1 à quantité de virus constante (150 UFP pour  $10^5$  cellules) pendant une heure à 37°C. Le mélange sérum/BTV-1 a été déposé (100  $\mu$ L) en quadriplate sur cellules Vero ( $10^5$  cellules). Après 2 heures d'absorption, le milieu est remplacé par un milieu de culture DMEM + 1% pénicilline-streptomycine + 3% de HS. Les puits sont analysés 5 jours après pour leur effet cytopathique ou non. Le titre en anticorps neutralisants est calculé et exprimé en ED50/mL selon la méthode de Spearman-Kärber.

## E – Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées pour les données de température rectale, score clinique, charge virale sanguine (déterminée par RT-PCR quantitative) 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 (ANOVA, splitplot). Si l'interaction « groupe » et « jour » était significative, des comparaisons multiples entre groupes ont été effectuées avec un test de Bonferroni. Les données ont été définies statistiquement significatives si la valeur p était inférieure à 0,05.

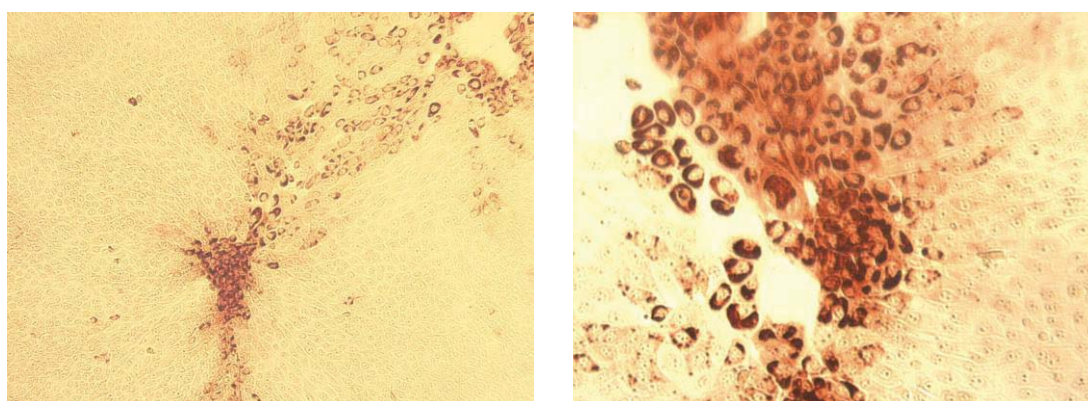


### III – Résultats

#### **A – Obtention et identification des isolats de terrain**

Au total, 32 échantillons de sang ou de rates ont été envoyés au laboratoire de l'ENVT lors de l'épizootie de BTV-1 en 2008. Un échantillon provenait d'une autopsie d'un yack (zoo de Plaisance du Touch), 2 échantillons provenaient de cervidés (Fédération de chasse de l'Ariège), 4 échantillons provenaient d'autopsie de lamas, réalisées à l'ENVT, et 25 prélèvements avaient été envoyés par des praticiens vétérinaires dont 4 échantillons caprins, 14 ovins et 7 bovins. Sur ces 32 échantillons, il a pu être identifié un effet cytopathique pour 22 prélèvements, 3 au premier passage (2 ovins et 1 bovin) en cellules BHK-21, 7 au 2<sup>ième</sup> passage (3 ovins, 3 bovins, 1 lama) et 12 au 3<sup>ième</sup> passage (1 lama, 1 yack, 1 cerf, 2 caprins, 5 ovins et 2 bovins).

Dans un premier temps l'effet cytopathique a été confirmé comme étant du virus BTV par immunohistochimie (Photographie 5). L'utilisation des 3 trousse de diagnostic par RT-qPCR, tous sérotypes et spécifiques BTV-1 ou BTV-8 a par la suite permis de confirmer que tous les isolats appartenaient au sérotype 1 du BTV (Tableau 9).



**Photographie 5 :** Effet cytopathique de l'isolat LVD4508 sur cellules BHK21, confirmé par immunohistochimie

echant.	Nom	Origine	Date extraction	Date run PCR	BTV all genotypes	BTV1 spécifique	BTV8 spécifique
					Ct	Ct	Ct
1	EL 21	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	14,81	15,54	>40
2	EL 22	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	14,59	18,01	>40
3	EL 24	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	15,07	16,84	>40
5	08-1091 R	Lama	06/11/2008	10/11/2008	13,15	13,33	>40
6	08-1092 R	Lama	06/11/2008	10/11/2008	13,72	18,31	>40
7	08-1093 R	Lama	06/11/2008	10/11/2008	12,92	13,61	>40
8	LVD 4508	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	14,09	14,75	>40
9	87	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	20,07	21,69	>40
10	99	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	14,54	15,05	>40
11	lama 2	Lama	06/11/2008	10/11/2008	13,83	14,69	38,8
12	lama 3	Lama	06/11/2008	10/11/2008	13,84	16,84	>40
13	08-1130	Yack	06/11/2008	10/11/2008	15,72	20,77	>40
14	60006	Caprin	06/11/2008	10/11/2008	14,18	15,97	>40
15	LVD 6894	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	15,71	19,06	39,3
16	31228	cerf	06/11/2008	10/11/2008	11,76	13,23	>40
17	80052	Ovin	06/11/2008	10/11/2008	16,04	19,4	>40
18	08-1018	Bovin	06/11/2008	10/11/2008	16,58	18,32	>40
19	08-1063	Bovin	06/11/2008	12/11/2008	18,13	19,19	>40
20	08-1021	Bovin	06/11/2008	12/11/2008	18,68	19,69	>40
21	7042	Ovin	06/11/2008	12/11/2008	16,81	18,74	>40
22	5527	Ovin	06/11/2008	12/11/2008	16,14	17,8	>40
T+	Témoins +			10/11/2008	25,79	30,95	27,84
<b>valeur cible :</b>					24,3 +/- 2Ct	27 +/- 2Ct	25 +/- 2Ct

**Tableau 9** : Résultats des RT-qPCR, exprimés en Ct pour les 3 trousse de diagnostic, pour les échantillons de terrain

Par la suite 8 isolats de terrain ont été utilisés pour les analyses phylogénétiques. La détection par RT-PCR ou PCR (ENVT ou LVD82) du virus de la diarrhée virale bovine (BVD), du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (BoHV-1), du coronavirus bovin, du parainfluenza 3 bovin et du virus respiratoire syncytial bovin s'est révélée négative pour ces échantillons.

## **B – Analyse comparative du gène L2 des différents isolats**

La séquence complète du gène L2 a été obtenue directement auprès des 8 isolats de terrain décrits précédemment. La séquence de VP2 de la souche LVD-4508 est longue de 2946 nucléotides et code un cadre ouvert de lecture de 956 acides aminés (Annexe 1). Elle présente des séquences communes à tous les gènes L2 des différents sérotypes viraux à savoir :

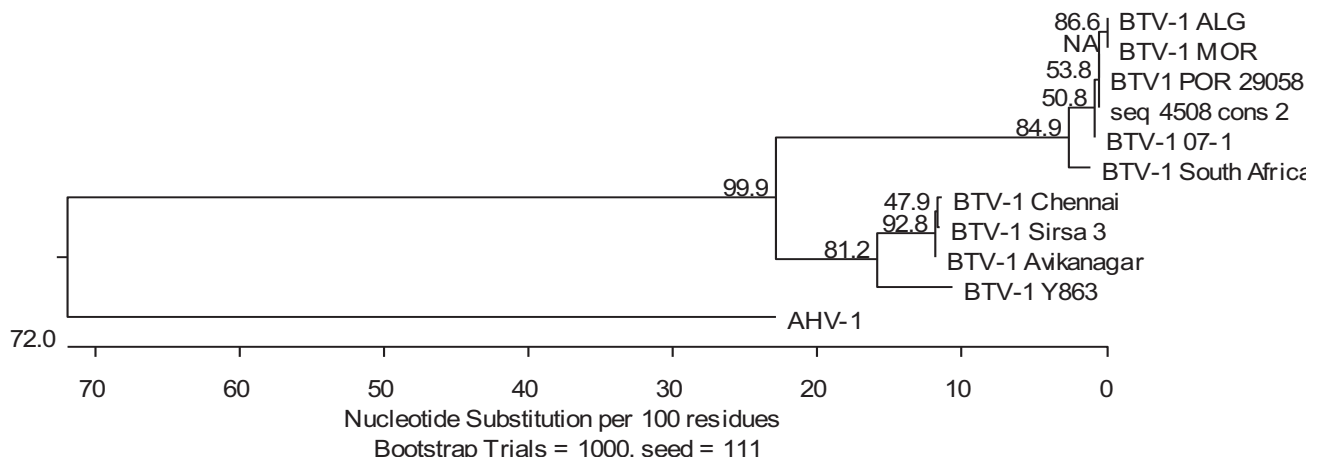
- l'hexanucléotide terminal 5' (5'-GUUAAA---) est conservé sur le brin positif entre les 24 souches de référence.

- l'hexanucléotide en 3' (---ACUUAC-3') est conservé avec toutes les souches sauf la souche référence du sérotype.
- Adjacents à ces hexanucléotides, de courtes séquences répétées et inversées sont observées. Elles pourraient être des signaux de reconnaissance intervenant dans la multiplication virale (réplication, transcription, ou encore traduction).
- L'existence d'un codon situé dans la région non-codante en aval (nucléotides 2911-2913), et dont la fonction est inconnue à ce jour.

Par ailleurs, malgré une forte divergence dans les séquences nucléotidiques, le profil d'hydrophobie et la position de certains résidus cystéine restent conservés entre les séquences L2 des différents sérotypes.

La comparaison des séquences consensus de VP2 des 8 isolats n'a pas montré de différences majeures. Seules deux mutations synonymes (sans changements d'acides aminés) ont été observées, une mutation TTG vers TTA (position nt 1715) sur la souche ovine 80052 et une mutation GCG vers GCA (position 2215) sur la souche bovine 08-1063, par comparaison avec les autres séquences obtenues. Dans la mesure où toutes les souches isolées présentaient la même séquence consensus de VP2, nous avons établi notre étude comparative en utilisant la séquence de la souche LVD-4508.

Une première analyse a été réalisée en comparant les séquences du BTV-1 disponibles dans les banques de données avec notre séquence LVD-4508. Seuls 541 nt communs étaient disponibles pour toutes les séquences, sur un total de 2946. Nous avons donc réalisé un alignement multiple sur ces 541 nucléotides en prenant la séquence VP2 de l'African Horse Sickness Virus (AHV, Orbivirus) comme séquence externe au BTV. Un arbre phylogénétique a été réalisé au moyen du logiciel DNA Star Lasergene (Graphique 2). Les résultats indiquent clairement que la souche LVD-4508 appartient à un embranchement contenant toutes les souches du rameau nord-africain et européen. Ce rameau diffère des souches Chennai, Sirsa, Y863 et Avikanagar isolées sur le continent asiatique (Inde et Chine).



**Graphique 2** : Comparaison du gène L2 de LVD-4508 avec celui des souches de BTV-1 précédemment isolées. Cladogramme réalisé par le programme Tree du logiciel Laser Gene DNASTar. BTV-1 07-1, France 2008, Ref FJ437557; BTV-1 POR, Portugal VVV, Ref EU498674; BTV1 ALG, Algérie Ref EU625361 ; BTV-1 MOR, Maroc, Ref EU625362 ; BTV-1 South-Africa, Afrique du Sud Ref FJ969720, BTV-1 isolate Chennai, Inde Ref AY559061; BTV-1 isolate Sirsa 3, Inde, Ref AY559060 ; BTV-1 isolate Avikanagar, Inde, Ref AY559058 ; BTV-1 strain Y863, Ref AF135217 (Chine), African horse sickness virus 1, Ref AM883165

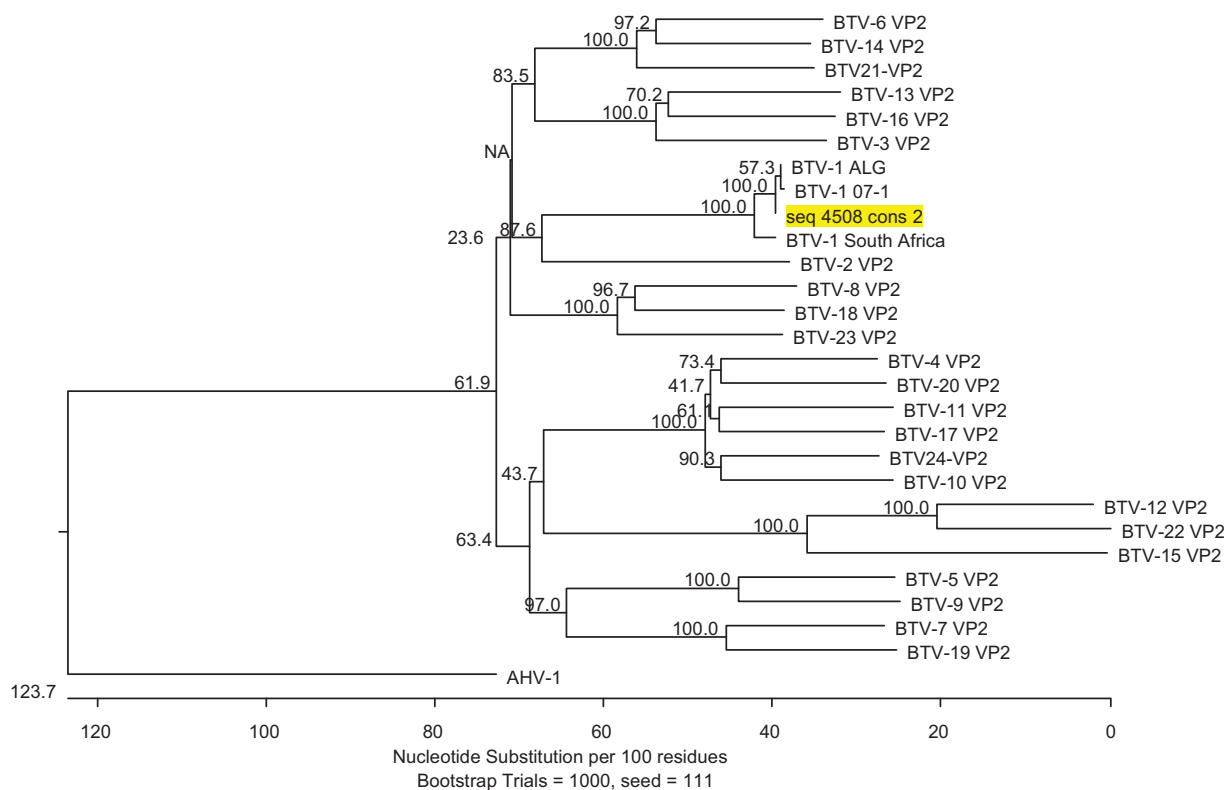
A l'intérieur du branchement nord-africain et européen, nous disposons des séquences complètes du gène L2. Par conséquent nous avons pu réaliser un alignement multiple sur les 2946 nt. La comparaison des séquences du gène L2 montre que la souche LVD-4508 corrèle parfaitement avec une souche isolée en France en 2007 (ANSES, 99,8 % identité), puis apparaît plus proche de la souche isolée au Portugal en 2005 (96,3% identité) et enfin des souches isolées en Algérie (93,1% identité) et au Maroc (92,9% identité) en 2005 et 2006.

Quand on compare notre souche LVD-4508 avec les deux souches isolées en Afrique du Nord, 9 substitutions synonymes et 4 non synonymes ont été détectées par comparaison avec l'isolat marocain BTV-1 MOR, et 8 substitutions synonymes et 3 non synonymes avec la souche algérienne BTV-1 ALG (Tableau 10).

Souche LVD4508	Souche MOR	Souche ALG
<b>Subst synonymes</b>	9/2946	8/2946
<b>Subst non synonymes</b>	GAA → GTA (pos 65) GLU → VAL  TAT → TTT (pos 1244) TYR → PHE  GCC → GCT (pos 1410) ALA → VAL  AAT → AGT (pos 1927) ASP → VAL	TAT → TTT (pos 1244) TYR → PHE  GCC → GCT (pos 1410) ALA → VAL  AAT → AGT (pos 1927) ASP → VAL

**Tableau 10** : Substitutions synonymes et non synonymes entre la séquence L2 de la souche LVD4508 et les souches MOR et ALG

Enfin la comparaison de la souche LVD-4508 du BTV-1 a été réalisée sur l'ensemble du gène L2 avec les souches de référence des autres sérotypes (Graphique 3). Suivant les sérotypes, on note entre 22,7% et 72,9% de variations dans la séquence d'acides aminés de VP2 avec notre séquence de la souche LVD-4508. La séquence N-terminale est particulièrement variable, et pourrait jouer donc un rôle majeur dans la détermination du sérotype viral. On constate que le sérotype 1 partage des similitudes avec le sérotype 2.



**Graphique 3** : Comparaison du gène L2 de la souche LVD-4508 avec celui des souches de référence des autres sérotypes ; cladogramme réalisé par le programme Tree du logiciel Laser Gene DNASTar

## C – Caractérisation du pouvoir pathogène de la souche LVD-4508 du BTV-1 et efficacité du vaccin Zulvac 1

### 1 – Validation du modèle d'épreuve et protection vaccinale clinique

Les agneaux ont été répartis en trois groupes, un groupe « *BTV-1* » infecté par le BTV-1 (agneaux n° 750, 4118, 724, 751, et 705), un groupe « *Vac BTV-1* » vacciné puis infecté (agneaux n° 596, 722, 753, 734 et 793) et enfin un groupe « *Sentinelles* » non vacciné et non infecté (agneaux n°521, 717, 635, et 720). Aucun signe clinique n'a été observé dans les 3 groupes jusqu'à l'inoculation d'épreuve. Par la suite les agneaux du groupe *Sentinelles* sont restés indemnes jusqu'à la fin de l'expérience

Après inoculation d'épreuve (J45), des signes cliniques sévères ont pu être observés chez tous les agneaux du groupe *BTV-1*, qui se caractérisaient par un syndrome fébrile sévère, un abattement plus ou moins intense, une baisse de l'appétit voire une anorexie, un œdème et une congestion de la face, de la bouche, des testicules et des sabots, du jetage nasal et de la dyspnée avec présence de râles à l'auscultation. Un mouton du groupe *BTV-1* a présenté en plus du ptyalisme, deux animaux ont présenté une cyanose de la langue et un animal avait des pétéchies sur les muqueuses buccales. Enfin deux moutons ont souffert de boiteries. A noter qu'un agneau (n°751) présentait des signes cliniques respiratoires modérés au moment de l'inoculation d'épreuve. Finalement un agneau (N°705) a dû être euthanasié pour des raisons éthiques 15 jours après l'inoculation (J60) en raison d'une atteinte sévère de l'état général (Photographie 6).

Pour le groupe *Vac BTV-1*, deux animaux ont montré des symptômes modérés, limités à une congestion des yeux associée à un épiphora sur 1 à 2 jours. Un animal (n°753) a en plus présenté de la toux dès J48 jusqu'à J52 avec une augmentation des bruits respiratoires et du jetage nasal. Un seul agneau du groupe (n°793) a présenté des symptômes réellement marqués avec une atteinte de l'état général, un syndrome fébrile, une congestion de la face, et ce pendant 3-4 jours.



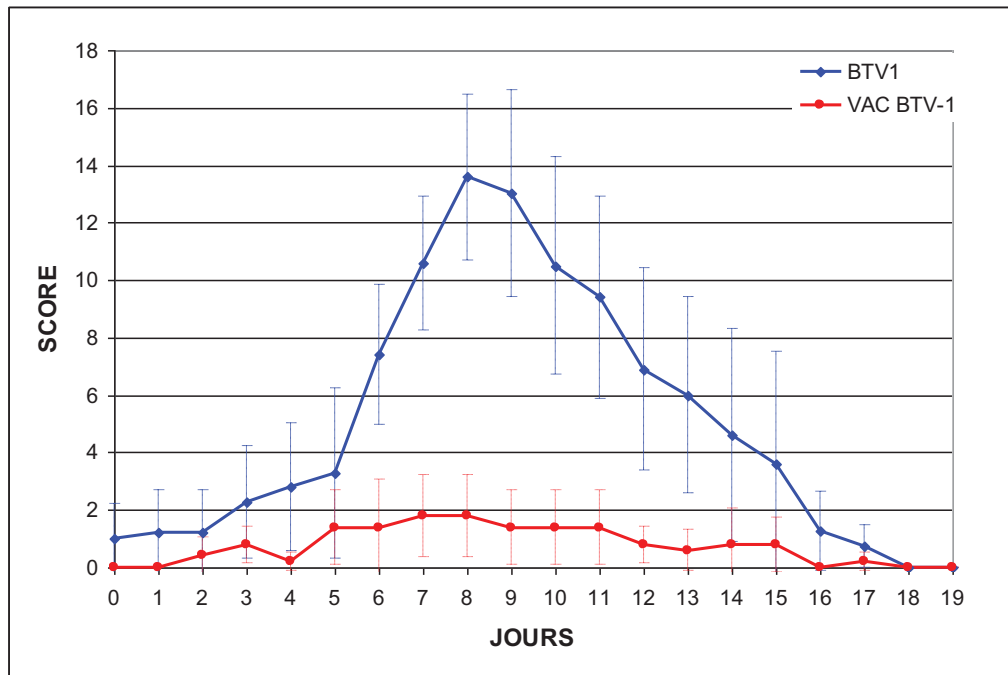


**Photographie 6 :** Manifestations cliniques observées chez les animaux infectés non vaccinés. A), B), C) congestion de la face et œdème de l'auge ; D) ulcérations hémorragiques sur la langue ; E) et F) abattement général (agneau euthanasié)

La moyenne des scores cliniques est présentée sur le graphique 4. Les symptômes ont commencé à apparaître dès le 3<sup>ème</sup> jour post-infection (J48) pour atteindre un pic de score

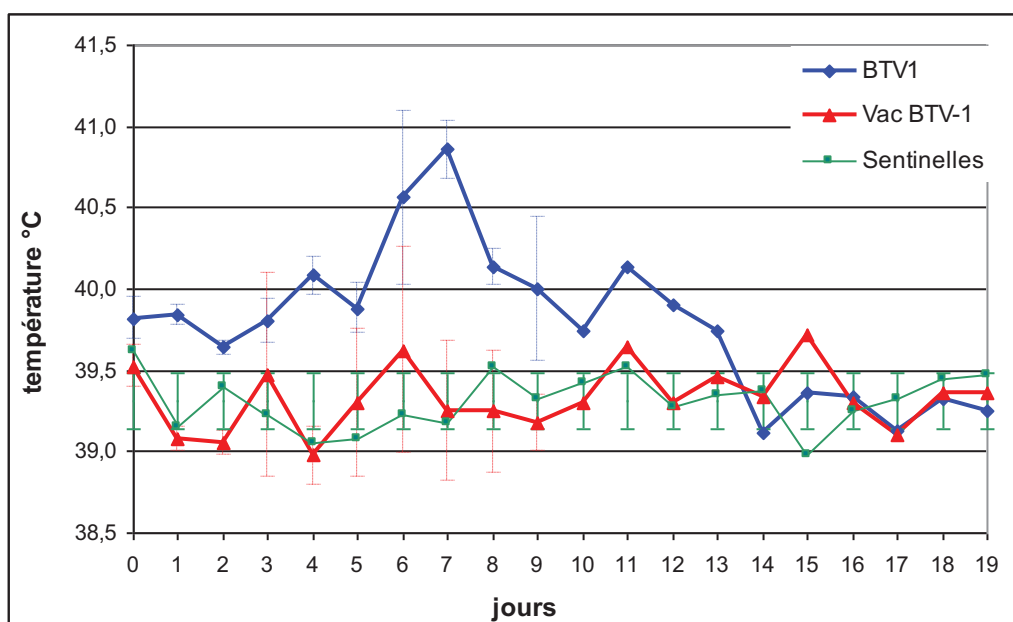


clinique de 13,6 à J53 pour le groupe *BTV-1*. La convalescence s'est ensuite faite plus lentement avec une disparition des signes cliniques à J61. Pour le groupe *Vac BTV-1* la moyenne des scores cliniques a oscillé entre 0 et 2, principalement en raison d'un mouton sur 5 qui a présenté une forme clinique plus marquée. Les analyses statistiques montrent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les groupes *BTV-1* et *Vac BTV-1* pour les jours 6 à 13 post-infection (J51 à J58).



**Graphique 4 :** Scores cliniques moyens après inoculation d'épreuve

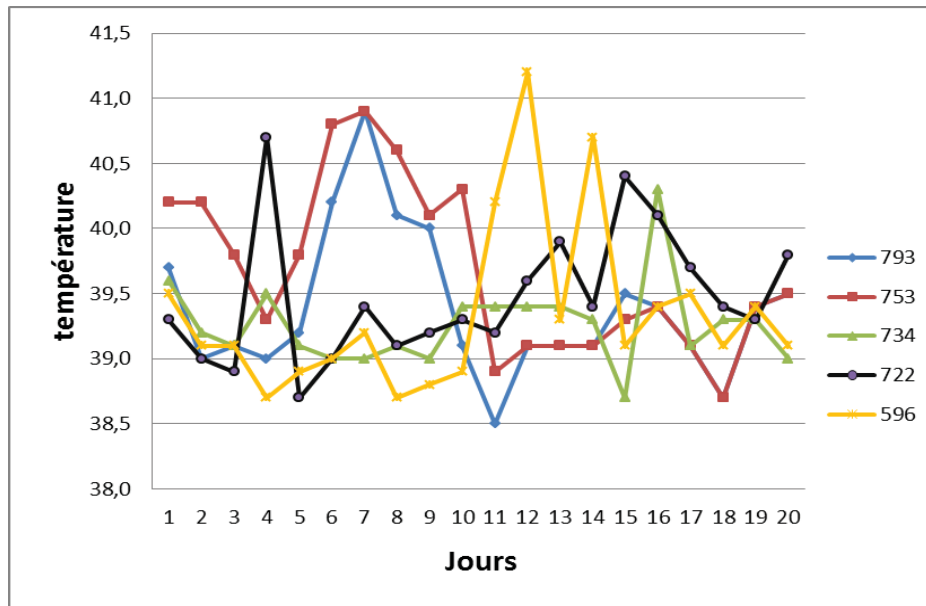
La température rectale est un critère souvent pris en compte individuellement par les firmes pharmaceutiques lors d'essais cliniques de protection vaccinale. Dans notre étude, nous avons représenté les moyennes des températures rectales pour chaque groupe sur le graphique 5. Nous avons considéré une hyperthermie lorsque la température rectale était supérieure à 40°C.



**Graphique 5 :** Evolution des températures rectales moyennes pour les trois groupes d'agneaux

Le graphique montre qu'en moyenne les groupes *sentinelles* et *Vac BTV-1* n'ont pas présenté d'augmentation nette de la température rectale durant l'expérimentation. La moyenne des températures du groupe *BTV-1* a en revanche augmenté 3 jours après l'inoculation d'épreuve (J48) pour atteindre un pic de 40,9°C, à 7 jours post-infection (J53). La température est ensuite descendue jusqu'à J10, avant de connaître un nouveau pic, plus modéré cette fois-ci : T = 40,1°C. Le retour à la normale s'est fait à partir de J12. Des différences significatives ont été observées entre les groupes *BTV-1* et *Vac BTV-1* pour les jours 4, 6, 7, 8, 9 et 11 après inoculation d'épreuve.

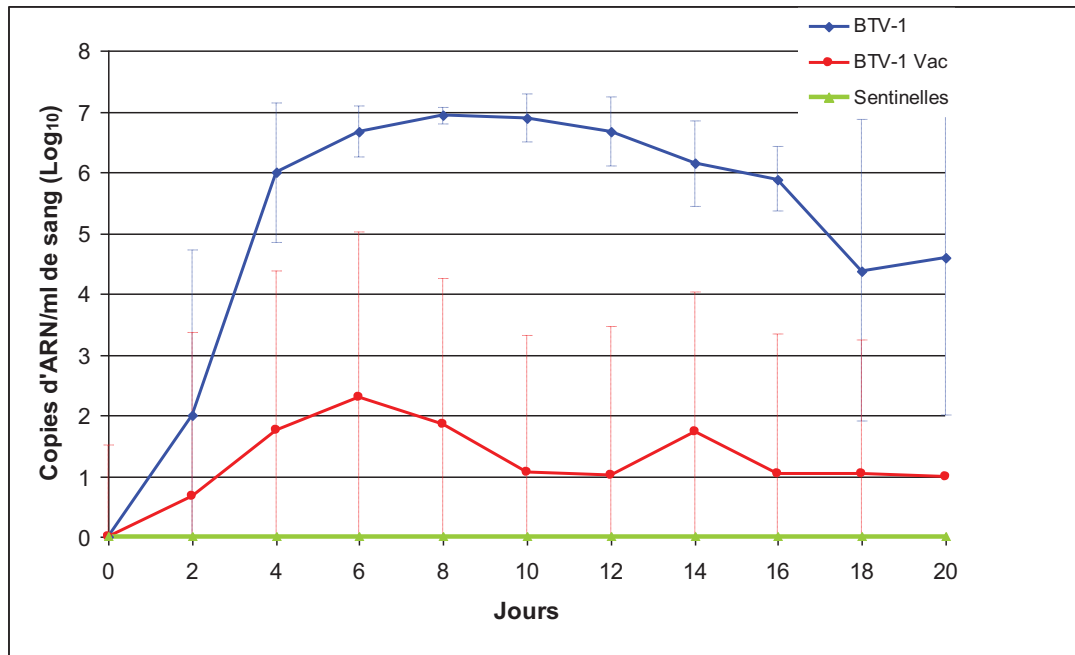
Concernant la température rectale, des variations individuelles importantes ont été observées principalement pour les agneaux du groupe *Vac BTV-1* (graphique 6). Tous les animaux de ce groupe ont en effet montré des températures > 40°C au moins un jour après l'infection expérimentale mais à des moments décalés. Deux agneaux (n°793 et 753) ont eu un pic d'hyperthermie de J6 à J9-J10 post-infection (Tmax de 40,9°C à J7). Un autre (n°596) a eu de l'hyperthermie de J11 à J14 (Tmax = 41,2°C à J12), un quatrième (n°722) à J4 (T= 40,7°C) puis de nouveau de J15 à J16 (Tmax = 40,4°C). Enfin le cinquième a dépassé les 40°C uniquement à J16 (T = 40,3°C).



**Graphique 6 :** Températures rectales individuelles des agneaux du groupe *Vac BTV-1*

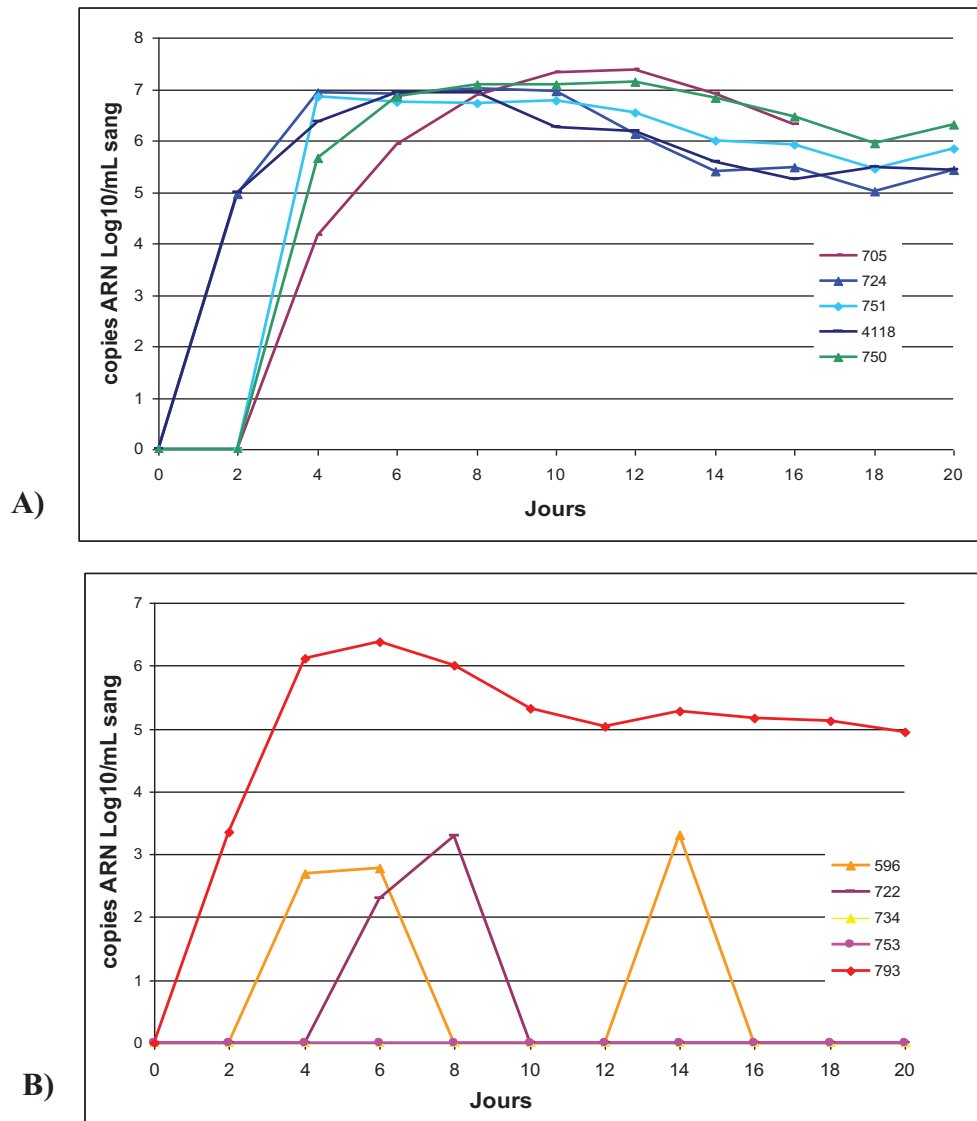
## 2 – Suivi de l’infection virale et protection vaccinale

Du virus BTV-1 a pu être détecté avec des charges virales importantes ( $> 6 \text{ Log}_{10}$  copies d’ARN/mL) chez tous les agneaux du groupe *BTV-1* (graphique 7), ce qui confirme l’efficacité du modèle d’épreuve. Le virus est présent dans le sang dès J4 pi et se multiplie pour atteindre un plateau d’environ  $7 \text{ Log}_{10}$  copies d’ARN/mL de sang entre J6 et J14 pi. La charge virale a alors diminué jusqu’à J20 pi. On note toutefois qu’à J20 pi les charges virales dans le groupe *BTV-1* sont en moyenne supérieures à  $4 \text{ Log}_{10}$  copies d’ARN/mL de sang. Des différences significatives entre les groupes *BTV-1* et *Vac- BTV-1* ont été observées entre J4 et J18 pi.



**Graphique 7 :** Détection du virus BTV-1 par RT-qPCR dans le sang des agneaux après inoculation d'épreuve

Dans le groupe *Vac BTV-1*, les niveaux de virémie sont restés globalement modérés entre 1 et 2 Log<sub>10</sub> de copies d'ARN/mL de sang. Deux "mini- pics" à 2,29 et 1,72 Log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL ont pu être observés à J6 pi et à J14 pi. Cependant, comme pour la température, une variabilité individuelle parfois très significative a été notée au sein du groupe *Vac BTV-1* (graphique 8). Notamment, l'agneau n°793 a développé une virémie beaucoup plus importante que les autres, avec une cinétique et des valeurs de charge virale équivalentes à celles du groupe *BTV-1* (pic à 6,38 Log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL de sang à 6 jours pi). Son titre viral s'est finalement maintenu autour de 5 Log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL jusqu'à J20. Un deuxième animal (n°722) a eu une virémie transitoire de 3 jours avec un pic à 3,3 Log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL à J8. Un troisième (n°753) a eu deux épisodes de virémie successifs : entre J4 et J6 avec un pic à 2,78 Log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL, et à J14 avec un pic à 3,3 Log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL.



**Graphique 8 :** Suivi de la virémie individuelle pour les groupes *BTV-1* (A) et *Vac BTV-1* (B) par RT-PCR

### 3 – Evaluation de la réponse immunitaire humorale

#### a. Résultats des tests ELISA

Les résultats des ELISA VP7 et NS1 sont synthétisés dans le tableau ci-après (tableau 11). Nous avons mis le détail de chaque groupe pour avoir une idée plus précise des réponses individuelles. Par contre nous n'avons pas fait apparaître les résultats du groupe *Sentinelles* qui sont restés négatifs jusqu'à la fin de l'étude.

		Vac BTV-1									
Jours pi	596		722		734		753		793		
	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	
0		Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
3	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
6	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
9	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
12	Douteux	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
15	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
18	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Douteux	Positif	
20	douteux	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Douteux	Positif	

		BTV-1									
Jours pi	705		724		750		751		4118		
	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	DIVA NS1	VP7	
0	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	
3	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	
6	Douteux	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Douteux	
8	Douteux	Négatif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
13	Positif	Positif	Négatif	Positif	Positif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	
16	Douteux	Positif	Négatif	Positif	Positif	Positif	Douteux	Positif	Négatif	Positif	
18			Négatif	Positif	Positif	Positif	Douteux	Positif	Négatif	Positif	
20			Douteux	Positif	Positif	Positif	Négatif	Positif	Douteux	Positif	

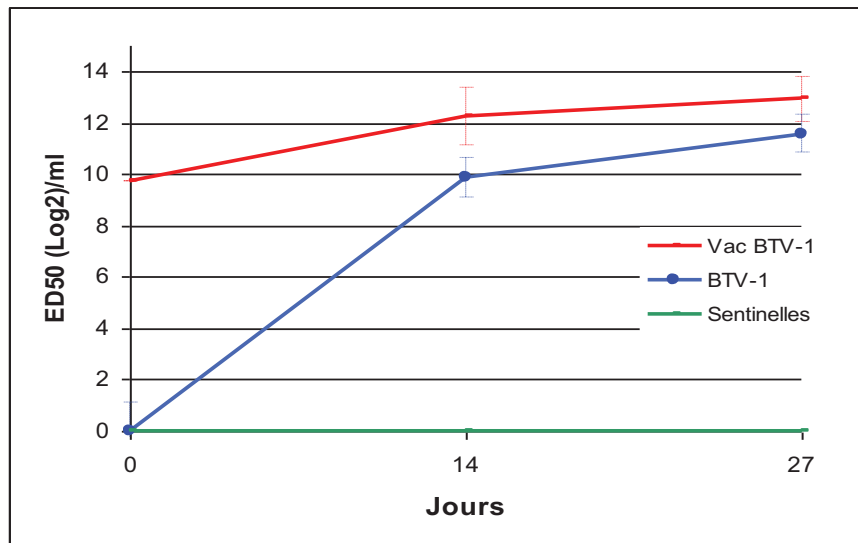
**Tableau 11** : Résultats qualitatifs des tests ELISA pour les 2 groupes infectés

Dans le groupe *Vac BTV-1* tous les agneaux étaient positifs à J0 ce qui est logique puisqu'ils avaient été vaccinés. De même ils étaient tous négatifs en anticorps anti-NS1, confirmant l'intérêt de cet ELISA dans le cadre d'une stratégie DIVA. Par contre très peu d'animaux ont séroconverti en anticorps anti-NS1 après inoculation d'épreuve, aucun dans le groupe *Vac BTV-1* et un seul dans le groupe *BTV-1* dès J8 post-infection. A l'inverse tous les agneaux non vaccinés ont séroconverti en anticorps anti-VP7 après inoculation d'épreuve entre J8 et J13. Ces résultats suggèrent un manque de sensibilité de l'ELISA NS1 ou un retard (> 20 jours) dans la réponse des anticorps anti-NS1 après infection par le BTV.

#### b. Résultats des tests de séroneutralisation

Les résultats des tests de séroneutralisation du BTV-1 (graphique 9) ont montré qu'au moment de l'inoculation d'épreuve (J0) les animaux vaccinés présentaient logiquement des taux d'anticorps neutralisants élevés (moyenne à 9,75 log<sub>2</sub> ED<sub>50</sub>), contrairement aux deux autres groupes qui n'en possédaient pas. Après l'inoculation du virus leurs taux d'anticorps

ont continué à augmenter mais de manière beaucoup plus progressive jusqu'à atteindre une valeur moyenne maximale de  $12,93 \log_2 \text{ED}_{50}$  à J20.



**Graphique 9 :** Titres moyens en anticorps neutralisants après inoculation d'épreuve

Au sein du groupe *BTV-1*, l'infection expérimentale a également provoqué la synthèse d'anticorps neutralisants. A J14 l'ensemble des animaux présentaient des anticorps neutralisants avec une moyenne inférieure de  $2 \log_2 \text{ED}_{50}$  par rapport au groupe *Vac BTV-1*. A J20 les moyennes des taux d'anticorps sont légèrement inférieures chez les agneaux non vaccinés ( $12,93 \log_2 \text{ED}_{50}$  pour le groupe *Vac BTV-1* et  $11,6 \log_2 \text{ED}_{50}$  pour le groupe *BTV-1*).

Par ailleurs l'analyse individuelle a montré des résultats très homogènes entre individus d'un même groupe.

Enfin comme prévu les sentinelles n'ont synthétisé aucun anticorps neutralisant durant toute la durée de l'expérience.

## **IV – Discussion**

Cette étude poursuivait plusieurs objectifs :

- L'étude phylogénétique du BTV-1 isolé lors de l'épizootie en 2007-2008 dans le Sud-Ouest et l'étude de son parcours avant son arrivée en France.
- L'étude du pouvoir pathogène du BTV-1 chez le mouton et la protection apportée par un vaccin commercial.

### **Le BTV-1 est resté génétiquement stable lors de l'épizootie de 2007-2008**

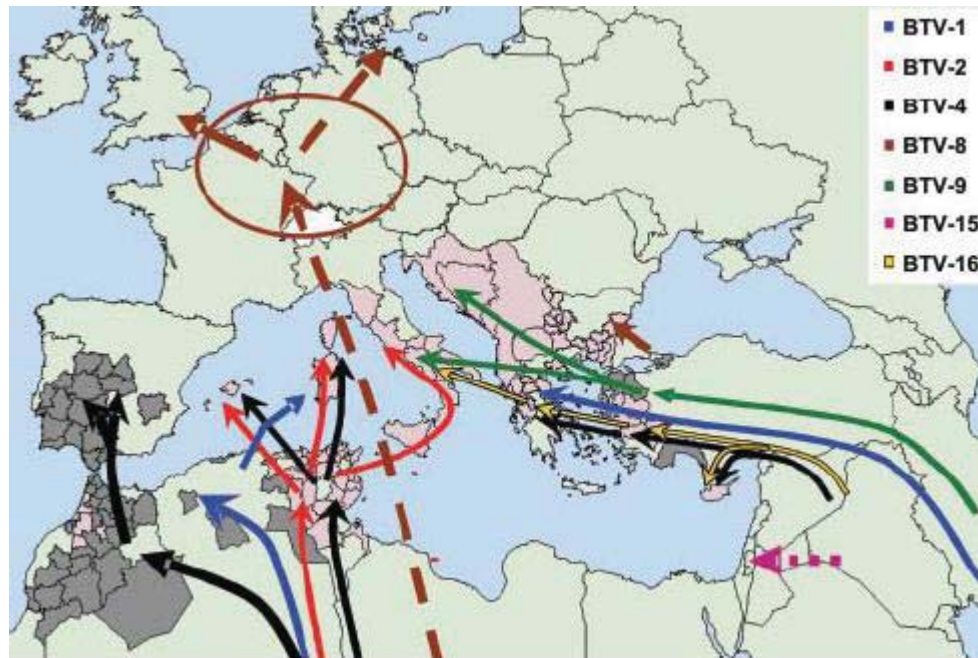
Dans une première étape nous avons voulu vérifier si le BTV-1 circulant lors de l'épizootie de 2007-2008 était génétiquement stable. Pour cela, nous avons analysé la séquence consensus du gène hypervariable codant VP2, provenant d'isolats d'espèces et de localisation différentes. Aucune différence majeure n'a été identifiée entre les séquences du gène L2 des 8 isolats, suggérant une stabilité génétique de la population virale dans nos conditions d'isolement. Ces résultats devraient être confirmés par une analyse sur un gène moins variable codant NS3. Ils indiqueraient que les différences de sensibilité clinique des différentes espèces ne sont pas associées à une modification du gène L2 dans la population virale. La distribution du BTV en quasi-espèces virales et sa variabilité lors de passages entre hôtes ou entre hôte et vecteur ont été peu documentées. Une étude [Bonneau et al., 2001] s'était intéressée à la stabilité génétique du BTV lors de passages successifs entre hôtes (ovins et bovins) et vecteurs biologiques. Elle a montré que le passage sur Culicoïdes était associé à une modification de la population virale se traduisant par une mutation sur le gène L2. Par contre lors de passages viraux entre mammifères, les gènes codant VP2 et NS3 restaient génétiquement stables.

Par la suite nous avons comparé la séquence du gène L2 avec celles obtenues dans les banques de données.

L'arbre phylogénétique comparant la souche LVD-4508 avec d'autres du sérotype 1 établit clairement des similitudes avec des souches portugaises, algériennes et marocaines.



Comme décrit précédemment, toutes ces souches méditerranéennes sont apparentées au topotype africain provenant de l'Ouest (cf carte 1).



**Carte 1** : Les routes d'introduction des différents sérotypes de la FCO en Europe et dans le bassin méditerranéen depuis 1998

(D'après Saegerman et al. 2008)

Une étude parue récemment [Cètre-Sossah et al. 2010] s'est intéressée au topotype de l'Ouest en étudiant les relations phylogéniques entre la souche algérienne BTV1 ALG 2006/01 isolée en 2006 au début de l'épizootie et différentes souches du bassin méditerranéen et d'Europe. La séquence du gène L2 algérien est apparue très proche de celle de tous les isolats de l'Ouest du bassin méditerranéen. Elle partageait par exemple 99,8% de similitudes avec la souche marocaine de 2006 (BTV1 MOR 2006/06), 99,8% avec la souche portugaise de 2007 (BTV1 Portugal 2007), et 99,7% avec une souche française isolée en 2007 (BTV-1 07-1, séquence récemment disponible lors de cette étude). Notre souche de BTV-1 isolée en France en 2008 entre dans ce topotype, elle est identique à la souche française de 2007 et présente 96,3% d'identité avec BTV1 MOR 2006/06, 93,1% avec BTV1 ALG 2006/01, 96,3% avec le BTV1 isolé au Portugal en 2007. Les différences présentes sont d'autant plus faibles que la majorité des mutations sont des substitutions synonymes (9/13 par rapport à BTV1 MOR 2006/06 et 8/11 par rapport à BTV1 ALG 2006/01) qui n'affectent donc pas la

structure de la protéine VP2. Le gène codant cette dernière étant considéré comme le plus variable du génome du BTV, on peut donc suggérer que la séquence consensus du BTV-1 est restée génétiquement stable durant l'épizootie de 2007-2008.

Tous ces isolats ont très certainement pour origine du BTV-1 qui a dérivé à travers l'Afrique sub-saharienne depuis l'Afrique du Sud. La séquence du gène L2 du BTV-1 d'Afrique du Sud possède en effet 94,3% de similitudes avec celle de la souche algérienne, et 93,1 % avec notre souche LVD-4508.

En ce qui concerne le toposype de l'Est, seule la Grèce a été touchée en Europe par le BTV-1, sans doute à cause du manque de virulence de la souche. On pense qu'elle provenait de Turquie mais cela n'a pu être prouvé. La même étude que précédemment [Cêtre-Sossah et al. 2010] a confirmé le lien de parenté entre un isolat grec (GRE2001/01) et des souches du toposype de l'Est : 95,9% de similitudes avec le gène L2 d'une souche d'Inde (IND1992/01, souche de référence de ce toposype), et 87,1% avec le L2 d'une souche d'Australie (AJ585120). En revanche on trouve des différences significatives entre ALG2006/01, notre souche LVD4508 et les isolats de l'Est avec environ 73 à 76% de similitudes sur le gène L2.

En conclusion, le BTV-1 isolé en France en 2007-2008 dérive d'un virus nord-africain qui a envahi le Sud-Ouest de l'Europe via l'Espagne et le Portugal.

## **La souche isolée LVD-4508 de BTV-1 est fortement pathogène chez le mouton**

L'apparition du BTV-8 en Europe du Nord, son extension rapide et son pouvoir pathogène pour les bovins ont surpris le monde agricole et les autorités vétérinaires françaises. Le BTV-8 a alors rapidement été considéré, en termes cliniques, comme plus pathogène que le BTV-1. Si les données épidémiologiques semblent conforter cette idée chez les bovins, cela est beaucoup moins évident chez les moutons. Dans cette étude nous avons donc voulu caractériser le pouvoir pathogène du BTV-1 dans cette espèce. En parallèle, des moutons avaient été inoculés avec du BTV-8 selon le même protocole

opérateur, les 2 virus ayant subi le même historique de passages en cultures cellulaires (données personnelles).

Nous avons choisi un protocole d'inoculation par voies sous-cutanée et intraveineuse avec un virus préalablement amplifié sur moutons. Nous partions de données qui montraient qu'un nombre conséquent de passages du BTV en cultures cellulaires était associé à une perte de sa virulence, une modification du phénotype et de son tropisme cellulaire [Franchi et al. 2008]. L'OIE elle-même déconseille cette méthode pour les tests de vaccins. Une étude récente [Eschbaumer et al. 2010] a cependant montré qu'il n'y a aucune différence significative entre l'utilisation de virus issu d'un très faible nombre de passages (n=2) en culture cellulaire et de lysat de sang, tant au niveau de la virémie que des manifestations cliniques de la maladie. Dans cette étude le sang était cependant congelé et non utilisé frais comme dans la nôtre.

Par rapport aux protocoles décrits dans la littérature (Tableau 12), deux facteurs semblent majeurs dans la reproduction des signes cliniques : la nature de l'inoculum et la voie d'inoculation.

Deux grands types d'inoculum sont fréquemment utilisés, du sang infecté dilué ou du virus passé en culture cellulaire. Les inocula ayant permis de reproduire expérimentalement et avec efficacité la FCO sont préparés à partir de sang frais prélevé chez des animaux infectés.

MacLachlan et al. (2008) ont choisi de travailler uniquement avec du sang frais. Ils ont infecté à deux reprises des moutons puis ont récupéré au bout de quelques jours leur sang (virémie maximale) pour obtenir à chaque fois de nouveaux inocula. Après le deuxième passage, ils ont dilué le sang obtenu pour avoir l'inoculum final. Nous avons utilisé le même protocole mais nous n'avons pas dilué le sang. Worwa et al. (2010) ont utilisé une technique similaire mais avec une dilution un peu différente (1:2). Les deux équipes ont réussi à reproduire la maladie. Backx et al. (2009) ont quant à eux isolé la fraction totale des cellules, procédé à plusieurs lavages pour éliminer le plus d'anticorps spécifiques possible, puis ont mis les cellules en suspension dans du PBS avant de s'en servir comme inoculum. Grâce à ce procédé les signes cliniques des moutons étaient comparables à ceux évalués sur le terrain, et une chèvre a même montré des signes cliniques.

	Inoculum	Dose et voie d'administration	Charge virale	Reproduction de la maladie
MacLachlan et al. 2008 (BTV-4)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sang infecté datant de 1981</li> <li>• 2 passages sur moutons</li> <li>• Inoculum = sang du 2ième mouton dilué à <math>10^{-2}</math></li> </ul>	2 mL intra-veineux	Inconnue	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 moutons infectés</li> <li>• Forme sévère chez tous les animaux (euthanasie pour raisons éthiques)</li> </ul>
Backx et al. 2007 (BTV-8)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sang infecté prélevé 1 semaine après apparition des signes cliniques</li> <li>• Fraction totale des cellules lavée 5 fois pr réduire les Ac spécifiques</li> <li>• Inoculum = Suspension dans PBS</li> </ul>	24 mL intra-veineux	Inconnue	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 moutons et 2 chèvres infectés</li> <li>• Signes cliniques des moutons comparables à ceux constatés sur le terrain</li> <li>• Présence de signes cliniques chez 1 chèvre</li> </ul>
Worwa et al. 2009 (BTV-8)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sang infecté de 2007 avec Ct = 24,9</li> <li>• Dilution au 1:2</li> <li>• Inoculation à des moutons de 2,1mL SC + ID</li> <li>• Inoculum = sang infecté récupéré avec Ct = 25</li> </ul>	2,1 mL SC +ID	Ct = 25	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 24 moutons de races différentes infectés</li> <li>• Présence de signes cliniques chez tous les animaux</li> <li>• Grande diversité dans l'intensité des symptômes</li> </ul>

**Tableau 12 :** Résumé des protocoles expérimentaux mis en place dans trois études cliniques récentes

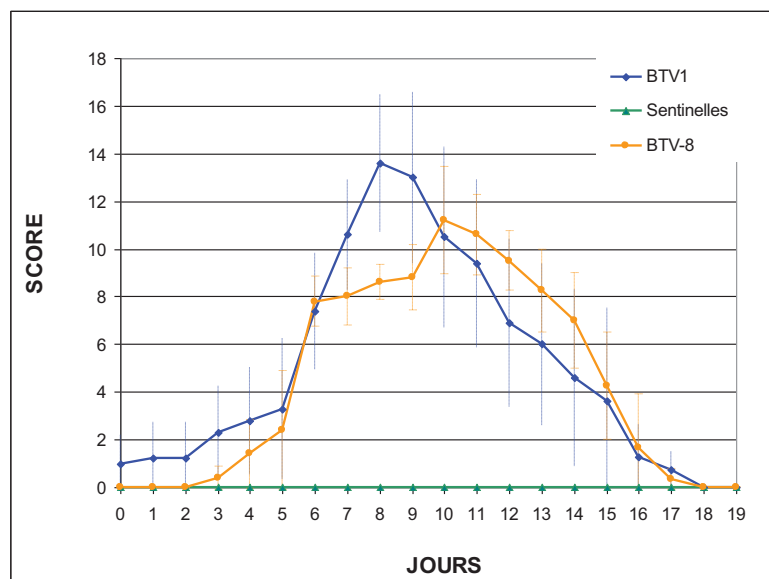
(D'après Backx et al. 2007, MacLachlan et al. 2008, Worwa et al. 2009)

En plus du type d'inoculum, les études de reproduction expérimentale de la maladie diffèrent dans leurs voies d'inoculation, la plupart combinant deux voies d'injection. La voie sous-cutanée, et surtout intradermique se rapprochent le plus de celle d'une infection naturelle (piqûre de Culicoïde), elles ont su reproduire la maladie [Worwa et al. 2010, Darpel et al. 2007]. Il est même possible de multiplier les points d'injection avec de petites quantités de virus pour coller au plus près à la réalité : c'est ce qui a été réalisé dans une étude sur l'efficacité et l'innocuité du vaccin BTVPUR Alsap 8 de Merial [Hamers et al. 2008]. A l'inverse, MacLachlan et al. [2008], ont reproduit des signes cliniques sévères chez les moutons après inoculation par voie intraveineuse seule. Dans notre étude nous avons choisi d'associer la voie veineuse et la voie sous-cutanée. En effet la reproduction expérimentale de

la maladie n'est pas aisée à obtenir, on peut citer le cas de deux études qui n'ont pas réussi à obtenir des symptômes chez les animaux infectés (Parsonson et al. 1987, Roeder et al. 1991). Notre protocole permettait donc de réunir toutes les conditions favorables à l'expression de la maladie : vérification des effets cytopathiques, charge virale élevée, et deux voies d'injection différentes.

En utilisant ces deux voies d'inoculation nous avons été capables de produire un modèle d'infection expérimentale intéressant. Premièrement tous les moutons inoculés ont présenté une forme sévère de la maladie, un animal devant être euthanasié pour des raisons éthiques. Les signes cliniques que nous avons pu reproduire sont typiquement observés dans les conditions naturelles. La durée de la maladie, environ 10 jours, est conforme aux données relevées sur le terrain. Toutefois nous n'avons pas pu induire des troubles majeures de la coagulation (syndrome hémorragique) comme observés dans l'étude de MacLachlan et al. (Mai 2008). Le protocole expérimental (inoculation de sang dilué par voie IV uniquement), le sérotype viral (BTV-17) ou les animaux infectés (races, âges différents) pourraient expliquer ces différences.

Par rapport à une expérience d'infection à BTV-8, que nous avons réalisé en parallèle et dans les mêmes conditions expérimentales (animaux, inoculum, doses, voies d'inoculation) les scores cliniques entre BTV-1 et BTV-8 apparaissent globalement similaires (Graphique 10), suggérant que le BTV-1 est aussi pathogène pour le mouton que le BTV-8. Ces données confortent les observations de terrain des praticiens locaux ou menées par l'ENVT.



**Graphique 10 :** Scores cliniques obtenus après infection de moutons par le BTV-1 ou le BTV-8

Sur le graphique 10, le pic clinique semble plus précoce et plus élevé pour le BTV-1. D'après nos données, cela s'expliquerait par la moins grande variabilité individuelle, observée dans le temps, pour les moutons infectés par le BTV-1.

Le 2<sup>ème</sup> critère d'efficacité de notre modèle d'épreuve est l'importance des charges virales observées après infection. Les charges virales que nous avons pu détecter sont du même ordre de grandeur que celles obtenues dans la littérature. Notamment, lors d'une étude d'efficacité et d'innocuité du vaccin BTVPUR Alsap 8 contre une souche belge de BTV-8 (passages cellulaires et titre à 7 log<sub>10</sub> copies/mL), le titre viral maximal mesuré a été 7,5 log<sub>10</sub> copies/mL [Hamers et al. 2009] contre 6.93 log<sub>10</sub> copies/mL dans notre étude. En utilisant la même trousse de diagnostic, ces charges sont similaires à celles retrouvées après infection expérimentale de BTV-8 (données personnelles).

Worwa et al. (2010) ont récemment constaté une relation significative ( $p < 0,0001$ ) entre les manifestations cliniques et les valeurs de Ct. Dans notre étude, cette relation s'est confirmée au sein du groupe BTV-1 jusqu'à J10 pi. L'augmentation de la virémie s'est faite parallèlement à celle des scores cliniques, avec un pic commun à J8-J9. Puis, là où les signes cliniques diminuent rapidement pour disparaître à J16, la virémie elle baisse lentement jusqu'à J16, et se maintient à 4 Log<sub>10</sub> copies d'ARN/mL à J20. Ces résultats rejoignent les nombreuses études qui ont, de plus, mis en évidence la persistance du BTV jusqu'à 45 jours chez des ovins guéris cliniquement. A l'inverse, nous avons noté des différences individuelles en termes de sensibilité clinique chez les agneaux infectés alors qu'une homogénéité était observée pour la virémie. Cela suggérerait que virémie et scores cliniques évoluent parallèlement sans qu'il y ait de corrélation réelle entre les 2 paramètres. L'explication de la symptomatologie de la FCO est encore mal définie, notamment on ne sait pas clairement si les signes cliniques sont dus à une action cytolytique directe du virus ou une action inflammatoire médiée par des chémokines produites par les cellules mononucléées sanguines infectées.

Les charges virales observées indiquent que le virus était très probablement infectieux, mais seuls des tests d'isolement viral auraient permis de le confirmer. La corrélation entre les quantités de génome viral et l'infectivité du BTV n'est pas bien connue à l'heure actuelle, et en particulier le niveau minimal de copies d'ARN associé à la plus petite quantité de particules virales infectieuses capables d'être transmises. Cependant les travaux en cours commencent à obtenir des résultats : ainsi Hamers et al. (2009) ont récemment suggéré que le

BTV ne pouvait être isolé en culture cellulaire pour des quantités d'ARN inférieures à 3,14 log<sub>10</sub> copies/mL. Par ailleurs, Chatzinasiou et al. (2010) ont démontré, pour deux sérotypes de BTV différents dont le BTV-1, une forte corrélation entre l'isolement viral (effets cytopathiques exprimés en EID<sub>50</sub>/mL après inoculation d'œufs embryonnés) et la virémie exprimée en copies d'ARN/mL (par RT-PCR en temps réel). Ils ont établi la relation linéaire suivante pour le BTV-1 :

$$Y \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{mL} = 1,06 \times Z \log_{10} \text{copies d'ARN}/\text{mL} - 2,43$$

On obtient grâce à cette formule des titres moyens positifs pour le groupe *BTV-1* à partir de J4 (3,9 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>/mL), avec un maximum de 4,9 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>/mL à J8 et une valeur finale de 2,4 log<sub>10</sub> EID<sub>50</sub>/mL à J20, suggérant ainsi une forte infectivité des moutons pendant cette période.

En conclusion, nous avons montré que la souche LVD4508 est pathogène pour le mouton, au même titre que la souche 2204 du BTV-8 et que notre modèle d'épreuve est suffisamment performant pour évaluer l'efficacité d'un vaccin.

## **Le Vaccin Zulvac 1 protège partiellement, mais de manière significative, les moutons contre l'inoculation d'épreuve**

Fort de notre modèle d'épreuve, nous avons voulu tester l'efficacité du seul vaccin BTV-1 disponible lors de l'épizootie de 2007-2008 vis-à-vis d'une souche de terrain : le Zulvac 1 Ovis de Fort Dodge. C'est un vaccin inactivé contenant la souche BTV-1 ALG 2006/01, donc une souche très proche de notre souche LVD-4508.

### **- Protection clinique :**

Après inoculation d'épreuve, des différences significatives ont été observées entre les scores cliniques moyens des animaux vaccinés et non vaccinés, indiquant une protection des animaux vaccinés contre la souche LVD-4508. Des différences ont cependant été observées entre individus. Tous les agneaux vaccinés ont présenté un léger pic d'hyperthermie mais un agneau (n°793) a aussi présenté une forme clinique nette, similaire à celle des agneaux les



moins atteints du groupe *BTV-1*. Le protocole vaccinal du fabricant a été parfaitement respecté, on peut alors se demander si le vaccin utilisé apporte réellement une protection clinique efficace contre tous les individus. Par ailleurs il est connu que tous les animaux ne réagissent pas de la même façon à un acte vaccinal et le nombre d'animaux dans notre groupe était restreint (n=5). Nous avons pu observer une très bonne corrélation inverse entre l'intensité des signes cliniques et les titres en anticorps neutralisants le jour de l'inoculation: les taux d'anticorps varient de près de 2 log<sub>2</sub> ED<sub>50</sub> dans le groupe *Vac BTV-1*, avec les taux les plus bas chez les individus les plus touchés cliniquement. Ainsi pour une même quantité de vaccin injectée chez tous les animaux, on a des taux d'anticorps neutralisants différents, et donc une protection clinique inégale entre les individus.

#### - Protection virologique :

Quand nous avons corrélé les titres virémiques avec les signes cliniques, selon la publication de Worwa et al. (2010), nous avons noté de fortes disparités au sein du groupe *Vac BTV-1*, avec des virémies intermittentes chez tous les animaux sauf le n°793 cliniquement atteint, qui a une virémie similaire à celles des agneaux infectés non vaccinés.

Afin d'évaluer la capacité du vaccin à bloquer le cycle de transmission virale, nous avons voulu savoir si les titres virémiques enregistrés au sein du groupe *Vac BTV-1* étaient suffisamment significatifs pour considérer les animaux comme infectieux, donc capables d'infecter un *Culicoides* et de propager ainsi la maladie. Il est clair qu'un animal (n°793) parmi les 5 du groupe n'a pas du tout été protégé par le vaccin : son titre viral, 6,38 log<sub>10</sub> copies/mL de sang, peut être considéré comme équivalent à ceux du groupe *BTV-1* (avec une moyenne à 6.93 log<sub>10</sub> copies/mL). Cet agneau est le même qui a les taux d'anticorps neutralisants les plus bas, et le même qui a développé la forme sévère de la maladie. Pour deux autres agneaux (n°722 et 753) du *BTV-1* a été détecté avec des titres maximum de 3,3 log<sub>10</sub> copies/mL chacun. Si on se base sur les résultats de Hamers et al (2009), ces 2 moutons sont probablement non infectieux. En effectuant les calculs de Chatzinasiou et al. (2010), on constate que le n°793 était potentiellement infectieux entre J3 et J20, le n°596 entre J5 et J7, et le n°722 à J9. Au vu de ce modèle d'infectivité on peut supposer que le vaccin Zulvac 1 n'a joué que partiellement son rôle de protection vis-à-vis de l'infectivité. Cependant il est



important de garder à l'esprit que nous n'avons pas utilisé les mêmes trousse de détection du BTV, celle utilisée dans notre étude étant considérée comme plus sensible.

Au final, il est très probable que l'agneau 793, protégé cliniquement de manière partielle contre la souche LVD-4508, n'était pas protégé d'un point de vue virologique. Pour les 2 autres agneaux, il est difficile de savoir dans la pratique si les niveaux de virémie étaient réellement suffisants pour la propagation, ni de quantifier cette probabilité. Nous aurions pu tenter d'isoler le virus sur cultures cellulaires BHK-21, ou mieux sur œufs embryonnés. A l'extrême, pour démontrer une transmission possible, il aurait fallu mettre ces animaux en contact avec des Culicoïdes, attendre que ceux-ci aient pris un repas sanguin, puis les mettre en contact avec des moutons sains afin de voir s'ils s'infectent. C'est un protocole expérimental très lourd qui n'a pas été tenté jusqu'à présent.

La synthèse de tous ces résultats nous pousse à nous interroger sur l'efficacité du vaccin Zulvac 1 Ovis commercialisé en 2007. En résumé, des différences cliniques et virologiques significatives ont été observées entre les groupes vaccinés et non vaccinés. Toutefois la protection apportée par le vaccin n'a été que partielle, notamment pour un individu vacciné (n°793) qui a présenté une infection similaire à celle des animaux non vaccinés. Le Zulvac 1 Ovis a reçu une ATU : son efficacité clinique a été étudiée et démontrée en laboratoire. Théoriquement il doit largement assurer la protection clinique des animaux infectés sur le terrain, comme indiqué sur la notice d'utilisation : « immunisation active en vue de prévenir la virémie et de réduire les signes cliniques causés par le virus de la fièvre catarrhale ovine, sérotype 1 ». Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette protection partielle :

- Facteur animal : la présence d'affections sub-cliniques sous-jacentes aurait pu être à l'origine de l'échec vaccinal concernant le n°793, mais son examen clinique est resté tout à fait normal jusqu'à J5. Reste la possibilité d'un système immunitaire affaibli ou défaillant : l'étude de la réponse humorale n'est pas suffisante, il aurait été intéressant d'évaluer chez tous les animaux la réponse cellulaire, avec un suivi de la numération-formule sanguine, et en particulier de la population leucocytaire et lymphocytaire.

- Facteur vaccinateur : On peut l'exclure car les vaccinations ont été réalisées par un opérateur expérimenté, avec un protocole bien maîtrisé.
- Facteur vaccin : Le Zulvac 1 a dans son indication une protection virologique partielle et non totale comme le BTVPUR Alsap 8 de Merial. Par contre il aurait dû y avoir une réduction du titre chez le n°793, ce qui n'est pas le cas. Il existe donc un risque d'échec, qui reste inhérent à tous les vaccins.
- Effet challenge : on peut se demander si notre protocole d'infection expérimentale n'était pas trop « virulent », avec une inoculation sous-cutanée mais aussi intra-veineuse de titres viraux élevés.
- Effet souche : c'est peu probable car ALG 2006/01 et LVD-4508 sont très proches sur VP2, les anticorps neutralisants synthétisés suite à la vaccination doivent théoriquement être identiques à ceux produits lors de l'infection par notre souche. Pour le vérifier il faudrait faire des séroneutralisations croisées.

Par ailleurs, on parle ici d'efficacité individuelle, or sur le terrain il faut aussi considérer l'efficacité dite « de masse ». En effet même si quelques animaux ne sont pas protégés correctement par le vaccin, la grande majorité le sera, ce qui va réduire considérablement la circulation virale et assurer une protection « indirecte » mais efficace à ces quelques individus restés sensibles. Ainsi, la vaccination de masse de 2009, associée à une infection massive en 2008 ont stoppé brutalement la propagation du virus. Pour éliminer définitivement le virus d'un territoire, il est donc primordial de généraliser la vaccination pour avoir cet effet masse, et de répéter les injections chaque année afin de limiter au maximum le nombre d'échecs vaccinaux.

## **Efficacité des tests sérologiques pour différencier animaux infectés et vaccinés**

Pour évaluer ce paramètre, nous avons étudié la réponse sérologique des deux groupes contre les protéines VP7 et NS1. On considère parfois que le test ELISA VP7 de compétition manque de sensibilité pour détecter les anticorps anti-VP7 chez les animaux vaccinés car ceux-ci synthétisent surtout des anticorps anti-VP2 et VP5 [Oura et al. 2009]. Or dans notre

étude tous les animaux vaccinés ont eu des tests positifs au moment de l'inoculation d'épreuve. Ce test a également permis de suivre l'infection des agneaux du groupe *BTV-1*, qui sont devenus positifs aux alentours de J8. Ces résultats correspondent aux données de la littérature qui fixent la séroconversion à 7 jours post-infection pour VP7.

Le jour de l'inoculation, tous les animaux vaccinés séropositifs VP7 étaient négatifs au test DIVA NS1, soulignant l'intérêt de ce test dans une stratégie de type DIVA. Par contre, quand on analyse les 2 groupes, peu de séroconversions NS1 ont eu lieu après infection expérimentale, à des moments où on s'attendrait à en avoir. Dans le groupe *Vac BTV-1* cela peut s'expliquer par l'effet vaccination : la présence d'anticorps neutralisants a sans doute freiné la réplication virale, et donc l'exposition des protéines non structurales au système immunitaire. D'ailleurs le n°793, le moins bien protégé par le vaccin, a eu le résultat « douteux » le plus précoce, à J18. Dans le groupe *BTV-1* la séroconversion aurait théoriquement dû se produire pendant l'expérimentation. Il existe peu de données sur la cinétique de la réponse des anticorps anti-NS1. Anderson et al. (1993) avaient suggéré l'intérêt d'un test ELISA de compétition ciblé sur NS1, en obtenant la détection d'anticorps anti-NS1 à 10 jours post-infection chez les animaux infectés mais pas chez les animaux vaccinés. Il est possible que dans notre étude les anticorps anti-NS1 apparaissent plus tardivement après les 18 jours de notre étude. D'ailleurs un animal a clairement été séropositif à partir de J13. Il avait par ailleurs une bonne réponse en anticorps anti-VP7 et neutralisants.

Par la suite on s'est rendu compte que NS1 présentait plusieurs inconvénients : parfois une faible immunogénicité, des anticorps peuvent être retrouvés chez un animal poly-vacciné (plus il est vacciné, plus on a de chances d'en retrouver), et les résultats semblent plus prometteurs chez les ovins que chez les bovins, mais restent difficilement reproductibles. C'est pourtant actuellement la piste de recherche privilégiée, les résultats de test ELISA dirigés contre NS3 étant peu reproductibles [Barros et al. 2009].

# CONCLUSION

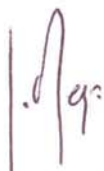
Actuellement l'épizootie de FCO semble sous contrôle en France, avec quelques cas sporadiques recensés en 2010 et début, et ce grâce aux campagnes de vaccination massives et coordonnées. Malheureusement la campagne 2011 a été déclarée facultative, ce qui va sans aucun doute entraîner une diminution de la pression vaccinale. Le risque est alors la ré-émergence du virus qui n'a pas pu être éliminé du territoire et reste probablement latent dans l'environnement. Les mesures d'épidémiosurveillance sont dans ce cas primordiales pour éviter l'apparition d'une seconde vague épizootique. Dans ce contexte il est urgent de trouver des protocoles DIVA fiables afin de différencier beaucoup plus facilement les animaux infectés et vaccinés.

Parallèlement à ces mesures réglementaires, le laboratoire Merial vient de commercialiser cette année le premier vaccin inactivé bivalent 1-8, qui va permettre une simplification des protocoles de vaccination et un gain de temps non négligeable. Les indications de protection vaccinale sont identiques à celles du BTVPUR Alsap 8, à savoir une protection clinique et virologique complètes. Cependant on l'a vu il est actuellement impossible d'évaluer l'infectivité d'un hôte, il convient donc de rester prudent quant à l'efficacité réelle des vaccins.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, **Gilles MEYER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CALVALIDO Jérôme** intitulée « *Pouvoir pathogène et variabilité génétique du BTV-1 responsable de l'épizootie de fièvre catarrhale ovine en 2008 dans le Sud-ouest de la France* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 12 mai 2011  
Docteur/Professeur **MEYER Gilles**  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

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



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur **IZOPET Jacques**



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
30 MAI 2011  
Professeur Gilles FOURTANIER


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

# BIBLIOGRAPHIE

AFSSA

Hors-série numéro spécial FCO

*Bulletin épidémiologique de l'AFSSA*, 2010 Mar ; 35

ALBINA, E., ZIENTARA, S., SAILLEAU, C., et al.

La fièvre catarrhale ovine : quand une maladie du sud s'invite au nord

*Virologie*, 2007 ; 11 : 63-74

ALLEPUZ A. GARCIA-BOCANEGRA I., NAPPA S., et al.

Monitoring bluetongue disease (BTV-1) epidemic in southern Spain during 2007

*Prev. Vet. Med.* 2010 Sep. 1 ; 96 (3-4) : 263-71

ANDERSON J., MERTENS P.P., HERNIMAN K.A.

A competitive ELISA for the detection of anti-tubule antibodies using a monoclonal antibody against bluetongue virus non-structural protein NS1

*J. Virol. Methods.* 1993 Jul ; 43 (2) : 167-75

ANDREW M., WHITELEY P., JANARDHANA V.

Antigen specificity of ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus

*Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1995 Aug. ; 47(3-4) : 311-22

BACKX A., HEUTINK R., VAN ROOIJ E., VAN RIJN P.

Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection

*Vet. Microbiol.* 2009 Sep. 18 ; 138 (3-4) : 235-43

BARRATT-BOYES, S.M., MACLACHLAN, N.J.

Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves

*Vet. Microbiol.* 1994 Jun ; 40 (3-4) : 361-371

BARRATT-BOYES, S.M., MACLACHLAN, N.J.

Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle

*J. Am. Vet. Med. Assoc.* (1995) 206:1322–1329

BARROS S.C., CRUZ B., LUIS T.M., et al.

A DIVA system based on the detection of antibodies to non-structural protein 3 (NS3) of bluetongue virus

*Vet. Microbiol.*, 2009 Jun 12 ; 137(3-4) : 252-9

BATTEN, C.A., MAAN, S., SHAW, A.E., et al.

A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment

*Virus Research*, 2008 Oct ; 137(1) : 56–63

BAUDOUX S., HERTIG A-J., GHENDRIKX P. *et al.*

*Vademecum Fièvre Catarrhale Ovine (Bluetongue) à l'usage des vétérinaires sanitaires*

Maisons-Alfort, Ed. CNEVA, 2003. 50p.

BHATTACHARYA, B., NOAD, R.J., ROY, P.

Interaction between bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress

*Viol. J.*, 2007 Jan 15 ; 4 : 7

BONNEAU K.R., MULLENS B.A., MACLACHLAN N.J.

Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies

Evolution of the VP2 and NS3/NS3A Genes of Bluetongue Virus

upon Passage between Sheep, Cattle, and *Culicoides sonorensis*

*J. Virol.*, 2001 Sep. ; 75(17) : 8298–305

BOSQUET G.

Signes cliniques de FCO observés sur le terrain dans le Nord et l'Est de la France

*Bulletin des GTV, Cahier spécial édité à la demande de la DGAL*, 2007 Oct.; 41 : 4-6

BOWEN, R.A., HOWARD, T.H.

Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected mature bulls

*Am. J. Vet. Res.* 1982 Nov ; 43(11) : 1907-11

BOZZETTI, M.

Le virus myxomateux vecteur vaccinal chez les petits ruminants : réponse immunitaire et devenir du virus

Th. : Med.vet. : Toulouse : 2007 ; 94pp

BOYCE, M., WEHRFRITZ, J., NOAD, R., et al.

Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity

*J. Virol.*, 2004 Apr ; 78 (8) : 3994–4002

BRODIE, S.J., WILSON, W.C., O’HEARN, P.M., et al.

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.* 1998 Jul ; 72 (7) : 5599–5609

BUTAN, C., TUCKER, P.

Insights into the role of the non-structural protein 2 (NS2) in Bluetongue virus morphogenesis

*Virus Research*, 2010 Aug ; 151 (2) : 109–17

CAMPBELL N., REECE J.B.

Biologie. 2e édition. De Boeck, 2004, 1364 p.

CARACAPPA, S., TORINA, A., GUERCIO, A., et al.

Identification of a novel bluetongue virus vector species of Culicoides in Sicily.

*Vet. Rec.* 2003 ; 153 : 71-4

CARUSO, A.

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

Th. : Med.vet. : Toulouse : 2009. 152pp.



CELMA, C.C., ROY, P.

A viral nonstructural protein regulates bluetongue virus trafficking and release

*J Virol.*, 2009 Jul ; 83(13) : 6806-16

CETRE-SOSSAH C., MADANI H., SAILLEAU C., et al. Molecular epidemiology of bluetongue virus serotype 1 isolated in 2006 from Algeria

*Res. Vet. Sci.* 2010 Nov. 10

CHATZINASIIOU E., DOVAS C.I., PAPANASTASSOPOULOU M., et al.

Assessment of bluetongue viraemia in sheep by real-time PCR and correlation with viral infectivity

*J. Virol. Methods.* 2010 Nov. ; 169 (2) : 305-15

DARPEL, K.E., BATTEN, C.A., VERONESI, E., et al.

Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe

*Vet Rec.*, 2007 Aug 25 ; 161(8) : 253-61

DARPEL K., OURA C., MELLOR P.

Overwintering of BTV-8 in the UK & Northern Europe

*Présentation ppt*, 2008 ; Arbovirology Department, IAH Pirbright

DARPEL, K.E., MONAGHAN, P., ANTHONY, S.J., et al.

Bluetongue virus in the mammalian host and the induced immune response

In: MELLOR, P., BAYLIS, M., MERTENS, P.

Bluetongue

Londres : Elsevier, 2009, 265-284

DE CLERCQ, K., DE LEEUW, I., VERHEYDEN, B.

Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type bluetongue virus serotype 8 natural infection

*Transbound. Emerg. Dis.* 2008 Oct ; 55(8) : 352-9

DEMAULA, C.D., LEUTENEGGER, C.M., BONNEAU, K.R.

The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue

*Virology* 2002 May ; 296(2) : 330–7

DEMAULA, C.D., LEUTENEGGER, C.M., JUTILA, M.A., et al.

Bluetongue virus-induced activation of primary bovine lung microvascular endothelial cells

*Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002 Jul ; 86(3-4) : 147-57

DERKSEN D., LEWIS C.

Bluetongue virus serotype 8 in sheep and cattle: a clinical update

*In Practice* 2007 ; 29 : 314-18

DOMINGO E., HOLLAND J.J.

RNA virus mutations and fitness for survival

*Annu. Rev. Microbiol.*, 1997 ; 51 : 151-78

ERASMUS B.J.

Bluetongue Virus

In : DINTER Z., MOREIN B.

Virus infections of Ruminants

New-York : Elsevier, 1990 ; 21 : 227-237

ESCHBAUMER M., WACKERLIN R., RUDOLF M., et al.

Infectious blood or culture-grown virus : A comparison of bluetongue virus challenge models

*Vet. Microbiol.* 2010 Nov. 20 ; 146 (1-2) : 150-4

FERRARI, G., DE LIBERATO, C., SCAVIA, G., et al.

Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy

*Prev. Vet. Med.* 2005 May 10 ; 68(2-4) : 103–13

FORZAN, M., MARSH, M., ROY, P.

Bluetongue virus entry into cells

*J. Virol.*, 2007 May ; 81 (9) : 4819–27

FRANCHI P., MERCANTE M.T., RONCHI G.F., et al. Laboratory tests for evaluating the level of attenuation of bluetongue virus

*J. Virol. Methods.* 2008 Nov ; 153 (2) : 263-5

GERBIER, G., HENDRIKX, P., ROGER, F., et al.

Bluetongue control using vaccines: experience of the Mediterranean Islands

*Vet. Ital.*, 2004 Oct-Dec ; 40(4) : 611-5

GERMANIQUE L.A.

Aspects cliniques de la Fièvre catarrhale ovine sérotype 8 chez les bovins

Th. : Med.vet. : Alfort : 2010 ; 123pp

GONZALEZ, J.M., FIGUERAS, L., ORTEGA, M.E., et al.

Possible adverse reactions in sheep after vaccination with inactivated BTV vaccines.

*Vet. Rec.*, 2010 Jun 12 ; 166(24) : 757-8

GOUET, P., DIPROSE, J.M., GRIMES, J.M., et al.

The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography

*Cell.* 1999 May 14 ; 97(4) : 481–90

GRIMES, J.M., BURROUGHS, J.N., GOUE, P., et al.

The atomic structure of the bluetongue virus core

*Nature*, 1998 Oct 1 ; 395(6701) : 470–8

GUIRAKHOO, F., CATALAN, J.A., MONATH, T.P.

Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles

*Arch. Virol.*, 1995 ; 140 (5) : 967–74

HAMERS, C., GALLEAU, S., CHERY, R., et al.

Use of inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccine against virulent challenge in sheep and cattle

*Vet Rec.*, 2009 Sep 26 ; 165(13) : 369-73

HAN, Z., HARTY, R.N.

The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties

*J. Biol. Chem.*, 2004 Oct 8 ; 279 (41) : 43092–7

HASSAN, S.S., ROY, P.

Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry

*J. Virol.*, 1999 Dec ; 73 (12) : 9832–42

HASSAN, S.H., WIRBLICH, C., FORZAN, M., et al.

Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization

*J. Virol.*, 2001 Sep ; 75(18) : 8356–67

HE C.Q., DING N.Z., HE M., et al.

Intragenic recombination as a mechanism of genetic diversity in bluetongue virus

*J. Virol.*, 2010 Nov. ; 84(21) : 11487-95

JONES L.D., CHUMA T., HAILS R., et al.

The non-structural proteins of bluetongue virus are dominant source of cytotoxic T cell peptide determinant

*J. Gen. Virol.*, 1996 May; 77(Pt 5) : 997-1003

KAR, A.K., BHATTACHARYA, B., ROY, P.

Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly

*BMC Mol. Biol.*, 2007 Jan 22 ; 8:4

KATZ, J., ALSTAD, D., GUSTAFSON, G., et al.

Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep

*J. Vet. Diagn. Invest.* 1994 Apr ; 6(2) : 139–142

KIRSCHVINK N., RAES M., SAEGERMAN C.

Impact de l'infection naturelle par le sérotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV-8) sur la qualité de la semence des béliers

*Epidémiologie et santé animale* 2007 ; 54 : 109-13

MAAN S, MAAN NS, SAMUEL A-R, et al.

Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes

*J. Gen. Virol.*, 2007 Fév ; 88(Pt 2) : 621-30

MACLACHLAN NJ

The Pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants

*Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, Aug-Nov. 1994 : 17(3-4) : 197-206

MACLACHLAN, N.J., CONLEY, A.J., KENNEDY, P.C.

Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion

*Anim. Reprod. Sci.* 2000 Jul ; 60-61 : 643-51

MACLACHLAN, N.J., OSBURN, B.I.

Induced brain lesions in calves infected with bluetongue virus

*Vet Rec.* 2008 Apr 12 ; 162(15) : 490-1

MACLACHLAN, NJ., CRAFFORD, J.E., VERNAU, I.A., et al.

Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep

*Vet Pathol.*, 2008 May ; 45(3) : 310-15

MACLACHLAN, N.J., DREW, C.P., DARPEL, K.E., et al.

The Pathology and Pathogenesis of Bluetongue

*J. Comp. Pathol.* 2009 Jul ; 141(1) : 1-16

MAHRT C.R., OSBURN, B.I.

Experimental bluetongue virus infection of sheep; effect of vaccination: pathologic, immunofluorescent, and ultrastructural studies

*Am. J. Vet. Res.* 1986 Jun ; 47(6) : 1198-203

MAKADIYA N.

Consequences of Genetic Variation and Selection in Viruses

*Student Perspectives on Contemporary Virology*, 2007 ; Vol. 1

MATSUO, E., ROY, P.

Bluetongue virus VP6 acts early in the replication cycle and can form the basis of chimeric virus formation

*J. Virol.*, 2009 Sep ; 83(17) : 8842-8

MAYO, C.E., CROSSLEY, B.M.

Colostrum transmission of Bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California

*Transbound. Emerg. Dis.*, 2010 Aug 1 ; 57(4) : 277-81

MORTOLA, E., NOAD, R., ROY, P.

Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells

*J. Virol.* 2004 Mar ; 78(6) : 2875–83

NASON, E.L., ROTHAGEL, R., MUKHERJEE, S.K., et al.

Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus

*J. Virol.*, 2004 Aug ; 78 (15) : 8059–67

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE ANIMALE (OIE)

Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial animals. 6e edition, 2008. 1343p.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE ANIMALE (OIE) (Page consultée le 11 avril 2011)

Fiche technique de l'OIE sur la Bluetongue

Adresse URL : <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bluetongue.pdf>

OSBURN B-I

The impact of bluetongue virus on reproduction

*Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1994 Aug-Nov ; 17(3-4) : 189-96.

OURA C.A., WOOD J.L., SANDERS A.J., et al.

Seroconversion, neutralising antibodies and protection in bluetongue serotype 8 vaccinated sheep

*Vaccine* 2009 Dec 9 ; 27 (52) : 7326-30

PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J., MCPHEE D.A., et al.

Experimental infection of bulls and cows with bluetongue virus serotype 20

*Aust Vet J.* 1987 Jan ; 64(1) : 10-3

PARSONSON, I.M.

Pathology and pathogenesis of bluetongue infections

*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1990) 162:119–141

RESEAU FRANÇAIS DE SANTE ANIMALE. (Page consultée le 3 mai 2011). Site du Réseau Français de Santé Animale, [en ligne].

Adresse URL : <http://www.rfsa.net/MANIFESTATIONS/2009/FCO/Resumes/Resume.doc>

RESEAU FRANÇAIS DE SANTE ANIMALE. (Page consultée le 3 mai 2011). Site du Réseau Français de Santé Animale, [en ligne].

Adresse URL : <http://www.rfsa.net/MANIFESTATIONS/2010/QR-FCO-VD-6.doc>



ROEDER P.L., TAYLOR W.P., ROBERTS D.H., et al.

Failure to establish congenital bluetongue virus infection by infecting cows in early pregnancy

*Vet Rec.* 1991 Mar 30 ; 128(13) : 301-4

ROY, P., BISHOP, D.H., LEBLOIS, H., et al.

Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection

*Vaccine*, 1994 Jul ; 12(9) : 805–11

ROY P.

Orbiviruses and their replication

In : FIELDS B. N., KNIPE D. M., HOWLEY P. M.

*Fields Virology, Third Edition, Volume 2*

Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, 1709 – 34

SAEGERMAN, C., BERKVEN, D., MELLOR P.S.

Bluetongue Epidemiology in the European Union

*Emerg. Infect. Dis.* 2008 Apr ; 14(4):539-44

SAEGERMAN C., THIRY E.

Historique du sérotype 8 du virus de la FCO en Europe.

In : *La fièvre catarrhale ovine*

Editeur: J.-M. Gourreau, Groupe France Agricole, Paris, 2009, 185 pages (figure 5, p. 25)

SAILLEAU, C., BREARD, E., ZIENTARA, S.

La fièvre catarrhale ovine ou « bluetongue »

*Le Point Vétérinaire* 2006 ; 262 : 38-41

SCHWARTZ-CORNIL, I., MERTENS, P.P.C., CONTRERAS, V., et al.

Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity

*Vet. Res.* 2008 Oct ; 39 : 46

STAUBER, N., MARTINEZ-COSTAS, J., SUTTON, G., et al.

Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates

*J. Virol.*, 1997 Oct. ; 71 (10) : 7220–26

SURVEILLANCE NETWORK FOR BLUETONGUE (Page consultée le 16 novembre 2010). Site du European Union Bluetongue Network, [en ligne]. Adresse URL : <http://eubtnet.izs.it/btnet/index.htm>

SUTTON, G., GRIMES, J.M., STUART, D.I., et al.

Bluetongue virus VP4 is an RNA-capping assembly line

*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007 May ; 14 (5) : 449–51

TAKAMATSU, H., MELLOR, P.S., MERTENS P.P., et al.

A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector

*J. Gen. Virol.* 2003 Jan ; 84 (Pt 1) : 227–235

TAN, B.H., NASON, E., STAEUBER, N., et al.

RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells

*J. Virol.*, 2001 Apr ; 75 (8) : 3937–47

VAN AERT M., LAUREYNS J., DE KRUIF A., et al.

Clinical symptoms caused by the bluetongue virus serotype 8 : experiences from the outbreak in Belgium

*Cattle Practice* 2008, **16**(1), 55-60.

VANDEBBUSSCHE, F., VANBINST, T., VERHEYDEN, B., et al.

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

*Vet. Microbiol.* 2008 May 25 ; 129(1-2) : 15-27

VERONESI, E., HAMBLIN, C., MELLOR,

Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae)

*Vaccine*, 2005 Dec 1 ; 23 (48-49) : 5509–16

WILSON, A., DARPEL, K., MELLOR, P.S.

Where does bluetongue virus sleep in the winter?

*PLoS Biol.* 2008 Aug ; 6(8) : e210

WHITE D.M., WILSON W.C., BLAIR C.D., BEATY B.J.,

Studies on overwintering of bluetongue virus in insects

*J Gen Virol*, 2005 Feb ; 86(Pt 2) : 453-62

WORWA G., HILBE M., CHAIGNAT V., et al. Virological and pathological findings in Bluetongue virus serotype 8 infected sheep

*Vet. Microbiol.* 2010 Aug 26 ; 144 (3-4) : 264-73

WOUDA W., ROUMEN M.P., PEPERKAMP N.H., and al.

Hydranencephaly in calves following bluetongue serotype 8 epidemic in the Netherlands

*Vet. Rec.* 2008 Mar. 29 ; 162 (13) : 422-3

ZIENTARA, S., SAILLEAU, C., BREARD, E.

Intérêts et limites des outils moléculaires dans le diagnostic et l'épidémiologie de la fièvre catarrhale des ovins

*Epidémiologie et santé animale* 2002 ; 42 : 109-113

ZIENTARA S, BREARD E, SAILLEAU C, et al.

Tests sérologiques différentiels : différenciation sérologique entre animaux vaccinés et animaux infectés (action A2). [Présentation PPT].

*In : AFSSA, INRA, ENVA. Journée de Restitution du Programme de recherches de la DGAL sur la FCO ; Questions/Réponses - Conférence du 18 mars 2010. Mis en ligne le 22 juillet 2010. Adresse URL : [http://www.rfsa.net/MANIFESTATIONS/2010/Presentations/S-Zientara3.pdf]*



# ANNEXES

## Annexe 1 : Séquence du gène L2 et de la protéine VP2 de la souche LVD4508 du BTV-1

→5' 1 UAAAAAAAAUAGUAGCGCGAUGGAUGAGCUAGGCAUCCAGUUUAUAAGAGAGGAUUUCCCGA 61

---

62 ACACCUGCUACGUGGUUACGAGUUCACAAUAGAUGUUGAACUAAGAUAGAAAGUGUUGG 121

---

122 AGGACGUCAUGAUGUAACGAAAAUACCAGAAAUGAACGCAUAUGACAUCAAGCAGGAGAC 181

---

182 AUCCGAACCGCAUUUAUGGUUUAUCCGAUAAGAAAUGAUGGUUAUUGUAUUGCCGCGAGUC 241

---

242 UUGGAUAUCACAUUGAGGGGUUACGAUGAAAGACGGGCCGUUGUUGAAAGUACGAGACAC 301

---

302 AAGAGUUCCAUAACGAAUGACCAGUGGGUGCAGUGGAUGAUGAAAGAUUCGAUGGACGCU 361  
M M K D S M D A

---

362 CAGCCUUUAAAGGUUGGGUUAGAUGAUCAAAGCAGGAAUGUAGCUCACUCGUUACAUAAC 421  
Q P L K V G L D D Q S R N V A H S L H N

---

422 UGCGUAGUCAAAAUCGAUUCAAAGAAGGCUGAUACUAUGUCUUACCAUGUAGAGCCGAUA 481  
C V V K I D S K K A D T M S Y H V E P I

---

482 GAGGACGCGUCGAAAGGAUGUUUGCAUACGAGGACCAUGAUGUGGAAUCACCUGGUACGU 541  
E D A S K G C L H T R T M M W N H L V R

---

542 AUAGAAACAUUUCAUACGGCGCAGGAGGUGCAUUAUCUCUCAAACCUACUUAUGACAUC 601  
I E T F H T A Q E V H I L F K P T Y D I

---

602 GUGGUCCACGCUGAAAGGAGAGAUCGCAGUCAACCGUUUAGGCCGGGGGAUCAGACAUUA 661  
V V H A E R R D R S Q P F R P G D Q T L

---

662 AUUAAUUUUGGGAGAGGUCAGAAGGUUCACAUGAACCACAAUUCAUUGAUUAGAUGGUU 721  
I N F G R G Q K V H M N H N S Y D K M V

---

722 GAGGGAUUAACACAUUUAGUGAUGAGAGGGAAAUGCCUGAGGUGAUUAGAGAUGAUUAC 781  
E G L T H L V M R G K M P E V I R D D I

---

782 GCGAGCUUGGAUGAGAUUAGCAAUAGGUGGAUACAAAGCAGGCACGACCCCGGAGAGGUA 841  
A S L D E I C N R W I Q S R H D P G E V

---

842 AAAGCAUAUGAGUUUUGUAAAAUUAUCAACGAUUGGUCGAAAAGUCCUCGAUCGGGGAG 901  
K A Y E L C K I L S T I G R K V L D R E

---

902 AAAGAACCAGAGGAUGAGGCAAUUCUAUCGAUCCGAUUUCAAGAGGGCAUCGACAAUAAA 961  
K E P E D E A N L S I R F Q E A I D N K

---

962 UUCCGACAACAUGACCCCGAGCGCCUGAAGAUUUUGAGCAUGGGAAUCAACGUAGAGAU 1021  
F R Q H D P E R L K I F E H G N Q R R D

---

1022 GAGGAUCGGUUCUAUAUUCUGUUGAUGAUUUCAGCCUCCGAUACUUUUAAUACACGAGUG 1081  
E D R F Y I L L M I A A S D T F N T R V

1082	UGGUGGUCGAACCCAUAUCCAUGUUUUAAGAGGAACCUUAAUUGCGUCAGAAACGAAACUA W W S N P Y P C L R G T L I A S E T K L	1141
1142	GGUGACGUUUUUCGAUGAUGCGUUCAUGGUAUGAUUGGAGUGUUCGACCGACCUAUACG G D V Y S M M R S W Y D W S V R P T Y T	1201
1202	CCUUACGAGAAAACAAGAGAACAAGAAGAAUUAUUUAUGGACGGGUUAACCGUUUGAC P Y E K T R E Q E E Y I Y G R V N L F D	1261
1262	UUCGUUGCGGAACCGGGAUUAAAAUUGUUCUUAUGGGAUUAUAGGCUGAAUCAUUCUACC F V A E P G I K I V H W E Y R L N H S T	1321
1322	CGGGAGAUAAACGUAUGCGCAAGGGAACCCAUGUGAUUUUUAACCCAGAGGAUGAUGAUGUA R E I T Y A Q G N P C D L Y P E D D D V	1381
1382	AUAGUCACAAAGUUCGAUGAUGUUGCGUAUGGUCAAAUGAUCAAUGAGAUGAUAAAUGGG I V T K F D D V A Y G Q M I N E M I N G	1441
1442	GGUUGGAAUCAAGAACAGUUCAAGAUGCAUAAAAUUUGAAAACGGAAGGUAAUGUUCUU G W N Q E Q F K M H K I L K T E G N V L	1501
1502	ACGAUAGACUUUGAAAAAGAUGCAAAGCUAACAACCAAUGAAGGCGUAACGAUGCCAGAA T I D F E K D A K L T T N E G V T M P E	1561
1562	UAUUUCAUAUAGUGGAUAUACGCUCCCGAUGUUCUAAUGCUAACGUCGCAUAAAACAUGAA Y F N K W I I A P M F N A N V R I K H E	1621
1622	GAGAUUGCGCAGCGUCAAAAGUGAUGAUCCGAUGGUAAAACGUACUUUAUCACCUAUUACU E I A Q R Q S D D P M V K R T L S P I T	1681
1682	GCAGACCCAAUCGAAUUGCAAAGACUGACUUUGGCGCGAUUUUACGACAUUCGUCCCGCU A D P I E L Q R L T L A R F Y D I R P A	1741
1742	UUAAGAGGACAGGCGCUUUCGCGGCAACAGGCACAGUCCACUUACGAUGAAGAAAUAUCG L R G Q A L S R Q Q A Q S T Y D E E I S	1801
1802	AAAAAAGCAGGUUAUGCGGAAGUAUUGAAACGUCGCGGAAUUGUGCAAAUCCCAAAGAAA K K A G Y A E V L K R R G I V Q I P K K	1861
1862	CCCUGCCCACUGUAACAGCUCAGUAUACGCUGGAACGUUACGCUUUUAUCAUUUAAAAC P C P T V T A Q Y T L E R Y A L F I I N	1921
1922	UACUUACAACAGCAUGUAGCGCGAGAUUGCGACGAGGAGGCGAUUAACGAACAUCGAGAA Y L Q Q H V A R D C D E E A I Y E H P K	1981
1982	GCAGACCAUGAACUUGAAAUAUUUGGCGAGAGCAUUGUGGAUAUCUCUCAAGUGAUUGUU A D H E L E I F G E S I V D I S Q V I V	2041
2042	CUAGUUUUUGACUUGAUUUUGAAAGAAGAAGGAGGGUUAGAGAUGUGUAUGAAUCGCGG L V F D L I F E R R R R V R D V Y E S R	2101
2102	UACAUAAUUGCGCGGAUUAGGAAAUGCGAGGUAAAGAAAAUUUAACGUGAUCGCGGAG Y I I A R I R E M R G K E K L N V I A E	2161
2162	UUUUUCCCAACCUAUGGGAGUCUUCUAAAUGGAUUAAGUGGCGCUACCGUAGUACAAGAU F F P T Y G S L L N G L S G A T V V Q D	2221
2222	AUUAUGUAUUUGAAUUUCUCCAUUGUAUUUUUCUAGUAGGCGAUAAACAUUAUACUCU I M Y L N F L P L Y F L V G D N M I Y S	2281

2282	CAUAGGCAGUGGUCUAUUCCUUUACUUCUAUAUACCCAUGAGGUGAUGGUGAUCCCAUUA	2341
	H R Q W S I P L L L Y T H E V M V I P L	
2342	GAAGUUGGUUCAUACAAUGAUCGGUGUGGAUUAUAGCGUACCUGGAAUACAUGGUUUUC	2401
	E V G S Y N D R C G L I A Y L E Y M V F	
2402	UUCCUCCAAGGCGAUUCGAUUAAGCAAACUAAAUGAAGCGCACGCCAAGAUUGC GCGC	2461
	F P S K A I R L S K L N E A H A K I A R	
2462	GAGAUCUUAAGUACUACGCUAUACAACGGUUAUUGAUGGGGAGACAAUCCAACGUU	2521
	E M L K Y Y A N T T V Y D G G D N S N V	
2522	GUGACGACGAAGCAGCUUUUUAUGAAACCUAUCUUGCUUCGUUAUGUGGGGGAUUUCU	2581
	V T T K Q L L Y E T Y L A S L C G G F L	
2582	GACGGAAUUGUUUGGUUUUGCCGAUCACACAUCCGAACAAAUGCAUUGUAGCGAUCGAG	2641
	D G I V W Y L P I T H P N K C I V A I E	
2642	GUAUCUGAUGAAAGAGUUCGCGUAGCGUAAGAGCGGGCGUAUAAGGCUAAGAUUCCA	2701
	V S D E R V P A S V R A G R I R L R F P	
2702	CUAAGCGCGCGACAUCUAAAAGGGUUGUAAUCAUACAAGUUGAUCUAGGAGGGCGAUUU	2761
	L S A R H L K G V V I I Q V D L G G R F	
2762	ACAGUGUAUAGCGAGGGAAUUGUGUCUCAUCGGGUAUGUAAGAAGAAUUUACUCAAGUAU	2821
	T V Y S E G I V S H R V C K K N L L K Y	
2822	AUGUGCGAUUAUUAUUACUCAAGUUUCCGGGCACGUUUUUGGUAACGACGAGAUGCUA	2881
	M C D I I L L K F S G H V F G N D E M L	
2882	ACAAAACUUCUCAACGUUGAUCUGCUUGACCGCAGAUCCGCGCACUAUUAGACUUAC	2939
	T K L L N V	*