

# TABLE DES MATIERES

<u>Liste des tableaux</u> .....	5
<u>Liste des figures</u> .....	7
<u>Liste des abréviations</u> .....	11
<u>Introduction</u> .....	12

## **I/ Rappels concernant la fièvre catarrhale du mouton**

.....	13
<u>1.1/ Historique de la fièvre catarrhale du mouton</u> .....	13
<b>1.1.1 Description des premiers cas</b> .....	13
<b>1.1.1 Isolement du virus</b> .....	13
<u>1.2/ Classification du virus</u> .....	14
<b>1.2.1 Caractéristiques générales de la famille des <i>Reoviridae</i></b> ....	14
<u>1.2.1.1 Structures et propriétés physico-chimiques</u> .....	14
<u>1.2.1.2 Cycles de réplication</u> .....	14
<u>1.2.1.3 Spectre d'hôte et pouvoir pathogène</u> .....	15
<b>1.2.2 Les <i>Orthoreovirus</i></b> .....	17
<b>1.2.3 Les <i>Rotavirus</i></b> .....	17
<b>1.2.4 Les <i>Coltivirus</i></b> .....	17
<b>1.2.5 Les <i>Orbivirus</i> : biologie et pathogénie</b> .....	17
<u>1.2.5.1 Les infections à <i>Orbivirus</i> chez l'homme</u> .....	18
<u>1.2.5.2 Les <i>Orbivirus</i> pathogènes pour l'animal : le virus de la fièvre catarrhale du mouton (ou virus de la Bluetongue)</u> .....	20
<u>1.3/ Organisation du génome du virus de la fièvre catarrhale du mouton</u> .....	20
<b>1.3.1 Structure du virus de la fièvre catarrhale et son organisation</b> .....	21
<b>1.3.2 Variation sérotypique du virus de la fièvre catarrhale</b> .....	25
<b>1.3.3 Réplication du virus</b> .....	26
<u>1.3.3.1 Adhésion et pénétration du virus</u> .....	26
<u>1.3.3.2 Décapsidation</u> .....	26
<u>1.3.3.3 Transcription du génome viral</u> .....	26
<u>1.3.3.4 Réplication des ARN double brin</u> .....	27

1.3.3.5 Traduction des ARN messagers.....	26
1.3.3.6 Assemblage des virions.....	28
1.3.3.7 Libération des virions.....	28
1.3.3.8 Réassortiment de segments génomiques.....	28
<b>1.4/ Epidémiologie analytique.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.1 Réservoirs viraux.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.2 Vecteur.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4.3 Physiopathogénie de la contamination virale.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4.4 Espèces réceptives.....</b>	<b>30</b>
<b>1.4.2 Physiopathogénie de la réponse immunitaire.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5/ Etude clinique.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.1 Symptômes.....</b>	<b>31</b>
1.5.1.1 Température.....	31
1.5.1.2 Signes cliniques évocateurs.....	31
1.5.1.3 Modifications biochimiques.....	33
1.5.1.4 Modifications hématologiques.....	35
1.5.1.5 Tératogénicité.....	36
1.5.1.6 Effets sur la fertilité.....	37
<b>1.5.2 Tableau lésionnel.....</b>	<b>37</b>
1.5.2.1 Lésions macroscopiques.....	37
1.5.2.2 Lésions microscopiques.....	38
<b>1.5.2 Pronostic.....</b>	<b>39</b>

## **II/ Méthodes de diagnostic expérimental de la fièvre Catarrhale du mouton...**

<b>2.1/ Diagnostic virologique.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1.1 Prélèvements.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1.2 Isolement de l'agent.....</b>	<b>41</b>
2.1.2.1 Isolement par inoculation à des oeufs embryonnés.....	42
2.1.2.2 Isolement par culture cellulaire.....	44
2.1.2.3 Isolement par inoculation à des moutons.....	45
<b>2.1.3 Identification de l'agent.....</b>	<b>46</b>
2.1.3.1 Sérogroupage des virus.....	46
2.1.3.2 Sérotypage des virus par neutralisation.....	51
<b>2.2/ Diagnostic virologique.....</b>	<b>53</b>
<b>2.2.1 Test de fixation du complément.....</b>	<b>53</b>

<b>2.2.2 Immunodiffusion en gélose</b> .....	53
<u>2.2.2.1 Méthode</u> .....	53
<u>2.2.2.2 Résultats</u> .....	54
<b>2.2.3 Techniques E.LISA</b> .....	55
<u>2.2.3.1 Evolution de la méthode</u> .....	55
<u>2.2.3.2 Résultats de ces méthodes</u> .....	56
<b>2.2.4 Technique de séroneutralisation</b> .....	58
<u>2.2.4.1 Méthode</u> .....	58
<u>2.2.4.2 Résultats</u> .....	58
<b><u>2.3/ Outils moléculaires</u></b> .....	59
<b>2.3.1 Principe de la PCR</b> .....	59
<u>2.3.1.1 Composants nécessaires</u> .....	59
<u>2.3.1.2 Différentes étapes de l'amplification</u> .....	60
<u>2.3.1.3 Différents types d'amplification</u> .....	61
<u>2.3.1.4 Identification des produits d'amplification</u> .....	61
<b>2.3.2 Principe de la méthode réalisée à l'AFSSA</b> .....	64
<b>2.3.3 Difficultés rencontrées</b> .....	65
<b>2.3.4 Caractéristiques de la techniques</b> .....	66
<u>2.3.4.1 Intérêts des RT-PCR pour le diagnostic de la fièvre catarrhale</u> .....	66
<u>2.3.4.2 Limites de ces techniques moléculaires</u> .....	67
<b>2.3.5 Variantes éventuelles</b> .....	68

### **III/ Situation épidémiologique de la fièvre catarrhale du mouton**..... 70

<b><u>3.1 Vecteurs de la fièvre catarrhale : les <i>Culicoides</i></u></b> .....	70
<b>3.1.1 Taxonomie et caractéristique générales des <i>Culicoides</i></b> .....	70
<u>3.1.1.1 Famille des cératopogonidés</u> .....	70
<u>3.1.1.2 Genre <i>Culicoides</i></u> .....	71
<b>3.1.2 Morphologie des <i>Culicoides</i></b> .....	72
<u>3.1.2.1 Tête</u> .....	73
<u>3.1.2.2 Thorax</u> .....	74
<u>3.1.2.3 Abdomen</u> .....	75
<u>3.1.2.4 Spécificité des <i>Culicoides imicola</i></u> .....	75
<b>3.1.3 Cycle évolutif des <i>Culicoides</i></b> .....	76
<u>3.1.3.1 Oeufs</u> .....	76
<u>3.1.3.2 Larves</u> .....	77
<u>3.1.3.3 Nymphe</u> .....	78
<u>3.1.3.4 Adulte</u> .....	78
<b>3.1.4 Virus associés aux <i>Culicoides</i></b> .....	79
<u>3.1.4.1 Différents virus associés</u> .....	79

3.1.4.2 Contamination des insectes et la réplication virale.....	80
<b>3.1.5 Localisation des <i>Culicoides</i> et rôle du climat sur leur     activité .....</b>	<b>84</b>
3.1.5.1 Leur habitat .....	84
3.1.5.2 Répartition géographique des différentes espèces de <i>Culicoides</i> .....	85
3.1.4.3 Influence du climat sur les <i>Culicoides</i> et leur dispersion.....	87
 <b><u>3.2 Fièvre catarrhale en Corse</u>.....</b>	<b>90</b>
<b>3.2.1 Situation épidémiologique mondiale actuelle .....</b>	<b>90</b>
<b>3.2.2 Evolution de la fièvre catarrhale dans le Bassin         méditerranéen au cours de ces dernières années.....</b>	<b>91</b>
<b>3.2.3 Deux épizooties successives en Corse.....</b>	<b>93</b>
3.2.3.1 Premiers cas en 2000.....	93
3.2.3.2 Nouvelle épizootie en 2001.....	99
<b>3.2.4 Evolution pour les années à venir.....</b>	<b>102</b>
 <b><u>Conclusion</u>.....</b>	<b>104</b>
 <b><u>Annexes</u>.....</b>	<b>105</b>
 <b><u>Bibliographie</u>.....</b>	<b>115</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> :	Structure et propriétés biologiques caractéristiques des neuf genres de la famille des <i>Reoviridae</i> .....	16
<u>Tableau 2</u> :	Les sérogroupes du genre <i>Orbivirus</i> (BORDEN, SHOPE et MURPHY, 1971 ; KARABATSOS, 1985 ; MERTENS, 1994) .....	19
<u>Tableau 3</u> :	Caractéristiques des segments génomiques et des protéines du virus de la FC sérotype 10 (ROY, 1992a).....	24
<u>Tableau 4</u> :	Principaux vecteurs du virus de la fièvre catarrhale du mouton_(OSBURN, 1994).....	29
<u>Tableau 5</u> :	Symptômes principaux des différentes formes cliniques de la maladie de fièvre catarrhale du mouton.....	33
<u>Tableau 6</u> :	Principales variations hématologiques après inoculation d'un BTV.....	36
<u>Tableau 7</u> :	Lésions les plus couramment observées suite à l'infection par un virus de la fièvre catarrhale.....	39
<u>Tableau 8</u> :	Caractéristiques de la technique d'inoculation sur œufs embryonnés.....	43
<u>Tableau 9</u> :	Caractéristiques de la technique d'isolement par culture cellulaire.....	45
<u>Tableau 10</u> :	Caractéristiques de différentes techniques d'identification virale.....	51
<u>Tableau 11</u> :	Caractéristiques de la séroneutralisation virale.....	52
<u>Tableau 12</u> :	Caractéristiques de l'immunodiffusion en gélose.....	54
<u>Tableau 13</u> :	Caractéristiques des différents types d'ELISA.....	57
<u>Tableau 14</u> :	Caractéristiques de la séroneutralisation par micro-titre.....	58
<u>Tableau 15</u> :	Zones d'efficacité de séparation des molécules d'ADN avec l'électrophorèse en gel d'agarose .....	62
<u>Tableau 16</u> :	Méthodes d'identification des produits d'amplification.....	64
<u>Tableau 17</u> :	Caractéristiques de la RT-PCR.....	68
<u>Tableau 18</u> :	Examens réalisés à l'AFSSA lors de l'arrivée d'un prélèvement suspect.....	69
<u>Tableau 19</u> :	Comparaison de la mesure de certaines parties de <i>Culicoides imicola</i> selon les études de WIRTH et HUBERT, et de MEISWINKEL et BAYLIS (1998).....	76

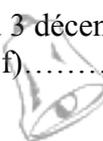
<u>Tableau 20</u> :	Effets climatiques sur les <i>Culicoides</i> et leur rôle comme vecteur de virus de la fièvre catarrhale du mouton.....	90
<u>Tableau 21</u> :	Evolution des suspicions de fièvre catarrhale en Corse du Sud du 21 octobre 2000 au 29 novembre 2000 (ZIENTARA <i>et al.</i> , 2000).....	94
<u>Tableau 22</u> :	Résultats d'analyses sérologiques en Corse au 29 novembre 2000 (ZIENTARA <i>et al.</i> , 2000).....	94
<u>Tableau 23</u> :	Séquences et localisations des amorces S7+ et S7-.....	112
<u>Tableau 24</u> :	Programmes d'amplification utilisés avec les deux couples d'amorces S7 et S10 .....	113

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Cycle de réplication des Réovirus selon TYLER et FIELDS (1990).....	16
<u>Figure 2</u> :	Structure du virus de la fièvre catarrhale selon LOUDON, LIU et ROY (1996) .....	23
<u>Figure 3</u> :	Phylogénie des souches de BTV fondée sur l'analyse de la protéine VP2 (BREARD <i>et al.</i> , à paraître).....	25
<u>Figure 4</u> :	Schéma synthétique de la réplication virale dans une cellule hôte.....	27
<u>Figure 5</u> :	Mouton atteint d'une forme aiguë de Fièvre catarrhale présentant une congestion des muqueuses buccales et un écoulement nasal muqueux (ZIENTARA S).....	31
<u>Figure 6</u> :	Mouton atteint d'une forme aiguë de Fièvre catarrhale présentant une cyanose de la langue (ZIENTARA S).....	32
<u>Figure 7</u> :	Variation du taux de GOT après inoculation de BLU-23 (JOHNSON <i>et al.</i> , 1996).....	34
<u>Figure 8</u> :	Variation du taux de CK après inoculation de BLU-23 (JOHNSON <i>et al.</i> , 1996).....	34
<u>Figure 9</u> :	Variation du taux de LDH après inoculation de BLU-23 (JOHNSON <i>et al.</i> , 1996).....	35
<u>Figure 10</u> :	Variation de la concentration en leucocytes dans le sang après inoculation de BLU-23 (JOHNSON <i>et al.</i> , 1996).....	35
<u>Figure 11</u> :	Variation de la concentration en lymphocytes dans le sang après inoculation de BLU-23 (JOHNSON <i>et al.</i> , 1996).....	36
<u>Figure 12</u> :	Hémorragie de l'artère pulmonaire sur un mouton mort à la suite d'une infection par le virus de la Fièvre catarrhale (ZIENTARA S).....	38
<u>Figure 13</u> :	Retrait du morceau de coquille et injection de l'inoculum lors d'une inoculation à des œufs embryonnés (PERIE P).....	42
<u>Figure 14</u> :	Exemple d'effet cytopathogène d'un BTV sur un tapis de cellules BHK-21 (ZIENTARA S).....	44
<u>Figure 15</u> :	Représentation schématique de la méthode d'identification virale par Immunofluorescence.....	47
<u>Figure 16</u> :	Représentation schématique de la méthode d'identification virale par E.L.I.S.A.....	48

<u>Figure 17</u> :	Représentation schématique de la méthode d'identification virale par Immunospot test.....	49
<u>Figure 18</u> :	Représentation schématique de la méthode d'identification virale par hybridation <i>In situ</i> .....	50
<u>Figure 19</u> :	Représentation schématique de la méthode sérologique par immunodiffusion en gélose.....	54
<u>Figure 20</u> :	Représentation schématique de la méthode sérologique par blocking ELISA .....	55
<u>Figure 21</u> :	Représentation schématique de la méthode sérologique par ELISA compétitive .....	56
<u>Figure 22</u> :	Etapes des cycles de la PCR (Polymerase Chain Reaction) (BALLAGI-PORDANY et BELAK, 1993a).....	61
<u>Figure 23</u> :	Fonctionnement de la méthode ELOSA KATZ <i>et al.</i> , 1993).....	63
<u>Figure 24</u> :	Deux électrophorèses sur gel d'agarose : une de RT-PCR de groupe et une pour différencier les souches vaccinales (ZIENTARA S).....	65
<u>Figure 25</u> :	Comparaison des méthodes d'isolement viral lors d'une étude de MACLACHLAN <i>et al.</i> (1994).....	67
<u>Figure 26</u> :	Représentation d'une aile de femelle <i>Leptoconops australiensis</i> au dessus et d'une aile de femelle <i>Forcipomyia townsvillensis</i> en dessous (KETTLE, 1984) .....	71
<u>Figure 27</u> :	Représentation d'une aile de femelle <i>Culicoides marmoratus</i> ( KETTLE, 1984).....	72
<u>Figure 28</u> :	Représentation d'un <i>Culicoides</i> femelle ailes ouvertes (KEETLE, 1984).....	72
<u>Figure 29</u> :	Représentation d'une femelle <i>Culicoides brevitarsis</i> de profil (KEETLE, 1984).....	73
<u>Figure 30</u> :	Représentation d'un <i>Culicoides</i> femelle ailes fermées selon (KEETLE, 1984) .....	73
<u>Figure 31</u> :	Représentation des deux premiers articles et du dernier article des antennes d'une femelle <i>Culicoides</i> montrant les différents types de sensilles (KREMER, WALLER et DELECOLL, 1987).....	74
<u>Figure 32</u> :	Hypogium des males <i>Culicoides</i> (KREMER, WALLER et DELECOLL, 1987) .....	75

<u>Figure 33</u> :	Représentation d'une vue dorsale d'une larve de <i>Culicoides impactus</i> (KEETLE, 1984).....	77
<u>Figure 34</u> :	Représentation schématique d'une nymphe de <i>Culicoides nubeculosis</i> (KEETLE, 1984).....	78
<u>Figure 35</u> :	Evolution de la concentration virale après un repas sanguin virémique chez <i>Culicoides variipennis</i> (MELLOR, 2000).....	81
<u>Figure 36</u> :	Représentation de la multiplication du virus de la Bluetongue chez un <i>Culicoides</i> infecté (MELLOR <i>et al.</i> , 2000).....	82
<u>Figure 37</u> :	Réplication du virus de la FC dans <i>Culicoides variipennis</i> selon le mode de contamination (MELLOR, 1990).....	84
<u>Figure 38</u> :	Répartition mondiale des différents <i>Culicoides</i> vecteurs et des sérotypes viraux associés (GIBBS et GREINER, 1994).....	87
<u>Figure 39</u> :	Formule permettant de donner la capacité vectorielle d'un <i>Culicoides</i> (WITTMANN et BAYLIS, 2000).....	88
<u>Figure 40</u> :	Modélisation des zones les plus favorable à la survie hivernale des <i>Culicoides</i> en Europe (HENDRIKX, 2003).....	89
<u>Figure 41</u> :	Représentation schématique de la distribution mondiale du virus de la Fièvre catarrhale et des cas cliniques (GIBBS et GREINER, 1994).....	91
<u>Figure 42</u> :	Situation sanitaire du pourtour méditerranéen au regard de la fièvre catarrhale du mouton en 2000 et 2001 (GREGORY, ZIENTARA et HENDRIKX, 2002).....	92
<u>Figure 43</u> :	Situation des suspicions et des confirmations de foyers de fièvre catarrhale en Corse du 18 octobre au 22 novembre 2000 (ZIENTARA <i>et al.</i> , 2000).....	95
<u>Figure 44</u> :	Résultats sérologiques de la fièvre catarrhale en Corse au 1 <sup>er</sup> décembre 2000 chez les bovins (ZIENTARA <i>et al.</i> , 2000).....	96
<u>Figure 45</u> :	Résultats sérologiques de la fièvre catarrhale en Corse au 1 <sup>er</sup> décembre 2000 chez les ovins (ZIENTARA <i>et al.</i> , 2000).....	97
<u>Figure 46</u> :	Représentation des captures de <i>Culicoides</i> réalisées début octobre : nombre d'insectes récoltés en quelques heures de piégeage (ZIENTARA <i>et al.</i> , 2000).....	98
<u>Figure 47</u> :	Zones infectées de fièvre catarrhale du mouton en Sardaigne, Calabre, Basilicate, Lazio et Toscane (Italie) au 28 septembre 2001 (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001e).....	99
<u>Figure 48</u> :	Répartition des cheptels suspects de fièvre catarrhale au 3 décembre 2001 (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001f).....	100



<u>Figure 49</u> :	Représentation de l'évolution de l'épizootie sur 2000-2001 : Cartographie des zones touchées en Corse (GREGORY, ZIENTARA et HENDRIKX, 2002)	101
<u>Figure 50</u> :	Localisation des pièges posés en Corse en juin et répartition des espèces (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001b)	102
<u>Figure 51</u> :	Représentation de la microplaque lors du dépôt des virus	109

## Liste des abréviations :

ADN = Acide désoxyribonucléique

AFSSA = Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AHSV+ un numéro= virus de la peste équine et son sérotype

BHK-21=Baby Hamster Kidney = lignée de cellules immortelles de reins de hamster nouveau-nés

BTV+ un numéro= virus de la Bluetongue ou fièvre catarrhale et son sérotype

CK= Créatinine kinase

CIRAD-EMVT= Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement- Elevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux

CTF= Colorado Tick Fever ou fièvre à tiques du Colorado

Da= unité de mesure Dalton

DEPC = Diethyl pyrocarbonate

DMI= Dose minimale infectante

EHD= Maladie hémorragique épizootique des cervidés

EHDV+ un numéro= virus de la maladie hémorragique épizootique et son sérotype

ELISA =Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay

FC= Fièvre catarrhale ou Bluetongue

GOT= Transaminase glutamino-oxaloacétique

LDH= Lactodéshydrogénase

LERPAZ= Laboratoire d'étude et de Recherche sur les pathologies animales et les zoonoses

MEM=Milieu minimum essentiel

NS1 à 3 = protéine non structurale 1 à 3

OIE= Office International des Epizooties

Pb= Paire de bases

PBS = solution tampon Phosphate Buffer Saline

PCR= Polymerase Chain Reaction

PI= post-infection

SVF=sérum de veau fœtal

TCID<sub>50</sub>= Dose infectieuse de 50% d'une culture cellulaire

UV= Ultra-Violet

VEE= Virologie des Equidés et des infections Emergentes et réémergeante

VP1 à 7= protéine virale de 1 à 7

# Introduction

La fièvre catarrhale du mouton ou « Bluetongue » est une arbovirose. Le virus de la fièvre catarrhale du mouton (ou BTV pour « Bluetongue Virus ») est transmis par des arthropodes hématophages de la famille des *Culicoides*, notamment *Culicoides imicola*.

La biologie du vecteur et son mode de transmission vectorielle confèrent à la maladie un caractère saisonnier et géographiquement délimité aux zones chaudes et humides. Le virus appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*. Plus d'une vingtaine de sérotypes viraux ont, à ce jour, été décrits.

La fièvre catarrhale est une infection qui a longtemps été classée en France parmi les « maladies exotiques », même si elle était déjà inscrite sur la liste A de l'Office International des Epizooties (OIE). Mais son apparition en 2000 et 2001 en Corse a provoqué l'abattage de près d'un quart du cheptel de l'île, la plaçant ainsi au premier rang des préoccupations zoosanitaires.

Suite à ces épizooties et étant donnée l'importance qu'elles avaient prises, l'AFSSA-LERPAZ de Maisons-Alfort, et plus précisément l'unité VEE, a été choisi en France comme laboratoire de référence. Il a donc été chargé de mettre en œuvre des méthodes de diagnostic fiables pour réagir face au problème Corse, notamment en développant des outils spécifiques, sensibles et rapides.

C'est dans ce cadre que j'ai accompli au sein du service de virologie de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Maisons-Alfort, un stage au cours duquel j'ai pu réaliser l'ensemble des méthodes de diagnostic virologique utilisées pour la fièvre catarrhale du mouton. Mon travail décrit donc tout d'abord les connaissances actuelles sur le virus de la fièvre catarrhale et sur la maladie qu'il provoque dans la population ovine, puis l'ensemble des méthodes de diagnostic réalisables, et enfin l'importance de son vecteur ainsi que la situation épidémiologique actuelle.

# **I/ Rappels concernant la fièvre catarrhale du mouton**

## **1.1/ Historique de la fièvre catarrhale du mouton**

### **1.1.1 Description des premiers cas**

Selon PARSONSON (1996), la fièvre catarrhale du mouton (FC) ou Bluetongue serait originaire du continent africain. Elle a été reconnue pour la première fois lors de l'introduction de moutons Mérinos et européens dans des élevages de la colonie du Cap en Afrique du Sud aux dix-septièmes et dix-huitièmes siècles. Les références font état d'un syndrome fébrile avec une forte létalité et une morbidité d'environ 30%.

Mais la maladie ne fut réellement décrite qu'en 1880 par HUTCHEON dans son rapport annuel cité par SPREULL (1905), qui poursuivit cette étude en 1905. La maladie fut alors nommée « Malarial Catarrhal Fever ». Ce n'est que par la suite que le terme « malarial » fut supprimé car il ne pouvait être attribué à cette pathologie ; le virus ne se trouvant pas dans les globules rouges. Ils décrivent la FC comme une maladie inoculable aux moutons caractérisée par de la fièvre dans une première phase de 7 à 30 jours, puis par l'apparition d'érythème, de pseudomembranes, d'une teinte bleutée anormale sur le mufle, de sécrétions catarrhales nombreuses et d'une infiltration oedémateuse de toute la muqueuse gingivale. Dans les cas sévères, la langue prenait une teinte bleu foncé (d'où le nom commun de « Bluetongue » donné à la maladie), son épithélium se désagrégait, et c'est toute la face qui devenait très oedématisée. Occasionnellement, des diarrhées sanguinolentes furent décrites, mais elles signaient toujours la mort imminente de l'animal. D'après SPREULL et HUTCHEON, la mortalité se situait entre 5 et 30% suivant la mise en place d'un traitement, mais la perte économique restait très grande car la FC provoquait toujours une perte importante de poids.

A cette époque, on pensait déjà que la matière virulente se trouvait dans le sérum et que la contamination se faisait par inoculation et non par contact. HUTCHEON, repris par SPREULL (1905), avait même suggéré le rôle d'insectes piqueurs comme vecteur de la FC.

### **1.1.2 Isolement du virus**

Le virus fut isolé et identifié sur l'île de Chypre (GAMBLES, 1949). La maladie y avait été décrite en 1924 pour la première fois, puis elle survenait régulièrement tous les étés. Pendant cette période, les scientifiques avaient essayé d'inoculer la maladie à des moutons sains avec de la salive ou du matériel nécrotique, mais leurs essais ne furent jamais concluants.

C'est en octobre 1943, alors que Chypre subissait une épizootie beaucoup plus importante (la mortalité atteignait 70%), que le virus fut isolé à partir du sang de moutons malades. Dès 1946, des essais furent réalisés pour essayer d'obtenir des vaccins à partir de souches atténuées, mais les procédés d'atténuation n'étaient pas encore maîtrisés et les résultats restaient très variables. Cela permit par contre de démontrer l'existence de différentes souches de virus de FC.

Sur le continent américain, c'est au Texas en 1948 que la FC apparut pour la première fois. La maladie y était nommée « sore muzzle of sheep » : le museau enflammé du mouton (HARDY et PRICE, 1952). Elle ne fut identifiée qu'en 1953, en Californie. Puis, jusqu'en 1960, on identifia jusqu'à 15 souches virales différentes dans le pays. Les virus étaient alors cultivés sur des œufs embryonnés de poulet (MOULTON, 1961).

Pendant cette même période, la maladie fut aussi identifiée en Turquie, en Israël et en Syrie. La maladie s'étendit alors progressivement dans l'ensemble du monde, jusqu'à obtenir la situation actuelle.

## 1.2/ Classification du virus

Ce virus appartient à la famille des *Reoviridae*.

### **1.2.1 Caractéristiques générales de la famille des *Reoviridae*:**

En 1959, SABIN proposa de regrouper au sein d'un groupe spécifique, des virus jusqu'alors classés dans le groupe des échovirus et isolés du tractus gastro-intestinal et de l'arbre respiratoire mais qui n'étaient pas directement associés à des entités cliniques définies. Il proposa le nom de « *Reovirus* » pour virus Respiratoires, Entériques, Orphelins. Cette famille s'est progressivement enrichie de virus apparentés et est aujourd'hui composée de neuf genres : les *Orthoreovirus*, les *Rotavirus*, les *Coltivirus* et les *Orbivirus* qui infectent les espèces animales (y compris l'espèce humaine), les *Cypovirus*, les *Phytoreovirus*, les *Aquareovirus* et les *Fijivirus* et les *Oryzavirus* qui infectent les plantes et les arthropodes (MATTHEWS, 1979 ; HOLMES, 1991).

Le virus de la fièvre catarrhale appartient au genre *Orbivirus*. Nous étudierons les caractéristiques des *Reoviridae*, puis envisagerons à titre de comparaison les différents genres de virus appartenant à ce groupe avant de détailler les caractéristiques des *Orbivirus*.

#### 1.2.1.1 Structures et propriétés physico-chimiques:

Les Réovirus sont dépourvus d'enveloppe virale et possèdent une capsid e à symétrie icosaédrique dont la taille varie de 60 à 80 nm (JOCKLIK, 1983). Cette dernière est constituée d'une capsid e externe et d'une capsid e interne (ou core). La masse molaire de la particule virale est d'environ  $120.10^6$  Da (URBANO P et URBANO FG, 1994).

Leur génome est constitué de 10 à 12 segments d'ARN bicaténaire, divisés en segments longs (L), moyens (M) et courts (S) selon leur vitesse de migration en gel de polyacrylamide. La masse molaire du génome varie de 12 à  $20.10^6$  Da.

Leur densité en gradient de chlorure de césium est de 1,36 à 1,39. Ils sont stables à  $-70^{\circ}\text{C}$  et à température ambiante.

#### 1.2.1.2 Cycle de réplication :

La réplication s'effectue dans le cytoplasme de la cellule (Figure 1). La transcription s'effectue à partir des brins négatifs des ARN bicaténaires et nécessite une ARN polymérase ARN dépendante d'origine virale. Les ARN messagers, coiffés et méthylés par des protéines virales non structurales, quittent la particule virale par des pores situés aux sommets de la capsid e icosaédrique (URBANO P et URBANO FG, 1994). Des corps d'inclusion virale, ou viroplasm es, sont détectés dans le cytoplasme de la cellule infectée. Ces structures semblent être le lieu de la morphogénèse des particules virales. Mais nous approfondirons la réplication virale des virus de la fièvre catarrhale dans la partie 1.3.3.

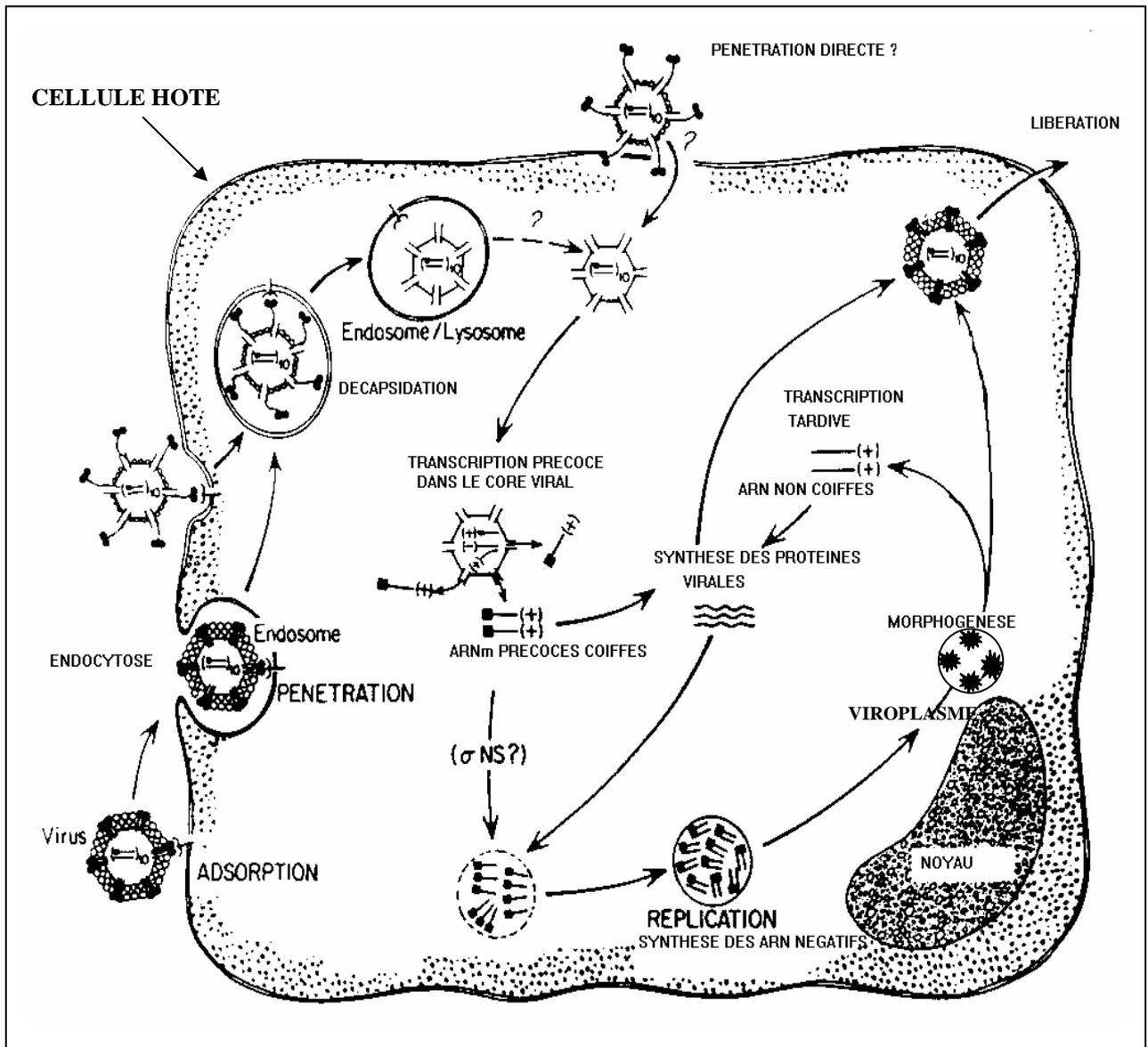


Figure 1 : Cycle de répliation des Réovirus selon TYLER et FIELDS (1990).

### 1.2.1.3 Spectre d'hôte et pouvoir pathogène:

Les virus de la famille des *Reoviridae* sont caractérisés par un large spectre d'hôte et infectent les Vertébrés : oiseaux, mammifères et poissons ainsi qu'Invertébrés et plantes. Nous ne présenterons brièvement que les *Orthoreovirus*, les *Rotavirus*, les *Coltivirus* et les *Orbivirus*, les caractéristiques des *Aquareovirus*, des *Phytoreovirus*, des *Cypovirus* et des *Fijivirus* étant résumées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Structure et propriétés biologiques caractéristiques des neuf genres de la famille des *Reoviridae*.

	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Coltivirus</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Orbivirus</i>
Prototype	Reovirus sérotype 3 (REO-3)	virus de la fièvre à tique du Colorado (CFTV)	Rotavirus simien séro groupe A (SA 11)	fièvre catarrhale du mouton (Bluetongue virus)
génom	10 ARN db	12 ARN db	11 ARN db	10 ARN db
propriétés antigéniques	2 groupes antigéniques : - réovirus aviaires - réovirus de mammifères.	trois sérotypes	6 groupes antigéniques (de A à F) divisés en sérotypes	14 sérogroupes (divisés en sérotypes) et 17 virus non groupés
spectre d'hôte	vertébrés	mammifères et tiques	vertébrés	vertébrés (humains, bovins, ovins, équins, rongeurs, primates)
arthropode vecteur	non	Tiques des genres <i>Dermacentor</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Harmaphysalis</i>	non	oui (moucheons, moustiques, phlébotomes, tiques)
pouvoir pathogène	troubles respiratoires, intestinaux	pathogène pour l'Homme	Diarrhées, gastro-entérites	très pathogène (peste équine) ou infections inapparentes

	<i>Fijivirus</i>	<i>Cypovirus</i>	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Oryzavirus</i>	<i>Aquareovirus</i>
Prototype	Fiji disease virus (FDV)	virus de la polyhédrose cytoplasmique du <i>Bombix mori</i> type1 ( <i>BmCPV1</i> )	Wound tumor virus (WTV)	Rice ragged stunt virus (RRSV)	Golden shiner virus (GSV)
génom	10 ARN db	10 ARN db	12 ARN db	10 ARN db	11 ARN db
Propriétés antigéniques	3 groupes antigéniques	(12 électrophorétypes)	3 virus isolés antigéniquement distincts	-	1 antigène de groupe et 6 sérotypes
Spectre d'hôte	plantes et insectes	arthropodes (insectes)	plantes (Graminées, Dicotylédones)	plantes (Graminées)	vertébrés poïkilothermes et invertébrés
Arthropode vecteur	oui ( <i>Delphacidae</i> )	non	oui ( <i>Cicadellidae</i> )	oui (sauterelles)	non
pouvoir pathogène	hypertrophie du phloème, tumeurs, galles...	anomalies larvaires et imaginaires	galles, colorations anormales des feuilles	destruction de 10 à 20% des cultures de riz en Asie	faible

### 1.2.2 Les *Orthoreovirus*

Les *Orthoreovirus* n'infectent que les Vertébrés et leur spectre d'hôte est large : oiseaux, mammifères et poissons. Leur transmission s'effectue directement par l'intermédiaire d'un cycle oro-fécal ou par voie aérienne. Chez l'Homme, les *Orthoreovirus* sont associés à des pathologies de l'arbre respiratoire supérieur, du tractus intestinal et à un syndrome d'atrésie des voies biliaires chez le nouveau-né. Les *Orthoreovirus* isolés chez les mammifères (bovins, équins, chiens, singes...) sont à l'origine de syndromes très variés mais c'est chez les oiseaux que les différents pathotypes de Réovirus aviaires sont responsables de maladies dont l'incidence économique est non négligeable (arthrites, syndromes de malabsorption, gastro-entérites...).

### 1.2.3 Les *Rotavirus*

Les *Rotavirus* n'infectent que les vertébrés et sont transmis par l'intermédiaire d'un cycle oro-fécal. Six groupes antigéniques de Rotavirus sont décrits (de A à F), chaque groupe étant divisé en plusieurs sérotypes (le groupe A est constitué de 14 sérotypes différents). Les virus qui infectent l'Homme appartiennent aux groupes A, B, et C. Les *Rotavirus* sont responsables de gastro-entérites aiguës chez l'enfant et le jeune animal (veau, poulain, porcelet ...) (MEBUS, UNDERDAHI, RHODES et TWIEHAUS, 1969). Des *Rotavirus* d'origine humaine peuvent être transmis à des porcelets, des veaux, des agneaux, des chiens non sevrés et à des singes rhésus nouveau-nés chez qui ils peuvent provoquer une diarrhée ou une simple infection. Les *Rotavirus* d'origine équine et simienne ont été transmis à des porcelets (HOLMES, 1979). Ces observations indiquent que les Rotavirus ne sont pas strictement spécifiques d'un hôte, cependant, la nature de ces échanges entre espèces est peu connue (ACHA et SZYFRES, 1989).

### 1.2.4 Les *Coltivirus*

La fièvre à tiques Colorado, appelée aussi "la fièvre des montagnes" ou « Colorado Tick Fever » (CTF), a été identifiée au début du siècle par des praticiens du Montana et du Colorado mais il fallut attendre 1930 pour que BECKER la décrive en tant qu'entité nosologique (BECKER, 1930). Le virus de la CFT a été isolé à partir de sang humain en 1944 en utilisant un système inhabituel de production de leucocytes chez des hamsters adultes (FLORIO, STEWART et MUGRAGE, 1944). Deux autres virus antigéniquement distincts ont été ensuite isolés : l'Eyach virus, isolé à partir de tiques du genre *Ixodes* en Allemagne et en France (CHASTEL, MAIN et COUATARMANAC'H, 1993) et le virus S6-14-03 isolé à partir d'un lièvre (*Lepus californicus*) en Californie (LANES *et al.*, 1982). Les virus CTF, longtemps considérés comme des *Orbivirus* (les seuls *Orbivirus* à posséder 12 segments d'ARN bicaténaire) sont aujourd'hui classés dans le genre *Coltivirus* (HOLMES, 1991).

### 1.2.5 Les *Orbivirus* : biologie et pathogénie

Les *Orbivirus* sont responsables de maladies majeures en médecine vétérinaire alors qu'en médecine humaine leur gravité est moindre. Les *Orbivirus* sont isolés de nombreuses espèces animales y compris l'homme et sont répandus dans le monde entier. Ils sont transmis par l'intermédiaire de nombreux vecteurs biologiques : tiques, phlébotomes, moustiques, moucheron (*Culicoides...*) (Tableau 2).

Les *Orbivirus* sont divisés en sérogroupes, les virus d'un même séro groupe possédant un antigène commun localisé au niveau de la capsid e interne qui leur confère une réactivité croisée en fixation du complément (KNUDSON, 1981). Des antigènes, spécifiques de type, sont associés à la capsid e externe et induisent la production d'anticorps neutralisants. Actuellement, 14 sérogroupes distincts sont identifiés ainsi qu'un ensemble de virus non-groupés (Tableau 2). Chaque séro groupe est divisé en sérotypes (BORDEN, SHOPE et MURPHY, 1971 ; KARABATSOS, 1985 ; MERTENS, 1994).

#### 1.2.5.1 Les infections à *Orbivirus* chez l'homme

- Le groupe *Changuinola*: Le virus de la maladie de Changuinola est le prototype d'un séro groupe comprenant 12 sérotypes et est le seul responsable d'une maladie chez l'homme. Le virus a été isolé chez un patient qui a présenté un syndrome fébrile modéré au Panama. Le taux de prévalence de l'infection est inconnu. Deux cent soixante dix souches ont été isolées à ce jour (à partir d'insectes notamment) et forment un groupe hétérogène comme l'atteste la diversité des électrophorétypes de 24 souches analysées par TRAVASSOS *et al.*(1984).

- Le groupe *Kemerovo*: Le groupe *Kemerovo*, divisé en 4 sous-groupes antigéniques, comporte 23 virus. Les trois virus du sous-groupe *Kemerovo* (*Kemerovo*, *Lipovnik* et *Tribec*) sont responsables de syndromes fébriles et d'infections neurologiques chez l'homme en Europe Centrale. Les virus des sous-groupes *Chenuda*, *Wad Medani* et *Great Island* ne sont pas pathogènes pour l'homme. Une vingtaine de souches du virus *Kemerovo* ont été isolées du sang de patients atteints de méningo-encéphalites dans la région de *Kemerovo* en Russie et à partir de tiques: d'*Ixodes persulcatus* en 1962 (WALTON et OSBURN, 1992), de *Hyalomma anatolium* dans la même région et d'un oiseau (*Phoenicurus phoenicurus*) en Egypte.

- Le groupe *Lebombo*: Le virus *Lebombo* a été isolé pour la première fois à Ibadan au Nigeria en 1968 d'un enfant atteint d'un syndrome fébrile. Le cycle de transmission n'est pas connu mais des virus ont été isolés à partir de rongeurs (*Thryonomys swinderianus*) et de moustiques (*Mansonia africana* et *Aedes circumluteolus*) au Nigeria et en Afrique du Sud.

- La fièvre d'Orungo : Le virus de la fièvre d'Orungo est présent en Afrique tropicale. Il fut isolé en 1959 de moustique (*Anopheles funestus*) en Ouganda. Le virus a été isolé au Sénégal, en Cote d'Ivoire, au Nigeria, en République d'Afrique Centrale et des données sérologiques permettent de suspecter sa présence au Ghana, en Sierra Leone et au Cameroun. Le virus est transmis à l'homme et aux animaux domestiques par l'intermédiaire de moustiques des genres *Anopheles* et *Aedes*.

Je n'ai pas traité le groupe de *Corriparta* car c'est un groupe mineur qui ne possède quasiment pas d'intérêt en médecine humaine.

Tableau 2 : Les sérogroupes du genre *Orbivirus* (BORDEN, SHOPE et MURPHY, 1971 ; KARABATSOS, 1985 ; MERTENS, 1994)

sérogroupes	nombre de sérotypes	hôtes vertébrés	invertébrés vecteurs
AHSV	9	équidés, zèbres, chiens, éléphants, chameaux, moutons, chèvres	<i>Culicoides</i> , moustiques
BTV	24	ruminants domestiques et sauvages	<i>Culicoides</i>
EHDV	8	chameaux, bovins lamas, cerfs	<i>Culicoides</i>
Encéphalose équine (EEV)	7	chevaux	<i>Culicoides</i> ,
Eubenangee	4	inconnu	<i>Culicoides</i> , moustiques
Palyam	11	bovins, moutons	<i>Culicoides</i> , moustiques
Wallal	2	marsupiaux	<i>Culicoides</i> ,
Warrego	2	marsupiaux	<i>Culicoides</i> ,
<hr/> <hr/>			
Changuinola	12	humains, rongeurs	<i>Culicoides</i> , phlébotomes
Corriparta	4	humains, rongeurs	moustiques
Kemerovo	40	humains, rongeurs, oiseaux, bovins, moutons	tiques
Lebombo	1	humains, rongeurs	moustiques
Orungo	4	humains, chameaux, bovins, chèvres, singes, moustiques	moustiques
Umatilla	3	oiseaux	moustiques

### 1.2.5.2 Les *Orbivirus* pathogènes pour l'animal : le virus de la fièvre catarrhale du mouton (ou virus de la bluetongue)

L'importance médicale des infections à *Orbivirus* (les virus de la fièvre catarrhale du mouton, de la maladie hémorragique épizootique du cerf (EHD) et de la peste équine) est considérable en médecine vétérinaire, notamment pour les espèces ovines et équines pour lesquelles ces maladies constituent des risques sanitaires majeurs. Les étudier dans leur ensemble représenterait un travail beaucoup trop vaste pour être réalisé ici. Je me contenterais donc de donner leurs principales caractéristiques.

- **Le virus de la peste équine :**

Cet *Orbivirus*, très proche du virus de la fièvre catarrhale, est à l'origine d'une maladie mortelle non contagieuse pour le cheval. Elle se caractérise par un affaiblissement des systèmes circulatoires et respiratoires, et provoque d'importantes suffusions et hémorragies dans différents organes.

D'importantes épizooties ont été observées en Afrique du Sud, au Pakistan, en Espagne, au Portugal, au Maroc, et en Inde où plus de 300 000 chevaux sont morts pendant la grande épizootie de 1959 à 1961 (MELLOR, BOORMAN et BAYLIS, 2000).

- **Le virus de la maladie hémorragique épizootique :**

C'est également un *Orbivirus* proche du virus de la fièvre catarrhale. Il sévit dans toutes les régions d'Amérique, en Afrique, en Asie du sud-est, au Japon et en Australie. Il contamine aussi bien des ruminants domestiques que des ruminants sauvages comme le cerf et donne des symptômes proches de l'infection par le virus de la fièvre catarrhale.

- **Le virus de l'encéphalose équine :**

Ce virus a été isolé en Afrique du Sud et au Botswana. Dans 90% des cas d'infections, il ne provoque que peu ou pas de symptômes cliniques. Dans les autres cas, le virus cause des avortements, une faiblesse cardiaque ou une maladie proche de la Peste équine.

### 1.3/ Organisation du génome du virus de la fièvre catarrhale du mouton

Un grand nombre de données est disponible sur la biologie moléculaire du virus de la Bluetongue (ou BTV), prototype du genre *Orbivirus*.

### 1.3.1 Structure du virus de la fièvre catarrhale et son organisation :

Les caractéristiques morphologiques du virus de la FC sont comparables à celles du virus de la peste équine. Le génome de la FC mesure  $18.10^6$  Da et consiste en une double chaîne d'ARN divisée en 10 segments. Ce virus possède sept protéines structurales différentes réparties en deux capsides (PRASAD, ROY et YAMAGUICHI, 1992).

La capside externe est composée de VP2 et VP5 et s'organise selon une symétrie icosaédrique avec un diamètre de 690Å (ROY, 1992b). La capside ou "core" est composée de deux protéines majeures VP3 et VP7 et renferme le "subcore" qui, lui, est formé de trois protéines mineures VP1, VP4 et VP6. Ce dernier englobe aussi les dix segments d'ARN (ROY, 1992a) numérotés de 1 à 10 en fonction de leur ordre de migration en gel de polyacrylamide, qui sont classés en segments long (L pour "large", L1 à L3), moyens (M pour "medium", M4 à M6) et courts (S pour "short", S7 à S10). Leur taille varie alors de 0,5 à  $2,7.10^6$  Da (ROY, 1989).

La totalité de la séquence en nucléotides du virus de la FC a été élucidée pour le sérotype BTV-10. La composition moyenne du génome est la suivante: 28,1% A, 28,1% U, 21,9% G et 21,9% C. La taille moyenne des séquences non codantes des extrémités 5' varie de 8 nucléotides pour M4 à 34 pour M6. Quant à celle des extrémités 3', elle est généralement plus longue: de 31 nucléotides pour M5 à 116 nucléotides pour S10. De plus, tous les ARN ont conservé une séquence terminale identique: une extrémité 5' ; GUUAAA et une 3' ; CACUUAC (ROY, 1989). Mais les rôles de ces séquences dans la transcription, la réplication et les événements morphogénétiques n'ont pas encore été élucidés.

- Gène L1 et protéine VP1:

Ce gène, le plus grand segment d'ARN, a une longueur de 3950 paires de bases (pb) environ et code pour une protéine mineure: VP1. Cette protéine est présente à l'intérieur de la capside du virion. Elle semble faire partie de l'ARN polymérase et joue le rôle de transcriptase reverse.

- Gène L2 et protéine VP2:

Ce segment, qui code pour la protéine VP2, a une longueur de 2920 paires de bases environ. Cette protéine est un composant majeur de la capside externe, c'est l'hémagglutinine du virus. C'est aussi le principal antigène spécifique de type et la protéine dont les variations sont les plus nombreuses.

La protéine VP2 constitue également la cible majeure du système immunitaire de l'hôte, les anticorps neutralisants de la FC sont induits par les épitopes localisés sur la protéine VP2. Enfin, le site de fixation du virus à son récepteur cellulaire serait situé sur VP2.

- Gène L3 et protéine VP3:

Le segment L3 a une longueur d'environ 2770 paires de bases et code pour la protéine VP3. C'est une protéine majeure de structure du core, et elle représente le déterminant antigénique de la spécificité de groupe. C'est la protéine la plus conservée entre AHSV-4, BTV-10 et EHDV-1.

- Gène M4 et protéine VP4:

Ce segment, qui code pour la protéine VP4, a une longueur d'environ 2010 pb. L'extrémité non codante 5' est spécialement courte par rapport aux autres segments: 8 paires de bases, mais sa fonction n'a pu encore être mise en évidence.

La protéine VP4, quant à elle, est une des protéines mineures du subcore. Les extrémités 5' des ARN messagers viraux sont coiffés et méthylés pendant la transcription. Il a été démontré que le complexe core-GTP, par l'intermédiaire de VP4, catalyse le "coiffage" de l'ARN messenger (ROY, 1992a). Cette protéine correspondrait à la guanilyl transférase.

- Gène M5 et protéine VP5:

Ce segment, de 1640 paires de bases, code pour la protéine VP5, protéine majeure de la capsid externe. Elle est formée de trois régions hydrophobes dont l'extrémité C-terminale, et elle semble être malgré tout moins exposée à la surface de la particule virale que la protéine VP2.

- Le gène M6 et la protéine NS1:

Le segment 6, d'environ 1770pb, code pour la protéine non structurale NS1. Cette protéine est particulièrement riche en cystéine, tryptophane et tyrosine. Elle forme les tubules dans le cytoplasme des cellules infectées par le virus BTV. Ces tubules de 68nm de large, sont constitués de dimères de NS1 enroulés en hélice (ROY, MERTENS et CASAL, 1994).

- Gène S7 et protéine VP7:

Le segment 7, d'une longueur d'environ 1160 pb, code pour un des composants majeurs de la capsid interne. La protéine VP7 représente à elle seule 36% du core (ROY, 1989), d'autant que son poids reste très élevé par rapport à sa taille (38548 Da pour 349 acides aminés).

De plus, les extrémités 5' et 3' présentent des séquences inversées complémentaires qui permettraient la formation de structures secondaires. Mais le rôle de ces structures n'a pas encore été élucidé: Elles pourraient :

- faciliter la transcription en favorisant la fixation de l'ARN polymérase (VP1) sur l'ARN génomique.
- protéger les ARN messagers de l'action des exonucléases, ou améliorer la terminaison de la traduction, ou bien permettre la sélection des 10 ARN lors de l'encapsidation (ROY *et al.*, 1991).

C'est également un déterminant antigénique de la spécificité de groupe. Elle semble d'ailleurs plus accessible que les autres protéines du core à la surface du virus. Mais elle possède des déterminants antigéniques communs avec d'autres *Orbivirus* (CHUMA *et al.*, 1992).

- Gène S8 et protéine NS2:

Le gène S8, d'environ 1130 pb, code pour la protéine non structurale NS2. C'est la seule protéine qui sera phosphorylée dans les cellules infectées par le BTV. Elle est capable de se fixer aux ARN simple brin du BTV, mais la fonction réelle de cette protéine est mal connue. NS2 est le constituant majeur des corps d'inclusion qui apparaissent dans le

cytoplasme des cellules infectées 4 à 8 heures après l'infection. Elle favoriserait la traduction des ARN messagers des protéines du core au sein de ces corps d'inclusion (HYATT, BROOKES, GOULD et EATON, 1992).

- Gène S9 et protéine VP6:

Le gène S9 s'étend sur une longueur d'environ 1050 paires de base, il code pour les protéines VP6 et VP6a, composant mineur du virion. L'obtention de l'une ou l'autre protéine dépend du site initial de transcription.

Ces protéines restent très basiques et riches en arginine, lysine et histidine. Elles possèdent une séquence commune aux hélicases et fixent avec une grande affinité les ARN simple et double brin. Elles sembleraient être elles aussi un composant de l'ARN polymérase ; elles interviendraient dans l'encapsidation de l'ARN (ROY, 1992a).

- Gène S10 et protéine NS3 :

La longueur totale du segment S10 est d'environ 820 paires de bases. Ce gène S10 est utilisé pour le sérogroupage des virus de la fièvre catarrhale car selon les souches il est conservé entre 90 et 100% (AKITA *et al.*, 1992).

Il code pour les protéines non structurales NS3 et NS3A. Ces deux protéines semblent provenir d'une alternative dans le site initial de la traduction du gène S10, mais au finale elles sont homologues à plus de 80% (ROY, 1989).

La microscopie électronique a permis de montrer une association des protéines NS3 et NS3A avec les vésicules lisses intracellulaires et la membrane plasmique. Cela a permis de suggérer que ces protéines intervenaient dans la maturation finale du virus ainsi que dans la libération des particules virales par les cellules infectées (ROY, 1992a).

Le tableau 3 récapitule les caractéristiques des segments génomiques du virus de la BT ainsi que de leurs produits d'expression.

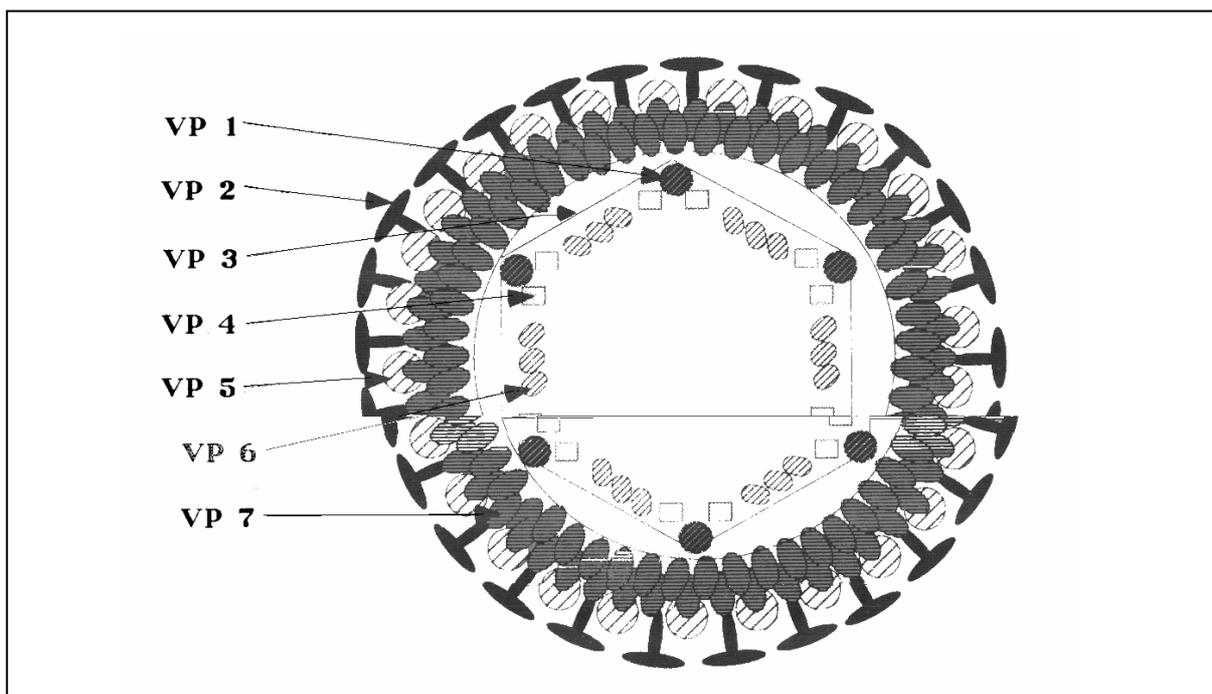


Figure 2 : Structure du virus de la fièvre catarrhale selon LOUDON, LIU et ROY (1996)

**Tableau 3** : Caractéristiques des segments génomiques et des protéines du virus de la FC sérotype 10 (ROY, 1992a)

segments	taille (en pb)	Protéines	nombre d'acides aminés	Masse molaire (Da)	Localisation	nombre de molécules par virion	fonctions ou propriétés
L1	3954	VP1	1302	149 588	protéine mineure du core	environ 6	- antigène de groupe - ARN polymérase
L2	2926	VP2	956	111 112	capside externe	180	- spécificité de type - antigène protecteur - récepteur cellulaire - hémagglutinine
L3	2772	VP3	901	103 344	protéine majeure du core	60	- antigène de groupe
M4	2011	VP4	654	76 433	protéine mineure du core	environ 5	- antigène de groupe - guanylyltransférase
M5	1639	VP5	526	59 163	capside externe	120	spécificité de type
M6	1770	NS1	552	64 445	protéine non structurale	-	antigène de groupe
S7	1156	VP7	349	38 548	protéine majeure de surface du core	780	antigène de groupe
S8	1123	NS2	357	40 999	protéine non structurale	environ 37	- associée aux corps d'inclusion - fixe les ARN messagers
S9	1 046	VP6/ VP6A	328	35 750	protéine mineure du core	-	- antigène de groupe - fixe les ARN sb et db (hélicase)
S10	822	NS3/ NS3A	229/216	25 572/24 020	protéine non structurale	-	- glycoprotéine, - libération des virions

Ainsi, le virus de la fièvre catarrhale est formé d'une dizaine de protéines codées chacune par un segment d'ADN différent. Mais on ne rencontre pas qu'un seul type de virus puisque l'on connaît déjà 24 sérotypes, voyons à présent les variations qui existent entre les différentes souches.

### 1.3.2 Variation sérotypique du virus de la fièvre catarrhale

Mis à part les segments 2 et 5, les huit autres gènes codant pour les protéines du core et les protéines non structurales, semblent être relativement bien conservés au sein des différents sérotypes de BTV. Et c'est la protéine VP7, protéine spécifique de groupe, qui reste la protéine la plus conservée comparée aux autres protéines du core (ROY, 1989). Elle a été utilisée pour déterminer les relations phylogéniques entre les différents types d'*Orbivirus*, au même titre que les protéines NS1 et VP3.

Pour étudier les relations entre les sérotypes de BTV, on a d'abord voulu se baser sur la protéine VP3. Par la suite, la protéine VP2 présentant une plus grande variabilité, c'est elle qui fut choisie pour déterminer les liens de parentés et l'ancêtre commun de l'ensemble des virus BTV actuels (Figure 3) (GOULD et HYATT, 1994).

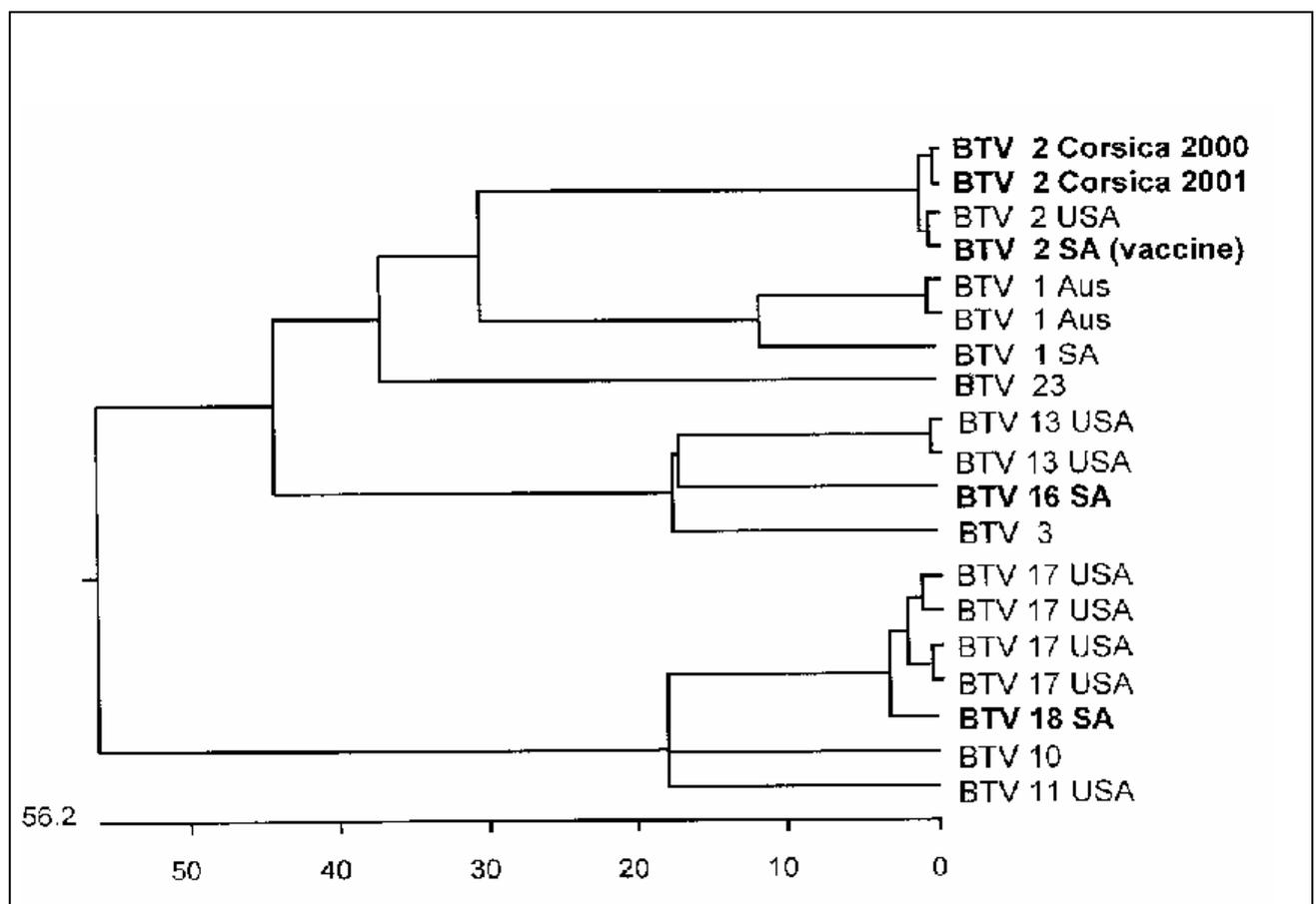


Figure 3 : Phylogénie des souches de BTV fondée sur l'analyse de la protéine VP2 (BREARD *et al.*, à paraître)

### 1.3.3 Réplication du virus

Pour bien comprendre le mécanisme de cette réplication virale, on pourra se référer à la figure 1 et 2, ainsi que la figure 4, qui suit, plus schématique.

#### 1.3.3.1 Adhésion et pénétration du virus :

Le virus s'attache à son récepteur localisé sur la membrane cellulaire dans un site caractérisé par la présence de molécules de clathrine. Ce sont des protéines qui facilitent les mécanismes de fusion des membranes. D'après PURDY, l'attachement du virion à la membrane cellulaire s'effectuerait par l'intermédiaire de la protéine VP2 (PURDY, PETRE et ROY, 1984). Le récepteur cellulaire, quant à lui, n'est pas encore identifié. Cependant, l'étude des interactions entre le BTV et les érythrocytes indique que le virus se fixerait par l'intermédiaire de la protéine VP2 à des glycoprotéines (les glycophorines) présentes à la surface des hématies d'origine humaine et animale (EATON et CRAMERI, 1989). La membrane cellulaire s'invagine alors produisant une vésicule (appelée coated-pit) dont la surface externe est recouverte des molécules de clathrine.

Un mode de pénétration directe du virus de la FC dans la cellule cible a été décrit pour les particules infectieuses subvirales (qui résultent de la digestion du virion, *in vitro*, par la chymotrypsine et qui contiennent les produits de clivage de la protéine VP2) et les cores viraux (particules virales ne comprenant pas les protéines externes VP2 et VP5). Ces particules sont 100 à 500 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes (comme *Aedes albopictus*, l'agent de la fièvre Dengue) que pour les cellules de mammifères. Elles sont aussi 100 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes que les particules virales intactes (MERTENS, BURROUGHS et ANDERSON, 1987).

#### 1.3.3.2 Décapsidation :

Les vacuoles d'endocytose fusionnent avec des lysosomes. HUISMAN a montré qu'une heure après la pénétration du virus de la FC dans la cellule, la capsid externe contenant les protéines VP2 et VP5 était hydrolysée (HUISMAN, VAN DIJK et ELS, 1987). Cette décapsidation est nécessaire à l'activation de la transcriptase virale par action des lysozymes libérés par la cellule hôte dans l'endosome.

#### 1.3.3.3 Transcription du génome viral :

L'initiation de la transcription est effectuée dans les virions décapsidés mais, en ce qui concerne le virus de la FC, aucune étude n'a permis de préciser si les virions restaient dans les vésicules lysosomales ou traversaient les membranes cellulaires. La seconde hypothèse reste la plus probable car la présence de ribonucléases, de phosphatase et l'absence de nucléotides triphosphates dans les endosomes constituent des facteurs défavorables à une éventuelle transcription (GOULD et HYATT, 1994).

La protéine VP1 du virus serait l'ARN polymérase ARN dépendante. Elle est présente à une concentration de six molécules par virion (HUISMAN, VAN DIJK et ELS, 1987). La température optimale de l'activité de la transcriptase du virus de la FC est de 28°C, alors qu'en général, pour les *Reovirus*, elle oscille entre 47 et 52°C. Cette propriété est à relier avec le fait que le virus de la FC est transmis par des insectes dans lesquels il se réplique.

Les brins négatifs d'ARN double brin sont transcrits en ARN messagers précoces. La transcription précoce est définie comme l'étape de transcription se déroulant dans le core viral et produisant des ARNm coiffés qui permettront la synthèse de protéines et serviront de matrice à la synthèse des ARN négatifs.

Les ARNm précoces sont coiffés et polyadénylés. La protéine VP4 serait la guanilyl transférase d'après LE BLOIS *et al.* (1992). Les ARN messagers synthétisés à l'intérieur du core, quitteraient celui-ci selon un mécanisme encore mal connu qui impliquerait un changement de conformation du core viral.

#### 1.3.3.4 Réplication des ARN double brin :

Les ARN génomiques négatifs sont synthétisés à partir des ARN positifs préalablement transcrits. Cette synthèse s'effectue simultanément à la formation des particules pro virales. La protéine NS2, une phosphoprotéine, se fixe sur les ARN simples brins et interviendrait dans la réplication. Les brins complémentaires ainsi synthétisés restent associés aux brins parentaux sous forme d'ARN double brin.

Les mécanismes par lesquels les dix ARN double brin génomiques s'associent ensemble à l'intérieur de chaque particule virale en formation restent inconnus. Les protéines VP6 et VP6a, produit de la traduction du segment 9, pourraient jouer un rôle dans l'encapsidation des ARN double brin.

La figure 4 récapitule les différentes étapes de la réplication virale dans une cellule hôte.

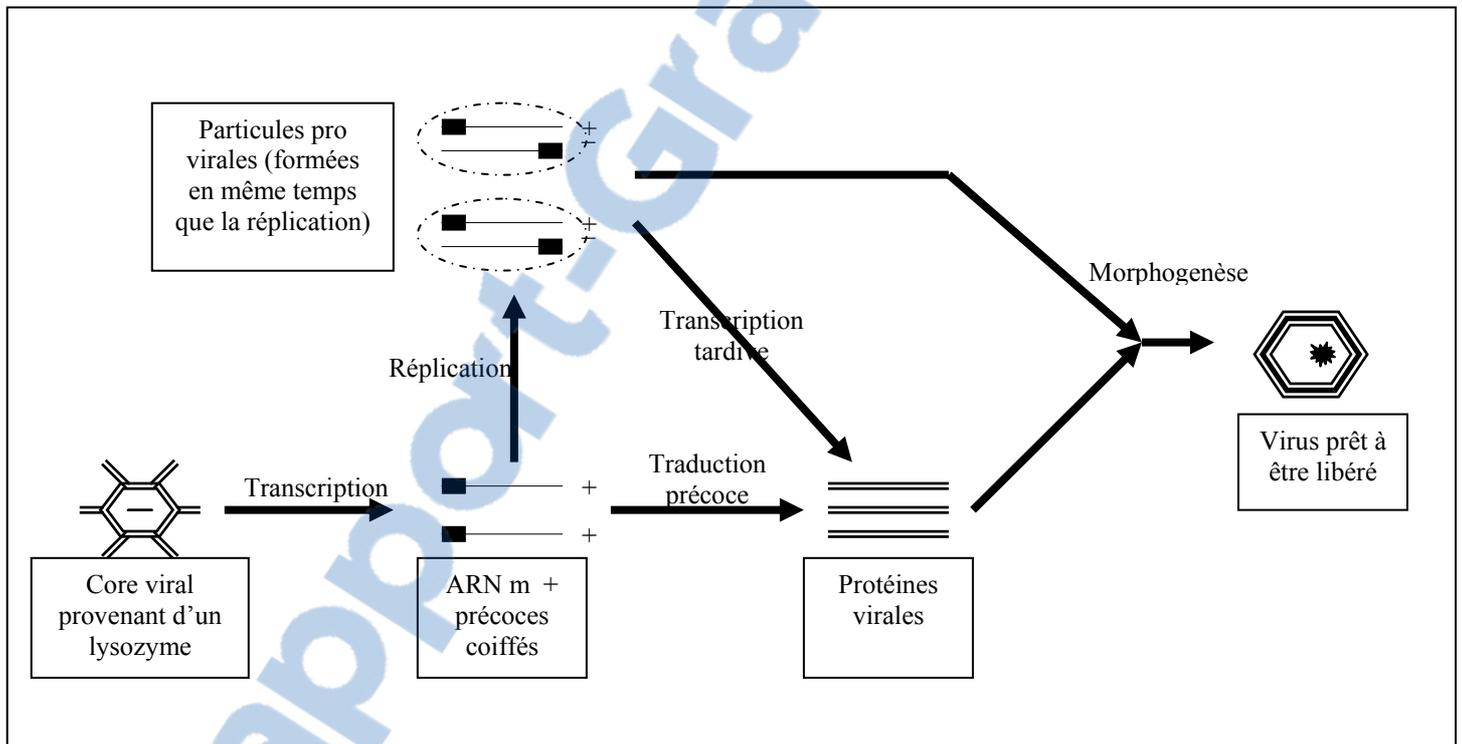


Figure 4 : Schéma synthétique de la réplication virale dans une cellule hôte

#### 1.3.3.5 Traduction des ARN messagers

Deux heures après l'infection de la cellule, des protéines d'origine virale peuvent être détectées dans le cytoplasme. Cette production de protéines virales s'effectue aux dépens de la synthèse de protéines cellulaires. Elle est permise par l'inactivation, par un mécanisme inconnu, de la protéine VP4 responsable du phénomène de coiffe des ARNm, qui induit l'arrêt de la traduction des ARNm coiffés (traduction « coiffe dépendante ») au profit de la traduction des ARNm tardifs non coiffés (traduction « coiffe indépendante »). Ces derniers codent pour des protéines structurales.

### 1.3.3.6 Assemblage des virions :

L'étude des produits d'expression en système eucaryote des protéines structurales VP2, VP3 et VP5 faite par LUI, BOOTH et ROY (1992) permet de proposer le principe d'assemblage suivant.

Les protéines VP3 synthétisées forment dans le cytoplasme une particule instable à géométrie icosaédrique. Les trois protéines VP1, VP4 et VP6 interagissent avec cette structure dans laquelle les ARN double brin sont encapsidés. La protéine VP7, sous forme de trimère, se fixe à la surface de cette capsid interne, puis les protéines VP2 et VP5 constituent, dans une dernière étape, la capsid externe.

Le cytoplasme des cellules infectées contient des tubules caractéristiques composés de protéines NS1 polymérisées auxquelles seraient associées les protéines VP3 et VP7. La fonction exacte de ces tubules est inconnue mais ils pourraient être impliqués dans les mécanismes de transfert intracellulaire car ils semblent associés aux protéines du cytosquelette (ROY, 1992b).

### 1.3.3.7 Libération des virions :

Les particules virales sont associées aux filaments du cytosquelette via les protéines VP2 et VP5 et transportées vers le système membranaire de la cellule (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi). Les Protéines NS3 et NS3A sont ancrées dans les membranes des vésicules intracellulaires et dans la membrane cellulaire. Ces deux protéines permettraient la fixation et le transport des particules virales dans les compartiments membranaires de la cellule et favoriseraient la libération des virions par bourgeonnement.

### 1.3.3.8 Réassortiment de segments génomiques :

Des échanges de segments génomiques peuvent se produire lors d'infection simultanée d'une cellule par deux virus de sérotype différent. La fréquence de réassortiment des gènes est variable : certains gènes, soumis à une forte pression de sélection, sont plus fréquemment échangés que d'autres. Ce phénomène de réassortiment participe à l'évolution génétique des virus (KARABATSOS, 1985).

Cette étude du virus de la fièvre catarrhale nous a montré que chaque protéine possédait son propre rôle dans les mécanismes cellulaires engendrés par une infection virale. Etudions à présent ce qui se produit à l'échelle de l'animal.

## 1.4/ Epidémiologie analytique

### **1.4.1 Réservoirs viraux :**

Ce sont surtout les moutons qui développent la maladie, mais ce ne sont pas eux le réservoir principal de la maladie. En effet, le virus infecte tous les ruminants aussi bien sauvages que domestiques. La virémie chez les bovins pouvant dépasser les 100 jours (MACLACHLAN, 1994), il y a une forte probabilité qu'un insecte pique un bovin virémique et se contamine. Cette longue durée de virémie constitue un mécanisme de survie du virus, notamment dans les régions dont les conditions climatiques empêchent l'activité des insectes vecteurs pendant 2 à 3 mois de l'année. Pour cette raison, cette espèce semble être un des principaux réservoirs de cette maladie, son sang correspondant à la matière virulente essentielle.

Mais le virus, en phase de virémie, peut aussi être excrété dans le sperme. Des virus ont été transmis à des vaches sensibles par une semence de taureau contaminé (OSBURN, 1994). Mais cette contamination reste vraiment mineure : sur une étude sur plus de 18000 éjaculats de taureaux, seulement deux semences contenait des virus de la fièvre catarrhale (OSBURN, 1994).

### 1.4.2 Vecteur:

Comme l'avait souligné SPREULLL (1905), la transmission de la maladie n'est pas possible par contact direct ou par l'intermédiaire des excréments. De même, des muqueuses intactes ne permettent pas l'entrée du virus dans l'organisme.

En réalité, mises à part quelques exceptions vues précédemment, la contamination se fait uniquement par la piqûre d'un insecte du genre *Culicoides* porteur du virus. C'est pour cette raison que la répartition des cas de fièvre catarrhale est reliée à leur localisation. Mais tous les *Culicoides* ne peuvent pas jouer le rôle de vecteur, le virus doit pouvoir s'y multiplier pour être de nouveau excrété. C'est pour cette raison que la distribution du virus reste limitée. Les principales espèces vectrices sont regroupées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Principaux vecteurs du virus de la fièvre catarrhale du mouton (OSBURN, 1994)

VECTEUR	DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE
<i>Culicoides fulvis</i>	Australie, Asie du sud-est
<i>Culicoides imicola</i>	Afrique, Europe, Moyen Orient
<i>Culicoides insignis</i>	Amérique Centrale et du Sud
<i>Culicoides variipennis</i>	Amérique du Nord
<i>Culicoides wadai</i>	Australie, Asie du Sud-Est

En Corse, la seule espèce incriminée pour l'instant est *Culicoides imicola*. J'approfondirai son étude en traitant de sa biologie et de son rôle direct dans la troisième partie de ce travail.

Pour citation, un dernier mode de contamination a été rapporté : un vaccin canin contre la maladie de Carré et la parvovirose a été contaminé par des virus de la fièvre catarrhale, via du sérum de bovin infecté, le sérum de veau fœtal étant utilisé comme milieu de culture pour ses qualités nutritionnelles. L'injection du vaccin a alors été fatale pour les chiennes gestantes (OSBURN, 1994).

### 1.4.3 Physiopathogénie de la contamination virale :

Le virus est donc généralement inoculé par la piqûre d'un insecte du genre *Culicoides* qui dépose le virus dans le derme. Celui-ci va alors se diriger vers le ganglion lymphatique le plus proche où il va se multiplier pour la première fois. Ensuite, il va rejoindre la circulation principale par l'intermédiaire du système lymphatique efférent. Il ira alors se multiplier dans différents sites secondaires : nodules lymphatiques, rate et poumons. S'ensuivra un relargage viral dans le sang où les particules semblent le plus souvent s'associer à des cellules : érythrocytes et plaquettes essentiellement (MACLACHLAN, 1994).

Le virus ne réapparaît donc dans le sang qu'au moment de l'apparition des premiers signes cliniques, soit entre le cinquième et le onzième jour après l'inoculation. La teneur maximale du sang en virus étant atteint le septième jour :  $10^3$  DMI (Dose minimale

infectante)/ml (BECKER, 1971). Dans le même temps, le virus peut être retrouvé dans la rate, dès la quarante-huitième heure qui suit l'apparition de l'hyperthermie, à la concentration de  $10^4$  DMI/ml. Ensuite, il peut persister jusqu'à 119 jours dans le sang d'un mouton infecté (KATZ *et al.*, 1993).

Mais au cours de l'évolution de la maladie, le virus devient de plus en plus difficile à retrouver, on ne le retrouve que de façon irrégulière dans le sang, il est le plus souvent associé à des érythrocytes. Voyons à présent les différentes espèces réceptives à ces virus.

#### **1.4.4 Espèces réceptives :**

Le virus de la Fièvre catarrhale infecte les moutons, les chèvres, les bovins et les ruminants sauvages. L'espèce la plus sensible reste le mouton, mais leur sensibilité varie selon les origines. Les moutons européens semblent plus sensibles que les moutons provenant d'Afrique ou d'Asie (LOSOS, 1986).

Les chèvres, elles, sont plus résistantes que les moutons et développent la plupart du temps une infection asymptomatique. Quant aux bovins, ils servent de réservoir pour la maladie dans la nature, et leur infection se caractérise uniquement par une longue période de virémie.

Enfin, les ruminants sauvages sont également sensibles au virus de la fièvre catarrhale. Selon l'espèce, ils peuvent développer soit une forme aiguë de la maladie soit une forme asymptomatique. Ainsi, des essais cliniques ont été réalisés sur des femelles élans gestantes, qui n'ont développé aucun symptôme de la maladie, et sur des biches qui, eux, ont parfois même développé des formes fatales (LOSOS, 1986). Les variations de réponse semblent dépendre à la fois de l'animal récepteur et de la pathogénicité de la souche.

#### **1.4.5 Physiopathogénie de la réponse immunitaire**

Les anticorps n'apparaissent bien souvent qu'après la phase de virémie. On a d'ailleurs souvent écrit qu'il existait une corrélation négative entre l'augmentation des anticorps neutralisants et la diminution de la concentration virale (OSBURN, 1996b). Les anticorps apparaissent ainsi en moyenne six jours après l'infection, mais on peut parfois en détecter dès quatre jours après l'inoculation (OSBURN, 1996b). En moyenne, tous les animaux sont séropositifs après 10 jours et le reste pendant au moins 2 à 3 mois (KOUMBATI *et al.*, 1999). La réponse immunitaire est similaire dans toutes les espèces, seul les durées d'apparition et de maintien des taux d'anticorps varient. Ainsi, chez les bovins, ils peuvent persister jusqu'à 6 mois (MACLACHLAN, BARRAT-BOYES, BREWER et STOTT, 1996).

On notera que c'est la protéine VP7 qui va être à l'origine de la production des anticorps spécifiques de groupe, alors que les protéines VP2 sont à l'origine de ceux spécifiques de type. Ceux-ci auront son importance lorsque l'on envisagera les méthodes de diagnostic sérologique, mais pour l'instant intéressons nous à l'étude clinique d'une infection par un virus de la fièvre catarrhale.

## 1.5 /Etude clinique

### **1.5.1 Symptômes**

#### 1.5.1.1 Température :

Les animaux infectés présentent une température allant de 40°C jusqu'à 42.5°C entre 4 et 8 jours après l'infection (JOHNSON *et al.*, 1996). Souvent, on observe une évolution biphasique avec une première augmentation entre J2 et J4, puis une seconde entre J5 et J7. Par la suite, on note régulièrement des pics de température jusqu'à J20 post-infection (PI).

A noter qu'il existe également des cas apyrétiques dans lesquels les lésions spécifiques se développent ultérieurement (BECKER, 1971). Mais de toute manière, aucune relation entre le niveau de l'hyperthermie et l'intensité de la maladie n'a pu être mise en évidence.

#### 1.5.1.2 Signes cliniques évocateurs :

C'est au pic de virémie, c'est à dire entre J5 et J7, que les symptômes apparaissent. L'animal semble alors abattu, devient anorexique et ne rumine plus. On décrit classiquement 3 formes (BECKER, 1971) :

- **La forme abortive :** Elle ne se manifeste que par une légère hyperthermie et une congestion irrégulière de la muqueuse buccale sans véritable inappétence. La brebis pourra alors avorter ou l'agneau sera malformé (LOSOS, 1986).
- **La forme aiguë :** 1 à 2 jours après le début de la fièvre commencent des mouvements de succion des lèvres et de la langue consécutifs à une congestion des muqueuses buccales, nasale et conjonctivale. Dans le même temps, apparaissent un écoulement nasal d'abord séreux puis muqueux et une salivation moussante (figure 5).



Figure 5 : Mouton atteint d'une forme aiguë de Fièvre catarrhale présentant une congestion des muqueuses buccales et un écoulement nasal muqueux (ZIENTARA S)

Puis, les muqueuses buccales et les lèvres tuméfiées prennent une coloration violacée (figure 6). Sous la nécrose épithéliale apparaissent alors des ulcères se recouvrant d'une membrane diphtérique dégageant une odeur fétide. Des croûtes se forment et un œdème inflammatoire de toute la tête conduit les animaux à consommer une quantité considérable d'eau (LOSOS, 1986).

Du fait de l'œdème pharyngé et de la parésie de l'œsophage, les pneumonies mortelles par corps étranger ne sont pas rares, mais plus fréquemment, on observe des ronflements et une dyspnée intense du fait de la tuméfaction et des croûtes sur les naseaux. Entre 5 et 10% des moutons présentent une dyspnée sévère pendant 24 à 48 heures en fin de virémie (JOHNSON *et al.*, 1996).

Lorsque les lésions buccales commencent à cicatriser (au bout de 5 jours), il apparaît une pododermatite au niveau des espaces interdigités d'un ou plusieurs pieds. Sur tout le corps, on rencontre aussi des lésions érythémateuses qui peuvent entraîner la chute de laine. Chez les jeunes, une diarrhée intense, souvent hémorragique, complète généralement le tableau clinique et se termine en 2 à 8 jours par la mort de l'animal. L'atteinte musculaire se traduit quand à elle par de l'apathie, de l'asthénie et des torticolis. Souvent, la mort ne survient que 3 semaines plus tard, au cours d'un collapsus, après une apparente guérison.

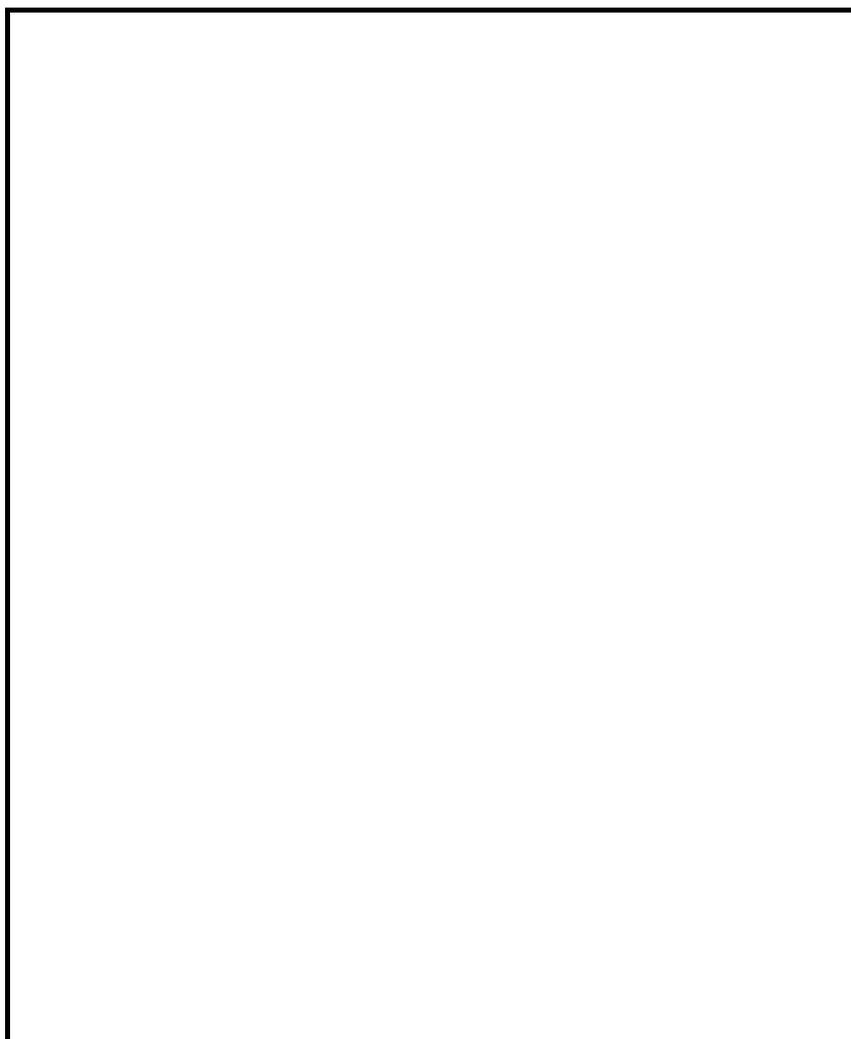


Figure 6 : Photo d'un mouton atteint d'une forme aiguë de Fièvre catarrhale présentant une cyanose de la langue (ZIENTARA S)

- **La forme subaiguë** : Les symptômes sont les même que dans la forme précédente mais sont moins intenses : on retrouve les lésions des muqueuses buccale et nasale, la congestion de la peau et la pododermatite, accompagnées éventuellement de myasthénie et d'exongulation provoquée par les germes bactériens de surinfection. L'évolution est cependant ralentie et l'animal périt en raison de l'amaigrissement et de la chute de laine. Cette mort peut survenir jusqu'à un an après le début de l'infection.

La létalité se situe au final entre 2 et 30% suivant les localisations d'étude et les traitements mis en place (LOSOS, 1986). Les principaux symptômes retrouvés dans les différentes formes cliniques de fièvre catarrhale du mouton sont repris dans le tableau 5

Tableau 5 : Symptômes principaux des différentes formes cliniques de fièvre catarrhale du mouton

	Forme abortive	Forme aiguë	Forme subaiguë
<b>Symptômes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-hyperthermie légère</li> <li>-congestion des muqueuses</li> <li>-avortement ou malformation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-hyperthermie</li> <li>-écoulements nasaux</li> <li>-salivation</li> <li>-asthénie, apathie</li> <li>-coloration violette des lèvres et de la muqueuse buccale</li> <li>-ulcères avec membrane diphtérique</li> <li>-dyspnée, ronflements</li> <li>-pododermatite</li> <li>-lésions érythémateuses sur tout le corps</li> <li>-mort 3 semaines plus tard</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-lésions ulcératives des muqueuses buccale et nasale</li> <li>-congestion de la peau</li> <li>-pododermatite, possibilité d'exongulation</li> <li>-myasthénie</li> <li>-mort peu survenir jusqu'à un an après</li> <li>-véritable non valeur économique</li> </ul>

#### 1.5.1.3 Modifications biochimiques:

Chez les moutons qui survivent à l'infection, on observe une augmentation brutale de la transaminase glutamino-oxaloacétique (GOT) (Figure 5), de la créatinine kinase (CK) (Figure 6) et de la lactodéshydrogénase (LDH) (Figure 7) aux alentours de J12. Elles ne redeviendront normales qu'après J21 (JOHNSON *et al.*, 1996). Les moutons qui meurent avant J11 présenteront une augmentation encore plus importante de ces 3 enzymes dans les 24 à 48 heures qui précèdent la mort.

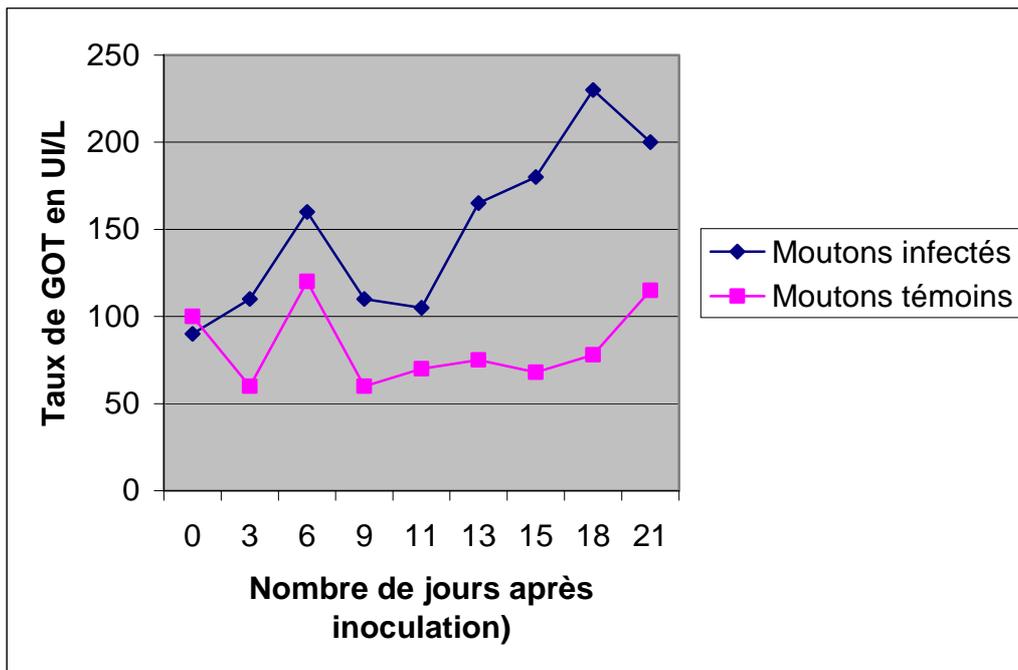


Figure 7 : Variation du taux de GOT après inoculation de BLU-23 (JOHNSON *et al.*, 1996)

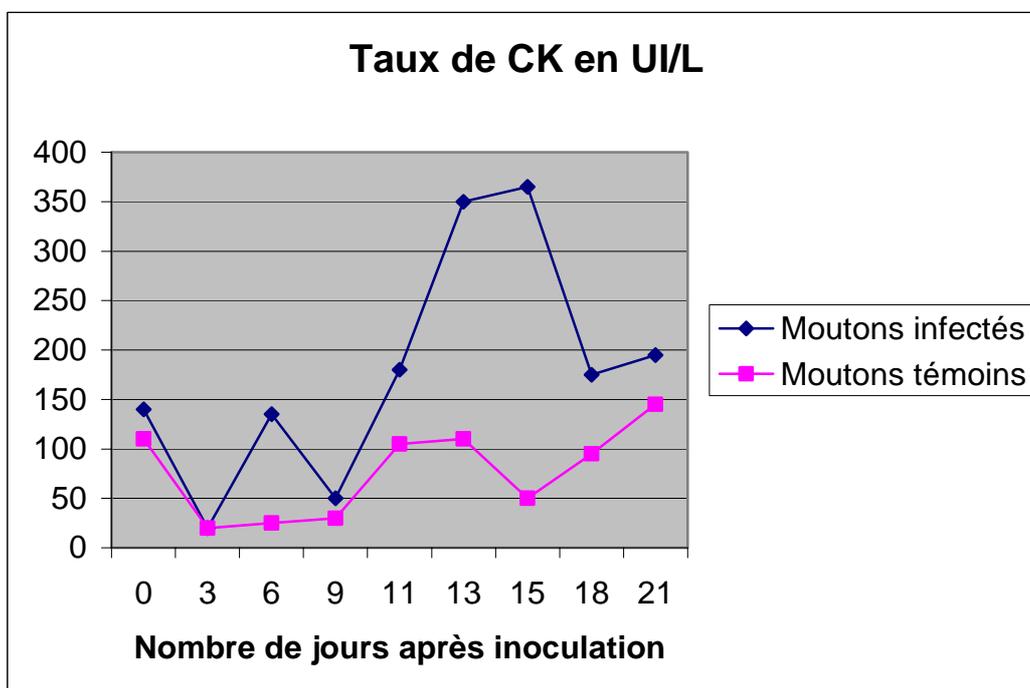


Figure 8 : Variation du taux de CK après inoculation de BLU-23 (JOHNSON *et al.*, 1996)

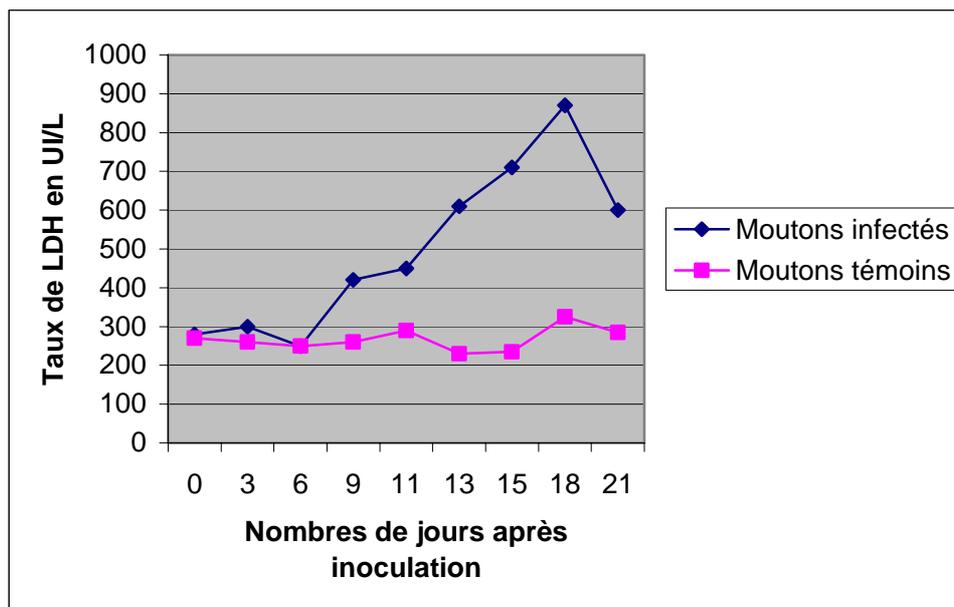


Figure 9 : Variation du taux de LDH après inoculation de BLU-23 (JOHNSON *et al.*, 1996)

Les taux sanguins de glucose et d'urée augmentent aussi manifestement au cours de la maladie et dans les cas particulièrement graves, on note également une chute importante de la teneur en hémoglobine (JOHNSON *et al.*, 1996).

#### 1.5.1.4 Les modifications hématologiques :

L'examen hématologique révèle une leucopénie et ultérieurement de l'anémie, ainsi qu'une déformation d'une partie des globules rouges en poires (BECKER, 1971). La diminution du nombre de leucocytes a lieu au début de la virémie vers J3. Cette diminution des leucocytes correspond en réalité à une chute des lymphocytes (les neutrophiles quand à eux restant en quantité normale). Leur quantité ne redevient normale qu'après J13 (Figure 8 et 9). En plus de cela, sur les moutons, on observe une thrombocytopénie, marquée surtout entre J8 et J11 (MAC COLL et GOULD, 1994).

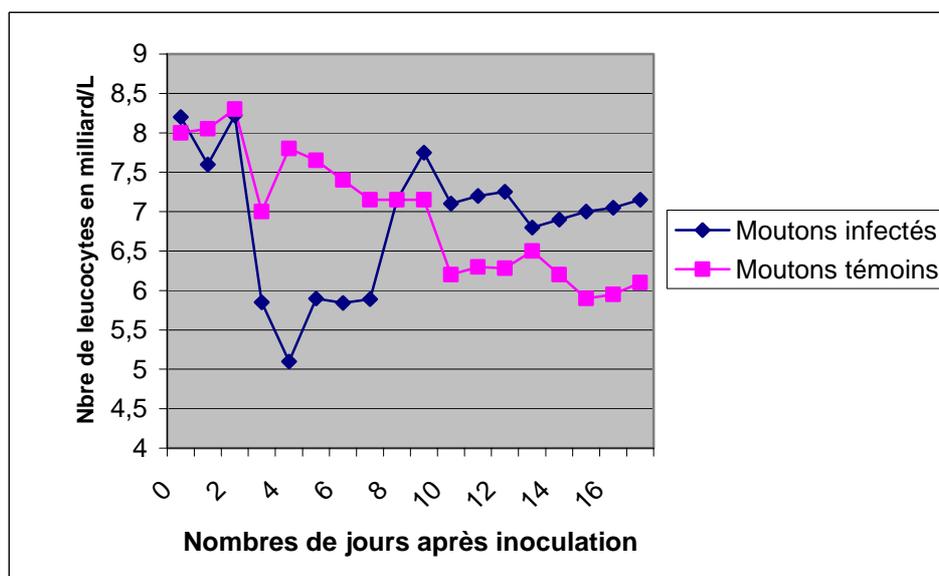
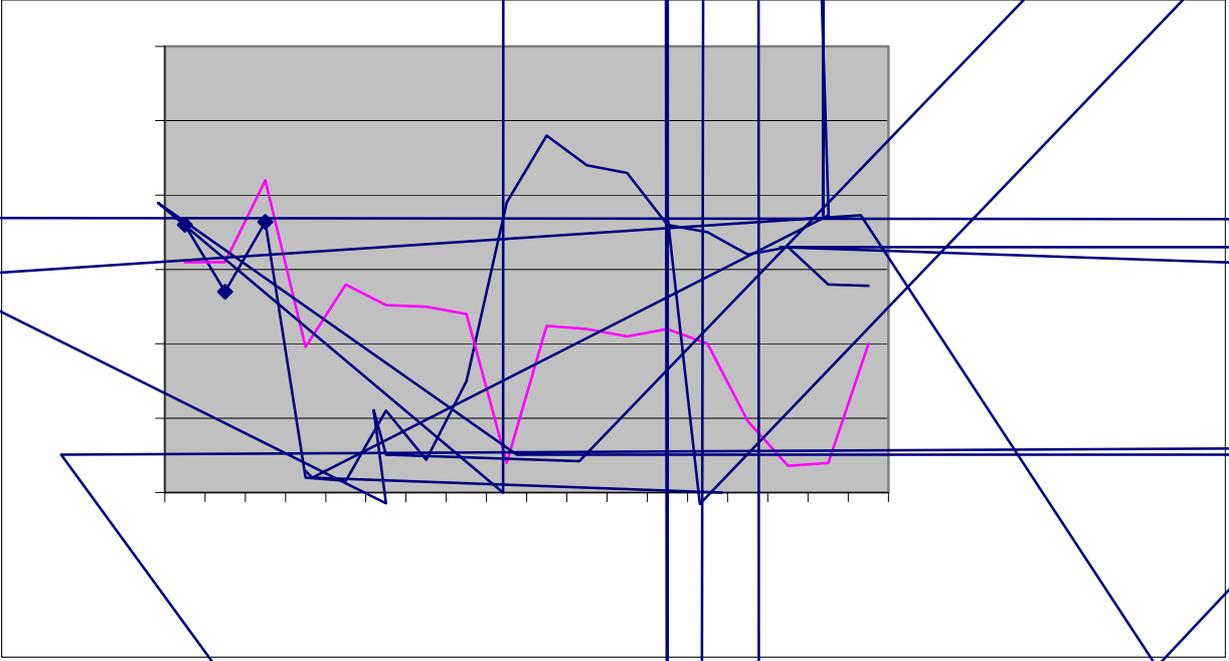


Figure 10 : Variation de la concentration en leucocytes dans le sang après inoculation de BLU-23 (JOHNSON *et al.*, 1996)



Auparavant, on avait déjà remarqué la formation d'hématomes sur le placenta (OSBURN, 1994). Le virus de la FC semble infecter les lymphocytes, les monocytes et les hématies, l'hématome représentant une localisation privilégiée de ce type de cellules. C'est seulement au cours du premier pic de virémie que l'on peut trouver le virus libre dans le plasma.

Ensuite, comme beaucoup d'autres virus, le virus de la FC infecte les cellules indifférenciées et provoque de nombreuses modifications cytologiques. C'est donc le stade de différenciation qui dictera le type de lésions neurologiques (OSBURN, 1996a) : si l'infection a lieu entre le 50<sup>ième</sup> et le 60<sup>ième</sup> jour de gestation on observe une hydranencéphalie et une dysplasie des cellules de la rétine à la naissance, dues à une importante nécrose. Si l'infection a lieu entre le 70<sup>ième</sup> et 80<sup>ième</sup> jour de gestation, les cellules gliales sont détruites et on aura une proencéphalie et la formation de kystes cérébraux. Les infections après 100 jours, quand à elle, provoquent seulement l'apparition de nodules focaux à développement modéré de cellules mononuclées dans le cerveau, mais aucune lésion destructive.

De nombreux rapports épidémiologiques ont également pu mettre en évidence des mortalités embryonnaires dans des troupeaux infectés par la FC en se basant sur la diminution du taux de conception. Le mécanisme proposé mettrait en cause une élévation des prostaglandines F2alpha (OSBURN, 1996a).

#### 1.5.1.6 Effets sur la fertilité

Le virus de la FC peut se retrouver dans la semence des boucs infectés en phase de virémie. Le point critique qui entraînerait le passage de virus dans la semence, semblerait être la présence de globules rouges ou de cellules mononucléaires qui contiendraient des particules virales à ce moment là dans la semence. Contrairement à ce qui avait été dit dans certaines anciennes études, on ne le rencontre pas seul dans les spermatozoïdes (OSBURN, 1996a).

En ce qui concerne les infections aiguës par un virus de la FC, on observe une infertilité transitoire consécutive à l'élévation de la température. Elle se manifeste le plus souvent le plus souvent par une azoospermie (OSBURN, 1996a).

### **1.5.2 Tableau lésionnel :**

#### 1.5.2.1 Lésions macroscopiques (BECKER, 1971):

Les animaux morts des suites de FC ou euthanasiés après des symptômes évocateurs, apparaissent souvent à l'autopsie cachectiques et anémiques. Au niveau de la peau et des muqueuses, on observe de la congestion, des pétéchies, de la cyanose et de l'œdème. Les lésions de congestion, rouge vif, apparaissent d'abord à la face interne des lèvres, mais cette coloration devient vite cyanosée et gagne d'autres muqueuses (vaginale,...). Des croûtes muco-sanguinolantes viennent recouvrir les naseaux après une semaine. Les zones de la muqueuse soumises aux mouvements des dents présentent rapidement des excoriations, des ulcères et de la nécrose. Dans les cas graves, l'épithélium lingual peut s'abraser dans sa quasi-totalité. Le tableau caractéristique de la FC s'accompagne d'une tuméfaction œdémateuse et d'une cyanose de la langue. Il est à noter que ce tableau clinique présente malgré tout des variations en terme de fréquence : ainsi, en Californie il représente même une exception.

La conjonctive est souvent parsemée de pétéchies et présente une réaction catarrhale importante. La congestion de la peau est quant à elle plus ou moins visible selon l'épaisseur de la laine. Si on retrouve des lésions de la couronne, on peut être certain que l'infection date d'au moins 9 jours. On retrouvera une congestion des lames du podophylle, du bourrelet coronaire et parfois de petits ulcères interdigités. Ces lésions pourront évoluer jusqu'à l'exongulation.

Les pétéchies et les suffusions se rencontrent aussi sur la muqueuse de l'œsophage, des réservoirs gastriques, de la caillette et plus rarement de l'intestin grêle. Peu de temps

avant la mort, on observe une entérite catarrhale hémorragique qui vient compliquer l'évolution de l'affection.

Ces lésions vasculaires se rencontrent aussi dans le myocarde, l'épicarde et l'endocarde, les muscles striés, et plus rarement dans la trachée, les cavités nasales, la vessie, l'urètre et la plèvre. La découverte de petites hémorragies à la base de l'artère pulmonaire accompagnées d'une péricardite fibrineuse est pathognomonique de la FC (JOHNSON *et al.*, 1996) (Figure 12).

On observe également de l'œdème et une infiltration gélatineuse dans le tissu sous cutané et surtout dans la région de l'auge et dans les espaces intermusculaires. Le péricarde, le thorax et l'abdomen sont parfois remplis de transsudat. En général, les poumons sont oedémateux, on peut observer une pneumonie par corps étranger déjà évoquée.

Les ganglions lymphatiques sont hypertrophiés, congestionnés et oedémateux. Lors d'infection secondaire, on peut observer une splénomégalie. De temps à autre, on retrouve des zones de nécrose sous forme de taches grises dans les muscles des lombes et le myocarde.

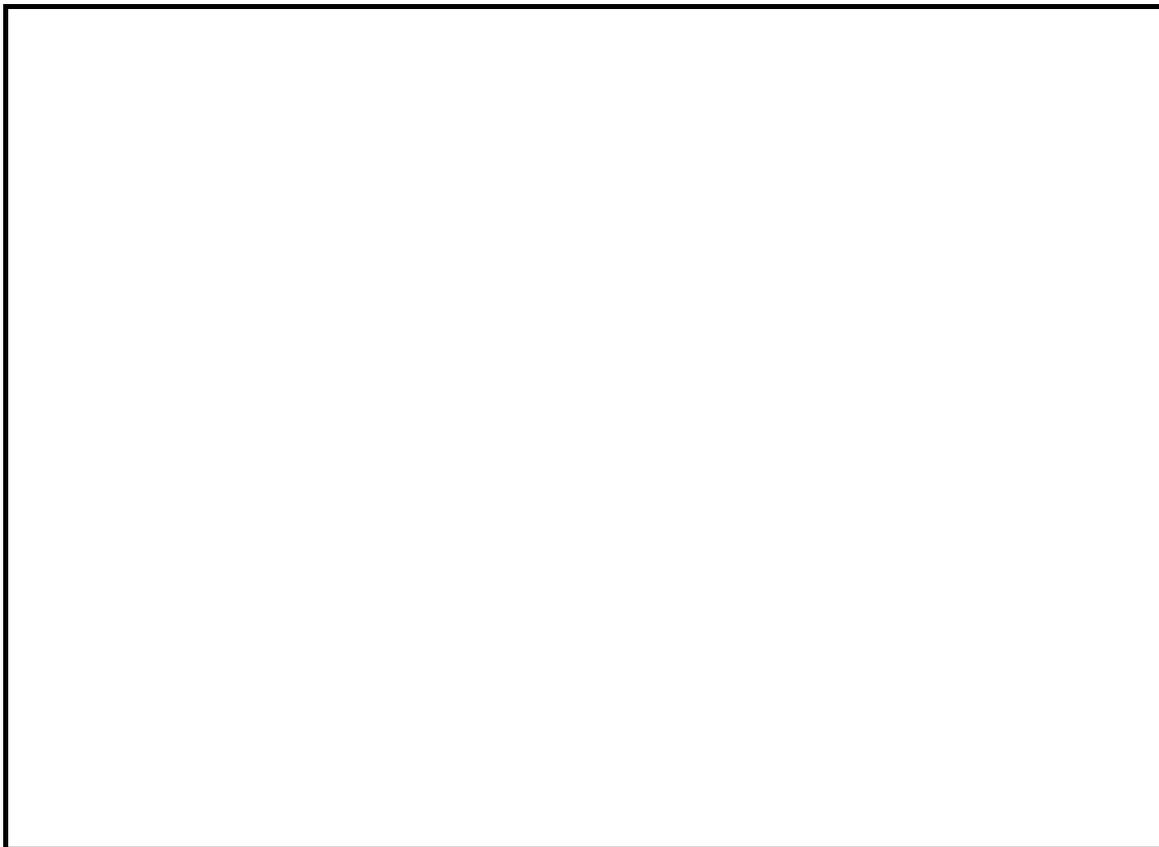


Figure 12 : Hémorragie de l'artère pulmonaire sur un mouton mort à la suite d'une infection par le virus de la Fièvre catarrhale (ZIENTARA S)

#### 1.5.2.2 Les lésions microscopiques (BECKER, 1971):

Sur le plan histologique, les hémorragies par diapédèse dominant. Les lésions vasculaires siègent principalement dans la média, plus rarement dans l'adventice des artères pulmonaires, et se traduisent par une nécrose et une hyperplasie de l'endothélium des *vasa vasorum* logés dans la média. On remarque aussi la présence de nombreuses thromboses capillaires à divers endroits.

Dans les régions en état d'irritation permanente (cavité buccale, muqueuses, ...), on retrouve une participation leucocytaire importante sous forme d'agrégations. Quant aux zones d'érosions de la peau et des muqueuses, on y observe une dégénérescence ballonisante

localisée initialement à la couche germinative, et qui envahit par la suite les autres couches (LOSOS, 1986). Ces deux phénomènes peuvent s'associer pour former des pustules, des ulcères ou même de la gangrène selon l'action des germes pathogènes secondaires.

La chute de poils fait suite à la congestion, l'exanthème et la dermatite qui ont lieu au niveau des follicules pileux. La pododermatite de la FC apparaît après des phénomènes de stase et la formation de stries dans la région des coussinets plantaires. Elle s'accompagne d'hémorragies, de transsudations et, ultérieurement, d'exsudats riches en leucocytes entre la zone papillaire et la paroi cornée. Si l'animal en réchappe, il conservera une trace de l'infection sous forme de stries concentriques sur les sabots.

Dans les muscles striés, les striations des fibres musculaires disparaissent et le sarcoplasme est en état de turgescence, avec en plus une nécrose de coagulation et une dégénérescence hyaline. Ultérieurement les fibrilles se rétractent et le noyau entre en pycnose. Ensuite, on assiste à des phénomènes de phagocytose, de régénération et d'envahissement des gaines de sarcolemme vide par du tissu conjonctif.

Des études expérimentales ont également montré qu'on pouvait retrouver des lésions de vascularite des artères et artérioles dans le stroma endométrial des placentomes (ANDERSON et JENSEN, 1969). Quant au fœtus, selon le moment de l'infection, on peut retrouver une méningo-encéphalite non suppurée, ou une zone nécrotique focale, ou simplement des nodules lymphoïdes sur la rate.

En définitif, l'intensité des lésions reste fonction à la fois de la souche de virus, de la sensibilité de la race, de la réceptivité individuelle et de facteurs de l'environnement. Le tableau 7 récapitule les principales lésions observées suite à une infection par un BTV.

Tableau 7 : Lésions les plus couramment observées suite à l'infection par un virus de la Fièvre catarrhale

	<b>Description des lésions les plus souvent observées</b>
<b>Lésions macroscopiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-cachexie, anémie</li> <li>-au niveau des muqueuses : pétéchies, cyanose, œdème, congestion, puis ulcères, excoriations et nécrose</li> <li>-croûtes muco-sanguinolentes sur les naseaux</li> <li>-tuméfaction oedémateuse de la langue</li> <li>-entérite catarrhale hémorragique</li> <li>-nombreuses zones d'hémorragie sur différents organes (trachée, endocarde, plèvre, artère pulmonaire, œsophage,...)</li> </ul>
<b>Lésions microscopiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-hémorragies par diapédèse dans la média des artères essentiellement, avec nécrose et hyperplasie de l'endothélium des <i>Vasa vasorum</i></li> <li>-nombreuses thromboses capillaires</li> <li>-disparition de la striation des fibres musculaires avec sarcoplasme turgescents, nécrose de coagulation et dégénérescence hyaline</li> <li>-vascularite des artères et artérioles dans le stroma endométrial des placentomes</li> </ul>

### 1.5.3 .Pronostic :

Il n'est pas toujours aussi sombre que le laisserait supposer la description détaillée qui précède. On peut voir des animaux très gravement atteints se rétablir alors que d'autres moins atteints meurent subitement. Le pronostic est particulièrement sombre lorsque les muqueuses sont le siège d'infections bactériennes secondaires et lors de diarrhée hémorragique (BECKER, 1971).

La morbidité est en général de 10 à 50%, mais elle peut être plus élevée. La létalité, quand à elle, peut atteindre 90%, mais est en générale de l'ordre de 2 à 30%. Il est alors

évident que le pronostic ne dépend pas uniquement de la virulence de la souche, mais aussi d'autres facteurs : sensibilité individuelle ou raciale, état d'immunité, âge des animaux, température extérieure, ensoleillement, épaisseur de laine, conditions de vie des animaux, alimentation, maintien en stabulation ou au pâturage.

Ainsi le pronostic reste toujours sérieux pour les animaux à laine dont la toison perd au moins 12% de sa valeur pour la campagne suivante (BECKER, 1971), et il faut également tenir compte des pertes liées aux avortements et à la mortalité. Enfin, il ne faut pas oublier que pendant la lente convalescence (de 3 semaines à 1 an), l'animal constitue une cible idéale pour les affections secondaires : coccidiose, piroplasmose, trypanosomiase, ... (JOHNSON *et al.*, 1996). Ceci arrête le développement des animaux affaiblis et rend la laine totalement inutilisable tout au long de la période. Ces animaux deviennent donc de véritables « non-valeurs économiques ».

Après ces rappels concernant la fièvre catarrhale du mouton et le virus correspondant, je vais développer les différentes méthodes de diagnostic de la maladie en m'attardant plus amplement sur les techniques que j'ai moi-même réalisées à l'AFSSA.

## II/ Méthodes de diagnostic expérimental de la fièvre catarrhale du mouton

Le diagnostic de la fièvre catarrhale doit se faire selon des normes strictes car cette maladie est inscrite sur la liste A de l'Office international des épizooties (OIE) En France, c'est le laboratoire de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Maisons-Alfort, où j'ai pu réaliser certaines manipulations, qui reste le laboratoire de référence.

### 2.1/ Diagnostic virologique

#### **2.1.1 Prélèvements**

Dans cette partie, nous cherchons à détecter le virus et ses antigènes. Or ce n'est pas dans le sang qu'on le retrouve principalement. Ce sont la rate, les ganglions lymphatiques ou des biopsies de lésions de l'appareil digestif ou respiratoire, qui représentent les prélèvements de choix pour le diagnostic direct du virus. Mais ceux-ci ne peuvent être réalisés que sur animal mort. Sur un animal vivant, le sang sera utilisé, prélevé sur tube EDTA. Mais le virus s'y trouvant associé aux érythrocytes, la sensibilité de notre test devra n'en être que plus importante.

Le virus peut être isolé surtout à partir de la rate 14 jours après l'infection (PEARSON, GUSTAFSON, SHAFER et ALSTAD, 1996), la rate ne restant positive que jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour, ceci avec les méthodes classiques d'isolement. Grâce aux outils moléculaires dont nous disposons actuellement, le virus pourra aussi être isolé plus tardivement (MACLACHLAN *et al.*, 1994). Bien entendu, les prélèvements doivent être rapidement acheminés et sous couvert du froid (à +4°C).

Aussi, il ne faut pas oublier que pour les suivis épidémiologiques de certaines régions, le virus doit pouvoir aussi être isolé directement à partir des *Culicoides* vecteurs. Pour cela, on se contente de produire un homogénat de cellules d'insectes, que l'on met ensuite en suspension pour effectuer les analyses (WILSON et CHASE, 1993).

La préparation des échantillons de mammifères est simple : pour les tissus tel que la rate ou les nœuds lymphatiques, ils sont broyés, puis mis en suspension. La semence, quand à elle est diluée au 1/10<sup>ème</sup> puis utilisée ainsi. Pour le sang, les globules rouges peuvent être lavés avec du PBS puis lysés avec de l'eau stérile et on récupère la solution (AFSHAR, 1994).

Il faut noter que des recherches virales ont aussi été réalisées dans la semence des mâles reproducteurs, mais cela ne correspond pas à la recherche virale classique. C'est uniquement utilisé à des fins de recherche, pour étudier les modes de transmission possibles de la maladie (WILSON, 1990).

C'est à partir de ces produits que l'on va chercher à isoler l'agent de la fièvre catarrhale du mouton, en gardant bien en tête, que dans la majeure partie des cas, on ne dispose que de sang.

#### **2.1.2 Isolement de l'agent:**

Les méthodes de diagnostic sont identiques pour les ruminants domestiques et pour les ruminants sauvages. Différentes méthodes permettent l'isolement viral, mais la plus utilisée actuellement est la culture sur œufs embryonnés. L'inoculation au mouton reste parfois utilisée lorsque le titre viral dans le sang reste très bas, notamment si le prélèvement a été obtenu longtemps après l'infection virale (OFFICE INTERNATIONAL DES

EPIZOOTIES, 2000). Quant à l'isolement sur culture cellulaire, il présente certains avantages pratiques et économiques.

### 2.1.2.1 Isolement par inoculation à des œufs embryonnés :

C'est la méthode la plus couramment utilisée pour le diagnostic de routine de la fièvre catarrhale du mouton. Elle a été décrite dans la littérature pour la première fois en 1941 par MASON *et al.*, mais l'inoculum était injecté dans le sac vitellin (AFSHAR *et al.*, 1991). Ce n'est qu'en 1968 que JAIN *et al.*, cités par GAYA *et al.* (2000), réaliseront l'injection en intraveineuse. Celle-ci a permis d'améliorer de plus de 100 fois la capacité à détecter le virus. Mais pour l'instant, je vais m'attacher à décrire la technique que j'ai pu moi-même réaliser lors de mes manipulations au sein de l'AFSSA.

#### 2.1.2.1.1 Principe de la méthode réaliser à l'AFSSA :

La méthode complète que j'ai pu réaliser à l'AFSSA est détaillée dans l'annexe 1 (p105). Je me contenterai de la résumer.

Pour réaliser cet isolement, il faut des œufs embryonnés de 10 à 11 jours provenant de l'INRA, sur lesquels un vaisseau sanguin assez important est repéré. Puis un morceau de coquille est ôté en regard de celui-ci, et l'inoculum est injecté directement dans le vaisseau (figure 13).



Figure 13 : Retrait du morceau de coquille et injection de l'inoculum lors d'une inoculation à des œufs embryonnés

Ensuite, l'œuf est incubé à 35°C pendant au moins 5 jours. Les œufs morts avant 24 heures sont jetés, ceux morts entre 2 et 5 jours sont récoltés chaque jour, et ceux encore vivants sont alors tués par congélation. Les éventuelles lésions de la fièvre catarrhale : hémorragie générale, malformation, atrophie, sont alors observées. Enfin, ils sont broyés pour récolter un homogénat qui pourrait être inoculé à des cellules, à de nouveaux œufs, ou servir à une extraction d'ADN.

#### 2.1.2.1.2 Difficultés rencontrées :

La difficulté principale dans cette technique consiste en l'obtention d'une fenêtre dans la coquille sans abîmer la membrane de l'œuf. C'est un geste très difficile à accomplir au début et pour lequel il faut un grand calme et une importante concentration. Par contre, les injections intraveineuses m'ont paru relativement faciles à réaliser.

L'autre problème réside dans l'obtention des œufs embryonnés. En effet, il faut impérativement se fournir auprès de l'INRA, qui n'en possède qu'un stock limité, et à des coûts assez élevés. De plus, une fois que ceux-ci sont livrés, il faut impérativement les utiliser dans les deux jours qui suivent car après l'embryon est trop âgé. Enfin, il en faut une quantité suffisante : pour chaque échantillon, il faut un minimum de 3 œufs, et encore certains auteurs recommandent d'en utiliser 10. Les œufs mal percés ou pour lesquels l'injection est mal effectuée meurent alors dans les 24 heures et doivent être éliminés.

#### 2.1.2.1.3 Caractéristiques de la technique :

La sensibilité de cette technique égale celle de l'inoculation aux moutons et est supérieure à celle de la culture cellulaire. Elle va permettre une multiplication du virus, et donc d'augmenter sa concentration dans les échantillons obtenus. Sur des embryons morts entre le 3<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour, on parvient à des concentrations entre  $10^5$  et  $10^7$  (CLAVIJO *et al.*, 2000).

#### 2.1.2.1.4 Variantes éventuelles :

La technique que j'ai présentée précédemment est celle que j'ai pu réaliser à l'AFSSA, mais il existe des variations selon les laboratoires. Certains utilisent des œufs jusqu'à 13 jours d'âge, mais le défaut reste que l'on observe davantage de morts non spécifiques, la spécificité en est alors réduite (PEARSON *et al.*, 1996). D'autres vont utiliser jusqu'à quinze œufs par échantillon, mais la sensibilité n'en est pas pour autant améliorée alors que le coût de l'analyse par échantillon en est lui multiplié par quatre.

Ainsi, la technique d'isolement sur œufs embryonnés reste la technique de routine pratiquée en première partie, pour l'isolement du virus. Mais elle va devoir être suivie d'autres examens pour spécifier la nature exacte de l'agent viral. On réalisera alors souvent une culture cellulaire.

Le tableau 8 récapitule les caractéristiques principales de la technique d'inoculation sur œufs embryonnés.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des caractéristiques de la technique d'inoculation sur œufs embryonnés

Technique	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Utilisation
<b>Inoculation sur œufs embryonnés</b>	Très bonne sensibilité (environ 90%), mais la spécificité reste médiocre	Augmente la concentration virale rapidement	Nécessité d'une confirmation par une culture cellulaire ou une PCR	-Augmenter la concentration virale dans les échantillons -1 <sup>er</sup> criblage des échantillons

### 2.1.2.2 Isolement par culture cellulaire :

Cette technique peut être utilisée seule à partir des prélèvements effectués sur les moutons, mais la plupart du temps elle est réalisée à la suite de la culture sur oeuf embryonnés de poules (AFSHAR, 1994). La méthode complète que j'ai pu réaliser à l'AFSSA est détaillée dans l'annexe 2 (p107), je me contenterai ici de la résumer.

#### 2.1.2.2.1 Principe de la méthode réalisée à l'AFSSA :

Pour cet isolement, il faut déjà obtenir des boîtes de culture monocouche de cellules BHK-21 de 24H. Ensuite on y incorpore l'inoculum en prenant garde d'avoir un témoin négatif.

Ensuite on laisse les boîtes à incuber à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, et tous les jours, on vient observer les monocouches pendant une semaine en recherchant les effets cytopathiques (Figure 14). En l'absence d'effet cytopathiques après 8 jours, on effectue des passages successifs, après congélation des boîtes, en procédant de la même manière qu'avec le premier, les surnageants des boîtes des passages précédents servant d'inoculum.

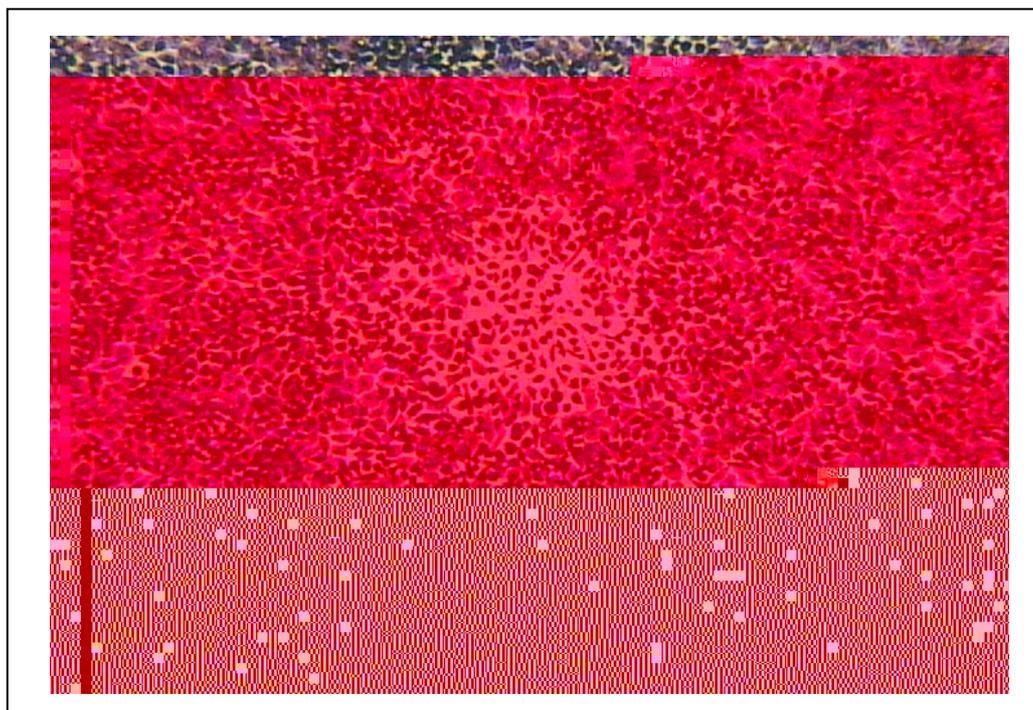


Figure 14 : Exemple d'effet cytopathique d'un BTV sur un tapis de cellules BHK-21 (ZIENTARA S)

#### 2.1.2.2.2 Difficultés rencontrées :

La principale difficulté rencontrée dans la réalisation de ces cultures cellulaires consiste à réussir à travailler dans des conditions de parfaite stérilité. J'ai pu voir certaines de mes cultures totalement détruites par la présence d'une levure dans la boîte de culture.

En ce qui concerne l'observation des effets cytopathiques, même si au départ cela peut sembler un peu délicat quand on n'est pas habitué à observer des tapis de cellules, on acquiert rapidement de l'expérience et cela devient un automatisme. Les cellules semblent former des amas, le tapis homogène n'existe plus. De plus, il se forme parfois des granules dans les cytoplasmes et les noyaux semblent entrer en pycnose.

Avec un microscope électronique, une structure spécifique du virus de la fièvre catarrhale peut aussi être observée : des tubules de 68nm de diamètre de conformation hélicoïdale avec une périodicité de 9nm (essentiellement formés à partir de NS1) (AFSHAR, 1994).

#### 2.1.2.2.3 Caractéristiques de la technique :

La culture cellulaire permet donc d'isoler et d'identifier le virus de la fièvre catarrhale du mouton, mais il doit absolument suivre une culture sur œufs embryonnés de poule car sans le cela, la sensibilité de cet examen devient trop faible. Et malgré tout, une identification finale du virus devra être réalisée pour ne pas le confondre avec d'autres *Orbivirus* similaires tel que le virus de la maladie hémorragique épizootique du cerf (ou EHDV).

#### 2.1.2.2.4 Variantes éventuelles :

Lors de mes manipulations, j'ai utilisé des cellules BHK-21, mais de nombreux autres types de cellules peuvent être utilisés. Les cellules Vero (cellules de rein de singe gris d'Afrique) sont parfois employées mais elles sont un peu moins sensibles. Par contre, récemment, certaines études ont montré que des cellules CPAE (Calf Pulmonary Artery Endothelial ou cellules d'endothélium pulmonaire de veau) présenteraient une plus grande sensibilité que les cellules BHK-21 (AFSHAR, 1994). Mais cela reste controversé selon les protocoles. Les cellules BHK-21 présentent le second avantage de produire le titre maximal de virus extracellulaire. A noter que, parfois, sont aussi employées des cellules d'*Aedes albopictus* C3/36, mais elles ne présentent pas d'avantage particulier (PEARSON *et al.*, 1996).

Le tableau 9 récapitule les principales caractéristiques de la technique d'isolement par culture cellulaire.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des caractéristiques de la technique d'isolement par culture cellulaire

Technique	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Utilisation
<b>Isolement par culture cellulaire</b>	-Sensibilité très bonne (environ 90%) si à la suite d'une inoculation sur œufs embryonnés -Spécificité trop faible si non suivi d'une identification	Diagnostic fiable et économique	-Confusion possible avec un EHDV -Doit être précédé d'une inoculation sur œufs embryonnés	A la suite d'une culture sur œufs embryonnés pour un premier diagnostic

#### 2.1.2.3 Isolement par inoculation à des moutons :

##### 2.1.2.3.1 Principe de la méthode

La méthode d'inoculation aux moutons a été décrite pour la première fois par SPREULLL en 1902 (AFSHAR, 1994). Elle consiste en une injection à des moutons séronégatifs de 10 à 500 ml de sang contaminé ou 10 à 50 ml de tissus en suspension. L'inoculum est administré en sous-cutanée par point de 10 à 20 ml. Parfois, l'injection peut aussi être réalisée en intraveineuse avec de gros volumes. Ensuite, 28 jours après l'inoculation, on recherche par immunodiffusion sur gel d'agarose ou par une ELISA compétitive la présence d'anticorps dirigés contre le virus de la fièvre catarrhale (OFFICE

INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000). Bien sûr, pendant toute cette période, l'apparition de tout signe clinique se rapportant à la maladie est surveillée.

#### 2.1.2.3.2 Caractéristiques de la technique

Je n'ai pas vu utiliser cette technique car elle n'est plus réalisée que dans des cas exceptionnels (certification de région indemne, recherche dans les semences). En effet elle reste beaucoup trop coûteuse et beaucoup trop longue. Elle semblerait intéressante dans les cas où le virus ne se retrouverait qu'en très faible quantité dans le prélèvement.

Mais, à présent, l'ensemble des unités de recherche se contente d'une culture sur œufs embryonnés puisqu'elle possède quasiment la même sensibilité. De plus, avec les outils moléculaires dont nous disposons actuellement, nous sommes capables de détecter même une infime quantité de virus dans un échantillon (comme nous le verrons des les parties qui suivent).

### 2.1.3 Identification de l'agent:

Les *Orbivirus* isolés sont systématiquement identifiés grâce à leur réactivité avec les antisérums standards qui détectent certaines protéines, telles que VP7 qui reste toujours conservée au sein de chaque séro groupe.

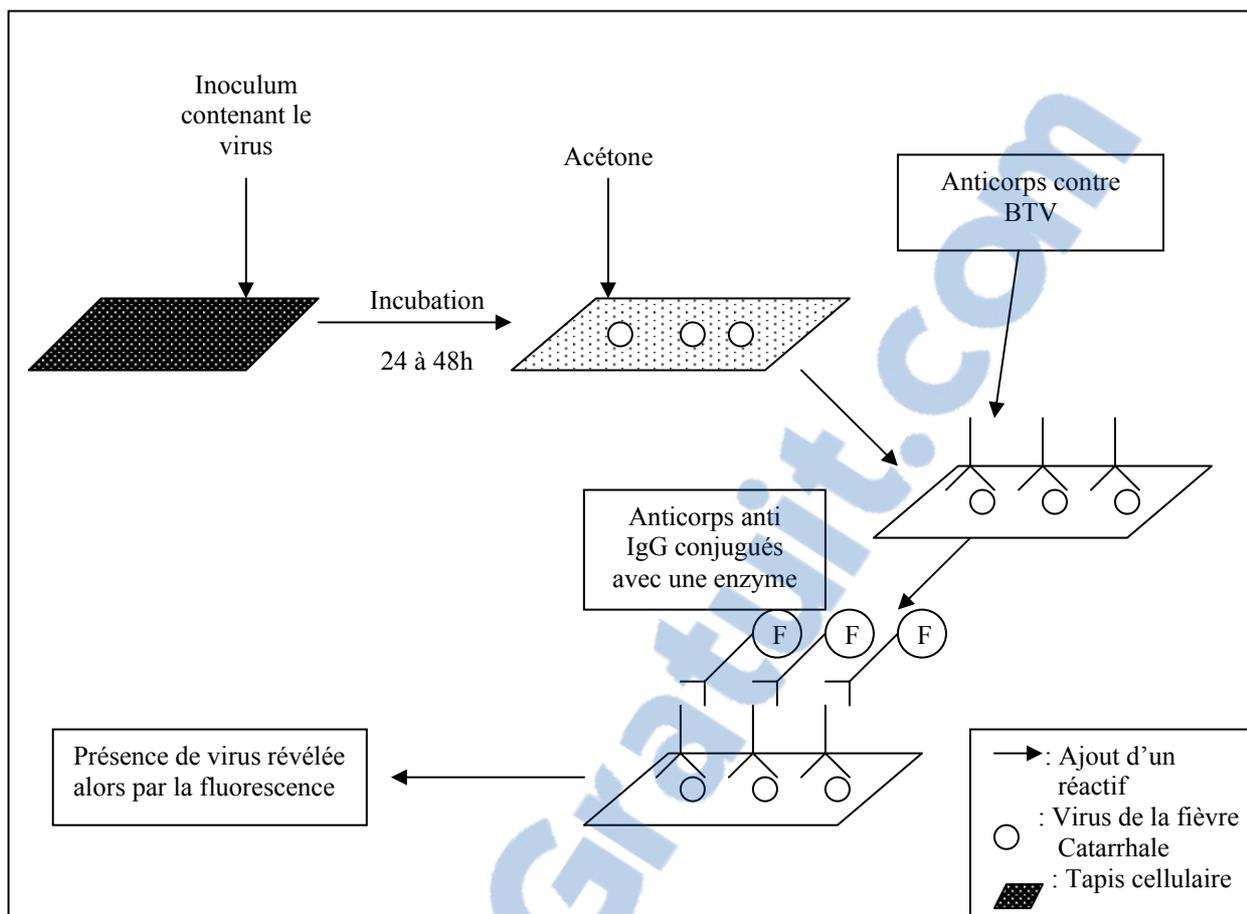
#### 2.1.3.1.Sérogroupe des virus :

Je vais m'attacher à ne présenter ici que les tests qui permettent de distinguer le virus de la fièvre catarrhale des autres *Orbivirus*. Je ne ferai en outre que les survoler car je n'ai pu en réaliser aucun. Je présenterai l'identification des virus à l'aide de PCR, dans une troisième partie.

##### 2.1.3.1.1 Par immunofluorescence (AFSHAR, 1994) :

C'est en 1962, que la méthode des anticorps immunofluorescents a été utilisée pour la première fois pour rechercher des virus de la fièvre catarrhale. Elle est restée pendant de nombreuses années la méthode de prédilection pour déterminer les antigènes de groupe présents à la surface du virus. Elle permettait notamment la différenciation du virus de la FC et de celui de la maladie hémorragique épizootique.

Dans cette méthode (Figure 15), on infecte un tapis de cellules BHK ou de cellules de rein de fœtus de bovin avec les produits de cultures cellulaires ou de cultures sur œufs embryonnés de poule. Après 24 à 48 heures, lorsque l'on voit apparaître des effets cytotoxiques, on fixe les cellules infectées avec de l'acétone. Ensuite on applique des anticorps anti-virus de la fièvre catarrhale, obtenus en laboratoire à partir d'animaux de ferme (le plus souvent des cobayes). Pour finir, on révèle les complexes formés avec des anticorps anti-IgG de cobaye conjugués à de l'isocyanate fluorescent.



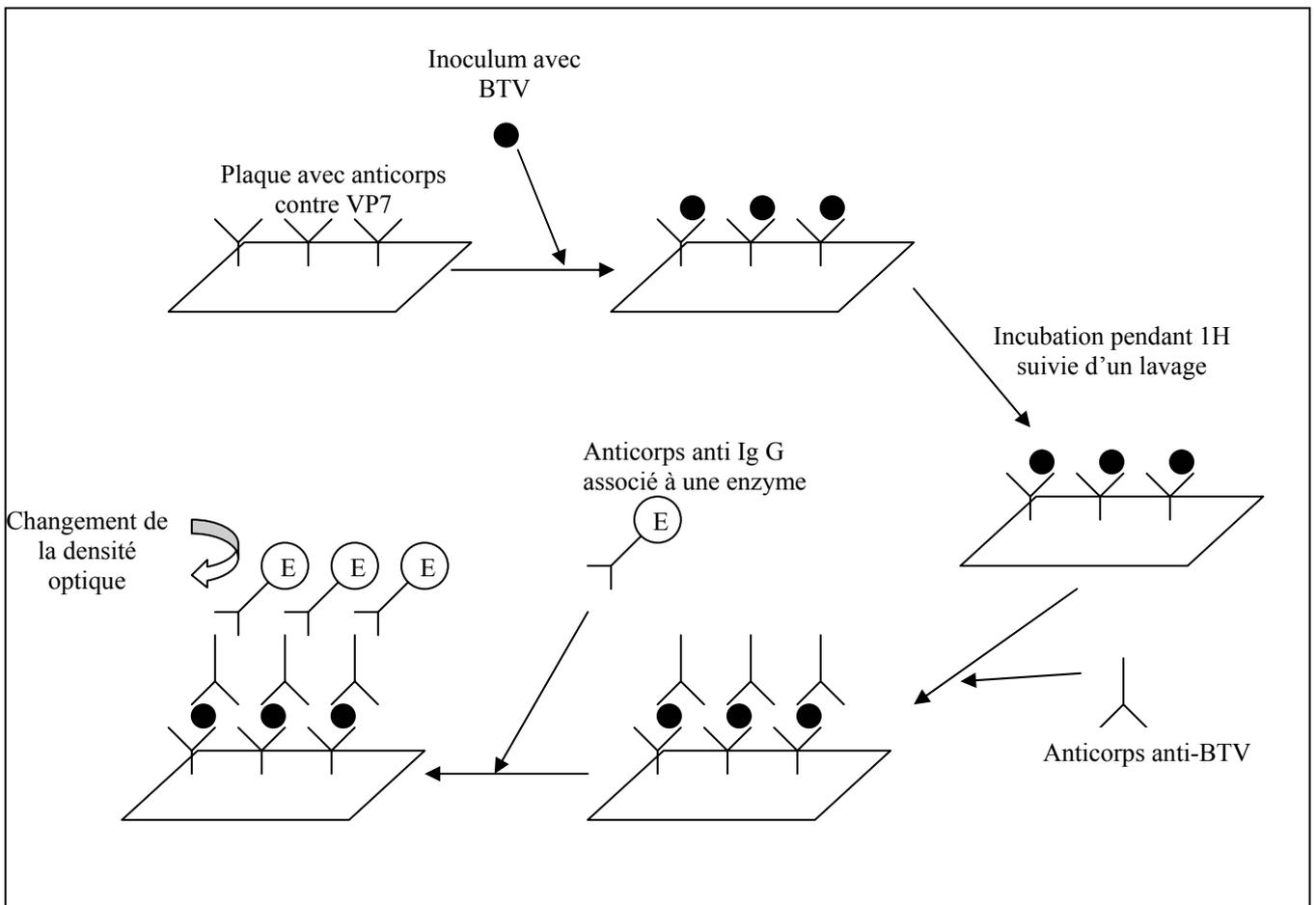
**Figure 15** : Représentation schématique de la méthode d'identification virale par immunofluorescence

L'immunofluorescence reste la méthode de routine pour l'identification des virus de la fièvre catarrhale, même si jusqu'à présent elle ne permettait pas le sérotypage des virus. Mais la progression des recherches ayant permis d'améliorer la production d'anticorps monoclonaux, il serait certainement possible dans l'avenir de sérotyper les virus grâce à l'immunofluorescence. Mais face à l'avancement d'autres méthodes plus faciles à réaliser et aussi efficaces, elle a été écartée des tests utilisés pour le typage des virus.

#### 2.1.3.1.2 Par ELISA (Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay)

Ce type de test a été décrit pour la première fois dans la littérature en 1989 par Huissein qui décrivait un ELISA sandwich avec deux types d'anticorps, réalisée à partir des produits d'une culture cellulaire sur BHK-21 (AFSHAR, 1994).

Dans cette technique (Figure 16), le virus, qui provient de cultures cellulaires ou d'œufs embryonnés, est appliqué sur une plaque de PVC sur laquelle sont attachés des anticorps monoclonaux qui vont fixer la protéine VP7 du virus de la fièvre catarrhale. Les anticorps monoclonaux sont obtenus à partir des préparations d'ascite de souris. On laisse ensuite incuber une heure à 37°C, puis on lave la plaque. On fait ensuite réagir des anticorps de lapins antiviruses de la fièvre catarrhale. On incube encore une demi-heure, puis on rince de nouveau. Enfin, on ajoute des anticorps anti-IgG de lapin conjugués à une enzyme qui va permettre de révéler les réactions Antigène-Anticorps. La lecture de résultat se fait alors en mesurant la densité optique de chaque puits, en n'oubliant pas les témoins positifs et négatifs (STANISLAWEK *et al.*, 1996).



**Figure 16** : Représentation schématique de la méthode d'identification virale par E.L.I.S.A.

Cette technique s'est révélée très sensible, elle est capable de détecter dans une suspension de 100 *Culicoides* le virus présent dans un seul des insectes (AFSHAR, 1994). Elle présente également l'avantage de fournir un résultat rapidement : environ quatre heures. Mais la méthode présente aussi des limites. En effet, si les recherches antigéniques sont réalisées assez tardivement après l'infection, la réaction antigène anticorps peut être bloquée par la présence d'anticorps provenant de l'organisme de l'animal qui cherche à se défendre. De plus, il s'est avéré qu'avec certaines souches de virus (les sérotypes 4, 15 et 19), la réaction antigène anticorps ne se faisait pas aussi facilement, et on obtenait beaucoup de faux négatifs (certainement à cause de différence de structure au niveau de la protéine VP7).

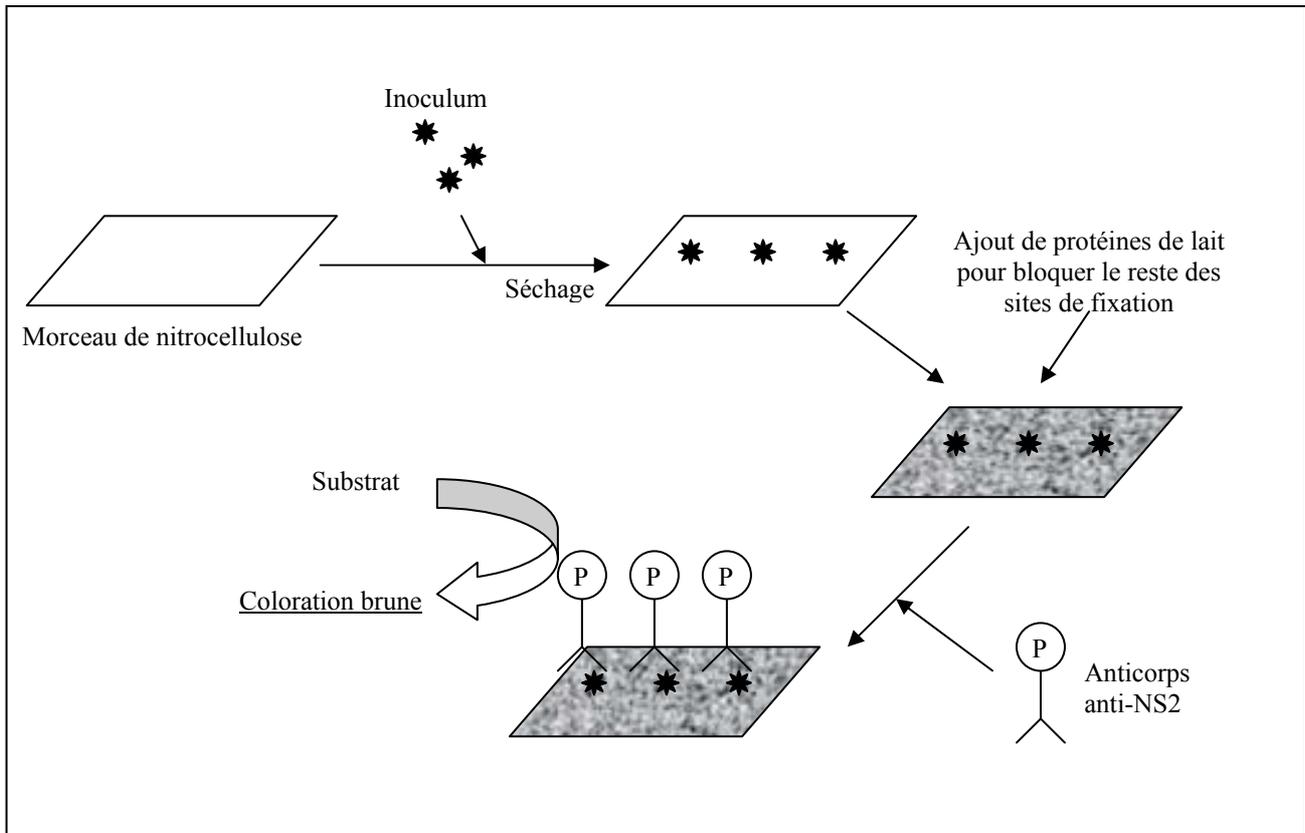
En conclusion, cette méthode peut se révéler très sensible, mais elle est à réserver au diagnostic dans les régions non endémiques de fièvre catarrhale, même si les progrès ont permis d'améliorer la sensibilité pour les souches des sérotypes 4, 15 et 19. Elle n'a d'ailleurs jamais espéré supplémenter les méthodes d'identification virale classiques (HAWKES *et al.*, 2000).

#### 2.1.3.1.3 Par immunospot test :

Cette méthode est également décrite dans le manuel de l'OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000).

Des petits volumes (2µl) de surnageant de cellules de culture ou de cellules lysées sont absorbés par des morceaux de nitrocellulose et ensuite séchés. Puis, les sites de fixation non spécifiques sont bloqués avec une solution contenant des protéines de lait écrémé. Ensuite des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine NS2 (spécifique de groupe) sont ajoutés. La préparation est alors incubée. Après, il ne reste plus qu'à ajouter des immunoglobulines anti-souris conjuguées à une peroxydase de raifort. Les réactions positives

seront alors visualisées comme des points bruns, après une dégradation enzymatique du substrat par un mélange d'eau oxygénée et de diaminobenzidine (Figure 17).



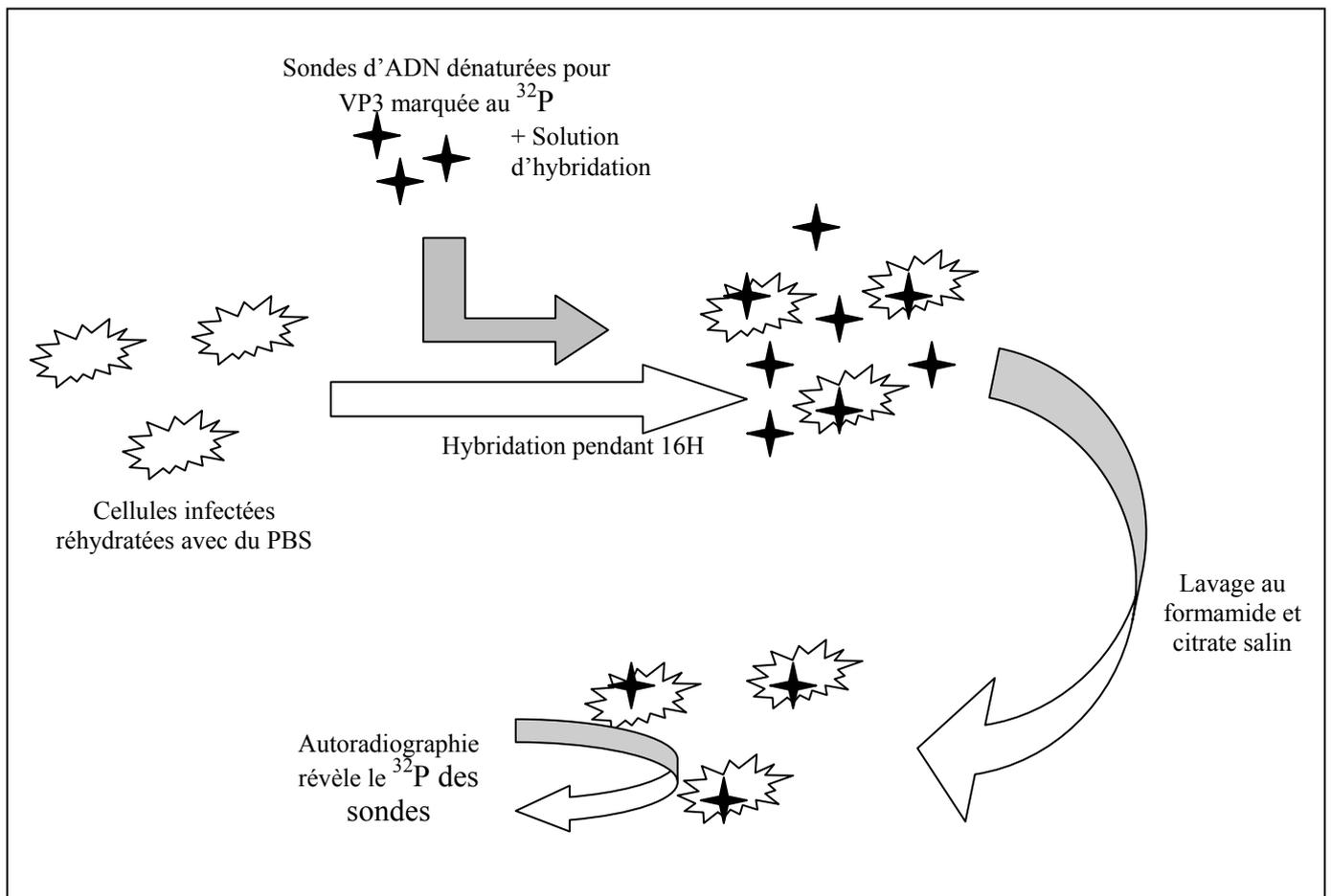
**Figure 17 :** Représentation schématique de la méthode d'identification virale par Immunospot test

Cette méthode permet de détecter et d'identifier le virus de la fièvre catarrhale dans les surnageants de cultures cellulaires infectées. Cependant la détection n'est pas possible à partir de sang de mouton infecté ou à partir des tissus de culture sur œufs embryonnés (AFSHAR, 1994). En réalité, cette technique n'est plus utilisée dans aucun laboratoire.

#### 2.1.3.1.4 L'hybridation *in situ* :

C'est la dernière méthode décrite dans le manuel de l'OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000) mais ne reste utilisée que pour certaines recherches et non en routine.

Les cellules infectées sont utilisées réhydratées avec du PBS (Figure 18). Les sondes sont dénaturées avec un mélange d'ADN de sperme de saumon et de formamide, le tout est chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Après un refroidissement rapide dans de la glace, les sondes sont mélangés à la solution d'hybridation, composée de formamide désionisé, de dextran sulfate, de vanadyl ribonucléoside complexe, de citrate standard salin, de sperme de saumon et de dithiothreitol. Le morceau d'ADN choisi pour l'hybridation est le segment 3, mais cela peut varier selon les souches à analyser. Le segment est marqué avec du <sup>32</sup>P. L'hybridation va avoir lieu pendant 16 heures à 37°C. Puis quelques lavages avec un mélange de formamide désionisé et de citrate standard salin sont réalisés. Enfin, les zones d'hybridation sont révélées par autoradiographie grâce au <sup>32</sup>P fixé (SCHOEPP *et al.*, 1991).



**Figure 18 :** Représentation schématique de la méthode d'identification virale par hybridation *In situ*

Cette technique est utilisable pour l'identification du virus mais elle reste trop complexe pour être pratiquée en routine. D'autant plus qu'elle n'est pas aussi sensible que la simple culture cellulaire ou que l'immunofluorescence, il faut des concentrations virales supérieures à 30 PFU/ml (WELCHER *et al.*, 1990). C'est pour cette raison que l'hybridation *in situ* a été abandonnée, les fragments d'ADN se révélant beaucoup plus utiles lors de la réalisation d'une PCR (comme nous le verrons dans la troisième partie).

Pour l'instant, je me suis attaché à décrire les méthodes les plus utilisées pour identifier le virus en complément des cultures sur œufs embryonnés et des cultures cellulaires. Mais il en existe quelques autres que je me permettrais au moins de citer :

- l'examen au microscope électronique des cellules infectées dans lesquelles certaines structures spécifiques peuvent être repérées (les tubules évoqués dans la partie sur la culture cellulaire).
- l'identification indirecte peroxydase / antiperoxydase, mais ce test n'est plus que rarement utilisé.
- des essais de diagnostic ont été réalisés par hémagglutination ou par fixation du complément mais les résultats n'étaient pas suffisamment satisfaisants pour que ces tests soient utilisés en pratique courante. A noter quand même que c'est par cette dernière méthode qu'a été identifié le premier virus australien de fièvre catarrhale.

Le tableau 10 résume l'ensemble des caractéristiques de ces 4 dernières méthodes d'identification virale.

Tableau 10 : Caractéristiques des différentes techniques d'identification virale

Technique	Avantages	Inconvénients	Utilisation
<b>Immunofluorescence</b>	Rapide et fiable	Impossibilité de sérotyper les virus	-Ancienne méthode de prédilection pour différencier les BTV des EHD -Méthode encore utilisée en routine pour identifier les virus de la FC
<b>E.L.I.S.A.</b>	Très bonne sensibilité	Sensibilité mauvaise pour les sérotypes 4, 15 et 19	-Utilisable dans les régions non endémiques -Peu pratiqué pour le diagnostic de routine
<b>Immunospot Test</b>		Détection qu'à partir de surnageant de culture cellulaire	-Plus utilisée actuellement
<b>Hybridation <i>in situ</i></b>		-Beaucoup trop complexe -Moins sensibles que les autres méthodes	-Uniquement utilisée dans certaines recherches

Maintenant que nous connaissons les moyens de détecter l'agent de la fièvre catarrhale, je vais présenter les tests qui permettent de caractériser les différentes souches virales.

#### 2.1.3.2 Sérotypage des virus par neutralisation:

2.1.3.2.1 Principe de la méthode réalisée à l'AFSSA : Par réduction de plaque :

L'annexe 3 (p109) décrit l'intégralité de la méthode utilisée à l'AFSSA, dans cette partie, je me contenterai de la résumer.

Pour commencer, le virus est dilué dans des tubes de 10 en 10, de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ . Ensuite, le virus est placé dans les différentes cupules d'une microplaque, en prenant soin d'identifier chaque cupule. Dans chaque cupule, l'antisérum spécifique est alors ajouté et la réaction se poursuit seule durant une heure.

Pendant cette incubation, des cellules sont mises en suspension à partir de boîtes de cellules non contaminées. Puis, lorsque l'incubation est achevée, ces cellules sont ajoutées à chaque cupule, et il ne reste plus qu'à mettre la microplaque à l'étuve.

Les plaques sont ensuite colorées et lues environ 8 jours après : la destruction ou non des cellules est observée. C'est donc le sérum qui aura permis la neutralisation du virus qui nous fournit le sérotype et la concentration virale.

#### 2.1.3.2.2 Caractéristiques de la technique

La séroneutralisation virale est le principal test approuvé par l'OIE pour sérotyper les 24 sérotypes de la fièvre catarrhale. Elle présente une bonne spécificité pour l'ensemble des virus BTV. Les antisérums nécessaires sont obtenus la plupart du temps à partir de cobayes ou à partir de lapins, car ce sont leurs antisérums qui permettent d'obtenir le moins de réactions

croisées et donc la meilleure spécificité (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000).

Cette méthode présente malgré tout un désavantage : le temps qu'elle nécessite : plus de 8 jours pour pouvoir interpréter les résultats. Or, lors de la gestion d'une épizootie, il faut réagir au plus vite.

#### 2.1.3.2.3 Variantes de la technique (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000) :

Bien entendu, il existe d'autres méthodes qui permettent de déterminer le sérotype d'un virus mais elles ne sont pas réalisées à l'AFSSA. Je les présente donc brièvement :

- Par inhibition de plaque :

Le test est réalisé dans une boîte de Pétri de 90mm de diamètre, contenant un tapis de cellules. Celui-ci est infecté avec environ  $5.10^4$  PFU de virus inconnu. Après l'adsorption, l'inoculum est retiré et la boîte est couverte par un gel d'agarose. Les antisérums standard sont mis chacun sur un disque de papier absorbant et placés sur la surface d'agarose. La préparation est alors laissée dans l'incubateur pendant 4 jours. La zone de neutralisation où les cellules ont survécues correspond au disque de l'antisérum homologue.

- Par micro titre neutralisation :

Environ 100 TCID<sub>50</sub> du virus inconnu sont ajoutées dans un volume de 50µl. Ceux-ci sont alors placés dans les cupules d'une microplaque à fond plat, et mélangés avec un volume égal d'antisérum dilué dans du milieu de culture. 10<sup>4</sup> cellules sont alors ajoutées par cupule de 100µl. Puis, après 4 à 6 jours, le test est prêt à être lu : les effets cytopathiques sont identifiés avec un microscope identique à celui utilisé pour les cultures cellulaires. Le virus inconnu est considéré sérologiquement identique à un sérotype standard de virus si les deux sont neutralisés par le même antisérum.

- Par un test d'inhibition avec immunofluorescence :

Cette neutralisation simple requiert des concentrations variables d'un virus inconnu et des concentrations standards d'antisérum de référence. Le virus isolé est d'abord concentré par des cultures cellulaires, puis il est dilué et mélangé avec des antisérums standards dans les cupules d'une plaque. Après avoir attendu une heure, des cellules sont ajoutées. La préparation est alors incubée pendant 16 heures, puis les cellules sont fixées et observées par une technique d'immunofluorescence utilisant les anticorps monoclonaux contre les virus de la fièvre catarrhale spécifiques de groupe. Le sérotype du virus est donné par la spécificité de l'antisérum à réduire au maximum le nombre de cellules fluorescentes. Le tableau 11 récapitule les caractéristiques de la séroneutralisation virale.

Tableau 11 : Caractéristiques de la séroneutralisation virale

Technique	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Utilisation
<b>Séroneutralisation</b>	-Sensibilité et spécificité bonne (de 80 à 95%), surtout si suit une culture cellulaire ou une inoculation sur œufs embryonnés	Diagnostic fiable et économique	8 jours pour obtenir des résultats	Après un premier isolement viral, pour déterminer le sérotype

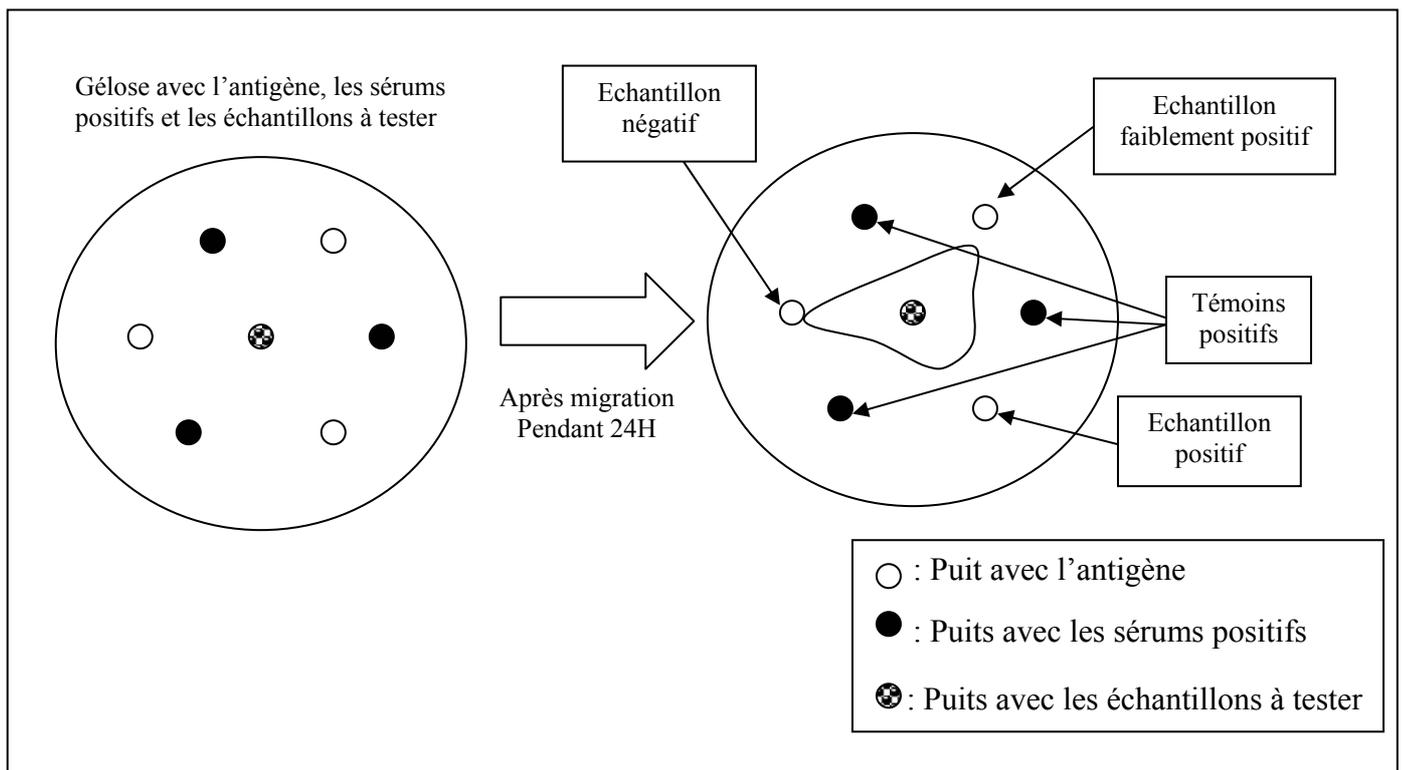
La neutralisation virale a été la technique la plus populaire pour l'identification des sérotypes des virus de la fièvre catarrhale, elle reste encore souvent utilisée. Mais à présent c'est la méthode par PCR (Polymerase Chain Reaction) qui a supplanté le sérotypage par neutralisation. Avant de m'intéresser à celle-ci, je vais d'abord vous présenter les méthodes de diagnostic sérologique.

## 2.2/ Diagnostic sérologique

Je vais vous présenter différentes méthodes de diagnostic sérologique d'une infection par le virus de la fièvre catarrhale du mouton, mais une d'entre elle semble dominer les autres tant par sa simplicité que par la qualité de ses résultats. A noter, que tous ces examens sont réalisés en France par l'AFSSA et le CIRAD à Montpellier : je n'ai donc pas pu en réaliser moi-même.

### **2.2.1 Test de fixation du complément**

Ce test a été utilisé de façon importante pour détecter les anticorps de la fièvre catarrhale jusqu'en 1982 (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000). Il a alors été entièrement abandonné et remplacé à cett



**Figure 19** : Représentation schématique de la méthode sérologique par immunodiffusion en gélose

### 2.2.2.2 Résultats :

Depuis 1982, le test est utilisé comme référence pour les échanges internationaux de ruminants. Cependant, un des désavantages de ce test, est son manque de spécificité puisqu'il détecte des anticorps vis-à-vis d'autres *Orbivirus*, et en particulier ceux du séro groupe de la maladie hémorragique épizootique (HOUSE C, HOUSE JA et BERNINGER, 1990). La spécificité de l'immunodiffusion en gélose a ainsi été évaluée à environ 70%. Par contre, sa sensibilité est excellente puisqu'elle approche les 95%. Les quelques résultats faussement négatifs sembleraient être liés au fait que les anticorps précipitants ne persistent pas aussi longtemps que les neutralisants (WARD, GARDNER et FLANAGAN, 1995).

Ces éléments, joints au côté subjectif de la lecture ont encouragé le développement d'autres tests, notamment ceux fondés sur l'ELISA pour la détection d'anticorps anti-virus de la BT comme nous allons le voir à présent.

Le tableau 12 récapitule les caractéristiques de l'immunodiffusion en gélose.

**Tableau 12** : Caractéristiques de l'immunodiffusion en gélose

Technique	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Utilisation
<b>Immunodiffusion en gélose</b>	-Sensibilité très bonne (environ 95%) -Spécificité trop faible (environ 70%)	-Rapide (48H) -Très bonne sensibilité	-Beaucoup de confusion avec l'EHD -subjectivité de la lecture	Test de référence pour le commerce international (mais à présent surpassé par l'ELISA)

## 2.2.3 Techniques ELISA

Dans les années 80, plusieurs tests ELISA ont été développés pour créer une alternative à l'immunodiffusion en gélose qui possède des limites, comme nous l'avons vu précédemment, notamment sa spécificité. Tous ces ELISA cherchent à détecter les anticorps dirigés contre la protéine VP7 qui est responsable de la spécificité de groupe des virus.

### 2.2.3.1 Evolution de la méthode :

Au début, ont été développés des ELISA indirects (AFSHAR, 1994). Dans cette méthode, le sérum test dilué au  $100^{\text{ième}}$  était incubé avec des antigènes viraux obtenus à partir de cultures cellulaires dans des plaques à micro titre de polystyrène. Les amas d'antigènes fixés aux anticorps du sérum étaient alors détectés par des immunoglobulines G de lapins anti-moutons associé à un enzyme. Un substrat était ajouté et la coloration obtenue révélait la présence ou l'absence d'anticorps contre la fièvre catarrhale dans le sérum.

Puis en 1985, Anderson a décrit une blocking ELISA (Figure 20), dans laquelle un antigène de FC immobilisé réagit tout d'abord avec le sérum test (ANDERSON, 1985). Puis des anticorps monoclonaux de souris spécifiques de groupe contre la FC sont ajoutés, et on fait ensuite réagir des anticorps anti-souris conjugués à une enzyme. En l'absence d'anticorps contre la FC, les anticorps monoclonaux s'accrochaient aux antigènes et était ensuite détectés par le changement de coloration. Dans le cas contraire, ils n'avaient plus la place de se fixer et il n'y avait donc pas de coloration.

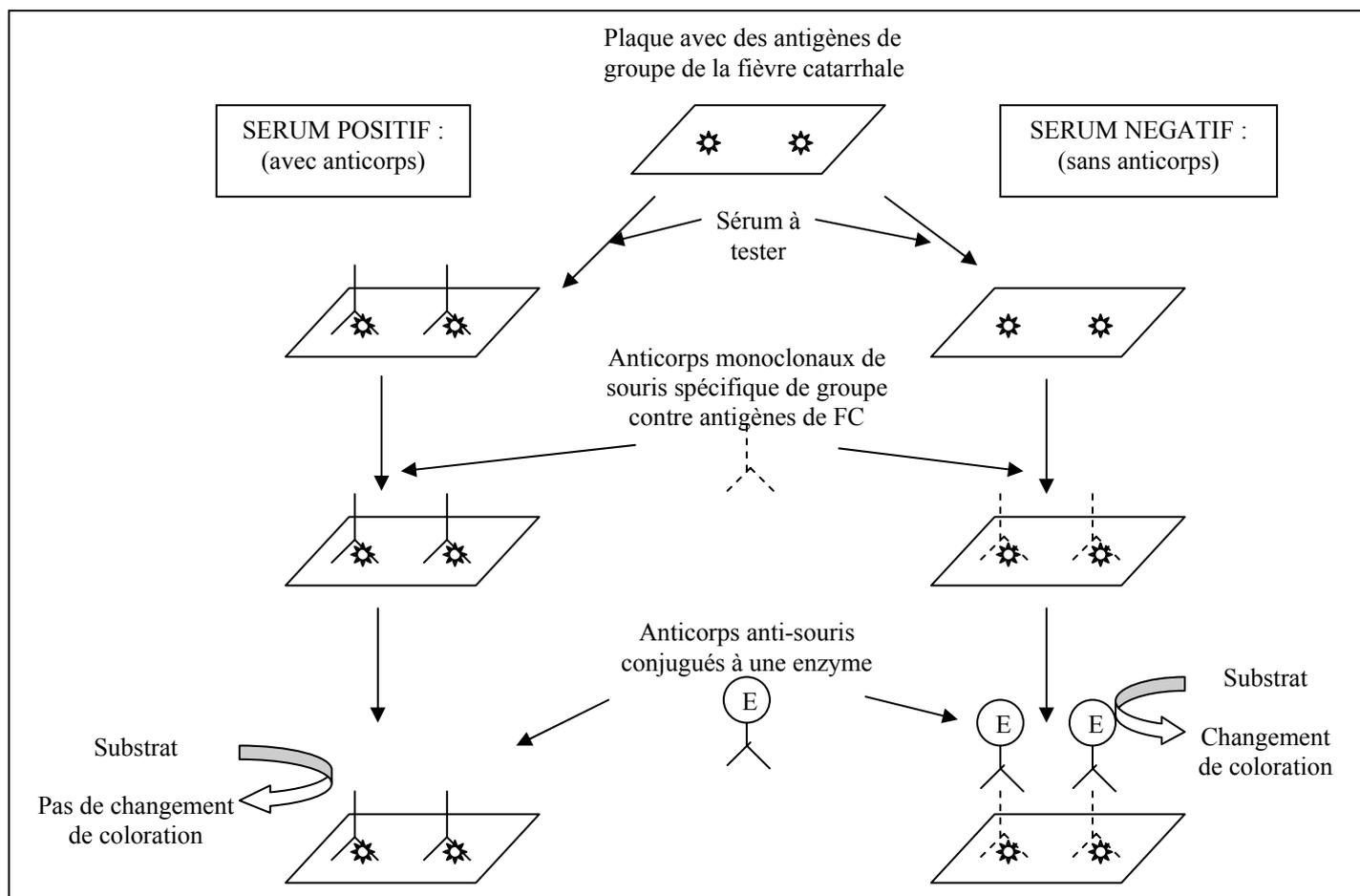
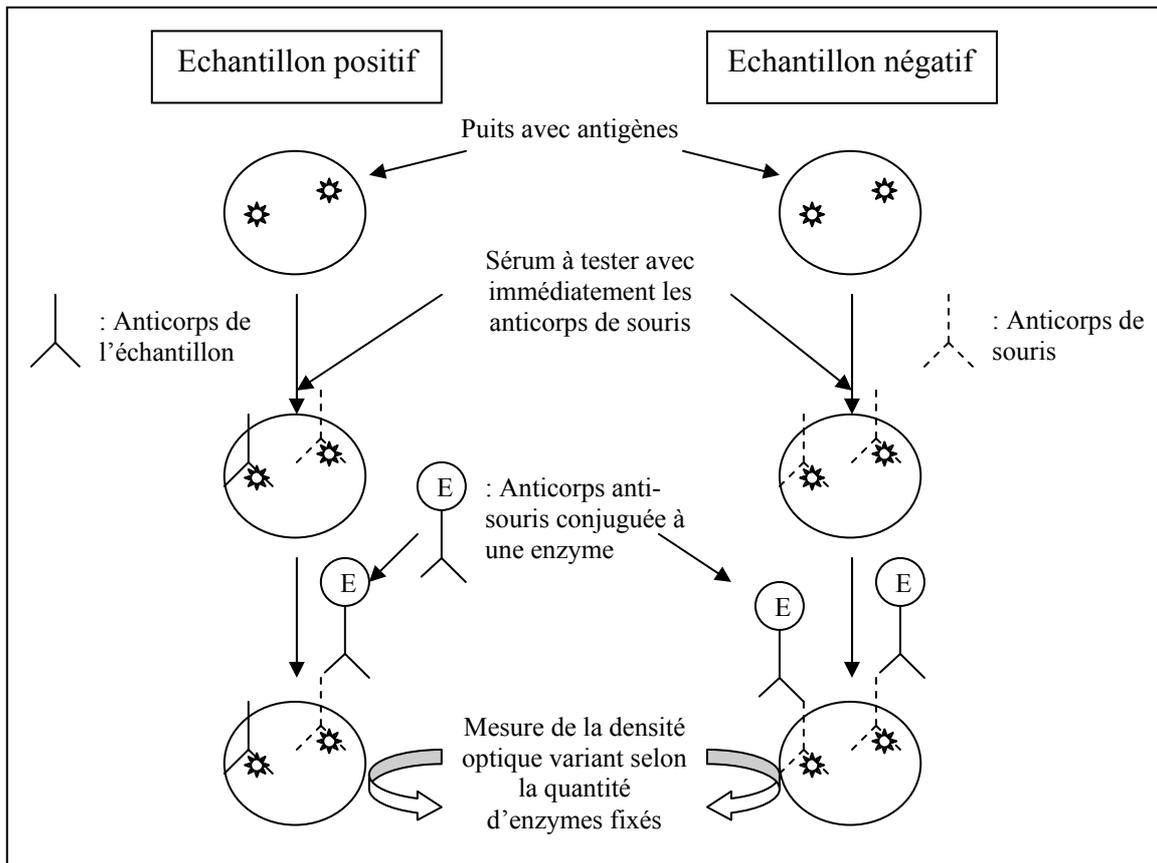


Figure 20 : Représentation schématique de la méthode sérologique par blocking ELISA

Une variante de cette méthode a été également réalisée : le dot blocking ELISA dans laquelle les antigènes sont mis sur une membrane de nitrocellulose. Elle a apporté un gain de temps dans la réalisation de cette méthode (AFSHAR, 1994).

Enfin ce n'est qu'en 1987 qu'a été décrite pour la première fois la méthode actuellement la plus utilisée : l'ELISA compétitif. Cette méthode consiste à mettre en compétition les anticorps des sérums à tester avec des anticorps de souris spécifiques pour un même antigène viral de la fièvre catarrhale. La fixation des anticorps de souris est ensuite révélée par des immunoglobulines G anti-souris conjugués à une enzyme (Figure 21).



**Figure 21** : Représentation schématique de la méthode sérologique par ELISA compétitive

La procédure a ainsi pu, par la suite, être standardisée après des études comparatives dans de nombreux laboratoires de différents pays (Annexe 4, p111) (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2000).

### 2.2.3.2 Résultats de ces méthodes :

L'ELISA indirect semblait présenter une grande sensibilité, mais par contre sa spécificité restait modeste. Ceci était dû au fait que l'antigène utilisé était seulement un antigène semi purifié (AFSHAR, 1994).

En ce qui concerne le blocking ELISA, il s'est rapidement révélé très sensible et très spécifique dans le cas du diagnostic de la fièvre catarrhale. Mais, à présent, on préfère réaliser des ELISA compétitifs, même si il a été montré en 1971 par AFSHAR *et al.* (1991) que la qualité de ces deux tests était similaire. D'autant que le dot blocking ELISA semblait même se révéler plus économique et plus spécifique que l'ELISA compétitif dans certaines études (AFSHAR, DULAC et RIVA, 1992).

L'ELISA compétitif, qui permet un diagnostic fiable à partir de deux semaines après l'inoculation, semblerait être plus sensible que l'immunodiffusion en gélose et la séroneutralisation (AFSHAR *et al.*, 1993 ; REDDINGTON JJ *et al.*, 1991). Lors d'études où des virus de la maladie hémorragique épizootique de différents sérotypes étaient inoculés à des bovins, aucun faux positif n'a été obtenu avec un ELISA compétitif pour le virus de la fièvre catarrhale. Le problème des épitopes communs au virus de la fièvre catarrhale et au virus de la maladie hémorragique épizootique des cervidés qui produisaient des faux positifs en immunodiffusion en gélose, ont ainsi été réglés (AFSHAR *et al.*, 1992). La spécificité oscille donc, selon les laboratoires, entre 95% et 100% (JEGGO *et al.*, 1996).

Pour finir, ce test reste plus facile à réaliser en routine qu'une séroneutralisation (REDDINGTON JJ *et al.*, 1991) et plus rapide qu'un blocking ELISA (AFSHAR *et al.*, 1993). C'est pour ces raisons qu'on a pu mettre au point, en 1993, un kit d'ELISA compétitif pour le diagnostic de la fièvre catarrhale utilisable pour le commerce international. Malgré tout, il persiste un défaut qu'il est important de préciser. En effet, l'ELISA possède une excellente sensibilité proche de 100% 20 jours après l'infection, mais il reste ces 20 jours au cours desquels, si le test est réalisé, sa sensibilité sera largement diminuée car nous nous trouverons en phase précoce. Ceci pose donc des problèmes pour les échanges internationaux (AFSHAR, TROTTER, DULAC et REDDINGTON, 1993).

Mais dernièrement, en 2001, a été développé un nouveau type d'ELISA pour bovin, pas encore utilisé: l'ELISA d'Ig M capturé. Ce test est fondé sur l'utilisation d'anticorps anti-bovins Ig M associé à de la biotiny, avec une plaque ELISA recouverte de streptavidine. Les anticorps Ig M capturés sont détectés par l'application de l'antigène VP7 du virus, puis par des anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène. Ce test présente une sensibilité de 100% 10 jours après l'inoculation, et semblerait même déjà donner de très bons résultats à partir de 5 jours post-infection. Ceci s'explique par l'utilisation des Ig M : ce sont les premiers anticorps sécrétés après une infection, et les autres tests ne font pas la différence entre eux et les Ig G. De plus, les Ig M sembleraient avoir moins d'affinité que les Ig G pour l'épitope auquel les anticorps monoclonaux s'accrochent, ce qui explique la moindre sensibilité de l'ELISA compétitive en début d'affection pour des bovins contaminés par un BTV (ZHOU *et al.*, 2001). En conclusion, ce test pour bovins semble sensible, rapide et utilisable plus précocement, il devrait logiquement être de plus en plus utilisé dans les années à venir. On notera que des tests similaires pour les moutons sont en cours de développement.

Le tableau 13 récapitule les caractéristiques des différents types d'ELISA.

Tableau 13 : Tableau comparatif des caractéristiques des différents types d'ELISA

Technique	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Utilisation
<b>Blocking ELISA</b>	-Sensibilité et spécificité très bonne	-Economique -Plus spécifique que la compétitive (pour la dot blocking ELISA)	-Un peu trop long à réaliser	Plus utilisé au profit de l'ELISA compétitive
<b>ELISA compétitif</b>	-Sensibilité proche de 100% -Spécificité d'environ 95 %	-Rapide et facile à réaliser -bonne sensibilité à 10J PI	-Ne suffit pas pour conclure à une infection BTV -moins spécifique chez les bovins	Utiliser pour la surveillance dans les zones d'enzootie
<b>ELISA d'Ig M de capture</b>	-Sensibilité et spécificité identique à l'ELISA compétitive	-détection plus précoce : dès 5J PI -rapide	-pour l'instant n'existe que pour les bovins	Pas encore utilisé en routine

Ce sont donc principalement les ELISA compétitifs qui vont être utilisés pour le diagnostic sérologique de groupe, voyons à présent la séroneutralisation qui reste parfois utilisée pour le diagnostic de type.

#### **2.2.4 Technique de séroneutralisation par micro-titre :**

La séroneutralisation par micro-titre est la ( )2i-mi e s p l

## 2.3/ Outils moléculaires

La réaction d'amplification en chaîne ou Polymerase Chain Reaction (PCR) est une méthode mise au point par MULLIS en 1983, cet outil moléculaire révolutionna alors le monde de la biologie moléculaire (GAYA *et al.*, 2000). Bien entendu, d'autres méthodes moléculaires ont été développées par la suite : la LCR ou Ligase Chain Reaction, la « real time PCR ou « PCR en temps réel », ... Mais, nous ne les étudierons pas ici car elles ne sont pas encore utilisées pour le diagnostic virologique de la fièvre catarrhale.

Je vais donc tout d'abord vous présenter le principe de ce nouvel outil de diagnostic : la PCR, puis je vous présenterai le protocole que j'ai utilisé lors de mes manipulations, et enfin nous verrons les avantages et les inconvénients de cette méthode.

### **2.3.1 Principe de la PCR:**

#### 2.3.1.1 Composants nécessaires (BELAK et BALLAGI-PORDANY, 1993b):

- **Echantillon nécessaire :**

Il faut un prélèvement de l'animal : cela peut aussi bien être du sang comme dans le cas de la fièvre catarrhale, qu'une suspension homogénéisée d'organes (des cellules nasales sont utilisées pour le diagnostic de la maladie d'Aujeszky), que des matières fécales (utilisées notamment lors de recherche de *Mycobacterium paratuberculosis*). Le virus n'a pas besoin de s'y trouver en grande quantité puisque la PCR sera généralement capable de l'amplifier. Par contre, il reste préférable de purifier les particules virales, et, dans le cas des virus à ARN, il est indispensable de transcrire le génome en brins d'ADN complémentaires avant de débiter la PCR. A noter que, pour la fièvre catarrhale, des diagnostics sur semence sont aussi réalisés, mais les concentrations virales y étant plus faibles, il est préférable d'utiliser un prélèvement sanguin (WILSON, 1990).

- **Matériel nécessaire à la réaction :**

Les amorces d'ADN sont le second composant important de cette réaction. Ce sont de courts oligonucléotides composés de 17 à 40 nucléotides complémentaires des extrémités de la séquence de 100 à 2000 paires de bases à amplifier. Elles sont choisies en laboratoire en fonction des virus à identifier.

Ensuite, une enzyme reste indispensable pour cette réaction : la Taq ADN polymérase. Elle a été isolée d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Cette enzyme présente le grand avantage de ne pas être inactivée par la chaleur. Il n'y aura donc pas besoin de rajouter des enzymes dans la cuve après chaque cycle puisque la polymérase reste active. L'exécution de la réaction se fait alors sans interruption, cela limite aussi le risque de contamination.

Bien sûr, il faut aussi les quatre sortes de désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) pour que les synthèses d'ADN puissent se faire. On rajoutera aussi les réactifs de la transcriptase inverse et des ions inorganiques tels que  $K^+$  et  $Cl^-$  qui promeuvent l'action de la Taq polymérase. Et pour finir, il faut un thermocycleur programmable pour pouvoir enchaîner les différentes étapes des cycles nécessaires à l'amplification.

### 2.3.1.2 Différentes étapes de l'amplification :

Tous les composants de la PCR décrits précédemment sont mélangés dans des tubes à réactions. La préparation est ensuite recouverte d'huile minérale si l'on ne dispose pas d'un couvercle chauffant. Les tubes peuvent alors être placés dans le thermocycleur qui va alors enchaîner des cycles de chaud et de froid grâce à des programmes présélectionnés. Chaque cycle est formé de trois étapes (Figure 22) :

- **Dénaturation des brins** : La préparation est chauffée à des températures situées entre 90°C et 95°C. A cette température l'ADN est dénaturé et les hélices doubles brins se séparent alors pour ne former plus que des molécules simple brin.  
Certains ont également essayé d'autres techniques : Wilson a par exemple choisi de séparer les brins d'ADN avec de l'hydroxyde de méthyl mercure. Cela permettait d'avoir une meilleure sensibilité qu'avec un simple chauffage, mais cela s'est révélé trop complexe à réaliser en pratique courante (WILSON et CHASE, 1993).
- **Accrochement des amorces** : Le thermocycleur est programmé pour une température entre 37°C et 70°C, température spécifique de l'attachement des amorces à leur cible d'ADN et non à d'autres séquences. Cette température optimale dépend notamment de la longueur de l'amorce et du nombre de couples guanidine/cytosine qu'elle contient.
- **Synthèse d'ADN (ou extension primaire)** : La température est remontée entre 67°C et 72°C. A cette température, la Taq polymérase étend les amorces en utilisant le brin simple cible comme un patron pour la construction d'une molécule complémentaire complète. Le résultat est une duplication du brin d'ADN.

Un cycle complet dure environ 3 à 5 minutes. 25 à 30 cycles sont réalisés. Il en résulte donc entre  $2^{25}$  et  $2^{30}$  molécules d'ADN pour une seule présente initialement dans l'échantillon, soit entre 33 millions et 1,1 milliard. Cependant, un million de molécules seulement sont obtenues à cause de la baisse d'activité de l'enzyme et d'autres facteurs variés (BELAK et BALLAGI-PORDANY, 1993a).

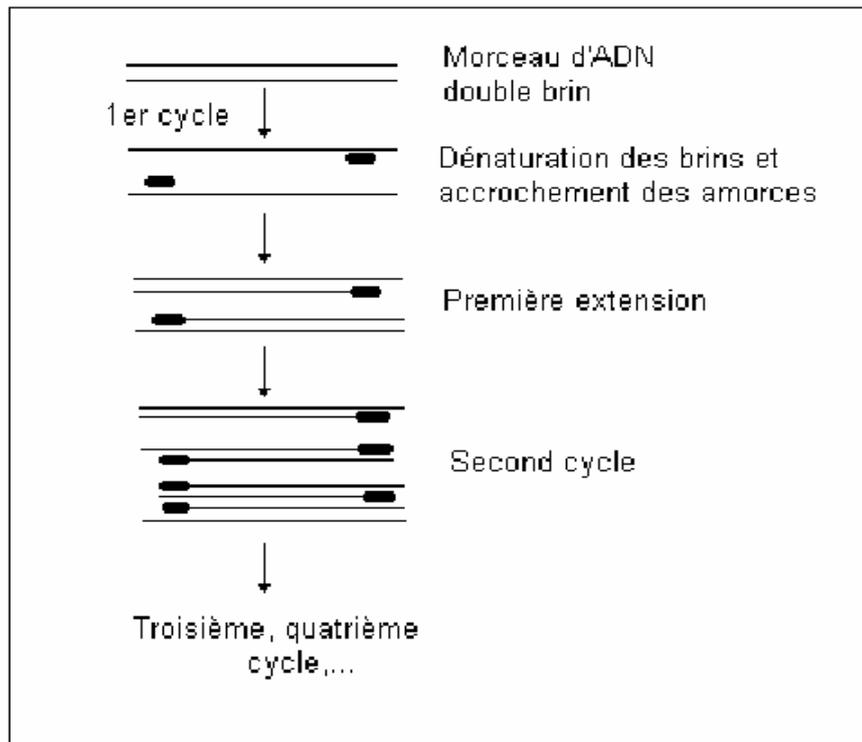


Figure 22 : Etapes des cycles de la PCR (Polymerase Chain Reaction) (BELAK et BALLAGI-PORDANY, 1993a)

### 2.3.1.3 Différents types d'amplification :

Différentes variantes de PCR existent : la PCR simple, la RT-PCR (avec l'utilisation d'une reverse transcriptase sur des ARN), la « Nested PCR » ou PCR nichée (avec deux cycles d'amplification), la « PCR multiplex » (avec l'amplification de plusieurs séquences en même temps) et la PCR *in situ* où l'amplification a lieu directement dans les tissus cellulaires infectés (GAYA *et al.*, 2000). A noter que la PCR nichée s'est souvent révélée la méthode la plus sensible, mais le risque de contamination lors des manipulations s'est aussi avéré plus important, augmentant ainsi le nombre de faux positifs (WILSON, 1990).

Mais la technique qui nous intéresse réellement ici est la RT-PCR, car c'est celle que j'ai réalisée lors de mes manipulations, et c'est de loin la plus couramment utilisée pour rechercher les BTV.

### 2.3.1.4 Identification des produits d'amplification :

Le principe de la PCR reste de produire de nombreuses copies d'un même segment d'ADN à partir de très peu de matériel initial. La grande quantité de produits de la PCR peut être facilement identifiée par différentes méthodes :

- Electrophorèse en gel d'agarose : Elle est utilisée pour séparer des fragments d'ADN

utilisant des gels d'agarose de concentrations différentes. Cette méthode suffisamment sensible permet d'obtenir des résultats en à peine une heure.

**Tableau 15** : Zones d'efficacité de séparation des molécules d'ADN avec l'électrophorèse en gel d'agarose

Pourcentage d'agarose dans le gel	Zone d'efficacité de séparation des molécules d'ADN linéaire (en kb)
0,3	60 – 5
0,6	20 – 1
0,7	10 - 0,8
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2,0	3 – 0,1

- **Hybridation d'acides nucléiques** : C'est la méthode la plus spécifique pour identifier les produits de la PCR. Toutefois elle nécessite l'utilisation de radio-isotopes, du temps et des manipulations plus importantes.

Dans ce test, il faut tout d'abord produire des sondes d'oligonucléotides marquées avec de la biotine-16-UTP. Le marquage est obtenu grâce à une TdT enzyme qui accroche une queue de biotine-16-UTP à l'extrémité 3' des oligonucléotides. A noter que parfois on produit aussi des sondes marquées à l'extrémité 5'. Puis, on laisse l'hybridation avoir lieu et les radio-isotopes révèlent la présence des séquences recherchées.

En plus de sa grande spécificité, cette méthode s'est avérée plus sensible que l'électrophorèse lors du marquage à l'extrémité 3' (BELAK et BALLAGI-PORDANY, 1993b). Mais beaucoup de laboratoires restent réticents à utiliser ce test pour les diagnostics de routine pour toutes les raisons données précédemment.

- **Méthodes colorimétriques** : Elles sont nombreuses et variées : Il existe déjà l'ELOSA (Enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay) qui s'est révélée dans certaines études plus sensible, plus spécifique et plus rapide que la plupart des méthodes d'identification de virémie (KATZ *et al.*, 1993). Elle fonctionne sur le même principe que l'ELISA : un brin d'ADN produit par la PCR est capturée par 2 sondes différentes (Figure 23). L'une va fixer la molécule au puits par l'intermédiaire d'une molécule de streptavidine et l'autre marquée par de la fluorescéine va provoquer l'accrochement d'un anticorps anti-fluorescéine associé à une peroxydase de cheval qui entraînera le changement de couleur du substrat prévu à cet effet.

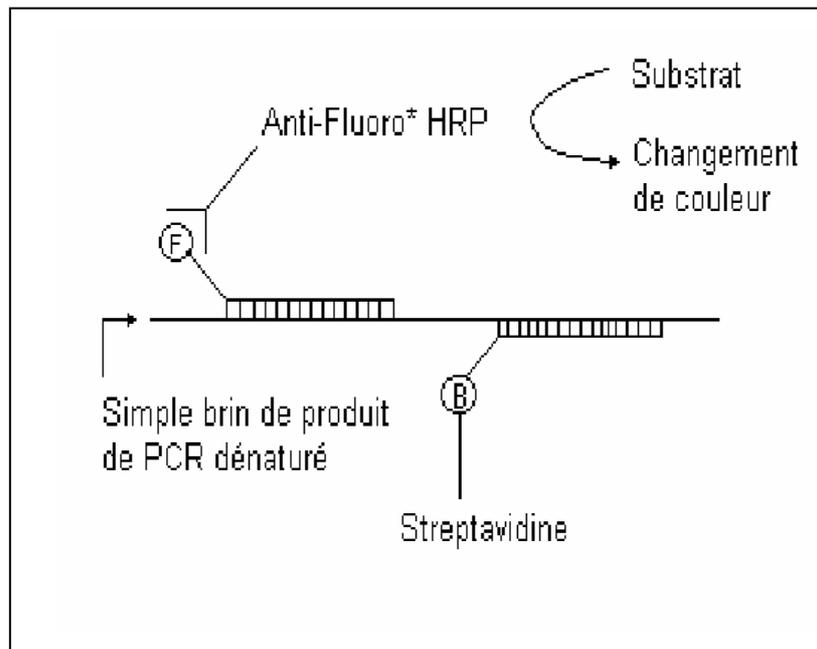


Figure 23 : Fonctionnement de la méthode ELOSA (KATZ *et al.*, 1993)

Il existe aussi la méthode DIANA (Detect Immobilized Amplified Nucleic Acids) qui consiste en un essai en phase solide. Une amorce marquée avec de la biotine est utilisée et une autre marquée avec une séquence spécifique provoque une réaction avec des *Escherichia coli* par l'intermédiaire d'une galactosidase. Les produits sont donc capturés grâce à la biotine qui se fixe à la streptavidine, elle même accrochée aux puits d'une plaque. Ensuite l'autre amorce, par sa réaction avec *Escherichia coli*, produit un changement de couleur qui sera évaluée par une mesure d'absorbance à 405nm. Le désavantage de cette méthode est qu'elle nécessite au moins 3 heures pour être réalisée et qu'elle donne régulièrement des résultats faux positifs à cause de la production de produits non spécifiques (notamment des dimères d'amorces lors de la PCR si les cycles sont mal réglés) (BELAK et BALLAGI-PORDANY, 1993b). Elle présente donc un intérêt pour le criblage d'un grand nombre d'échantillons, mais les positifs doivent être confirmés par une électrophorèse (SHAD *et al.*, 1997).

Il existe enfin la méthode CODAF : Colorimetric Detection of Amplicons on Filter. Cette méthode est basée sur la biotinylation de l'extrémité 5' de l'une des 2 amorces de la PCR. Les produits marqués par la biotine sont immobilisés sur un filtre de nylon par une irradiation aux UV. Le marquage à la biotine est ensuite détecté par l'addition d'une streptavidine alcaline phosphatase et l'ajout de son substrat. Le défaut est que, théoriquement, des amorces libres pourraient constituer de faux positifs, mais cette méthode présente l'avantage de ne pas prendre plus de trente minutes (BELAK et BALLAGI-PORDANY, 1993b).

Le tableau 16 récapitule les caractéristiques des différentes méthodes d'identification des produits d'amplification.

**Tableau 16 : Tableau comparatifs des méthodes d'identification des produits d'amplification**

<b>Technique</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Utilisation</b>
<b>Electrophorèse en gel d'agarose</b>	-Simple -Rapide (1H) -Sensibilité correcte	-sensibilité et spécificité pourrait être améliorées	Utilisée dans la plupart des laboratoires
<b>Hybridation d'acides nucléiques</b>	-Meilleure spécificité -Plus sensible que l'électrophorèse	-Nécessité de radio-isotopes -Manipulations importantes	Rarement utilisée en routine
<b>ELOSA</b>	-Bonne sensibilité et spécificité en général -Rapide	-Résultats variables selon les laboratoires	Parfois utilisé pour le diagnostic de routine mais pas en France
<b>DIANA</b>	-Bonne sensibilité	-Trop longue (3H) -Manque de spécificité	Intéressant dans le criblage d'un grand nombre d'échantillons
<b>CODAF</b>	-Bonne sensibilité -Rapide (30 minutes)	-Manque de spécificité	Non utilisée en routine

Dans le diagnostic courant, c'est l'électrophorèse en gel d'agarose qui reste le plus souvent utilisé. Les deux dernières méthodes que j'ai décrites ne sont pratiquement plus utilisées que pour des protocoles de recherches.

### **2.3.2 Principe de la méthode réalisée à l'AFSSA :**

En France, cette méthode de diagnostic a surtout été développée lors des deux épizooties de 2000 et 2001 en Corse, durant lesquelles l'AFSSA a isolée une trentaine de souches de virus du sérotype 2. L'annexe 5 détaille la technique complète de l'AFSSA.

❖ L'extraction des ARN à l'isocyanate de guanidium :

Cette méthode permet d'isoler les ARN totaux. Les ARN récupérés sont non dégradés et exempts d'ADN et de protéines. Lors de l'extraction, il y a formation de complexes entre l'ARN, le guanidium et les molécules d'eau ; les interactions hydrophiles avec l'ADN et les protéines sont supprimées. L'ADN et les protéines ne sont alors plus solubles dans la phase aqueuse tandis que l'ARN reste dans cette phase.

❖ La transcription inverse et l'amplification génique *in vitro* (RT-PCR) :

L'ARN ayant été isolé, il est mis en contact avec les amorces qui permettront d'amplifier la séquence choisie (S7 ou S10). Ensuite, il ne reste plus qu'à mettre les tubes à RT-PCR dans le thermocycleur qui réalisera alors l'amplification de la séquence désirée en enchaînant de nombreuses transcriptions.

❖ L'électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 24):

Enfin, il faut révéler les produits de la RT PCR. Ceci est fait par une électrophorèse en gel d'agarose. Il faut d'abord préparer un gel d'agarose, ensuite disposer les produits des RT PCR. Alors, après avoir mis sous tension le bac, les produits vont pouvoir migrer. Quand la migration est achevée, il ne reste plus qu'à prendre une photo du gel sous U.V (Figure 24).

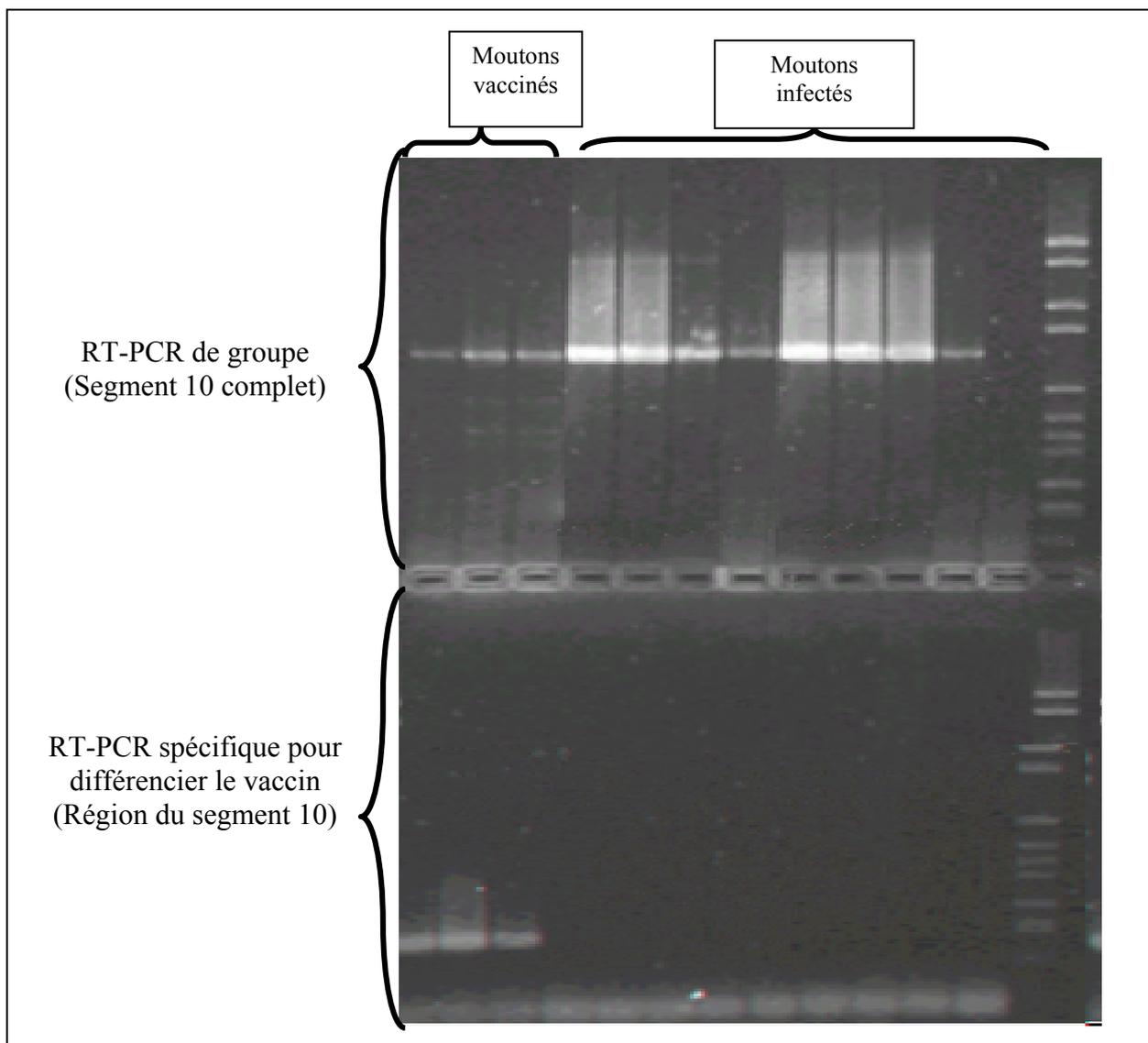


Figure 24 : Deux électrophorèses sur gel d'agarose : une de RT-PCR de groupe et une pour différencier les souches vaccinales (ZIENTARA S)

### 2.3.3 Difficultés rencontrées :

L'extraction des ARN ne présente pas de difficulté particulière. La seule chose délicate reste le prélèvement des surnageants car, le culot n'étant pas visible, il faut prendre garde à ne pas le prélever avec. D'autre part, comme dans toutes les autres étapes de cette méthode, il faut vraiment veiller à éviter toutes les contaminations possibles entre les échantillons ou avec les témoins positifs. Des conditions d'asepsie et de stérilité draconiennes sont nécessaires pour éviter tout passage d'ARN d'un tube à l'autre.

La seconde partie de la RT-PCR (l'amplification) ne pose pas non plus de problème. Une fois que le programme permettant la transcription et l'amplification du génome viral est connu, il suffit d'optimiser le nombre de cycles pour obtenir une bonne amplification génique.

Quant à la phase finale de lecture des résultats de la RT-PCR, c'est elle la plus simple. La seule chose à surveiller est de bien « tracer » les échantillons. Puis, en ce qui concerne la lecture du résultat, il suffit de comparer l'échantillon au témoin positif pour savoir si celui-ci contenait des particules de virus de la fièvre catarrhale.

## 2.3.4 Caractéristiques de la technique :

### 2.3.4.1 Intérêts des RT-PCR pour le diagnostic de la Fièvre catarrhale

Ces méthodes de diagnostic sont de deux types : les RT-PCR de groupe qui font le diagnostic d'une infection de fièvre catarrhale sur un mouton, et les RT-PCR de type qui détermine le sérotype du virus et sont donc plus utilisées pour la phylogénie et l'épidémiologie.

#### 2.3.4.1.1 RT-PCR de groupe :

Grâce à cette méthode, le génome viral peut être spécifiquement détecté en 48 heures à partir du sang ou de la rate contre une dizaine de jours pour la détection du virus à l'aide des techniques classiques. De plus, ce test semble beaucoup moins sensible à la qualité d'acheminement de l'échantillon que les autres méthodes. Ce problème est important à prendre en compte, notamment lors des épizooties, où les envois sont fait dans la précipitation, en oubliant certaines précautions. Il faut quand même noter que sa sensibilité reste diminuée tout en étant correcte sur des suspensions de tissus congelés (PARSONSON et MAC COLL, 1995).

Si on étudie à présent de plus près la sensibilité, la RT-PCR détecte même une concentration virale de 10 TCID<sub>50</sub> voir même 5 TCID<sub>50</sub> selon certaines études récentes (BILLINIS *et al.*, 2001). La détection de particules virales dans le sang de bovins peut ainsi avoir lieu pendant beaucoup plus longtemps qu'avec les méthodes classiques d'isolation, jusqu'à 160 jours chez les bovins (Figure 25) (KATZ *et al.*, 1994 ; PARSONSON et MAC COLL, 1995). De plus la spécificité de ce test est presque parfaite. De nombreuses études ont montré qu'il n'y avait aucune confusion avec le virus de la maladie hémorragique (GAYA *et al.*, 2000).

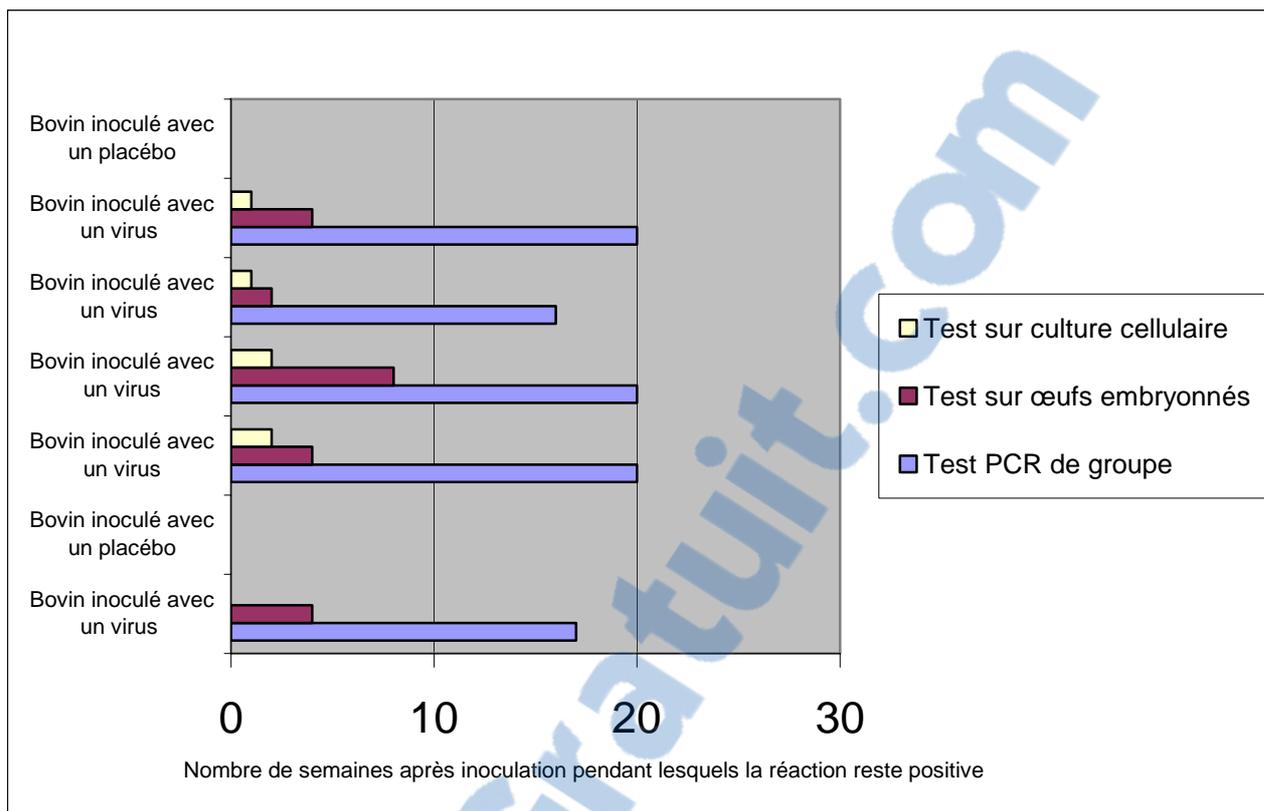


Figure 25 : Comparaison des méthodes d'isolement viral lors d'une étude de MACLACHLAN *et al.* (1994)

Ainsi, la sensibilité et la rapidité de la PCR en font une technique fort utile pour le diagnostic de la fièvre catarrhale du mouton.

#### 2.3.4.1.2 RT-PCR de type :

Ces méthodes ne sont réalisées qu'après une RT-PCR de groupe car elles sont surtout utilisées pour analyser l'épidémiologie de la maladie. En effet, l'obtention des sérotypes, voire même la différenciation des différentes souches virales permet de retrouver la source d'une contamination, et même parfois de déterminer l'origine d'une épizootie. Par exemple en 2001, cela a permis de conclure que le virus présent n'avait pas été importé en Corse, mais que c'était le même que celui de l'épizootie de 2000 (ZIENTARA *et al.*, 2001). Cela peut donc s'avérer utile pour lutter contre la maladie, et cela permet de prévoir son évolution.

L'autre principal intérêt reste que les RT-PCR de type permettent de distinguer les séquences nucléotidiques des souches sauvages de celui des souches vaccinales. On pourra alors différencier un animal vacciné, d'un animal malade (Figure 24).

Bien entendu, ces méthodes bénéficient de la même rapidité et de la même sensibilité que les RT-PCR de groupe. En ce qui concerne la spécificité, elle varie selon les souches et les laboratoires ; mais malgré cela, elle semble la plupart du temps plus que satisfaisante.

#### 2.3.4.2 Limites de ces techniques moléculaires :

Les limites de ces techniques moléculaires sont générales et en aucun cas particulières au diagnostic de la fièvre catarrhale. Ces techniques génèrent de grandes quantités d'oligonucléotides amplifiés (« les amplicons ») susceptibles de contaminer le laboratoire et les prélèvements biologiques, voire même les réactifs. Dans ce cas, des réactions faussement

positives peuvent être obtenues. Différentes procédures permettent de limiter ce risque : attribution de pièces spécifiques pour la réalisation des différentes étapes techniques, ports de gants, utilisation de contrôles internes,...

Mais la seule mise en oeuvre de la PCR et sans isolement du virus prive le laboratoire de la connaissance des propriétés biologiques particulières du virus : étude de la virulence, étude des propriétés antigéniques du virus, étude génétique sur d'autres régions du génome... De nombreuses études ont d'ailleurs montré que les particules virales de sang positives en PCR et négatives avec les techniques classiques ne pouvaient plus être infectieuses pour d'autres mammifères, pouvant seulement infecter certains *Culicoides* (MACLACHLAN *et al.*, 1994). Ainsi, il faut toujours coupler la PCR avec des isollements classiques sur œufs embryonnés lors des études d'épizooties. Chacune de ces méthodes possède des avantages complémentaires qui font qu'il ne faut surtout pas les dissocier.

### 2.3.5 Variantes éventuelles :

Les RT-PCR possèdent de nombreuses variantes déjà au niveau des cycles du thermocycleur pour lesquels chaque laboratoire a son programme d'amplification. Malgré cela, tout le monde s'accorde à affirmer qu'il faut au moins une quarantaine de cycles pour réduire le risque de faux négatifs, dû notamment au faible niveau de contamination des échantillons (DANGLER *et al.*, 1990 ; WADE-EVANS *et al.*, 1990).

En ce qui concerne les segments amplifiés, le segment 7 ou le 10 sont utilisés à l'AFSSA. Mais ce ne sont pas les seuls qui peuvent être choisis. D'autres laboratoires ont par exemple choisi d'amplifier le segment 6 qui code pour la protéine NS1 pour les sérogroupages, puisqu'il n'est qu'à 60% homologue avec le même segment du virus de la maladie hémorragique épizootique (DANGLER *et al.*, 1990 ; MACLACHLAN *et al.*, 1994 ; WILSON et CHASE, 1993). Certains ont opté pour la protéine VP2 pour le sérotypage, car il n'existe quasiment pas de réactions croisées, avec elle, entre les différentes souches (seulement une entre BTV3 et BTV16 car ils sont homologues à 70%) (HARDING *et al.*, 1995 ; MAC COLL et GOULD, 1971). En tout cas, en ce qui concerne le sérogroupage, c'est la protéine VP7 qui semble donner les meilleurs résultats selon les différentes études qui ont été menées (WADE-EVANS *et al.*, 1990).

Le tableau 17 récapitule les principales caractéristiques de la RT-PCR.

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des caractéristiques de la RT-PCR

Technique	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients	Utilisation
RT-PCR	Sensibilité très bonne et spécificité presque parfaite (proche de 100%) surtout si suit une culture	-Virus isolé plus longtemps après l'inoculation -Rapide (48H) -Utilisable sur les tissus congelés	-Ne suffit pas à conclure une infection par un BTV	En routine pour diagnostiquer une infection par un BTV en complément des cultures

En conclusion, il faut bien retenir que, même si les progrès réalisés dans le domaine du diagnostic moléculaire par PCR ont permis d'améliorer la sensibilité et la rapidité de la détection du virus, les techniques virologiques classiques gardent toujours un intérêt réel et confortent la décision finale du vétérinaire biologiste lors du rendu du résultat. Un simple résultat positif par RT PCR ne peut suffire à conclure. Pour cette raison, elle n'est jamais réalisée seule lors du diagnostic d'une infection par un virus de la fièvre catarrhale (tableau 18).

Tableau 18 : Examens réalisés à l'AFSSA lors de l'arrivée d'un prélèvement suspect

<b>Examens réalisés lors de l'arrivée d'un prélèvement à l'AFSSA</b>
<p>Pour chaque prélèvement, on réalise d'abord une RT-PCR, puis seulement si celle-ci s'avère positive, on cherche à isoler le virus.</p> <p>On continue alors avec une inoculation sur œufs embryonnés suivie d'une culture cellulaire. Si le virus n'est toujours pas isolé on refait des passages successifs sur des œufs ou sur des cellules jusqu'à ce que l'on parvienne à isoler l'agent.</p> <p>A noter que la séroneutralisation n'est quasiment plus utilisée, seulement certaines fois pour déterminer le sérotype viral, mais la RT PCR le permettant aussi, celle-ci est préférée.</p>

Après avoir passé en revue l'ensemble des méthodes de diagnostic, voyons à présent l'épidémiologie de la fièvre catarrhale du mouton.

# **III/ Situation épidémiologique de la fièvre catarrhale du mouton**

Comme nous le savons déjà, la fièvre catarrhale est une maladie transmise principalement par une piqûre d'insecte. C'est d'ailleurs la définition d'un arbovirus (Arthropod borne virus): « virus qui, dans la nature, peut infecter un arthropode hématophage par l'ingestion de sang de vertébré infecté. Il se multiplie dans les tissus de l'arthropode et sera transmis par une piqûre à un autre vertébré sensible ». Ainsi, nous allons découvrir tout d'abord le vecteur de cette maladie et ensuite nous verrons la situation mondiale qui en découle.

## **3.1/ Vecteurs de la fièvre catarrhale : les *Culicoides***

Les *Culicoides* sont les plus petites diptères hématophages du monde : elles ne mesurent qu'1 à 3 mm. Pour cette raison, ils sont souvent qualifiés abusivement de moucheron. Plus de 1400 espèces ont actuellement été identifiées et on les retrouve partout sur la planète : des tropiques à la toundra, du niveau de la mer jusqu'à 4000 mètres d'altitude (à l'exception de l'Antarctique). Voyons donc d'abord les caractéristiques de ces diptères et des familles auxquelles elles appartiennent ; ensuite, nous verrons quelles espèces nous intéressent réellement pour la transmission du virus de la fièvre catarrhale.

### **3.1.1 Taxonomie et caractéristiques générales des *Culicoides* :**

#### **3.1.1.1 Famille des Cératopogonidés :**

Les Cératopogonidés sont une grande famille qui fait partie de l'ordre des Diptères et du sous ordre des Nématocères. Elle contient près de 60 genres et environ 4000 espèces. Seules les femelles sont hématophages et se nourrissent à partir de vertébrés ou d'autres insectes. Les mâles, eux, se nourrissent de nectar.

Les diptères de cette famille ont un corps élancé de 1 à 3mm, avec des ailes velues et des antennes longues et filiformes, globuleuses vers la base et de 14 à 16 articles. La zone radiale semble condensée et les ailes recouvrent le dos au repos. Ils ont un développement de type orthorhaphé avec la présence de plusieurs stades larvaires.

Les Cératopogonidés se divisent en 4 sous-familles : *Leptoconopinae*, *Forcipomyiinae*, *Dasyheleinae* et les *Ceratopogoninae* (KETTLE, 1984). Les *Leptoconopinae* ne contiennent qu'un seul genre : les *Leptoconops* qui possède des ailes d'un blanc laiteux contrastant avec une tête et un thorax noir (Figure 26). Ils ne possèdent pas de macrotriches sur les ailes et ni de r-m cross-veine (c'est la nervure transverse rejoignant la nervure radiale et la nervure médiane).

En second, on trouve la sous-famille des *Forcipomyiinae* qui contient le genre des *Forcipomya*. Ils possèdent des ailes très velues, un empodium (ou épine) très développé sur le dernier segment du tarse et une longue seconde cellule radiale (Figure 26). Ce groupe contient, notamment, le sous genre *Forcipomya* qui est représenté par environ 50 espèces différentes de diptères hématophages.

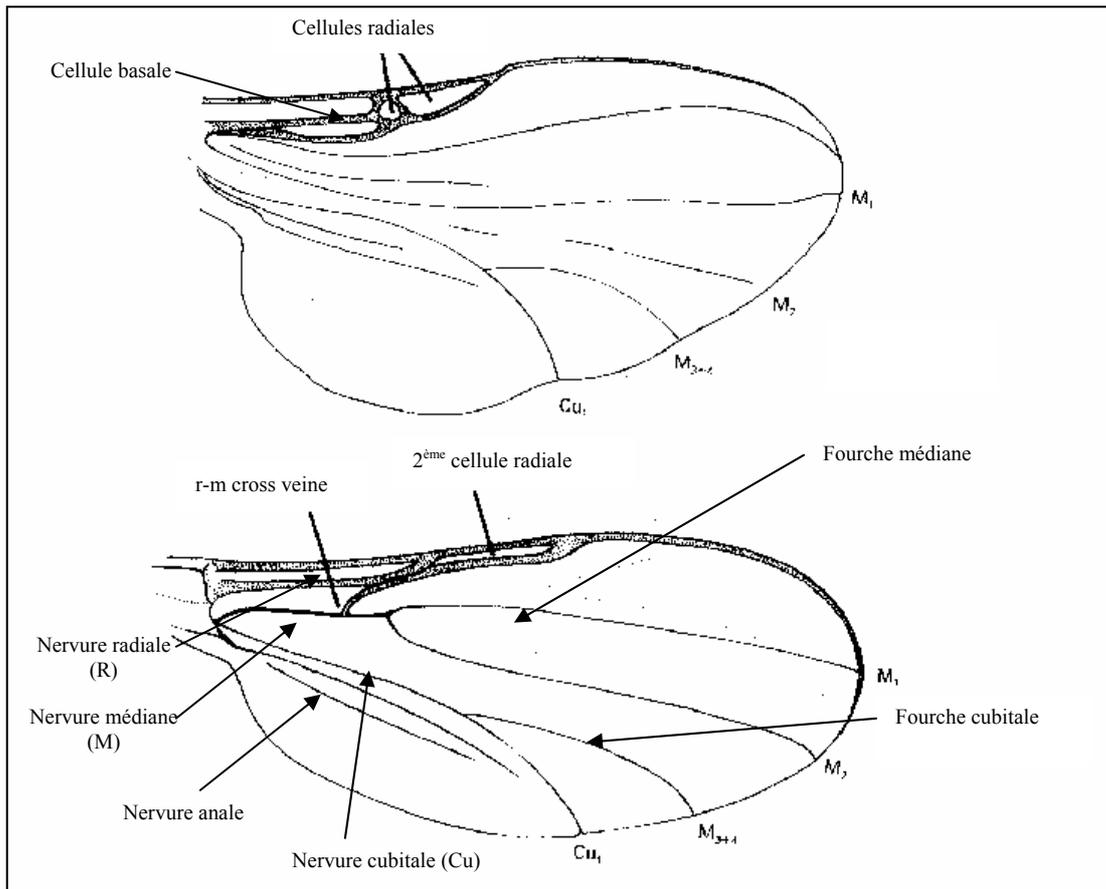


Figure 26 : Représentation d'une aile de femelle *Leptoconops australiensis* au dessus et d'une aile de femelle *Forcipomyia townsvillensis* en dessous (KETTLE, 1984)

Puis, il y a la sous famille des *Dasyheleinae* que nous nous contenterons de citer car aucun d'entre eux n'a d'importance, aussi bien dans le milieu vétérinaire qu'en médecine humaine.

Enfin, on retrouve la sous famille des *Ceratopogoninae* : ses membres ont encore un vestige d'empodium, mais les différents segments de leurs antennes ne sont plus vraiment sculptés. Elle contient le genre *Austroconops* et bien entendu le genre *Culicoides* que nous allons décrire à présent plus amplement.

### 3.1.1.2 Genre *Culicoides*

Les insectes faisant partie de ce genre sont faciles à identifier grâce aux dessins noirs et blancs présents sur leurs ailes. Ceux-ci sont constitués à partir des pigments compris dans la membrane de l'aile et ils ne peuvent donc pas s'effacer.

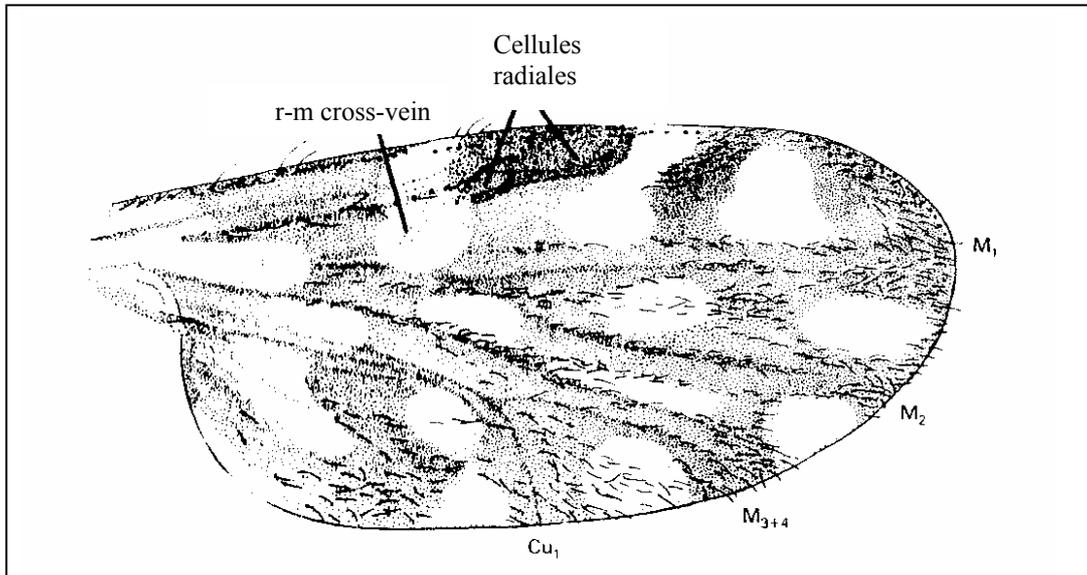


Figure 27 : Représentation d'une aile de femelle *Culicoides marmoratus* (KETTLE, 1984)

De plus, selon (KREMER *et al*, 1987), les *Culicoides* sont des Cératopogonidés avec 2 cellules radiales de même taille, des macrotriches parfois abondantes, des microtriches, des griffes tarsales égales, un empodium rudimentaire, la nervure médiale pédiculée et toujours une nervure transverse (Figure 27).

### 3.1.2 Morphologie des *Culicoides* :

Les *Culicoides* sont donc des Diptères, Orthorhaphes, Nématocères. Les figure 28, 29 et 30 présente la morphologie des *Culicoides* avec une vue dorsale ailes ouvertes, une vue latérale et une vue dorsale ailes repliées (KREMER, WALLER et DELECOLLE, 1987).

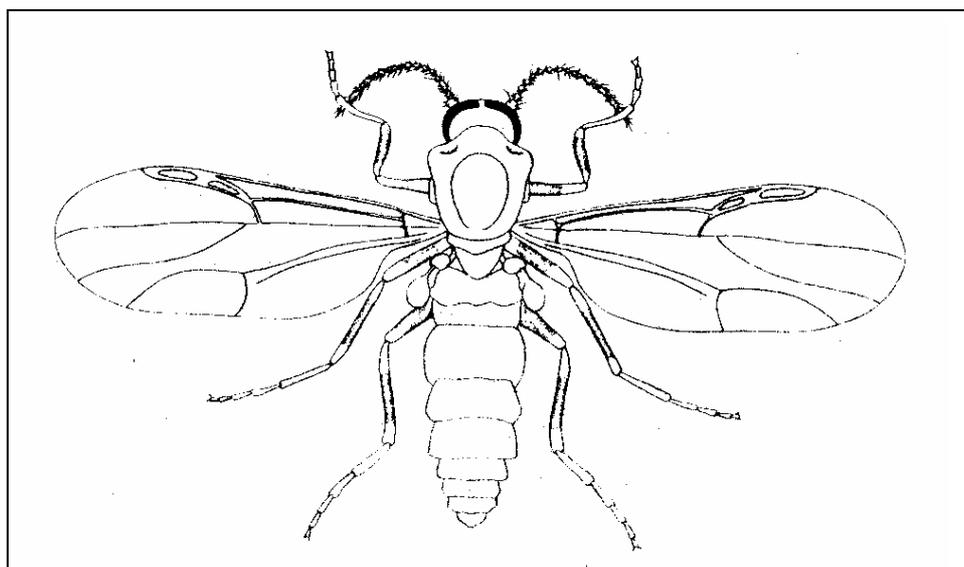


Figure 28 : Représentation d'un *Culicoides* femelle ailes ouvertes (KEETLE, 1984)

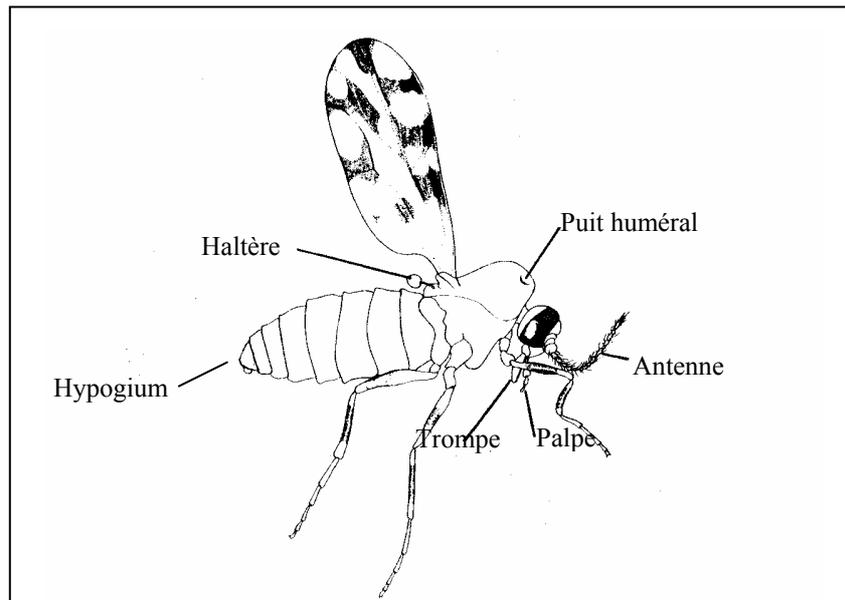


Figure 29 : Représentation d'une femelle *Culicoides brevitarsis* de profil (KEETLE, 1984)

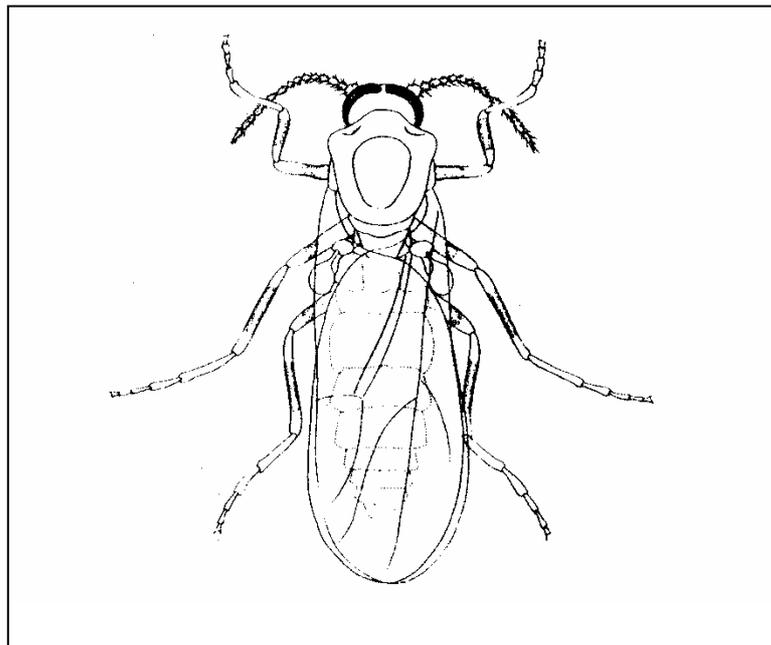


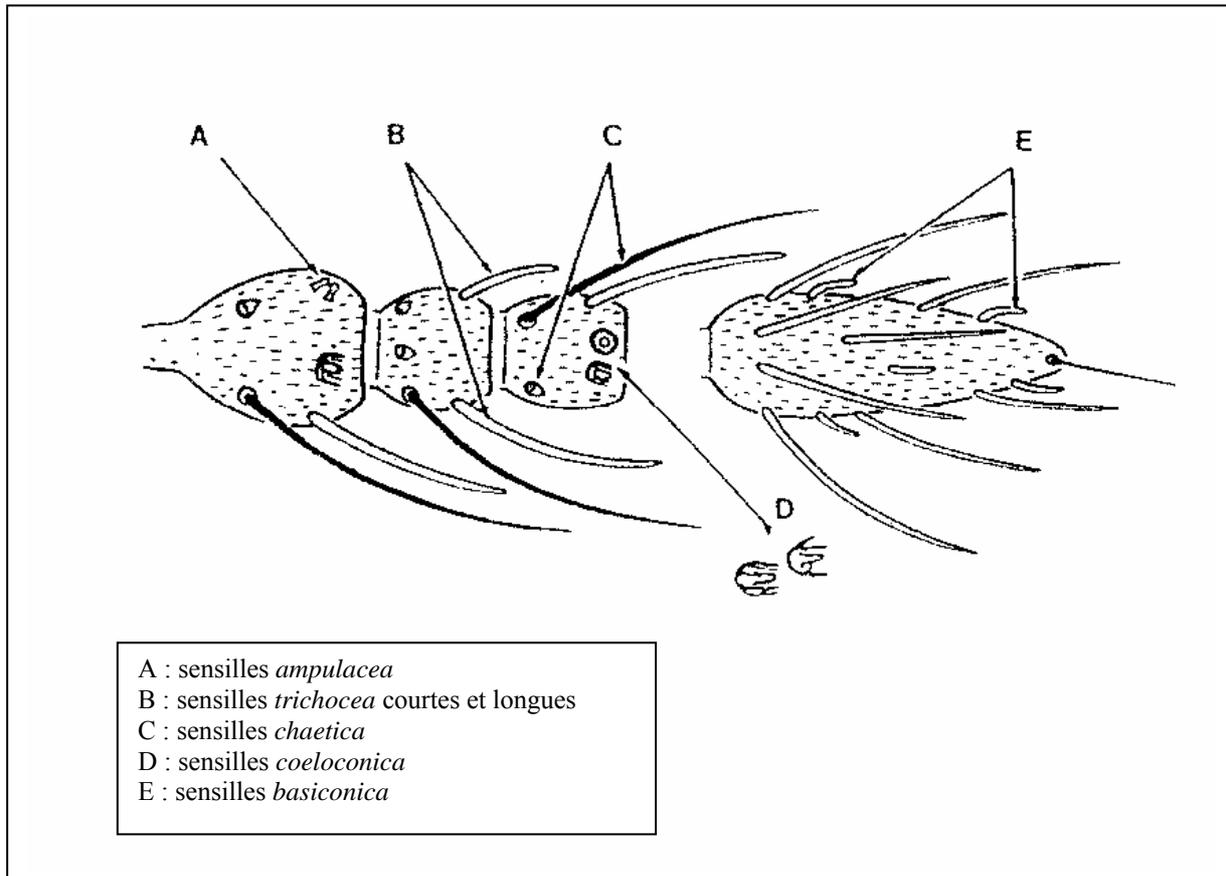
Figure 30 : Représentation d'un *Culicoides* femelle ailes fermées selon (KEETLE, 1984)

### 3.1.2.1 Tête

Le flagellum de l'antenne est formé de 13 articles. Chez les femelles, le rapport antennaire (somme des longueurs des 5 derniers articles divisée par la somme des longueurs des 8 premiers) est particulièrement important. De plus, la mensuration individuelle de tous les articles est indispensable pour la différenciation des espèces.

En ce qui concerne les sensilles, on en retrouve 5 sortes réparties sur les articles antennaires (Figure 31) : les sensilles *coeloconica* constitués d'une couronne de quelques soies courtes entourant une dépression centrée sur une protubérance plus ou moins importante, les sensilles *ampulacea* correspondant à une fossette étroite et profonde contenant un axe globuleux, les sensilles *basiconica* faites de soies courtes courbées en doigt de gant, en général sur les articles longs, les sensilles *trichocea* formés de soies courtes à longues,

transparentes, sans articulation à la base et, pour finir, les sensilles *chaetica* constituées de soies longues et courbes, insérées sur une articulation. L'abondance de ces dernières donne l'aspect plumeux des antennes chez le mâle.



**Figure 31** : Représentation des deux premiers articles et du dernier article des antennes d'une femelle *Culicoides* montrant les différents types de sensilles (KREMER, WALLER et DELECOLLE, 1987)

Quant aux pièces buccales : les maxilles et mandibules sont généralement pourvues de dents dans leur partie distale et les palpes maxillaires se composent de 5 articles. C'est sa trompe (ou labium) qui lui permettra de prendre ses repas. Parfois, on retrouve des tubercules, soit au niveau du cibarium, soit à la jonction du pharynx postérieur et du cibarium.

### 3.1.2.2 Thorax

Le thorax est l'élément sur lequel reposent les ailes. Celles-ci sont toujours pourvues de microtriches, mais leurs macrotriches ont une extension variable, même si elles sont moins abondantes chez les mâles. Les ailes sont ornées de zones claires et de zones sombres dues, soit à la teinte de fond de la membrane alaire, soit à celle des microtriches. Ce sont les nervures ainsi que les cellules alaires qui participeront essentiellement à la classification des différentes espèces.

Quant aux pattes, elles ne possèdent aucun caractère particulier, si ce n'est la paire de pattes postérieure pour laquelle on note la présence d'un peigne tibial distal doté de nombreuses épines.

### 3.1.2.3 Abdomen

Il est composé de 10 segments, dont le dernier est réduit à des cerques. L'élément principal de diagnose d'espèces est l'hypogium situé à l'extrémité distale de l'abdomen chez les mâles (Figure 32). Il existe des clés pour toutes les espèces fondées presque exclusivement sur cet organe.

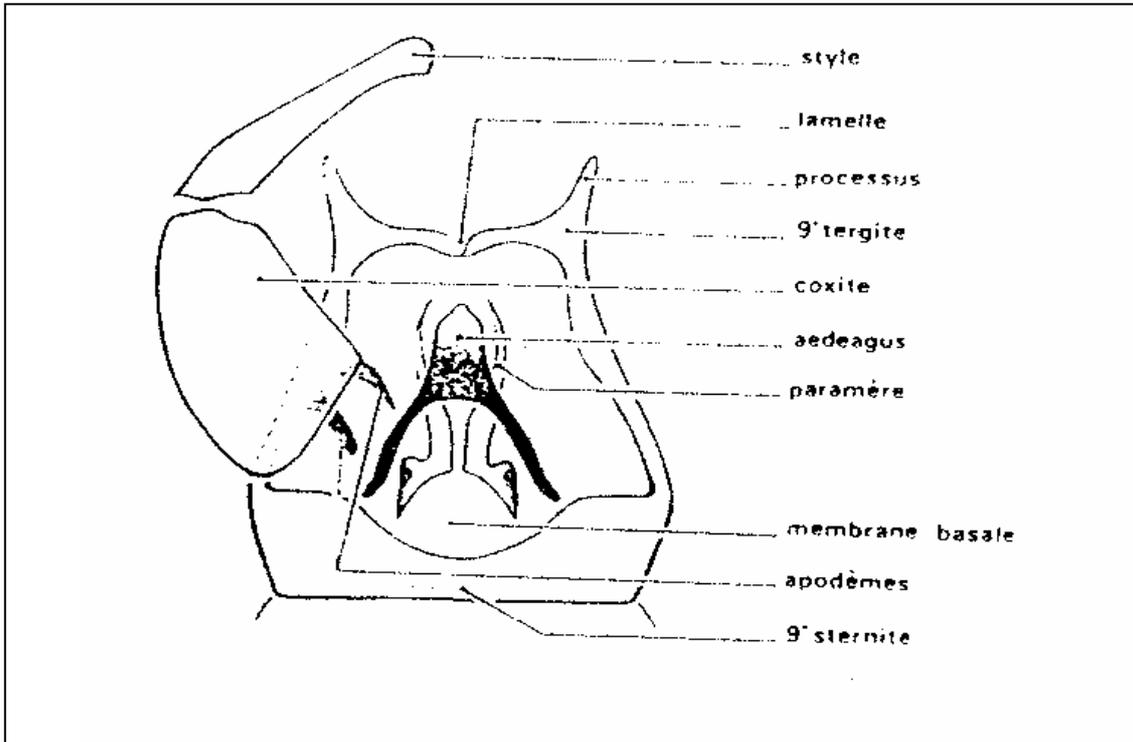


Figure 32 : Hypogium des mâles *Culicoides* (KREMER, WALLER et DELECOLLE, 1987)

Par contre chez les femelles, les seuls éléments de morphologie utilisables sont le nombre, la taille et la forme peu variée des spermathèques (1 à 3 selon les espèces). A noter que des sclérites abdominaux peuvent être visibles sur le huitième segment chez certaines espèces, ainsi qu'un anneau sclérifié sur le conduit génital commun.

### 3.1.2.4 Spécificité de *Culicoides imicola*

*Culicoides imicola* est une espèce très abondante à travers le monde : on l'a retrouvée de l'Afrique au Moyen-Orient, en passant par la Chine et le Laos. Elle fut d'abord connue sous le nom de *Culicoides pallidipennis* sur le continent africain vers les années 1920 (MEISWINKEL, 1989). Mais dès 1940, elle fut renommée avec le nom que nous lui connaissons à présent. Nous nous attardons sur elle car c'est la seule espèce démontrée responsable actuellement de la transmission de la fièvre catarrhale du mouton en Corse.

Cependant, différencier toutes les espèces de *Culicoides* reste une chose difficile à réaliser. La seule méthode fiable dont nous disposons actuellement pour les différencier morphologiquement reste la mesure de certains ratios. C'est d'ailleurs ce qui a permis à MEISWINKEL et BAYLIS (1998) de différencier *Culicoides imicola* de *Culicoides nudipalpis* (Tableau 18). L'envergure des insectes fut d'abord mesurée, mais cela ne semble pas être un paramètre fiable pour la distinction des espèces car il dépend aussi de la saison, de leur nutrition ainsi que de facteurs environnementaux. Ensuite ce fut le tour de la trompe, ce critère semble être plus utile. Mais il est encore plus fiable de calculer le ratio de la longueur

de la trompe sur la taille de la tête (qui correspond à la distance du tormae (renforcements situés de part et d'autre de l'insertion des maxilles et mandibules à la base du labium) au setae interoculaire ou soie interoculaire). C'est ce paramètre qui semble montrer la plus grande spécificité. Quand à la longueur des antennes, elle ne permet aucune distinction ; même le ratio entre les segments distaux et basaux n'est pas significatif.

Tableau 19 : Comparaison de la mesure de certaines parties de *Culicoides imicola* selon l'étude de WIRTH et HUBERT repris par MEISWINKEL et BAYLIS (1998) et leur propre étude

Caractères :	Etude de WIRTH et HUBERT	Etude de BAYLIS M. et MEISWINKEL R
Envergure (en mm)	0,79 - 0,86	0,92 - 1,17
Longueur de la trompe (en µm)	-	117,5 - 182,5
Ratio trompe/ tête	0,88	0.82 - 1.02
Longueur des antennes (en µm)	-	435,0 - 494,5
Ratio des antennes	1,17 – 1,19	0,95 – 1,10

Sinon, *Culicoides imicola* présente quelques spécificités qui peuvent orienter vers sa diagnose. Tout d'abord le segment 11 des antennes ne présente que rarement des sensilles *coeloconica* (4% des *Culicoides imicola* selon MEISWINKEL et BAYLIS (1998)). Quant au fossé du palpe, il semble le plus souvent bien marqué et profond. En ce qui concerne les mâles, ils possèdent de nombreux spicules (de 8 à 145) sur la membrane du sternum 8. Si on regarde à présent les dessins sur les ailes, ils peuvent parfois orienter la diagnose notamment pour les différencier de *Culicoides brevitarsis*, *C. pseudopallidipennis*, *C. bolitinos*, *C. miombo* et *C. ixodontis* grâce à une zone pâle en avant de la veine M1 et la juxtaposition d'une tache pale et d'une foncée à l'extrémité distale de la veine M2 (MEISWINKEL, 1989), mais elles restent souvent comparables d'une espèce à l'autre.

### 3.1.3 Cycle évolutif des *Culicoides*

#### 3.1.3.1 Oeufs :

L'accouplement a lieu le plus souvent dans de grands espaces, et est précédé d'un vol nuptial de nombreux mâles et femelles : ce sont des espèces eurygames. L'accouplement effectué, la femelle a un besoin de sang accru et devient très agressive. Son repas de sang obtenu, elle se reposera pendant 2 à 4 jours selon les espèces, (celles des zones froides nécessitant plus de temps), pour permettre la maturation des œufs. Ce n'est qu'ensuite que pourra avoir lieu la ponte (à noter qu'en général une femelle peut pondre 5 à 6 fois dans sa vie).

Les œufs sont alors déposés dans de l'eau stagnante (boues et vases des bords des cours d'eau, mares) en grappe de 30 à 40 pour *Culicoides brevitarsis* mais pouvant aller jusqu'à 450 pour *Culicoides circumscriptus* (KETTLE, 1984). Les œufs sont petits, sombres et effilés. Ils mesurent entre 350 et 500µm de longueur et 65 à 80 µm de diamètre. Ils sont recouverts de petites projections qui permettent, en maintenant un film d'air au contact de l'œuf, de faciliter la diffusion d'oxygène pour la respiration lorsque l'œuf est immergé.

Pour la plupart des espèces, les œufs éclosent ensuite en quelques jours s'ils se trouvent à des températures favorables. Seules quelques espèces nordiques, tel *Culicoides*

*grisescens*, mettent jusqu'à 8 mois à éclore et cela, certainement, pour leur permettre de passer la saison hivernale. Cette éclosion donnera alors naissance à une larve.

### 3.1.3.2 Larves

La larve qui émerge de l'œuf est une larve typique de nématocère avec une tête sclérifiée, un corps composé de 11 segments et aucun appendice (Figure 33). Les 3 segments thoraciques sont identiques aux 8 segments abdominaux et ne sont pas fusionnés.

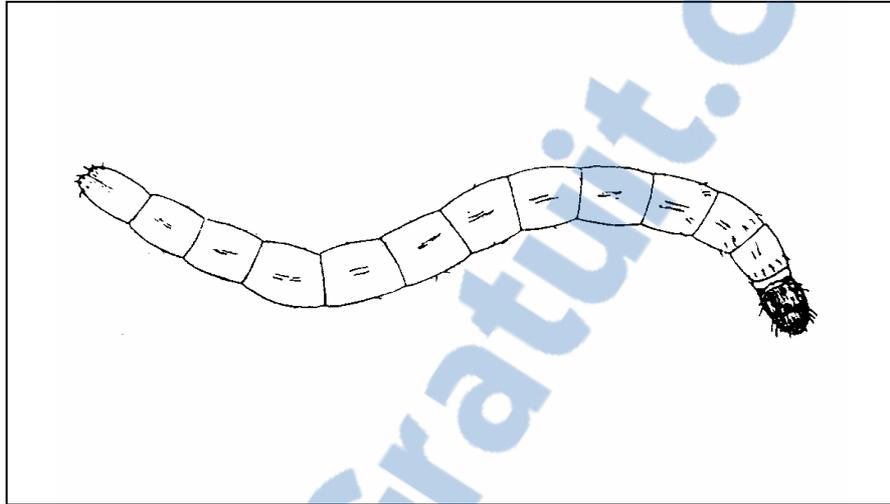


Figure 33 : Représentation d'une vue dorsale d'une larve de *Culicoides impactus* (KEETLE, 1984)

La larve se déplace en nageant grâce à des mouvements oscillatoires qui impliquent une flexion à partir des nœuds antérieurs et postérieurs situés sur le métathorax et sur le septième segment abdominal. Elle semble dépenser beaucoup d'énergie par rapport à la progression qu'elle réalise. Sinon, elle possède une paire de trachées, mais les spiracles sont fermés et la respiration ne se fait alors que de manière transcutanée.

Deux paires de fines papilles étroites peuvent également être extériorisées de l'anus, ou rétractées dans le rectum. Ces papilles serviraient à l'absorption de sels dans le milieu extérieur. Quand aux soies, alors que les larves de culicidés ont un tactisme très développé, celles de *Culicoides* n'ont en général que des soies discrètes et peu abondantes.

Voyons à présent les structures internes principales de la tête : les épipharynx. Selon les espèces, ils sont présents sous deux formes différentes : une forme légère et une forme lourde. Pour les formes lourdes, les bras latéraux, le corps et les peignes sont fortement sclérifiés. Avec l'hypopharynx, ils agissent comme des structures écrasantes, agissant comme un pilon et un mortier. Ce type d'épipharynx se retrouve sur les larves d'insectes du sous-genre *Monoculicoides* tel que *Culicoides variipennis*. Pour les formes légères, les bras et le corps sont seulement légèrement sclérifiés, et les peignes, qui se retrouvent au nombre de 2 à 4, sont très finement dentés. Malgré cela, ces espèces restent des prédateurs.

La larve passe par 4 stades au cours de son développement. Cette vie larvaire dure au minimum 2 semaines pour les espèces tel que *Culicoides brevitarsis*, 2 à 3 mois pour les espèces subtropicales, un an pour les espèces vivant en milieu tempéré et jusqu'à 2 ans pour les espèces arctiques. C'est la quatrième larve qui donnera la nymphe.

### 3.1.3.3 Nympe

La tête et le thorax sont fusionnés et portent une paire de cornes tubulaires prothoraciques utilisées pour la respiration atmosphérique par l'intermédiaire de nombreuses ouvertures terminales. La nympe est donc une nympe prop1119711.98059 Tm(t6Tj6342ce 6340 c07 tm

### 3.1.4 Virus associés aux *Culicoides*

#### 3.1.4.1 Différents virus associés :

A travers le monde, plus de 50 virus ont été isolés à partir des *Culicoides* : une vingtaine de la famille des *Bunyaviridae*, 19 appartenant aux *Reoviridae* (comme le virus de la fièvre catarrhale) et 11 de la famille des *Rhabdoviridae*. Dans la première partie de cet exposé, nous avons présenté les principaux *Orbivirus* présents à travers le monde et leurs caractéristiques. Ici, nous allons étudier les principales maladies transmises par une piqûre de *Culicoides*.

- **Oropouche virus :**

C'est le seul virus réellement pathogène pour l'homme inoculé par les *Culicoides*. Il fait partie des *Bunyavirus* et correspond à une arbovirose très importante en Amérique. Près d'un demi million de personnes ont été infectées par ce virus, depuis les années soixante, rien qu'au Brésil (MELLOR *et al.*, 2000). Les symptômes classiques sont de la fièvre, des frissons, des douleurs articulaires, musculaires, une anorexie, des vomissements, une photophobie, des vertiges, voire même une méningite.

*Culicoides paraensis* est le principal vecteur de ce virus. Il est retrouvé dans toutes les régions à densité importante de population au cours des épidémies, aussi bien dans le milieu extérieur qu'à l'intérieur des maisons.

- **Virus de la peste équine :**

D'importantes épizooties ont été observées en Afrique du Sud, au Pakistan, en Espagne, au Portugal, au Maroc, et en Inde où plus de 300 000 chevaux sont morts pendant la grande épizootie de 1959 à 1961. Le seul vecteur qui a été confirmé comme agent de la peste équine, reste *Culicoides imicola*, qui est présent tout au long de l'année dans les zones d'enzootie. Mais d'autres espèces sont suspectées, comme *Culicoides bolitinos* qui pourrait être considéré comme le second vecteur de la peste équine (MELLOR *et al.*, 2000).

- **Virus de la maladie hémorragique épizootique :**

Le vecteur principal de cette maladie est *Culicoides variipennis*. Cependant, d'autres espèces, comme *Culicoides lahillei* ou *Culicoides schultzei*, peuvent devenir des vecteurs dans certaines régions où *Culicoides variipennis* est absent.

- **Virus de l'encéphalose équine :**

Ce virus a été isolé en Afrique du Sud et au Botswana. Il a été retrouvé dans des pools de *Culicoides* dont plus de 95% étaient des *Culicoides imicola* (MELLOR *et al.*, 2000).

- **Virus de la fièvre catarrhale :**

C'est bien évidemment le virus transmis par les *Culicoides* qui nous intéresse. Pour l'instant, nous ne présenterons pas l'ensemble des espèces pouvant jouer le rôle de vecteur pour celui-ci. Nous allons d'abord nous attacher à développer la réplication de ce virus dans ces insectes.

### 3.1.4.2 Contamination des insectes et réplication virale

Dans la nature, les *Culicoides* deviennent infectants seulement après l'ingestion du sang d'un hôte vertébré virémique. La transmission du virus peut donc uniquement avoir lieu après une piqûre. Aucune étude n'a pu mettre en évidence la possibilité d'une transmission verticale (transovarienne) comme c'est le cas avec les phlébotomes pour d'autres germes.

- **Infection orale et réplication du virus de la fièvre catarrhale chez les *Culicoides* susceptibles :**

Les femelles *Culicoides* font en général un repas sanguin de  $10^{-4}$  ml de sang, qui contient en moyenne  $10^6$  TCID<sub>50</sub> virus par ml. Chaque femelle ingère donc quasiment 100 TCID<sub>50</sub> (MELLOR, 1990). Les repas sanguins sont en général effectués à 4 jours d'intervalle. On retrouve un taux de survie des adultes entre 2 repas de 80% pour *Culicoides imicola* (KETTLE, 1984).

Après l'ingestion de sang virémique, le titre en virus de l'insecte vecteur chute (Figure 35). Cette diminution correspond à une inactivation d'une partie des particules virales par l'hostilité de l'environnement rencontré (l'intestin), et par l'excrétion d'une partie des particules par l'anus. S'en suivra alors une prolifération virale dans le mésentère infecté, et la concentration virale atteindra un plateau de 5 à 6 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> par moucheron environ une semaine après. Cela correspond à une multiplication virale de  $10^3$  à  $10^4$  par insecte, et cette concentration persistera pendant toute la vie de l'insecte (MELLOR, 2000). La transmission à un vertébré sera donc possible 10 à 14 jours après le repas sanguin.

A noter que certaines études ont malgré tout montré que les enzymes digestives pouvaient aussi faciliter la contamination des moucherons. MELLOR (1990) a prouvé que la chymotrypsine et la trypsine coupent la protéine VP2, transformant ainsi les virus de la fièvre catarrhale en particules infectieuses sous virales. Ces particules semblent alors 100 à 500 fois plus infectieuses que les virus intacts.

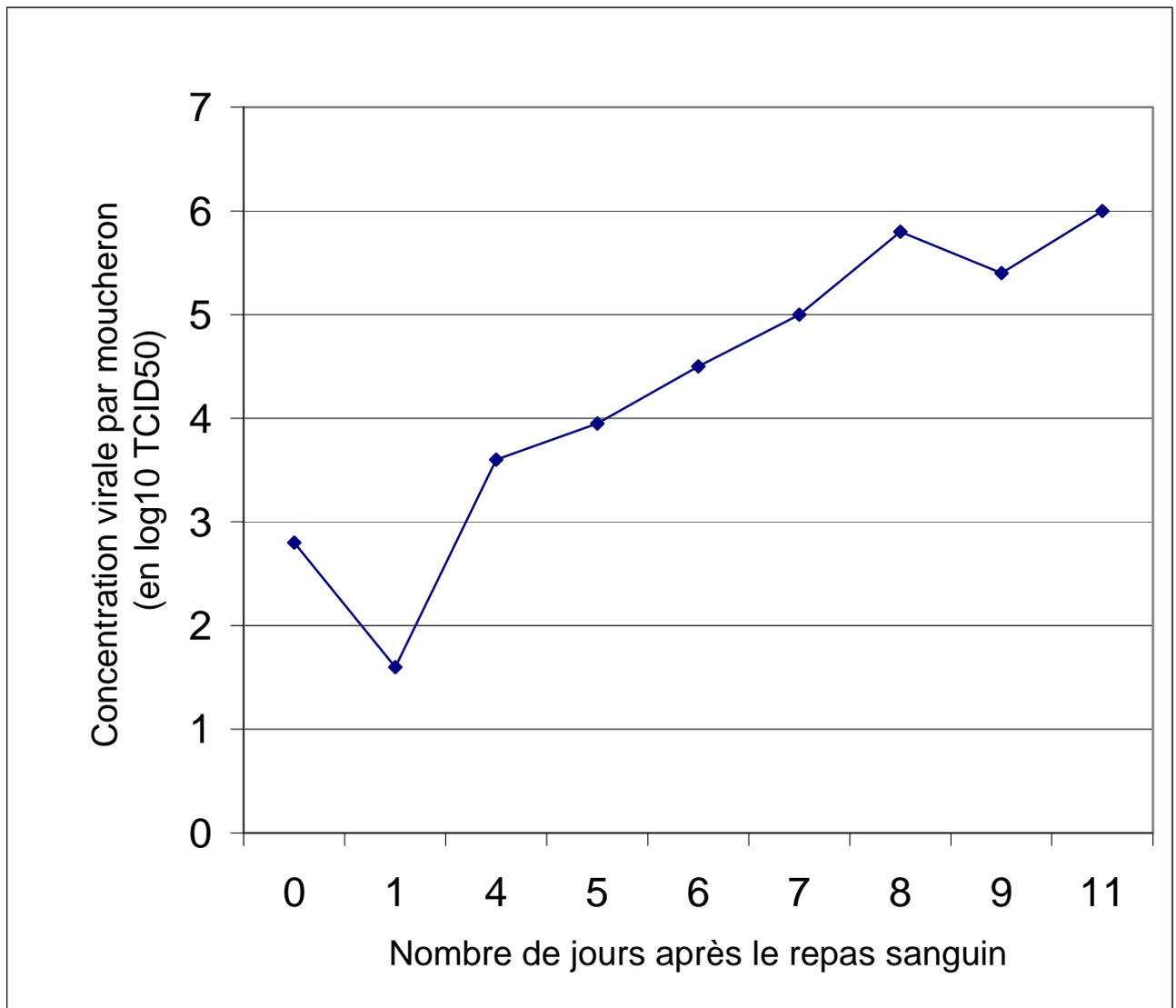
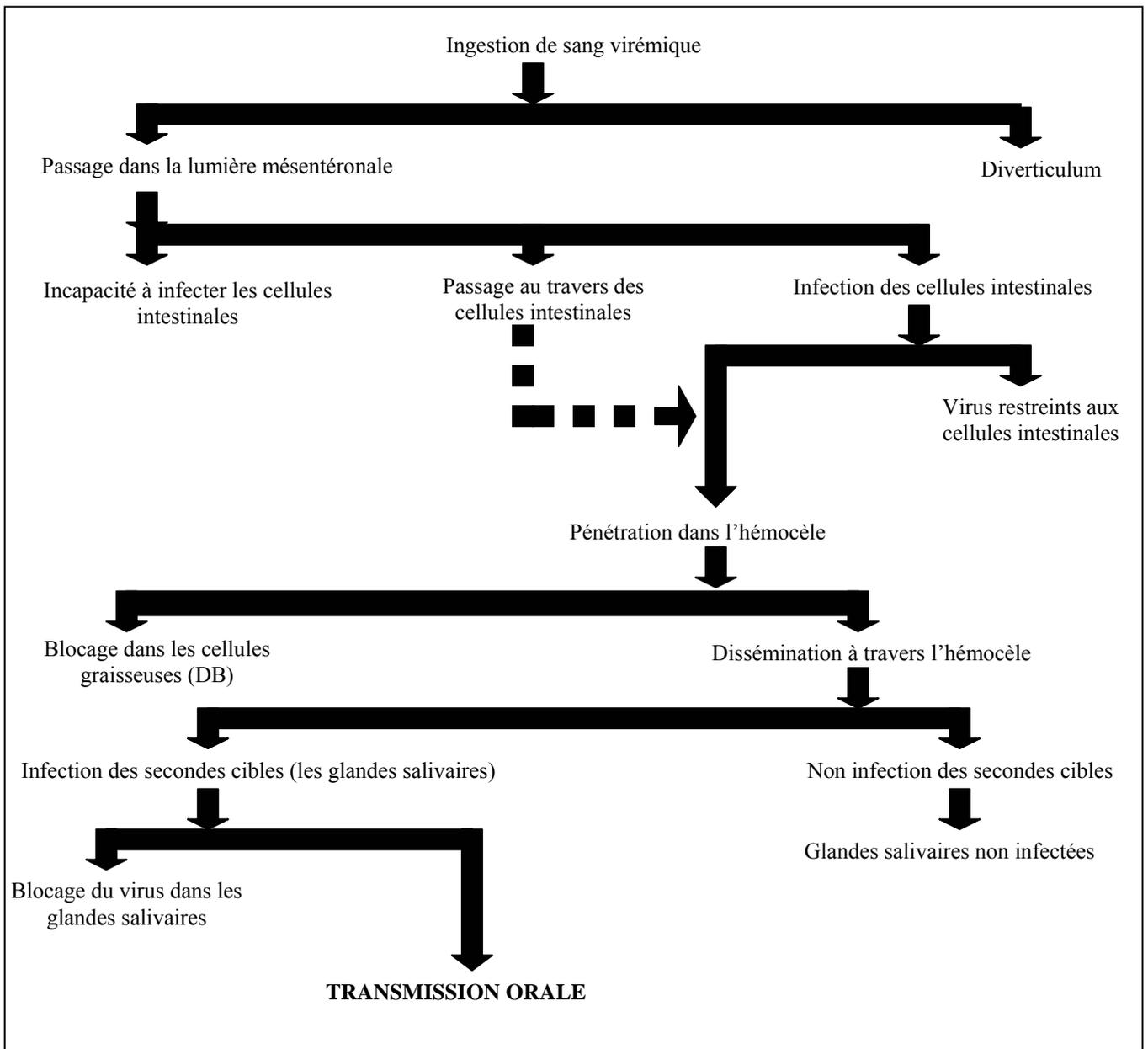


Figure 35 : Evolution de la concentration virale après un repas sanguin virémique chez *Culicoides variipenis* (MELLOR, 2000)

Le virus se sera donc multiplié dans les cellules de l'intestin, des tissus nerveux, les cellules graisseuses et les glandes salivaires, mais pas dans les cellules musculaires, les tubes de Malpighi ou les cellules des organes de la reproduction. La figure 36 montre les différentes étapes de cette multiplication virale.



**Figure 36** : Représentation de la multiplication du virus de la fièvre catarrhale chez un *Culicoides* infecté (MELLOR *et al.*, 2000)

La transmission virale à un nouvel hôte ne deviendra donc possible qu'après l'accomplissement de la période extrinsèque d'incubation au cours de laquelle le virus sera confronté à de nombreuses barrières.

- **Barrières à la multiplication virale *in vivo* (MELLOR, 2000) :**

En effet, différents phénomènes propres aux *Culicoides* limitent la multiplication virale en leur sein. La première barrière que rencontrent les particules virales, est la paroi de l'intestin qu'elles doivent traverser (MIB : Mesenteron Infection Barrier). Une partie des particules vont finir dans le diverticulum, celle-ci seront alors détruites et n'infecteront donc pas l'insecte. Sur celles restant dans la lumière de l'intestin, seule une partie parviendra à

infecter les cellules intestinales. Les autres seront soit éliminées par des enzymes digestives, soit bloquées par la membrane péritrophique, soit ne trouveront pas de récepteur pour infecter les cellules.

Les particules virales qui parviennent malgré tout à infecter les cellules intestinales vont alors être confrontées à un second problème : parvenir à passer dans l'haemocèle. C'est la seconde barrière : MEB (Mesenteron Escape Barrier). En effet, certaines particules vont être bloquées dans ces cellules et ne parviendront pas à s'en échapper.

Puis, se retrouvant dans l'hémocèle, les virus vont aller contaminer les organes secondaires, et avant d'atteindre les glandes salivaires, ils vont se retrouver au sein des cellules graisseuses. Mais celles-ci jouent un rôle notable dans la réponse immunitaire des insectes. Elles seront donc à l'origine de la destruction d'une partie des virus et limiteront la dissémination virale, c'est la troisième barrière (DB : Dissemination Barrier).

A présent, pour que l'insecte parvienne à contaminer un nouvel hôte, il faut que les virus parviennent aux glandes salivaires. C'est là qu'intervient la quatrième barrière : SGIB (Salivary Gland Infection Barrier). Si la concentration virale dans l'hémolymphe est trop faible, le virus ne parviendra pas à pénétrer dans les glandes salivaires.

Enfin, pour finir, le virus va devoir parvenir à quitter les glandes salivaires, mécanisme parfois délicat car certains facteurs, génétiques notamment, font que les virus restent séquestrés dans les glandes salivaires. C'est la cinquième et dernière barrière : SGEB (Salivary Gland Escape Barrier).

Ainsi, lors de la multiplication du virus de la fièvre catarrhale chez les *Culicoides*, celui-ci va devoir vaincre de multiples barrières pour parvenir enfin à infecter de nouveau un vertébré. Maintenant, avant de voir l'habitat de ces insectes et les différents facteurs les influençant, voyons brièvement un mode de contamination utilisé pour la recherche en laboratoire.

- **Inoculation parentérale (MELLOR, 2000):**

Cette méthode d'infection est en général réalisée à l'aide d'une fine aiguille qui vient injecté le virus directement dans l'haemocèle de l'insecte. Cela présente l'avantage de sauter les deux premières barrières auxquelles sont confrontées les particules virales lors de l'inoculation par voie orale.

Ainsi, quand on observe la courbe de concentration virale dans l'insecte, on s'aperçoit qu'il n'y a plus la chute de concentration suite à la contamination : après l'inoculation la concentration virale ne fait qu'augmenter (Figure 37). De plus, par cette méthode 100% des moucheron contaminés se retrouvent infectés ; ce qui n'était pas le cas suite à un repas sanguin.

Par contre en ce qui concerne la finalité de la contamination, les deux modes sont identiques. En effet, la concentration virale atteint également un plateau après 7 jours à  $5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>, et les *Culicoides* ne sont infectants pour un vertébré que 10 jours après l'inoculation.

En laboratoire, cette méthode a permis de nombreuses avancées scientifiques, mais elle présente l'inconvénient de pouvoir infecter des moucheron qui, en réalité, ne pourraient l'être naturellement, ce qui peut fausser certaines études. Les résultats ne peuvent donc pas toujours être extrapolés à la contamination par voie orale. Elle ne doit être utilisée que pour certaines recherches bien précises.

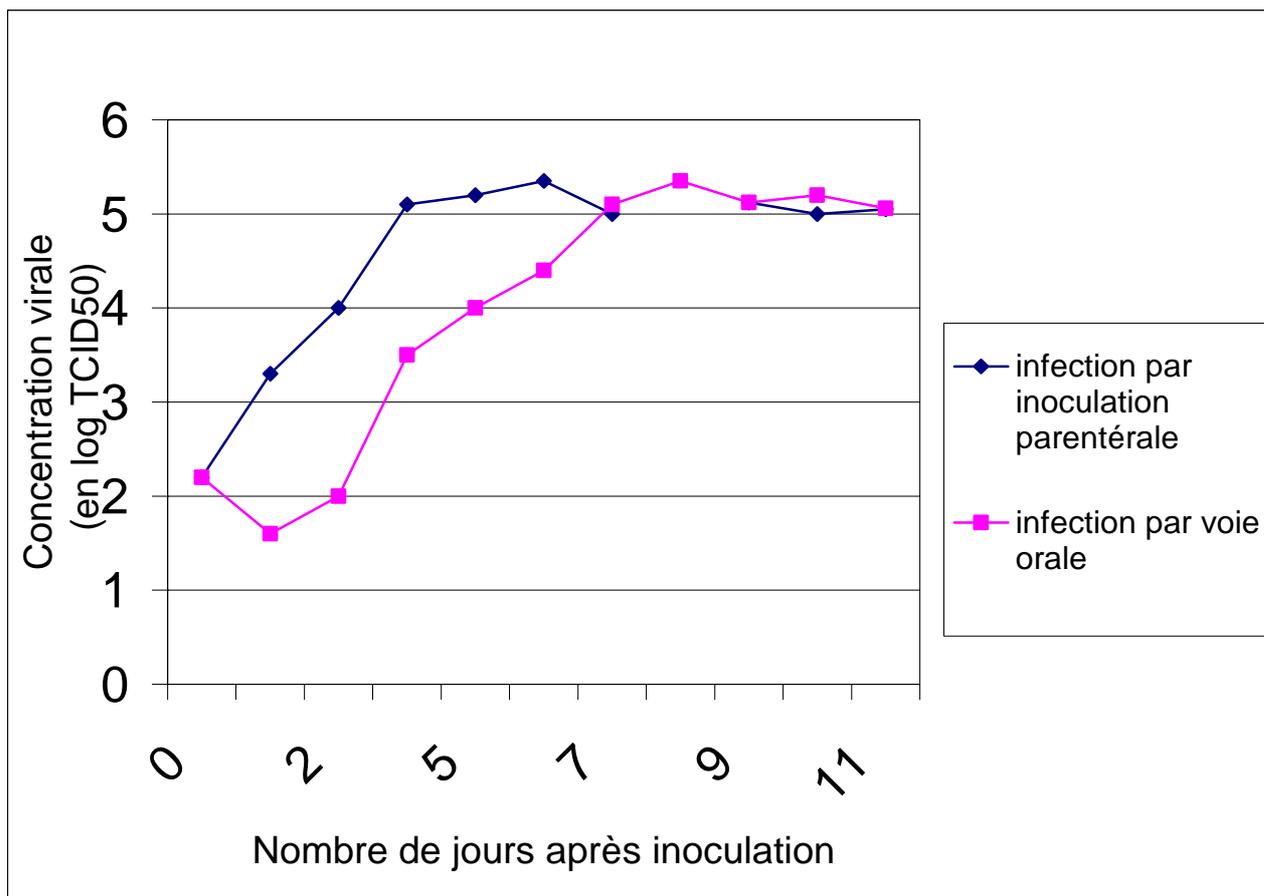


Figure 37 : Réplication du virus de la FC dans *Culicoides variipennis* selon le mode de contamination (MELLOR, 1990)

### 3.1.5 Localisation des *Culicoides* et rôle du climat sur leur activité :

#### 3.1.5.1 Leur habitat :

Les *Culicoides* vivent en général dans des zones humides, en frontière d'un habitat terrestre et aquatique, ou dans des zones contenant de nombreux végétaux pourrissants, cela pour leur permettre d'accomplir l'ensemble de leur développement : de l'œuf, en passant par la larve, jusqu'à l'adulte. A noter que les larves creusent à la surface du substrat pour s'enfouir légèrement, elles ne nagent librement que très rarement dans l'eau environnante. Quelques larves de *Culicoides* s'enfouissent également dans le sable, notamment *Culicoides melleus* ou *Culicoides hollensis*, mais elles ne font pas partie des espèces qui nous intéressent.

D'autre part, ces insectes nécessitent un habitat contenant une quantité suffisante d'arbres et de végétaux, car certaines larves se nichent uniquement dans des trous d'arbre. En Afrique de l'Ouest, on en retrouve même dans les troncs des bananiers.

En ce qui concerne *Culicoides imicola*, ils prédominent dans les zones semihumides (300 à 750mm par an) dans la savane ou ses zones boisées. Leur quantité diminue largement dès que les pluies s'intensifient notamment dans les forêts tropicales. Il a aussi été montré qu'ils étaient capables de survivre dans les zones du littoral où les sols sont sableux et l'humidité est rapidement absorbée. Ainsi dans les zones en parfaite adéquation avec leur

biologie, *Culicoides imicola* peut représenter presque 99% des *Culicoides* présents dans ces régions (MEISWINKEL et BAYLIS, 1998).

Malgré toutes ces conditions qui viennent d'être énumérées, les *Culicoides* peuvent être retrouvés dans la majorité des écosystèmes, car cette famille contient une grande diversité d'espèces. Ce n'est qu'individuellement qu'ils nécessitent un environnement particulier (KETTLE, 1984).

### 3.1.5.2 Répartition géographique des différentes espèces de *Culicoides* :

Nous nous intéresserons ici uniquement à la répartition géographique des espèces susceptibles de véhiculer le virus de la fièvre catarrhale du mouton selon une synthèse réalisée par MELLOR (1990). Ceci semble se retrouver principalement dans une zone allant d'une latitude de 40° Nord jusqu'à 35° Sud :

- **En Afrique et au moyen Orient :**

*Culicoides imicola* reste l'espèce majeure chez laquelle la plus grande quantité de virus a été isolée en Afrique du Sud, au Kenya et en Israël, ainsi que par la suite sur la péninsule Arabique, en Iran et en Turquie. Souvent, les épidémies de fièvre catarrhale ont eu lieu en même temps que la découverte de *Culicoides imicola*. Leur relation n'est d'ailleurs plus à démontrer.

Au Kenya, en plus de *Culicoides imicola*, le virus a aussi été isolé à partir de *Culicoides tororoensis* ou *Culicoides milnei*. Cependant leur rôle n'a pas encore pu être mis réellement en relation avec les épidémies qui s'y sont déroulées.

D'autres espèces africaines ont également été suspectées de jouer un rôle de vecteur pour la fièvre catarrhale, mais pour l'instant cela reste des suppositions. On citera notamment *Culicoides obsoletus* à Chypre, *Culicoides schultzei* au Soudan qui est aussi responsable de la transmission de virus de la maladie épizootique hémorragique.

- **En Asie :**

Des cas de fièvre catarrhale ont été enregistrés au Pakistan, en Inde, au Japon, en Nouvelle Guinée, en Malaisie et en Indonésie. De réelles études sur les vecteurs n'ont pas encore été réalisées dans ces régions. Mais, malgré tout, plusieurs espèces sont suspectées de transmettre les BTV, voire sont même connues pour cela, car elles sont également présentes en Australie. *Culicoides wadai*, *Culicoides fulvus* et *Culicoides oxystoma* peuvent notamment être cités. *Culicoides brevitarsis* a également été retrouvé en grande quantité en Iran, en Inde et au Laos, et il est bien connu pour être presque aussi spécifique que le vecteur majeur africain *Culicoides imicola*.

- **En Australie :**

Le virus de la fièvre catarrhale a été identifié pour la première fois sur ce continent au nord de l'Australie en 1977 à partir d'un mélange de *Culicoides* (BAYLIS, 2002). Depuis, huit sérotypes différents ont été isolés, la plupart à partir du bétail. Deux de ces sérotypes ont été isolés à partir de pools de *Culicoides* : le sérotype 20 a été isolé à partir d'un mélange de 12 espèces différentes de *Culicoides* puis même à partir de *Culicoides brevitarsis* seul. Le sérotype 1 a été isolé à partir de *Culicoides fulvus* et de *Culicoides brevitarsis* (SAINT GEORGES et MULLER, 1984). Puis, il a été également montré que *Culicoides wadai*, *Culicoides actoni*, *Culicoides peregrinus* et *Culicoides oxystoma* étaient aussi capables de supporter la réplication des virus après une infection orale en laboratoire ; et *Culicoides fulvus* et *actoni* sont même parvenus à infecter des moutons indemnes.

Ce sont *Culicoides wadai*, *Culicoides actoni*, *Culicoides fulvus* qui montrent le taux d'infection le plus élevé après un repas sur un mouton infecté, alors que *Culicoides brevitarsis* semble moins susceptible à l'infection. Ces quatre espèces font partie du sous genre *aviritia*, groupe très proche des *Culicoides imicola*. *Culicoides actoni* et *Culicoides fulvus* ont une zone de distribution très limitée où les pluies d'été excèdent les 1000mm, on ne les retrouve pas dans les zones plus sèches. Quant aux autres espèces, elles sont plus tolérantes et on les retrouve dans des zones plus peuplées en espèce ovine. Ce n'est que l'ensemble de cette faune qui permet la circulation actuelle du virus sur le continent Australien.

- **En Amérique :**

Le principal vecteur aux Etats-Unis et dans l'Okanagan Valley au Canada est *Culicoides variipennis*. Le virus a été isolé à partir de cette espèce à de nombreuses reprises. Cependant, *Culicoides variipennis* ne s'épanouit pas en Floride, aux Caraïbes, en Amérique centrale et en Amérique du Sud, où pourtant, le virus de la fièvre catarrhale sévit également. Dans ces régions, ce serait *Culicoides insignis* et *Culicoides pusillus* les vecteurs principaux. GREINER (1985) a notamment isolé le sérotype 2 à partir d'un pool de *Culicoides insignis* en Floride en 1985.

D'autres études ont aussi montré la compétence de certaines autres espèces présentes sur ce continent, même si leur rôle est moindre comparé aux *Culicoides* cités précédemment. Il faut nommer *Culicoides depilipalpis* et *Culicoides venustus* qui sont capables de s'infecter à partir d'un repas sanguin, mais leur taux d'infection reste beaucoup plus mauvais. Ils ne joueraient qu'un rôle très faible dans la situation épidémiologique que connaît l'Amérique actuellement.

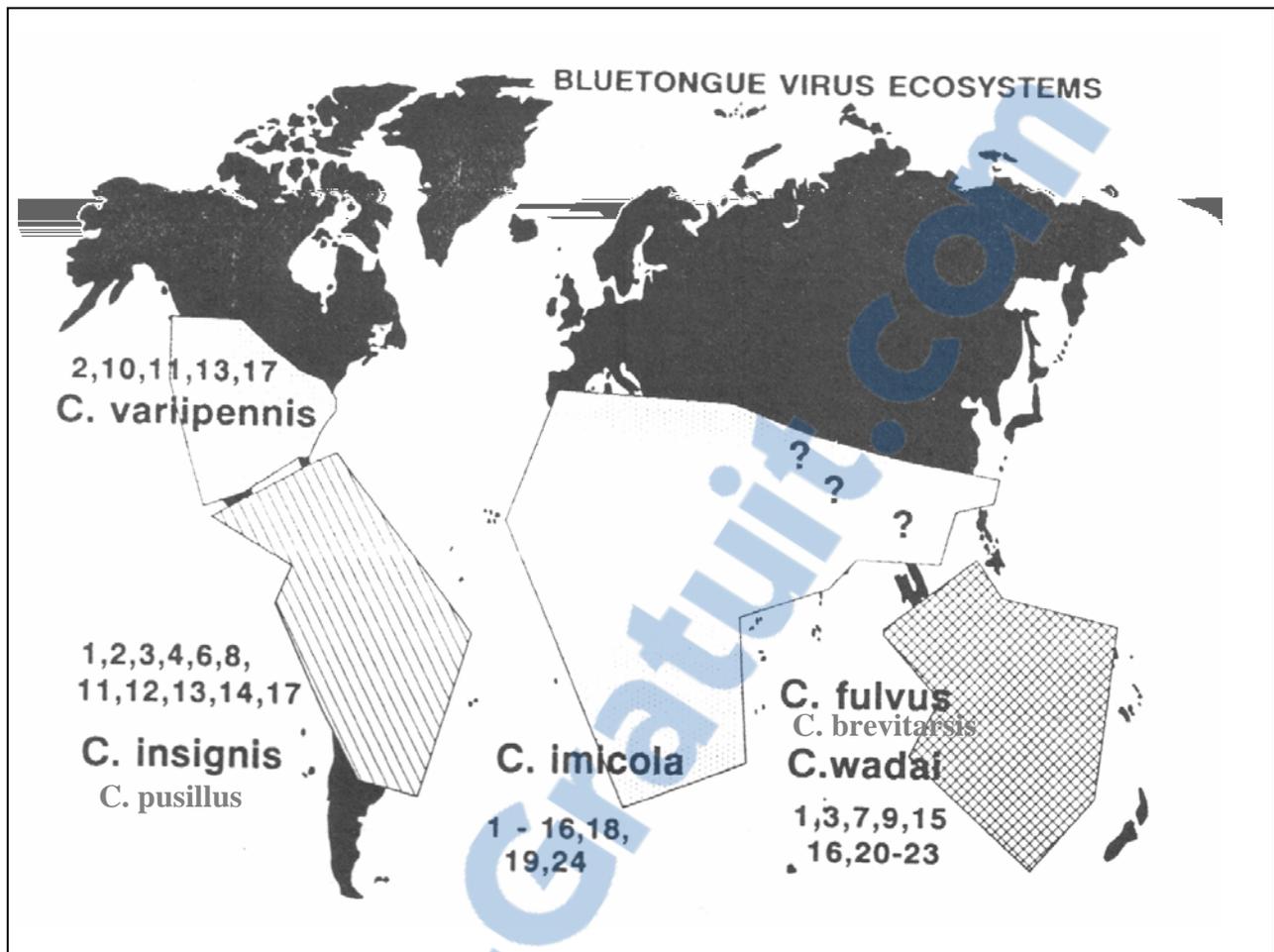
- **En Europe :**

Ce n'est qu'en 1981 que *Culicoides imicola*, le vecteur majeur de la fièvre catarrhale sur le continent africain, a été isolé en Europe sur un territoire turc adjacent aux îles grecques par JENNINGS, BOORMAN et ERGUN (1983). Ensuite, il a été retrouvé à Rhodes, en Espagne, au Portugal, en Italie et même depuis ces trois dernières années en Corse, alors que lors des précédents recensements il n'y avait jamais été identifié (KREMER, LEBERRE et BEAUCOURNU-SAGUEZ, 1971). En fait, on s'est rendu compte que la zone de distribution de *Culicoides imicola* était identique à celle des cas de fièvre catarrhale. Cela confirme l'idée selon laquelle il serait aussi le vecteur principal en Europe.

D'autres espèces suspectées de transmettre la maladie en Australie sont aussi présentes en Europe. On trouve notamment *Culicoides schultzei*, *Culicoides pulicaris* et *Culicoides obsoletus* (à Chypre notamment) chez qui le virus a été également isolé (SAVINI *et al.*, 2003). Mais, ces espèces ne doivent être considérées que comme des vecteurs potentiels, et non comme l'agent responsable de la transmission de la fièvre catarrhale à travers l'Europe (WITTMANN et BAYLIS, 2000).

Il faut aussi noter, pour finir, qu'on retrouve en Europe une espèce très proche de *Culicoides variipennis* : *Culicoides nubeculosus*, qu'il est important de surveiller. On n'en a certes jamais isolé de virus de la fièvre catarrhale jusqu'à présent. Mais ses ressemblances avec son parent américain laisse supposer qu'elle puisse devenir un jour vecteur à son tour (JENNINGS et MELLOR, 1988).

La figure 38 récapitule la répartition des différentes espèces de *Culicoides* dans le monde.



**Figure 38** : Répartition mondiale des différents *Culicoides* vecteurs et des sérotypes viraux associés d'après GIBBS et GREINER (1994) (les points d'interrogation correspondent à des zones encore indéterminées)

### 3.1.5.3 Influence du climat sur les *Culicoides* et leur dispersion :

Si, on étudie leurs déplacements, on s'aperçoit que, dans la plupart des cas, ceux-ci n'excèdent pas 500 mètres autour de leur lieu de vie principal. Ils sont réalisés pour trouver les hôtes qui leur serviront de repas sanguin, pour leur accouplement ou pour s'occuper de leur progéniture. Mais, ceci ne représente qu'un type de déplacement qui reste certes le plus courant : le vol actif. Parfois, les *Culicoides* vont réaliser des trajets beaucoup plus longs, grâce à l'intervention du vent et des courants d'air chaud. Les distances parcourues s'étendent alors de 1 jusqu'à 700 kilomètres, cela pour des vents allant de 10 à 40km/h et des températures situées entre 12°C et 35°C (SELLERS, 1996). Ces longs déplacements permettent aux *Culicoides* de profiter des conditions favorables temporaires de certaines régions, mais c'est également l'une des causes de l'extension des zones d'enzootie de fièvre catarrhale. C'est d'ailleurs l'étude de ces vents et des déplacements alors possible de *Culicoides* qui ont permis d'expliquer différentes apparitions de nouveaux foyers de fièvre catarrhale. C'est notamment le cas en Espagne, où les premiers *Culicoides imicola* collectés au cours des années 1960, semblent avoir été transportés par des vents à partir de l'Afrique du Nord (MELLOR *et al.*, 1985).

Malgré cela, le vent semblerait avoir aussi un effet positif dans le contrôle des zones d'enzootie : il augmenterait la mortalité des adultes et diminuerait leur activité. Au Kenya, elle semble même totalement arrêtée pour *Culicoides imicola* pour des vents de 20km/h, les températures y étant aussi beaucoup plus élevées (MELLOR *et al.*, 2000).

La température est aussi un facteur important. En effet, si celle-ci est abaissée, les durées des différents stades du développement sont allongées et la réplication virale ne peut avoir lieu dans l'insecte. Ainsi, au Colorado, pour *Culicoides imicola*, dans les meilleurs conditions, une nouvelle génération peut apparaître toutes les 2 semaines, alors que sur l'année seules 7 générations différentes sont retrouvées (KETTLE, 1984). De plus, si les températures sont trop basses, l'insecte devient totalement inactif et entre dans une sorte d'« hibernation ». SELLERS (1996) a ainsi montré dans son étude qu'on retrouvait des *Culicoides* vecteur de la fièvre catarrhale uniquement dans des zones où la température oscillait entre 10°C et 35°C, la zone de température optimale pour *Culicoides imicola* se situant entre 13°C et 35°C avec un idéal à 24°C (WARD et THURMOND, 1995). A noter qu'il reste bien présent dans la région et ne meurt pas. Ce facteur est d'autant plus important qu'au cours de ce dernier siècle la planète a subi un réchauffement global de 0,5°C (JONES et WIGLEY, 1990), et les prévisions envisagent même une augmentation de presque 2°C pour le siècle à venir. Il faut aussi rappeler que les températures élevées augmentent la durée de vie des adultes : WITTMANN (2000) a montré dans une de ses études que la durée de vie de *Culicoides variipennis* était trois fois plus longue à 30°C qu'à 15°C.

Mais, les températures trop élevées ont également un effet néfaste pour le développement : des chaleurs excessives pendant la vie larvaire entraînent notamment une baisse de la fécondité de la femelle adulte et la durée de vie des adultes est aussi fortement diminuée.

Enfin, il faut signaler que dans certaines conditions extrêmes, des températures trop élevées peuvent rendre des insectes vecteurs du virus de la fièvre catarrhale, alors que dans des conditions normales ceux-ci en auraient été incapables. Sous des températures de 33-35°C, *Culicoides nubeculosus* se retrouve, dans plus de 10% des cas, capable de véhiculer un BTV (WITTMANN, 2000).

Voyons à présent un dernier paramètre qui joue un rôle de manière indirecte essentiellement : les précipitations. La plus grande concentration de *Culicoides imicola* est souvent retrouvée dans les trois mois suivant celui avec la plus grande pluviosité, et les concentrations annuelles les plus importantes correspondaient aux années les plus humides (WITTMANN et BAYLIS, 2000). Mais ceci est à nuancer, car si les précipitations deviennent trop importantes, l'activité de certains *Culicoides* peut être totalement stoppée et les larves, qui se retrouvent dans des milieux trop humides, finissent par mourir (MELLOR *et al.*, 2000).

Ainsi WITTMANN et BAYLIS (2000) ont mis au point une formule qui permet d'estimer la capacité d'un *Culicoides* présent dans une zone à transmettre le virus à un vertébré (Figure 39). Mais tous les paramètres qu'elle nécessite, étant trop variables d'un moment à l'autre, elle ne peut être utilisée comme un point de repère fiable. Elle sert juste pour certaines prédictions et dans la surveillance du développement des zones d'enzootie.

$$C = ma^2Vp^n / (-\ln p)$$

C = nombre de nouvelles infections par jour à partir d'un foyer d'infection qui correspond à la capacité vectorielle de l'insecte  
m = nombre de vecteurs sur nombre d'hôtes  
a = nombre de repas sanguins pris par un vecteur sur l'hôte par jour  
V = compétence du vecteur, obtenue à partir de données de laboratoire  
P = taux journalier de survie des insectes  
n = durée de la période d'incubation en jours

**Figure 39** : Formule permettant de donner la capacité vectorielle d'un *Culicoides* (WITTMANN et BAYLIS, 2000)

En conclusion, selon les régions, les concentrations mensuelles en insectes vecteurs ne seront pas les mêmes d'un endroit à l'autre à cause de la variabilité des paramètres que nous venons d'énumérer. Le pic d'activité des *Culicoides* n'aura alors bien évidemment pas lieu au cours des même périodes en zones tropicales que sous des latitudes telles que les nôtres.

En ce qui concerne *Culicoides imicola*, MELLOR, repris par HENDRIKX. (2003), a pu ainsi modéliser les zones qui semblaient les plus favorables à la survie hivernale de cet insecte. Pour simplifier, il a pris un indicateur de température basé sur les moyennes mensuelles des températures maximales quotidiennes. Quand cette moyenne est supérieure à  $+12,5^{\circ}\text{C}$  toute l'année, la zone peut être considérée comme favorable à la survie de *Culicoides imicola*. Si cette moyenne n'est supérieure à  $12,5^{\circ}\text{C}$  que pendant 7 mois, on retrouve quand même, selon les saisons, des *Culicoides*. Sur cette carte dessinée par MELLOR (Figure 40), il y a presque une dizaine d'année, on constate que la Corse (et même le territoire continental français) présente déjà des zones favorables à la survie du vecteur.

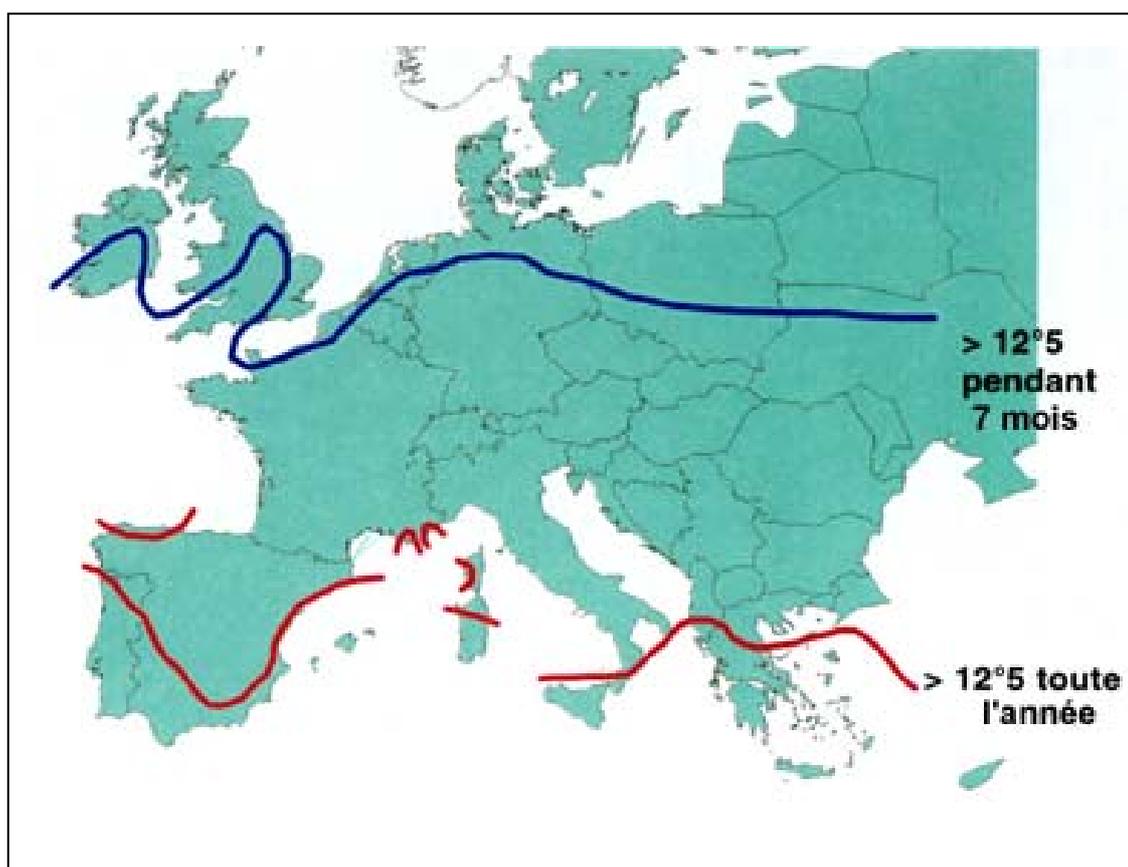


Figure 40 : Modélisation des zones les plus favorable à la survie hivernale des *Culicoides* en Europe (HENDRIKX, 2003)

Le tableau 20 récapitule les effets des différents facteurs climatiques pouvant influencer les *Culicoides*.

Tableau 20 : Effets climatiques sur les *Culicoides* et leur rôle de vecteur de virus de la fièvre catarrhale

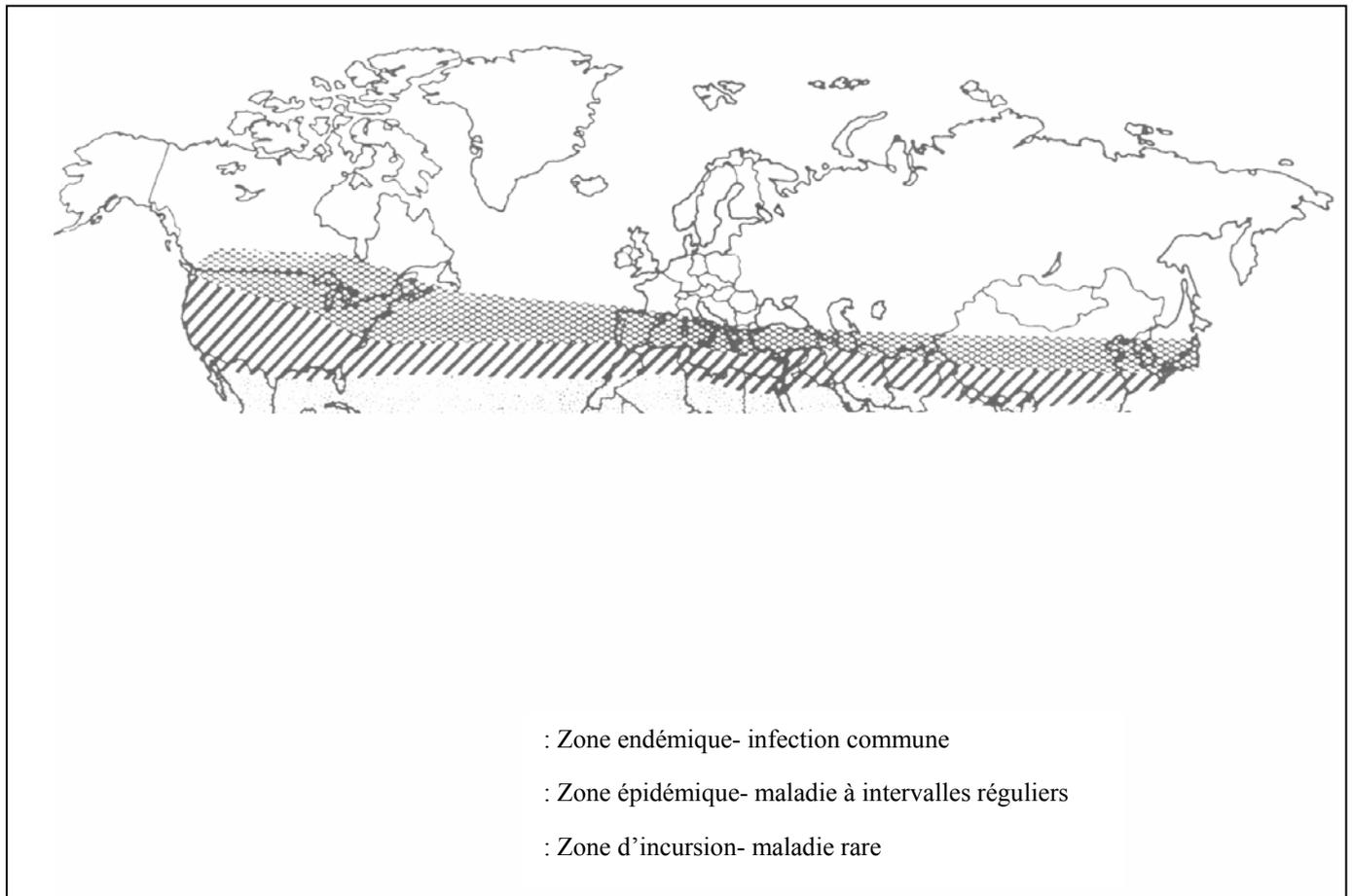
<u>Paramètre</u>	<u>Effets en faveur des transmissions virales</u>	<u>Effets en défaveur des transmissions virales</u>
<b>Les vents</b>	-Transport des insectes sur de longues distances	-Inhibe leur activité -Augmente la mortalité des adultes
<b>Fortes chaleurs</b>	-Raccourcissement de l'espace entre 2 générations -Augmente le nombre de repas sanguins -Peut rendre certains insectes non vecteurs porteurs d'un BTV	-Baisse la fécondité des femelles adultes -Diminue de la durée de vie des adultes si excessives
<b>Froid</b>		-Inactivité -Absence de réplication virale -Diminution de la durée de vie des adultes
<b>Précipitations</b>	-Nécessaire pour un développement correct -Augmente la quantité d'insectes présents sur une année	-Détruit certaines larves si trop importantes

### 3.2/ Fièvre catarrhale en Corse

#### **3.2.1 Situation épidémiologique mondiale actuelle**

Décrite pour la première fois en Afrique du Sud à la fin du 19ème siècle, la fièvre catarrhale du mouton s'est étendue à partir de 1940 en Afrique centrale, pour atteindre ensuite le Bassin méditerranéen et l'Asie. A l'heure actuelle, elle est également signalée en Amérique du Nord et du Sud, en Australie et en Nouvelle-Zélande.

GIBBS et GREINER (1994) ont dessiné une carte du monde qui permet une bonne visualisation de la répartition mondiale de la fièvre catarrhale, même si elle reste très schématique (Figure 41). Elle divise le monde en quatre parties : une zone totalement sans risque, une zone où peuvent avoir lieu des incursions de virus selon les conditions climatiques, une zone épidémique où la maladie sévit à intervalles réguliers et zone d'endémie où la maladie reste toujours présente.



**Figure 41** : Représentation schématique de la distribution mondiale du virus de la Fièvre catarrhale et des cas cliniques (GIBBS et GREINER, 1994)

### **3.2.2 Evolution de la fièvre catarrhale dans le Bassin méditerranéen au cours de ces dernières années :**

La fièvre catarrhale est apparue pour la première fois en Europe en 1943 à Chypre où elle a été responsable de nombreuses épidémies qui ont été beaucoup documentées. Elle a ensuite été observée lors d'une épizootie en Espagne et au Portugal en 1956 et 1957, pour laquelle le virus semblerait avoir été véhiculé par des insectes transportés par le vent provenant d'Afrique du Nord (GIBBS et GREINER, 1994).

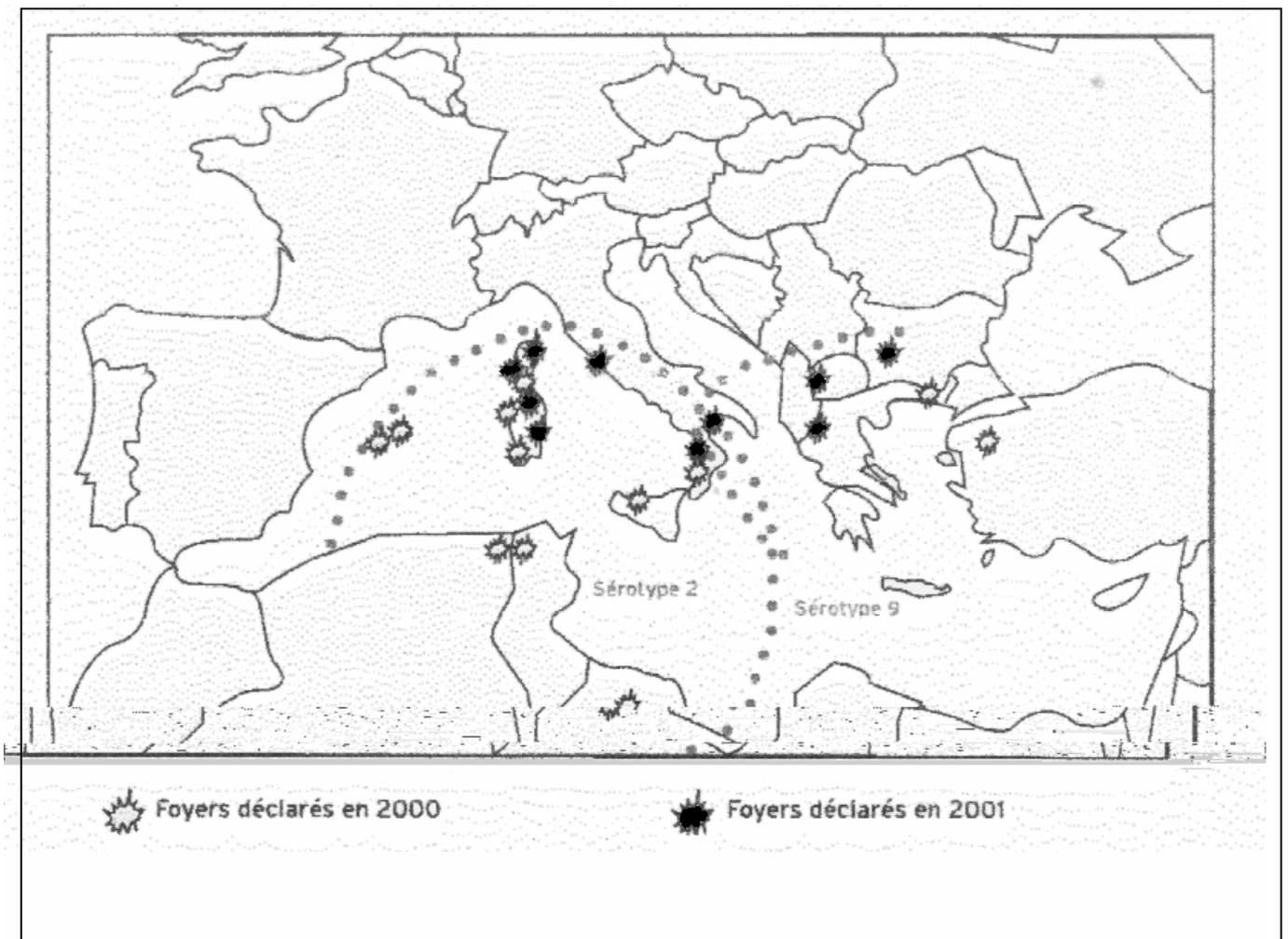
La France fut également concernée de 1974 à 1977 puis en 1979 par des épizooties qui sévirent sur l'île de la Réunion (ZIENTARA *et al.*, 2002).

L'épizootie suivante apparut 23 ans plus tard sur l'île grecque de Lesbos, située dans la mer Egée. A l'automne 1979, plus de 500 moutons cliniquement atteints par la fièvre catarrhale avaient été recensés. Le sérotype 4 fut alors identifié. Mais dans les années qui suivirent, aucun cas de la maladie ne fut répertorié. Il semblerait que cette-fois ci le virus provenait de Turquie où le même sérotype y avait été identifié 2 ans auparavant (PAPADOPOULOS, 1996).

Cette épizootie fut suivie d'une période d'une vingtaine d'années au cours de laquelle l'Europe resta indemne de fièvre catarrhale. Ce n'est qu'au dernier trimestre de 1998 que la maladie fit de nouveau son apparition dans les îles grecques du sud-est de la Mer Egée. Puis, à la faveur de l'arrivée et de la multiplication du vecteur dans des régions où il n'existait

pas auparavant, la situation sanitaire du Bassin méditerranéen s'est fortement dégradée. Des cas furent enregistrés en 1999 en Grèce, en Bulgarie, en Tunisie et en Turquie. Puis en 2000, l'infection continua en Tunisie, en Algérie, puis en Italie (Sardaigne, Sicile et Calabre), en Espagne (îles Baléares), à nouveau en Grèce et finalement en France comme nous allons le voir plus en détail dans la partie qui suivra (Figure 42).

En septembre 2001, le sérotype 9 fut identifié dans la région de Calabre en Italie et infecta ensuite de nouvelles provinces : Crotona, Catanzaro, Cosenza, puis Lazio. Mais le développement le plus important de la maladie eut lieu en Europe du Sud-Est. Le sérotype 9 infecta alors le nord-ouest de la Grèce, l'ouest de la Bulgarie, la Turquie, le Kosovo, la Macédoine, le Monténégro et la Serbie (BAYLIS et MELLOR, 2001).



**Figure 42** : Situation sanitaire du pourtour méditerranéen au regard de la fièvre catarrhale du mouton en 2000 et 2001 (GREGORY, ZIENTARA et HENDRIKX, 2002)

### 3.2.3 Deux épizooties successives en Corse :

#### 3.2.3.1 Premiers cas en 2000 :

- **Evolution de l'épizootie :**

Le 30 août 2000, le ministre de l'agriculture et de la pêche en fonction décide l'interdiction d'importation des animaux en provenance de la Sardaigne, où les premiers cas de fièvre catarrhale du mouton avaient été confirmés (Fièvre catarrhale du mouton en Corse : Bilan et constat sur l'épizootie 2000, 2001).

A partir du 7 septembre 2000, le CIRAD-EMVT participe aux différentes opérations de surveillance mises en place par la Direction Générale de l'Alimentation, en relation avec les Directions des Services Vétérinaires des deux départements de Corse, afin de surveiller l'évolution de la maladie du fait de la proximité de l'île de Corse avec les foyers confirmés de Sardaigne. Ce dispositif visait à identifier les espèces de *Culicoides* présentes sur l'île, à effectuer des contrôles cliniques réguliers des cheptels ovins, à identifier les zones potentiellement à risque et à réaliser des dépistages sérologiques sur un échantillon de la population de ruminants présents dans ces zones. Au même moment, le ministère met en place une campagne de sensibilisation dans la presse et auprès des éleveurs.

C'est le 18 octobre qu'a lieu la première suspicion clinique dans la commune d'Arbellena, dans le Sartonais, non loin de Figari, où 6 animaux présentaient des signes cliniques pouvant évoquer la maladie. S'en suit, une semaine plus tard, des mortalités et de nouvelles suspicions. Le 20 octobre, le ministère ordonne une interdiction de sortie de l'île des animaux des espèces réceptives.

Ce n'est que le 27 octobre que l'AFSSA confirme pour la première fois la présence de virus de la fièvre catarrhale du mouton de sérotype 2 par une méthode de PCR. La maladie cantonnée dans un premier temps dans la région de Figari (extrême sud de l'île) a rapidement été mise en évidence plus au nord en passant de chaque côté de l'île, toujours à des altitudes inférieures à 900 mètres.

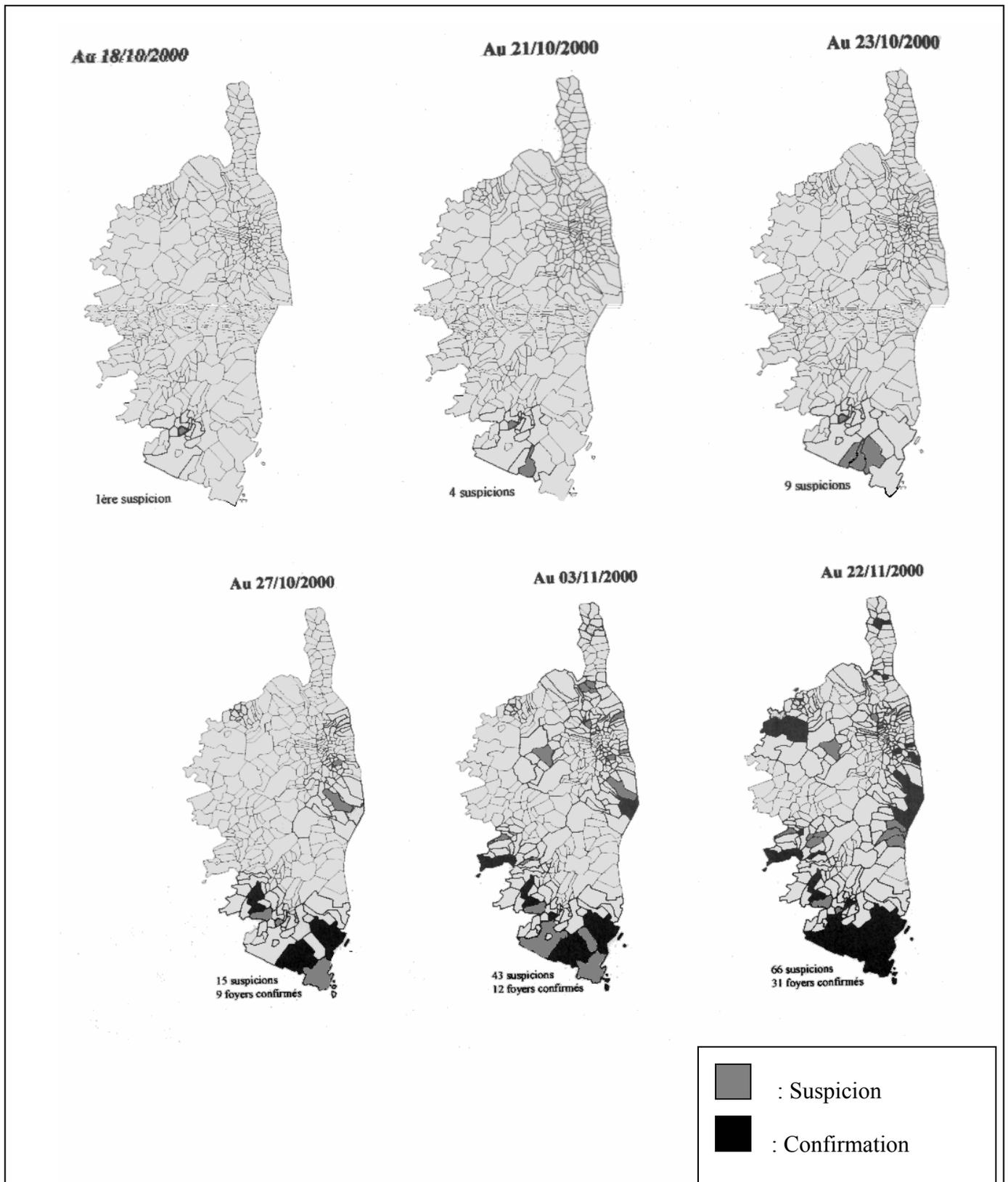
L'évolution de la maladie sur le territoire corse est indiquée dans le tableau 21 et visualisée sur la figure 43. Mais, en définitive, la progression de la maladie et les 7000 premiers résultats de la surveillance sérologique (Figures 44 et 45 et tableau 22) traduisent bien une contamination massive de la Corse, avec une circulation virale plus importante dans le sud de l'île, ce qui est en relation avec les forts taux de morbidité (14,89%) et de mortalité (13,05%) observés dans ces régions (ZIENTARA *et al.*, 2000)

**Tableau 21** : Evolution des suspicions de fièvre catarrhale en Corse du Sud du 21 octobre 2000 au 29 novembre 2000 (ZIENTARA *et al.*, 2000)

Date	Nombre de troupeaux suspects	Nombre total de mouton dans ces troupeaux	Nombre de moutons malades	Nombre de moutons morts ou abattus	Nombre de troupeau où la FC est confirmée par analyse de laboratoire
21 au 24 octobre	21		55	66	0
Au 26 octobre	21	3714	414	344	0
Au 27 octobre	21	4180	502	471	0
Au 28 octobre	22	4680	516	485	9
Au 30 octobre	21	4574	537	503	10
Au 31 octobre	22	4602	574	535	11
Au 1 <sup>er</sup> novembre	26	4642	653	618	11
Au 2 novembre	29	5227	825	733	11
Au 6 novembre	29	5170	1053	911	11
Au 7 novembre	29	5078	1191	1027	11
Au 8 novembre	29	5227	1302	1210	11
Au 9 novembre	29	5227	1379	1285	11
Au 13 novembre	37	5883	1686	1557	17
Au 17 novembre	39	5968	1738	1609	18
Au 21 novembre	40	5996	1845	1720	23
Au 24 novembre	40	5996	1955	1845	25
Au 29 novembre	40	5996	2015	1906	25

**Tableau 22** : Résultats d'analyses sérologiques en Corse au 29 novembre 2000 (ZIENTARA *et al.*, 2000)

	Bovins				Ovins			
	Cheptels testés	Animaux testés	Positifs	Pourcentage	Cheptels testés	Animaux testés	Positifs	Pourcentage
<b>Haute Corse</b>	31	1216	296	24%	18	2095	337	16,1%
<b>Corse du Sud</b>	23	1021	405	40%	21	2609	982	38%



**Figure 43** : Situation des suspicions et des confirmations de foyers de fièvre catarrhale en Corse du 18 octobre au 22 novembre 2000 (ZIENTARA *et al.*, 2000)

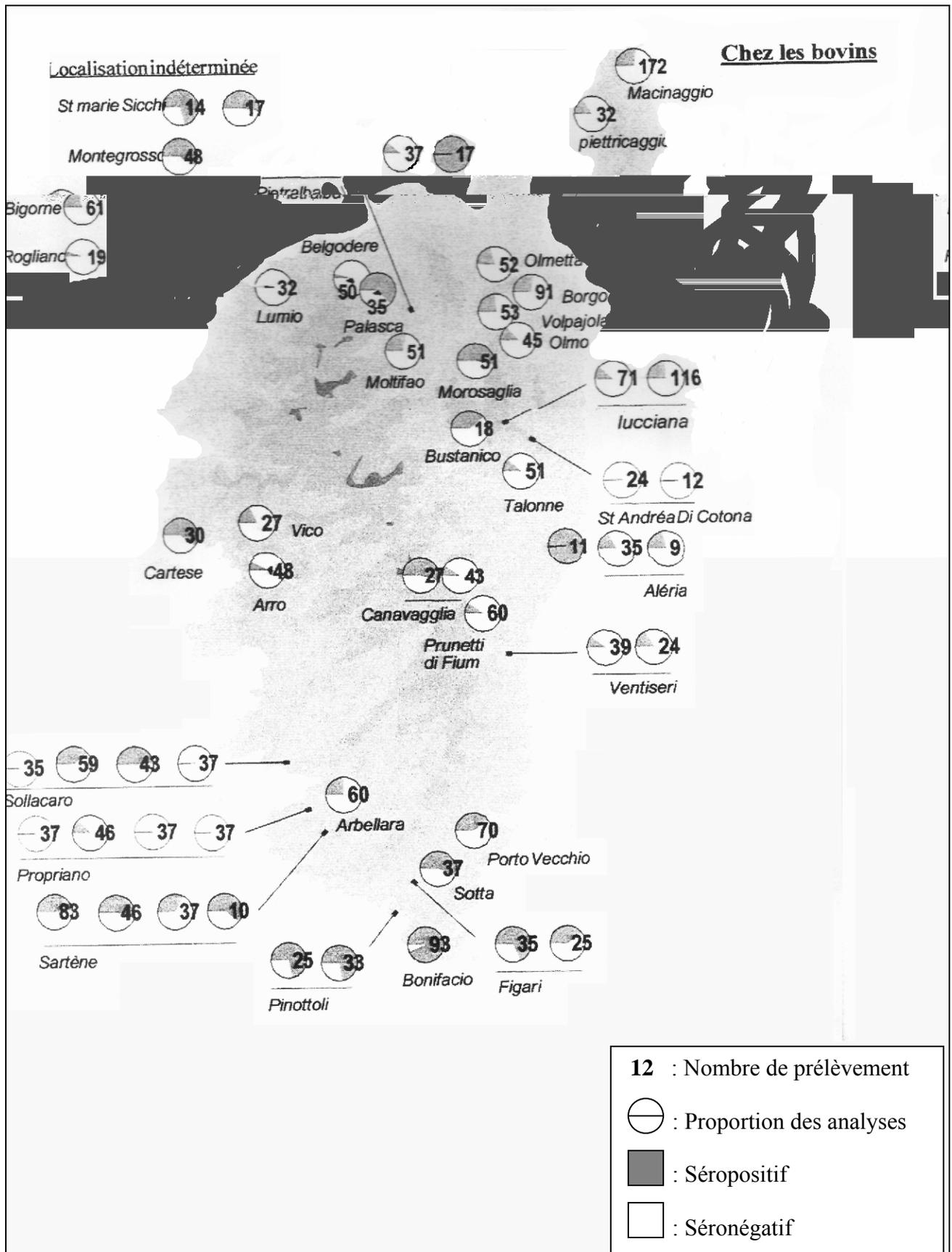
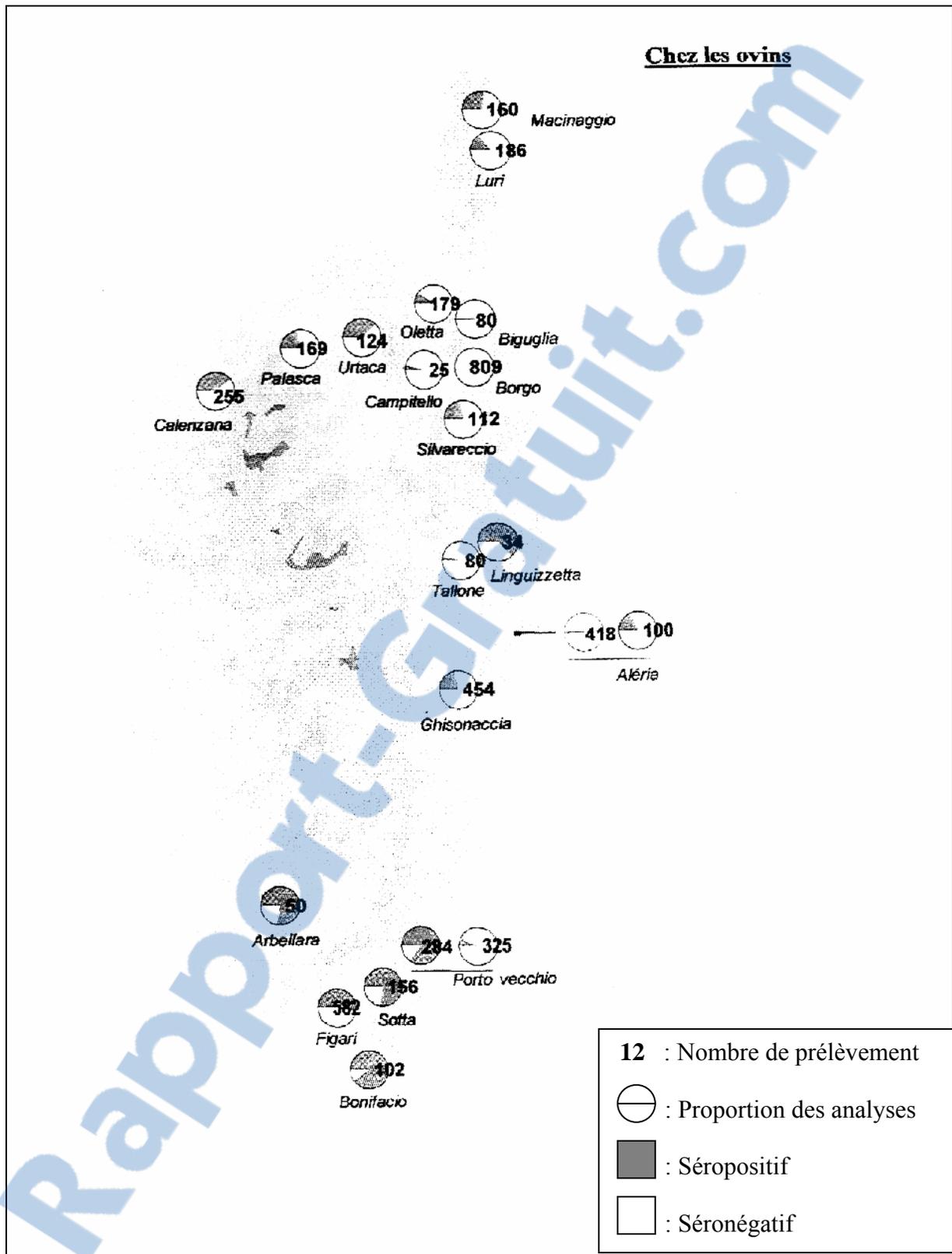


Figure 44 : Résultats sérologiques de la fièvre catarrhale en Corse au 1<sup>er</sup> décembre 2000 chez les bovins (ZIENTARA *et al.*, 2000)



**Figure 45** : Résultats sérologiques de la fièvre catarrhale en Corse au 1<sup>er</sup> décembre 2000 chez les ovins (ZIENTARA *et al.*, 2000)

- **Vecteurs présents au cours de cette épizootie :**

Les différents pièges mis en place pour la surveillance ont révélé l'arrivée en 2000 en Corse de *Culicoides imicola*, alors que lors du dernier recensement, il n'avait pas été détecté

(KREMER, LEBERRE et BEAUCORNU-SAGUEZ, 1971). Or, cette espèce est considérée comme le principal vecteur de la fièvre catarrhale en zone tropicale. La figure 46 montre d'ailleurs sa multiplication et sa diffusion au sud de la Corse début octobre, quelques jours avant l'apparition des premiers foyers. Bien évidemment, ils avaient été également capturés en grande quantité, dans le mois qui précédait, en Sardaigne.

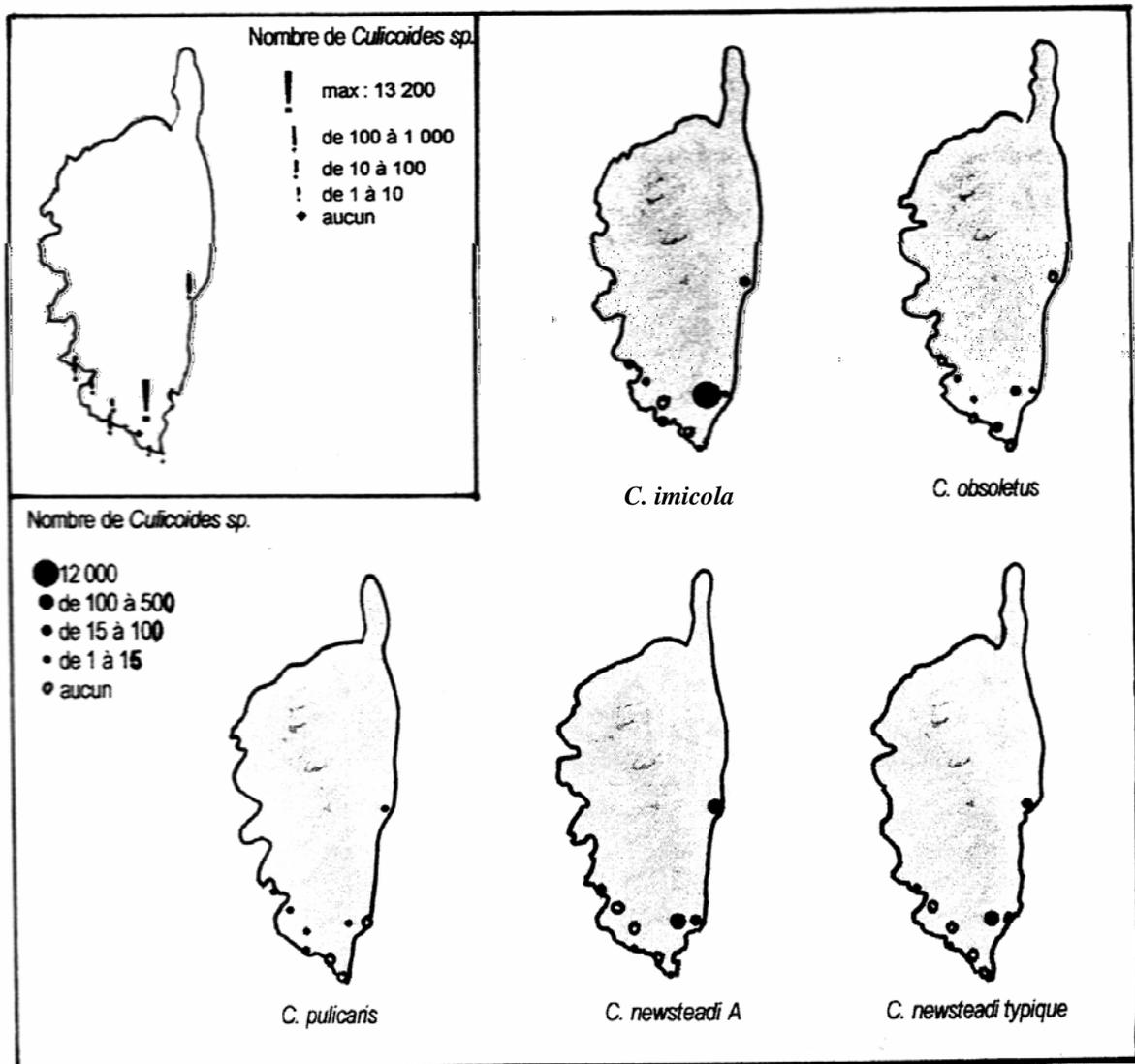


Figure 46 : Représentation des captures de *Culicoides* réalisées début octobre : nombre d'insectes récoltés en quelques heures de piégeage (ZIENTARA *et al.*, 2000)

Le choix des sites de piégeage a été orienté selon des critères jugés favorables à la présence du vecteur, tels que la proximité avec la Sardaigne, la répartition des élevages, l'orientation des vents dominants et les facteurs écologiques compatibles, comme le relief et l'altitude, le climat et la végétation. Mais toutefois, il faut préciser que le nombre de pièges lumineux réduits et l'ampleur des opérations de tri et d'identification ont limité le nombre de relevés.

Au total, 13769 individus ont été capturés, appartenant à au moins 21 espèces ou sous espèces de *Culicoides*. La présence de *Culicoides imicola* a été confirmée sur presque toute la zone prospectée, le premier ayant été identifié en octobre 2000 (BAYLIS, MELLOR,

WITTMANN et ROGERS, 2001). Les densités les plus abondantes ont été relevées dans les vallées humides et occupées par l'élevage tant ovin que bovin.

Trois autres espèces potentiellement vectrices du virus de la fièvre catarrhale ont été capturées : *Culicoides pulicaris*, *Culicoides obsoletus* et *Culicoides newsteadi*. Les deux premières se sont révélées peu abondantes, mais le faible nombre de pièges et les conditions climatiques peu favorables lors de la prospection obligent à la prudence pour l'interprétation. La troisième a été capturée essentiellement dans les zones littorales. Son abondance semble liée à la densité du cheptel (ZIENTARA *et al.*, 2000).

### 3.2.3.2 Nouvelle épizootie en 2001 :

- **Evolution de l'épizootie :**

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, depuis mai-juin 2001, la fièvre catarrhale du mouton s'est étendue du sud de la botte italienne vers le nord, la Sicile et la Sardaigne étant toujours infectées. Deux sérotypes différents y sévissent : le 2 en Sicile, Sardaigne et dans le sud du pays, et le 9 dans les provinces de Basilicata, de Calabre, de Lazio et de la Toscane (Figure 47).

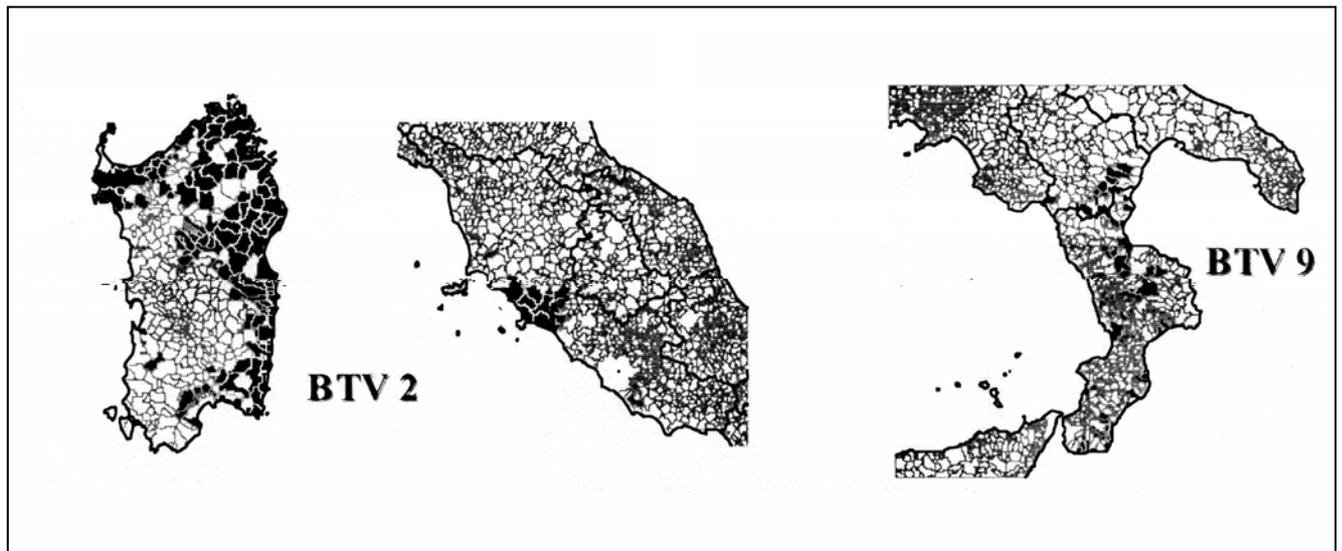


Figure 47 : Zones infectées de fièvre catarrhale du mouton en Sardaigne, Calabre, Basilicate, Lazio et Toscane (Italie) au 28 septembre 2001 (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001e)

Pour la Corse, après un hiver et un printemps 2001 sans cas répertorié de fièvre catarrhale, la maladie est réapparue début juillet, avec un premier isolement viral le 16 juillet 2001. Les premiers cas ont touché le Sartenais (Corse du Sud), puis progressivement les autres zones, avec un développement marqué de la maladie dans le sud de la plaine orientale (Haute Corse) (Figure 48).

Le 7 août, les services vétérinaires de Corse font état de 25 foyers concernant 3712 animaux avec 256 animaux malades (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001c). Puis le 13 septembre 2001, on comptait 237 suspicions (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001d), pour le 28 septembre dénombrer 363 suspicions dont 234 foyers confirmés hébergeant 53279 ovins dont 6683 malades (ZIENTARA *et al.* 2001).

Au final, 335 foyers de fièvre catarrhale ont été identifiés en Corse au cours de l'épizootie de 2001, le dernier foyer confirmé datant du 2 novembre (Figure 49). Le taux de morbidité aura atteint 17,23% et le taux de mortalité, quant à lui, a oscillé autour de 13%.

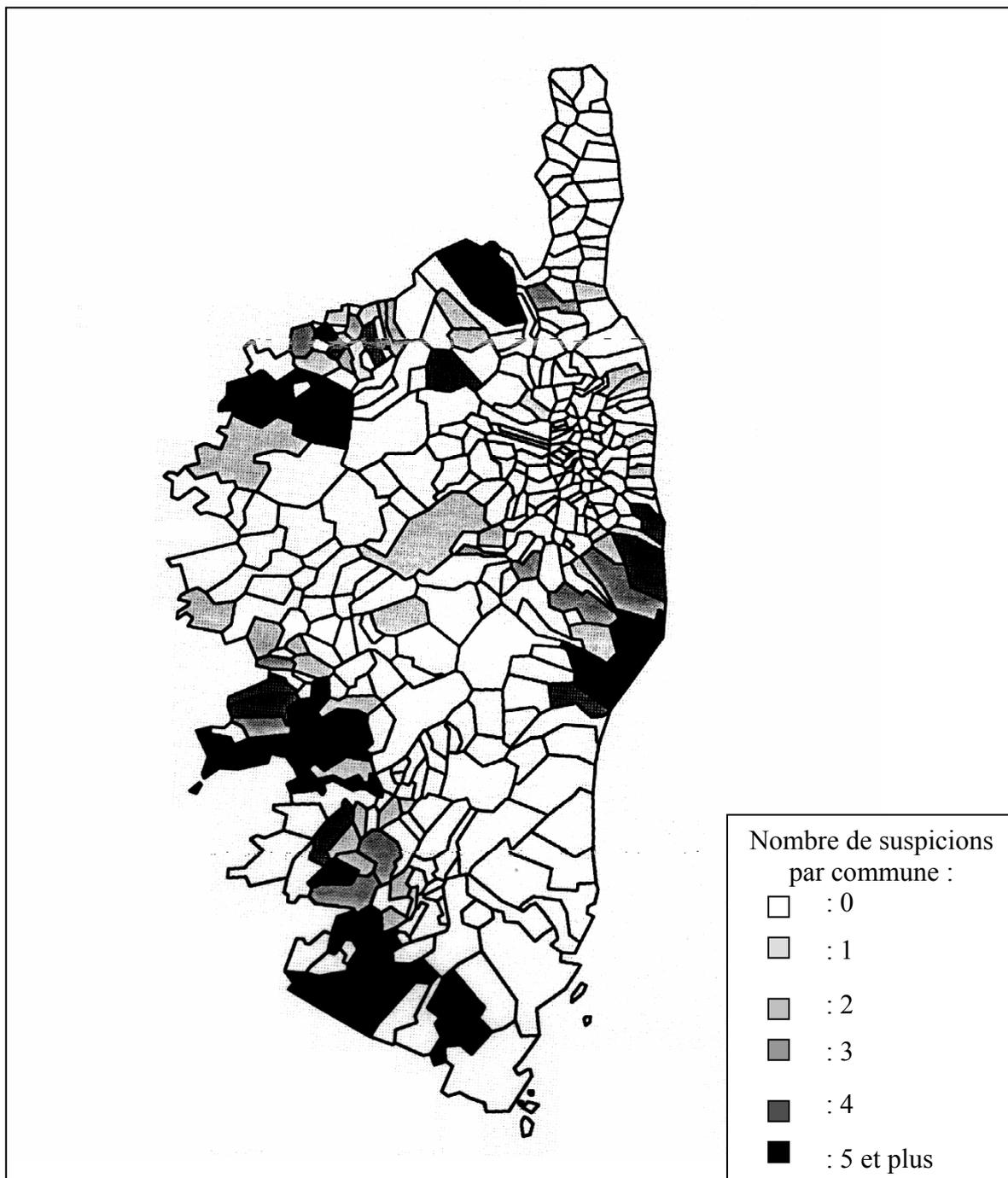


Figure 48 : Répartition des cheptels suspects de fièvre catarrhale au 3 décembre 2001  
(Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001f)

Pour la totalité des isolats, l'appartenance au sérotype 2 a été confirmée. Des comparaisons avec les isolats de 2000 ont permis d'affirmer qu'ils étaient tous les deux identiques. De plus, les séquences étudiées diffèrent du reste de la séquence de la souche vaccinale utilisée après la première épizootie, ce qui permet la distinction entre les souches sauvages et les souches d'origine vaccinale.

Ainsi, la seconde épizootie de fièvre catarrhale en Corse, a atteint presque dix fois plus de cheptels ovins qu'en 2000, assomant alors l'élevage corse avec presque 50% des cheptels ovins de l'île concernés et plus de 8% du cheptel détruit (GREGORY, ZIENTARA et HENDRIKX, 2002).

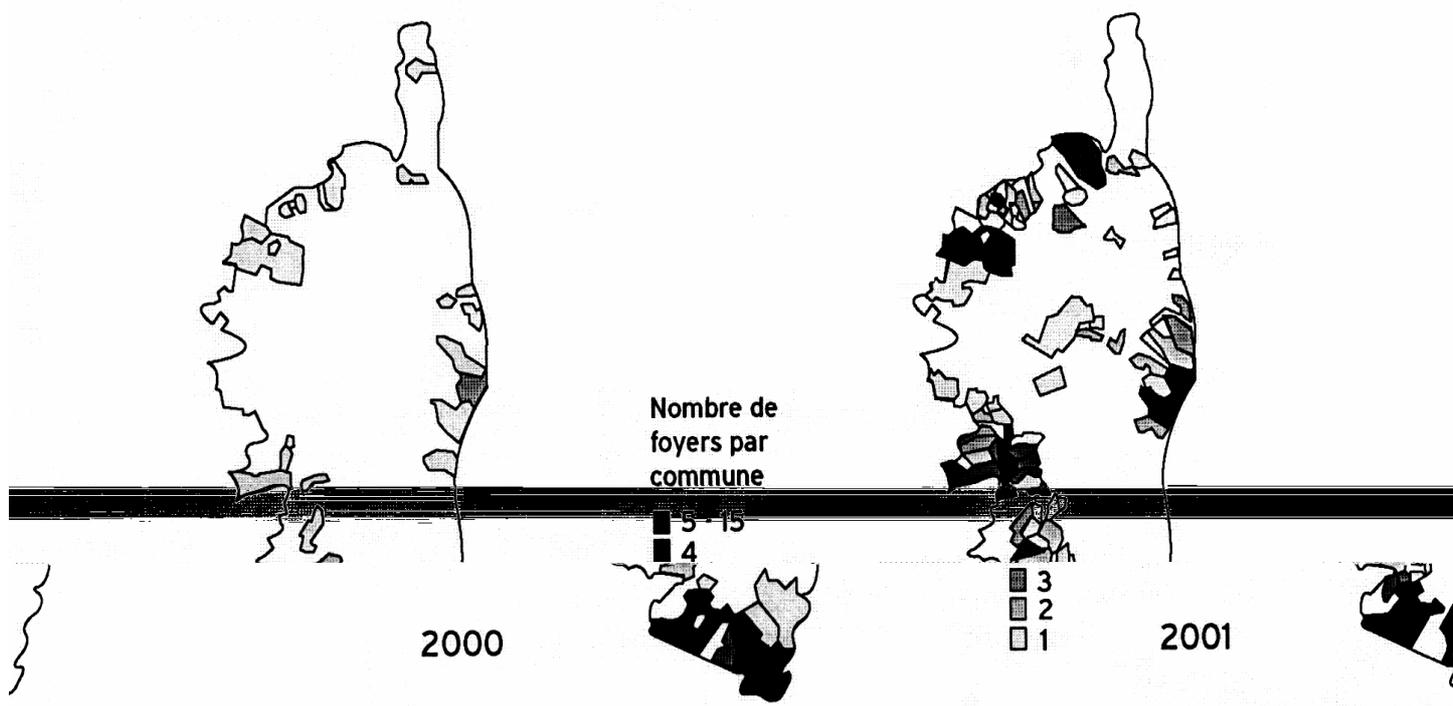


Figure 49 : Représentation de l'évolution de l'épizootie sur 2000-2001 : Cartographie des zones touchées en Corse (GREGORY, ZIENTARA et HENDRIKX, 2002)

•

incidences élevées de la maladie dès le début juillet, les populations d'insectes étant sans doute déjà à leur deuxième ou troisième génération.

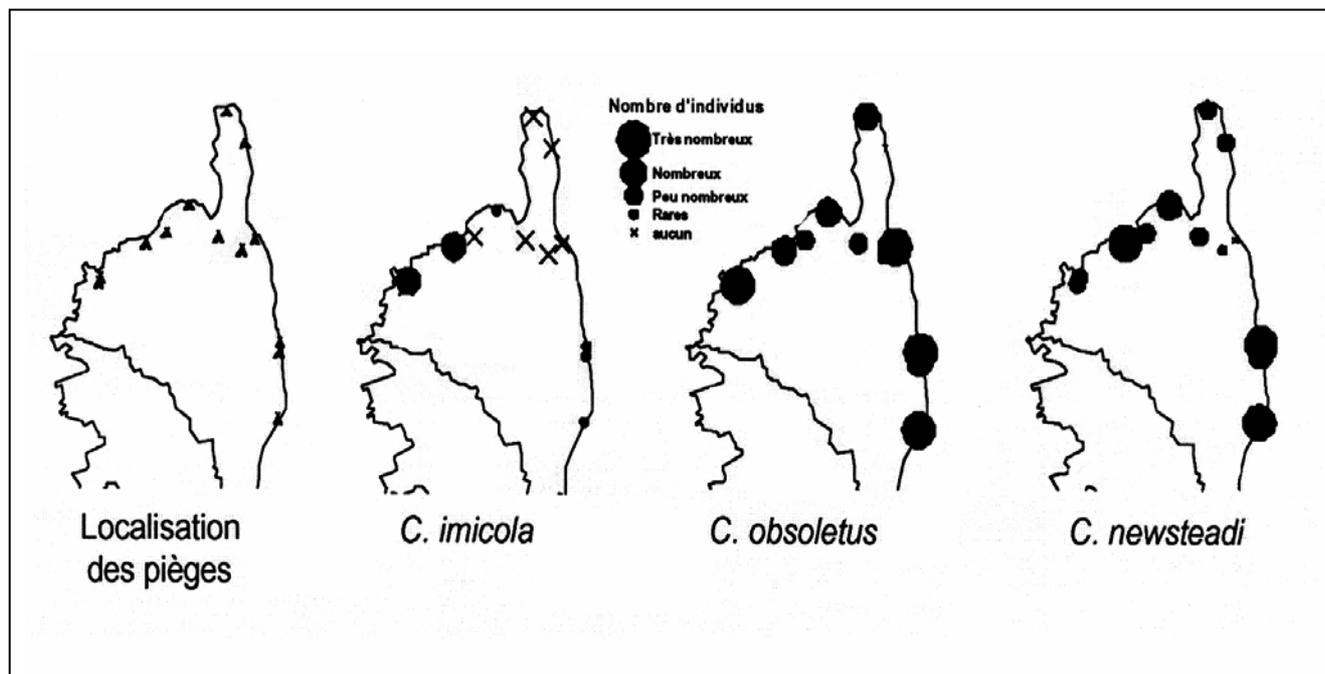


Figure 50 : Localisation des pièges posés en Corse en juin et répartition des espèces (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001b)

### 3.2.4 Evolution pour les années à venir

Comme nous l'avons vu pour les épizooties de 2000 et 2001, le virus de la fièvre catarrhale a progressé vers le nord en Europe causant ainsi l'une des plus importantes épizooties connues. Les raisons de cette extension sont complexes mais liées à la récente extension de son vecteur principal : *Culicoides imicola*, à l'apparition de certaines nouvelles espèces vectrices, ainsi qu'à l'apparente capacité du virus à persister durant l'hiver en l'absence de vecteur (MELLOR et WITTMANN, 2002).

Une équipe de chercheurs italiens est parvenue à identifier à cinq reprises le sérotype 2 à partir de *Culicoides pulicaris* capturés en Sicile, alors que le virus n'y avait jamais été retrouvé malgré d'importantes suspicions (CARACAPPA *et al.*, 2003). Ils supposaient bien l'intervention d'un autre vecteur car, lors des captures de *Culicoides*, *Culicoides imicola* n'y avait été retrouvé qu'en faible quantité, même au moment le plus fort de l'épizootie. Ce vecteur représente un nouveau risque pour la France continentale car il y a déjà été capturé à plusieurs reprises (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001f). Elle semble même s'étendre dans presque toute la région paléarctique de l'Europe.

De plus, le virus semble être capable de persister pendant l'hiver, même en l'absence de vecteur (NEVILL, 1971). Un BTV peut survivre jusqu'à douze mois en l'absence d'adultes vecteurs, avec aucune virémie, maladie ou séroconversion chez les hôtes (TAKAMATSU *et al.*, 2003). La survie du virus en sautant une saison est appelée « overwintering », mais le mécanisme n'a pas encore été entièrement élucidé. On sait seulement que les BTV peuvent persister dans des cellules T  $\gamma\delta$  de moutons infectés *in vitro*, le virus serait donc capable d'utiliser ce mécanisme lors d'une phase de virémie pour persister. D'autant que la piqûre du *Culicoides* induit une réaction inflammatoire de la peau qui s'accompagne du recrutement d'un grand nombre de cellules T  $\gamma\delta$  activées (TAKAMATSU *et al.*, 2003).

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, les bovins et autres ruminants sauvages jouent un rôle de réservoir viral, la virémie lors d'une infection pouvant persister pendant plus de 4 mois. Ils interviendront donc aussi dans la persistance hivernale des virus.

Ainsi la fièvre catarrhale reste une maladie importante à surveiller dans les années à venir. Même si aucun cas n'a été enregistré en Corse depuis ces 2 dernières années suite aux mesures qui ont été prises dès 2000 (vaccination des ovins et surveillance sérologique des bovins), nous ne sommes pas à l'abri d'une résurgence de cas pour les années à venir, aussi bien en Corse que sur le continent, même si aucun *Culicoides imicola* n'y a été retrouvé lors des captures de 2001 (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001a) et par la suite (HENDRICKX, communication personnelle), et que la plupart des sérologies sont restées négatives (Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton, 2001c). Tout le monde s'accorde d'ailleurs à l'envisager aussi bien à cause du réchauffement de la planète, qu'à l'apparition de nouveau vecteur, ou bien qu'à la détection de nouveau sérotype (comme le 9 et le 16 qui sont actuellement suspectés de circuler dans le sud de l'Italie).

## CONCLUSION

La fièvre catarrhale du mouton représente un risque sanitaire majeur chez les ovins. Elle a provoqué la perte de près de 8% du cheptel Corse en 2001. Certes, depuis, grâce aux mesures d'urgence qui ont été prises et aux conditions climatiques qui ont suivi, aucun nouveau foyer n'a été détecté sur le territoire français depuis cette dernière épizootie.

Les travaux présentés ont pu souligner l'importance de chacune des méthodes de diagnostic pour la surveillance épidémiologique:

-Les méthodes sérologiques, avec notamment l'E.L.I.S.A. compétitive, sont utilisées pour l'épidémiosurveillance à partir de prélèvements sanguins de bovins, espèce servant actuellement de sentinelle.

-Les isolements du virus par inoculation sur œufs embryonnés et par culture cellulaire restent aujourd'hui les seules méthodes permettant de conclure avec certitude à une infection par un BTV.

-Enfin la RT-PCR semble être la méthode la plus sensible permettant de détecter des particules virales jusqu'à 160 jours après l'inoculation. Elle peut même être réalisée sur des tissus congelés, elle permet aussi de différencier les souches sauvages des souches vaccinales, mais, malheureusement, elle ne suffit pas, seule, à conclure à une infection par un BTV.

Il faut aussi souligner l'importance du réseau de pièges à *Culicoides* qui a été mis en place dans le sud de la France sous la tutelle du CIRAD. Les espèces vectrices étant connues pour la plupart, eux seuls peuvent nous informer aux fils des saisons du niveau de risque de réapparition de fièvre catarrhale du mouton sur le territoire français.

Ainsi, grâce à la réaction rapide des autorités françaises suite aux épizooties de 2000 et 2001, aucun cas n'a été diagnostiqué en France ou en Corse en 2002 et 2003. Mais nous ne sommes pas à l'abri d'une résurgence prochaine de la maladie, le sérotype 2 circulant toujours en Corse. De plus, il est possible que d'autres sérotypes parviennent jusqu'à nos côtes étant donné que le sérotype 9 circule aussi en Italie, et qu'on suspecte la présence des sérotypes 4 et 16 en Sicile. Nos mesures vaccinales se révéleraient alors totalement inefficaces car elles procurent de protection que contre le sérotype 2.

Enfin, la France pourrait également être touchée par la fièvre catarrhale dans ses Territoires d'Outre Mer, notamment sur l'île de la Réunion, où des prélèvements sur des animaux suspects ont fourni des résultats positifs en RT-PCR, mais jusqu'alors on n'est pas parvenu à isoler le virus, de nombreuses manipulations étant encore en cours de réalisation.

## **Annexe 1 : Méthode de l'AFSSA pour l'inoculation sur œufs embryonnés**

- **Matériel nécessaire :**

- une hotte à flux laminaire
- un réfrigérateur de +1°C à +8°C et un congélateur à -20°C et -80°C
- un incubateur à 35°C
- une source de lumière froide KLQ 150 Watt, Bioblock Scientific
- une fraise à graver avec pointe à graver 0.8mm, référence 108, DREMEL
- un broyeur
- des chambres à broyer stériles
- une centrifugeuse pour microtubes
- des seringues stériles de 1ml en plastique avec aiguilles
- des filtres de 0,22µm
- des microtubules stériles de 1,5ml, Eppendorf
- des pipettes de 2ml stériles
- une micro pipette de 1ml et de 200µl
- des cônes à filtres de 1ml et de 200µl
- des boîtes de pétri stériles de 15cm
- des scalpels stériles
- des pots à prélèvement stériles
- du ruban adhésif
- un marqueur à pointe

- **Produits chimiques et réactifs nécessaires sont:**

- du PBS stérile auquel on ajoute 0,6% d'un mélange d'antibiotique (Pénicilline à 100UI/ml et Streptomycine à 100 µg/ml)
- de l'huile minérale
- du milieu minimum essentiel + 0,6% d'antibiotique (Pénicilline et Streptomycine)
- des œufs blancs embryonnés de poule de 10 à 11 jours provenant de l'INRA

- **Procédure :**

- Mirer des œufs à l'aide de la source de lumière froide en maintenant la poche d'air de l'œuf en haut. Pour chaque échantillon à inoculer, prévoir 3 ou 4 œufs.
- Repérer un vaisseau sanguin assez important, de préférence sans ramification, et dessiner un triangle d'environ 6mm de long avec un marqueur le long du vaisseau.
- Graver la coquille en suivant les traits en prenant soin de ne pas percer la membrane de l'œuf.
- Retirer le morceau de coquille à l'aide d'un scalpel
- Sous la hotte à flux laminaire, diluer chaque échantillon à tester au 1/10<sup>ème</sup> dans du PBS stérile. Prélever la solution avec une seringue de 1ml ayant une aiguille.
- Marquer sur les œufs la date et l'identification de l'échantillon à tester.
- Déposer une goutte d'huile minérale sur la fenêtre de l'œuf et le maintenir contre le faisceau de lumière de façon à bien mettre en évidence le vaisseau sanguin.
- Très délicatement, faire une inoculation intraveineuse de 0,1 à 0,2ml de l'échantillon dilué dans le sens de la circulation sanguine.
- Recouvrir la fenêtre d'ouverture avec un morceau de ruban adhésif.

- Mettre les œufs à incuber, placer un récipient d'eau au fond de l'incubateur pour l'humidifier.
- Mirer les œufs chaque jour après inoculation et jeter les œufs morts en moins de 24 heures.
- Conserver les œufs morts 2 à 5 jours après inoculation. Au 5<sup>ème</sup> jour, les œufs restant vivant sont tués par congélation 45 minutes à -20°C.
- Placer les œufs sous la hotte à flux laminaire et briser la coquille au niveau de la poche d'air à l'aide d'une pince stérile pour mettre en évidence la membrane. Avec une autre pince stérile, et en prenant garde de ne pas percer la membrane vitelline, percer la membrane sous la coquille, prélever l'embryon et le placer dans une boîte de Pétri stérile. Jeter le reste de l'œuf.
- Observer les éventuels signes cliniques de la fièvre catarrhale : hémorragie générale, malformation, atrophies.
- Etêter l'embryon à l'aide d'un scalpel stérile et le placer dans une chambre à broyer stérile. Ajouter 30ml de milieu essentiel supplémenté en antibiotiques.
- Placer la chambre sur le broyeur et broyer pendant 15 secondes.
- Verser la suspension homogène dans un pot à prélèvement stérile.
- Prélever 1,5ml de la suspension dans un tube Eppendorf et centrifuger à 4000G pendant 8 minutes à +4°C.
- Prélever le surnageant et le conserver dans un tube Eppendorf au réfrigérateur pour une utilisation rapide ou au congélateur à -80°C.
- Le surnageant pourra soit être inoculé à des cellules (BHK-21 ou Vero), soit à des œufs embryonnés, soit servir à une extraction d'ADN.

## **Annexe 2 : Méthode de l'AFSSA pour l'isolement par culture cellulaire**

- **Matériel nécessaire :**

- des hottes à flux laminaire, une à cellules, une à virus
- un réfrigérateur, un congélateur à -20°C et -80°C
- un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>
- un microscope
- des boîtes de cultures de différentes tailles : 150 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup>, des plaques de 24 puits
- des filtres de 0,22µm
- des pipettes de 10, 5 et 2ml stériles
- une pro-pipette
- des micro-pipettes de 1ml et de 200µl
- des pinces en plastique stériles
- un marqueur à pointe fine

- **Réactifs nécessaires :**

- du Milieu minimum essentiel (MEM)
- des antibiotiques : Pénicilline à 100UI/ml et Streptomycine à 100 µg/ml
- du sérum de veau fœtal (SVF)
- du Pyruvate
- des acides aminés non essentiels
- des cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney = cellules immortelles de reins de bébé hamster)

- **Procédure :**

- \*Trypsination :

- Toutes les manipulations doivent être effectuées sous la hotte à flux laminaire et stérilement.
- Utiliser une boîte de culture monocouche de BHK-21 par échantillon et une boîte supplémentaire par passage de contrôle négatif.
- Observer au microscope une boîte de culture de 150 cm<sup>2</sup> (T150) à confluence.
- Sous la hotte, préparer extemporanément le volume nécessaire de milieu de culture 1 (10%de SVF, 1% de pyruvate, 1% d'acides aminés non-essentiels, le reste de MEM avec 0,6% d'antibiotiques).
- Sous la hotte, vider le milieu de la boîte à trypsiner dans un récipient.
- Ajouter 2 ml de trypsine à température ambiante, la répartir sur les parois de la boîte afin d'éliminer le sérum (inhibiteur de trypsine). Répéter l'opération trois fois assez rapidement.
- Laisser 1 à 2ml de trypsine, agiter ; le tapis de cellules doit se détacher tout seul (si besoin mettre une minute à l'étuve).
- Ajouter 20ml du milieu 1, bien agiter avec la pipette afin de dissocier les cellules.
- Répartir la suspension cellulaire dans les boîtes de culture nécessaires préalablement identifiées au marqueur : 1ml par T25, 2,5ml par T150, 1,5ml pour un plaque de 24 puits.
- Compléter avec le milieu à 75ml pour les T150, à 10ml pour les T25, à 36ml pour les plaques 24 puits (à répartir à l'aide d'une pipette de 10ml, 1,5ml par cupule, assez rapidement pour que la solution reste homogène).

- Mettre les boîtes et les plaques à l'étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.
- Désinfecter la hotte, chlorer le récipient contenant les milieux à jeter.

\*Préparation des inoculums :

- Sous la hotte à virus, placer l'organe dans une boîte de pétri, prélever un fragment d'organe à l'aide d'un scalpel et d'une pince stérile et y ajouter dans un pot à prélèvement 9 volumes de MEM additionné de 0,6% d'antibiotiques. Procéder de même pour les embryons de poules.
- Broyer l'ensemble et placer le tube à centrifuger.
- Centrifuger la suspension pendant 8 minutes à 4000G.
- Prélever le surnageant pour l'inoculum
- Diluer chaque échantillon sanguin au dixième avant l'inoculation

\*Inoculation :

- Prendre des boîtes de culture de 24 heures (monocouches à environ 80%).
- Sous la hotte à virus, vider le milieu de culture des boîtes à inoculer.
- Rincer avec du MEM additionné de 0,6% d'antibiotiques (MEM Ab)
- Ajouter l'inoculum, soit 0,5ml pour une T25, 5ml pour une T150, 150µl par puits ; pour le témoin négatif, ajouter du MEM Ab et procéder de la même façon.
- Bien répartir la suspension sur tout la boîte puis mettre à incuber à 37°C pendant une heure.
- Pour les organes et embryons de poule, jeter l'inoculum et rincer avec du MEM Ab.
- Ajouter le volume nécessaire de milieu 2 (5% de SVF, 1% de pyruvate, 1% d'acides aminés non essentiels et le reste de MEM Ab) comme pour la trypsination, 1ml seulement par puits pour les plaques 24 puits.
- Mettre à incuber à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>.
- Observer chaque jour les monocouches pendant une semaine à la recherche d'effets cytopathogènes. En l'absence d'effet cytopathogène après 8 jours, effectuer des passages successifs, après congélation des boîtes, en procédant de la même façon qu'avec le premier. Les surnageants des boîtes des passages précédents servant d'inoculums. Les rinçages après incubation ne sont pas nécessaires.

### **Annexe 3 : Méthode de l'AFSSA pour le sérotypage par neutralisation :**

- **Matériel nécessaire :**

- des microplaques 96 puits
- une pipette multicanaux
- des réservoirs
- des cônes
- une pipette P200
- des tubes à hémolyse
- un vortex
- un congélateur à -80°C et à -20°C
- un bain-marie
- des hottes à flux laminaires (une où l'on ne manipule que des virus et l'autre où l'on ne manipule que les cellules non contaminées)
- une étuve à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, humide
- des boîtes à cellules 150cm<sup>2</sup>

- **Produits nécessaires :**

- du milieu minimum essentiel complétement à d'un mélange d'antibiotique (Pénicilline à 100UI/ml et Streptomycine à 100 µg/ml) (MEMAb)
- du milieu de culture pour cellules : MEM, 10% de sérum de veau fœtal, 2% de pyruvate, 2% d'acides aminés non essentiels
- des cellules BHK-21

- **Procédure :**

\*Dilution du virus et sa répartition :

- Sous la hotte à virus, préparer 7 tubes à hémolyse avec 0,9ml de MEMAb.
- Prélever 100µl d'une solution de virus et réaliser des dilutions de 10 en 10, de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup> dans les tubes préparés ci-dessus.
- Déposer 50µl de virus dilué dans les quatre cupules de la microplaque comme sur la figure 43 :

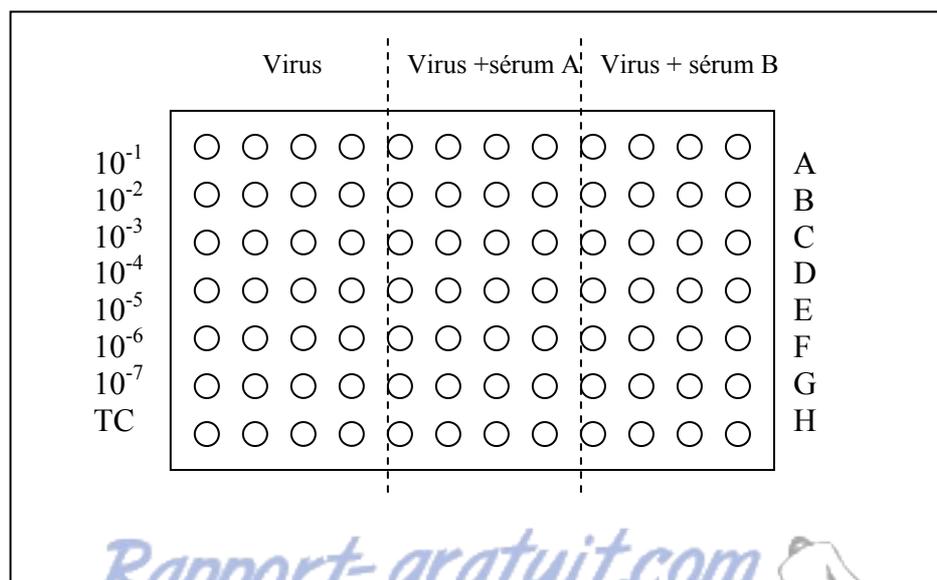


Figure 51 : Représentation de la microplaque lors du dépôt des virus

- Dans la rangée H (TC = témoin cellules), déposer 100µl de MEM.
- Dans les 4 premières colonnes (virus), sauf dans la ligne H, ajouter 50µl de MEM.

\*Préparation des antisérums :

- Préparer 2ml d'antisérum dilué à 4 unités neutralisantes (une unité neutralisante correspond au titre de l'antisérum spécifique, dernière dilution qui neutralise 100 doses de virus).
- Inactiver les sérums à 56°C pendant 30 minutes.
- Déposer 50µl du ou des antisérums spécifiques dans les colonnes correspondantes (virus + sérum).
- Laisser une heure à 37°C

\*Préparation des cellules BHK-21 :

Pendant l'incubation, trypsiner des cellules sous la hotte à cellules :

- Prendre une boîte de cellules 150cm<sup>2</sup> à confluence et vider le milieu.
- Ajouter quelques ml de trypsine préalablement réchauffée à 37°C au bain-marie, remuer lentement et renverser (ne pas laisser trop longtemps afin de ne pas rejeter les cellules qui seraient déjà décollées).
- Ajouter 2 à 3 ml de trypsine, mettre si besoin à l'étuve à 37°C, remuer la boîte, le tapis doit se décoller facilement.
- Reprendre les cellules dans 20ml de MEM, en prélever 2ml et les ajouter aux 15ml de milieu de culture pour cellules préparé (c'est la quantité pour remplir un trou de la microplaque).

\*Le dépôt des cellules :

- Après l'heure d'incubation, ajouter 100µl de cellules à l'aide d'une pipette multicanaux.
- Mettre alors les plaques dans l'étuve à CO<sub>2</sub>.

• **Résultats et interprétation :**

Les plaques peuvent être colorées et lues environ après 8 jours : on surveille la destruction ou non des cellules. Le sérum qui a permis la neutralisation des 100 doses de virus, nous fournit le sérotype et la concentration du virus.

## **Annexe 4 : Méthode de l'OIE pour l'ELISA compétitive :**

-En premier lieu, les plaques à 96 puits sont placées à 4°C pendant une nuit ou à 37°C pendant 1 heure avec 50 à 100 µl d'un antigène de culture cellulaire ou d'un antigène viral VP7 exprimé en levure dilué dans le tampon carbonate pH 9,6 0,05 M.

-Les plaques sont ensuite lavées 5 fois avec le PBST (tampon phosphate salin 0,01 M contenant 0,05% ou 0,1% Tween 20, pH 7,2).

-Puis, 50µl des sérums à tester sont ajoutés, en double, pour une seule dilution, soit le 1/5, soit le 1/10 en PBST contenant 3% de sérum albumine (BSA).

-Immédiatement après, chacun des puits reçoit 50µl d'une dilution préétablie de l'anticorps monoclonal dilué en PBST contenant 3% de BSA. Les puits témoins contenant l'anticorps monoclonal reçoivent le tampon diluant à la place de l'échantillon à tester.

-Les plaques sont incubées pendant une heure à 37°C ou 3 heures à 25°C, en agitation continue.

-Après l'étape de lavage décrite précédemment, les puits sont remplis avec 100µl d'une dilution appropriée d'une immunoglobuline G anti-souris, conjuguée à la peroxydase de raifort dans le PBST contenant 2% de sérum normal de bovin.

-A l'issue de l'incubation pendant 1 heure à 37°C, la solution ayant le conjugué est retirée et les plaques sont lavées 5 fois en utilisant du PBS. Les puits sont alors remplis avec 100µl de solution « substrat » contenant de l'ABTS (2,2-Azino-bis [acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique]) 1,0 mM-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4mM dans le tampon citrate de sodium 50mM, pH 4,0, et les plaques sont agitées à 25°C pendant 30 minutes (d'autres substrats peuvent être utilisés et la réaction peut se prolonger sous agitation pendant la durée nécessaire à l'apparition de la coloration).

-La réaction colorée est arrêtée par addition d'une solution d'arrêt comme l'azide de sodium.

-Après avoir arrêté la réaction et réalisé le blanc du lecteur de plaques ELISA sur les puits portant le substrat, les valeurs d'absorbance sont alors mesurées à 414nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et dérivent des valeurs d'absorbance moyenne pour chacun des échantillons à l'aide de la formule suivante :

$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 - \frac{\text{Moyenne de l'absorbance de l'échantillon testée} \times 100}{\text{Moyenne de l'absorbance de l'anticorps monoclonal témoin}}$
---

-Les valeurs d'inhibition en pourcentage supérieures à 50% sont considérées comme positives. L'inhibition située entre 40 et 50% est considérée comme suspecte. Des échantillons très positifs ou faiblement positifs et un sérum négatif devront être inclus sur chaque plaque. Le positif faible devra donner 60 à 80 % d'inhibition et le sérum négatif devra donner moins de 40% d'inhibition.

## **Annexe 5 : Méthode de l'AFSSA pour la PCR:**

### ❖ Extraction des ARN à l'Isocyanate de guanidium :

#### **Produits et matériels :**

- un réfrigérateur
- une hotte à extraction de produits chimiques
- une chambre froide
- du TRIZOL-LS (Life-Technologies)
- du Chloroforme
- de l'isopropranolol
- de l'éthanol à 75%
- de l'eau DEPC
- des microtubes eppendorf 1,5ml RNase free
- un témoin positif
- un vortex, une centrifugeuse réfrigérée, un dessiccateur

#### **• Méthode :**

- Sous la hotte, dans un laboratoire spécialisé dans ces manipulations, déposer 0,25ml de sang ou de surnageant de culture infectée dans un tube eppendorf RNase free.
- Ajouter un témoin positif de l'extraction
- Ajouter 0,75ml de TRIZOL-LS, puis vortexer 30 secondes et laisser 5 minutes sur la paillasse
- Ajouter 0,2ml de chloroforme, mélanger par retournement et laisser 5 à 10 minutes sur la paillasse.
- Centrifuger 15 minutes, à 4°C, à 12000g
- Transférer la phase aqueuse dans un tube RNase free et ajouter 0,5ml d'isopropranol
- Mélanger par retournement et laisser 15 minutes sur la paillasse
- Centrifuger 10 minutes, à 4°C, à 12000g
- Enlever alors le surnageant et ajouter 1ml d'éthanol à 75%
- Vortexer puis centrifuger 8 minutes, à 4°C, à 7500g
- Enlever le surnageant, laisser les tubes sécher 3 minutes sur papier absorbant, puis assécher complètement le culot pendant 5 minutes dans le dessiccateur.
- Reprendre le culot avec 10 µl d'eau DEPC et laisser sur la paillasse pendant au moins 15 minutes avant utilisation, ou congeler les ARN à -20°C.

### ❖ Transcription inverse et l'amplification génique *in vitro* (RT-PCR) :

#### **• Produits et matériels :**

- Amorces F7+ et F7- (20pM) (Tableau 22) stockées au congélateur (parfois il arrive aussi qu'on utilise les amorces S10+ et S10-)

Tableau 23 : Séquences et localisations des amorces S7+ et S7-

Amorces	Localisation (5'-3')	Séquences
S7+	1-20	GTAAAAAATCTATAGAGATG
S7-	1156-1138	GTAAGTGTAATCTAAGAGA

- un kit QIAGEN « one-step RT-PCR »
- du méthyle mercure (0,02M)
- du mercaptoéthanol
- de l'ARN BTV+ témoin PCR
- de la RNase inhibiteur (Amersham)
- des microtubes eppendorf 0,2 et 1,5ml « RNase free »
- un réfrigérateur, un congélateur -20°C, une centrifugeuse réfrigérée et un vortex
- un thermocycleur avec le programme BTVF7 (programme spécifique au virus de la BT développé dans le tableau 23)

Programme pour fragment S7+ et S7-	Programme pour fragment S10+ et S10-
30 minutes à 48°C	30 minutes à 50°C
15 minutes à 94°C	15 minutes à 94°C
1 minute à 94°C	1 minute à 94°C
1 minute à 45°C	2 minutes à 72°C
1 minute 30 à 72°C	
10 minutes à 72°C	10 minutes à 72°C

Tableau 24 : Programmes d'amplification utilisés avec les deux couples d'amorces S7 et S10

• **Méthode :**

- Numéroter les microtubes 0,2ml et les mettre dans la glace.
- Préparer dans la glace le mix pour la RT-PCR (Qiagen) : 50µl au final par tube : vortexer et centrifuger les réactifs avant utilisation, puis préparer le mélange réactionnel suivant (pour une réaction) : H<sub>2</sub>O 31µl, tampon 5x 10µl, dNTP 2µl (400µM de chaque dNTP), amorce S7- 1,5µl (600nm), amorce S7+ 1,5µl (600nm) et 2µl d'enzyme.
- Puis dénaturer les ARN : pour cela prendre 1,25µl d'ARN issu de l'échantillon et le déposer dans un tube eppendorf RNase free, prendre aussi 1,25µl d'ARN BTV+ témoin PCR, et le déposer dans un tube RNase free, puis ajouter dans chacun 1,25µl d'hydroxyde méthyl Mercure, laisser alors 5 à 10 minutes sur la paillasse, puis ajouter au dernier moment 5µl de B mercaptoéthanol
- Mettre alors 3µl de la solution d'ARN dénaturés et les mettre dans les tubes RT-PCR (toujours dans la glace)
- Mettre les tubes dans le thermocycleur quand le thermocycleur a atteint la température de 48°C et lancer le programme spécifique de l'amorce.

❖ L'électrophorèse sur gel d'agarose :

• **Produits et matériels :**

- un appareil pour électrophorèse horizontale (gel immergé) avec peigne
- un générateur
- un transilluminateur et un système photo polaroid
- de l'agarose en poudre
- du TAE 50X
- des marqueurs de poids moléculaire
- un tampon de charge
- du bromure d'éthidium 10mg/ml
- une solution de dépôt

• **Méthode :**

-Préparer le TAE X en mélangeant 20ml de TAE 50X et 980 ml d'eau.

-Préparer un gel d'agarose à la concentration de 2% en ajoutant 20ml de TAE 1X à 0,4g d'agarose en poudre (pour un petit gel de 10 cm par 6 cm), ou 70ml avec 1,4g d'agarose (pour un grand gel de 10 cm par 10 cm). L'agarose est dissous par chauffage dans le four à micro-ondes. Laisser refroidir le gel vers 60°C avant de le couler,.

-Pendant ce temps, sceller le support de gel et placer le peigne.

-Puis couler le gel dans le support et le laisser durcir à +4°C avant l'utilisation.

Le gel durci. Le gel immergé peu à +4°C avant l'utilisation

Utilisation, retirer le peigne, e puits du gel avec 3µl de à tester e préparer r de

Insérer le bac au générateur (e rancement des polarités), régler le voltage.

-Arrêter la migration

-Placer alors le gel avec précaution dans une solution de bromure d'éthidium (25µl de solution mère dans 100µl d'eau bidistillée) pendant 10 minutes.

## BIBLIOGRAPHIE

ACHA PN et SZYFRES P. (1989) Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux, *Office international des Epizooties*, 2<sup>ème</sup> édition, 1989

AFSHAR A. (1994) Bluetongue: laboratory diagnosis, *Comparative Immunology and Microbiology Of Infectious Diseases*, **17**, 221-242

AFSHAR A, ANDERSON J, EATON BT et GUSTAFSON GA. (1991) Serological diagnosis of bluetongue by blocking or competitive ELISA by four laboratories, *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation*, **3**, 255-257

AFSHAR A, DULAC GC, DUBUC C, PEARSON JE et GUSTAFSON GA. (1993) Competitive ELISA for serodiagnosis of Bluetongue: a refinement, *Journal Of Veterinary Investigations*, **5**, 614-616

AFSHAR A, DULAC GC et RIVA J. (1992) Comparison of blocking dot ELISA and competitive ELISA, using a monoclonal antibody for detection of bluetongue virus antibodies in cattle, *Veterinary Microbiology*, **31**, 33-39

AFSHAR A, EATON BT, WRIGHT PF, PEARSON JE, ANDERSON J, JEGGO M et TROTTER HC. (1992) Competitive ELISA for serodiagnosis of bluetongue: evaluation of group-specific monoclonal antibodies and expressed VP7 antigen, *Journal Of Veterinary Investigations*, **4**, 231-237

AFSHAR A, TROTTER HC, DULAC GC et REDDINGTON JJ. (1993) Evaluation of a commercial competitive ELISA test kit for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus, *Journal Of Veterinary Investigations*, **5**, 336-340

AKITA GY, CHINSANGARAM J, OSBURN BI, IANCONESCU M et KAUFMAN R. (1992) Detection of bluetongue virus séroroupe by polymerase chain reaction, *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigations*, **4**, 400-405

ANDERSON CK et JENSEN R. (1969) Pathologic changes in placentas of ewes inoculated with Bluetongue virus, *American Journal of Veterinary Research*, **30**, 987-999

ANDERSON J. (1985) Monoclonal antibodies and bluetongue virus diagnosis, *Program of Clinical Biological Research*, **178**, 497-504

BAYLIS M. (2002) The Re-emergence of Bluetongue, *The Veterinary Journal*, 2002, **164**, 5-6

BAYLIS M et MELLOR PS. (2001) Bluetongue around the Mediterranean in 2001, *Veterinary Record*, **149**, 659

BAYLIS M, MELLOR PS, WITTMANN EJ et ROGERS DJ. (2001) Prediction of areas around the Mediterranean at risk of bluetongue by modelling the distribution of its vector using satellite imaging, *Veterinary Record*, **149**, 639-643

- BECKER CH. (1971) La fièvre catarrhale du mouton ou Bluetongue, *In* : ROHRER H, editors. *Traité des maladies à virus des animaux*, Paris, Vigot Frères, **3**, 1173-1199
- BECKER FE. (1930) Tick-borne infections in Colorado. A survey of the occurrence of infections transmitted by the wood tick, *Colorado medicine*, **27**, 87-95
- BELAK S et BALLAGI-PORDANY A. (1993a) Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology, *Veterinary Research Communications*, **17**, 55-72
- BELAK S et BALLAGI-PORDANY A. (1993b) Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory, *Molecular and Cellular Probes*, **7**, 241-248
- BILLINIS C, KOUMBATI M, SPYROU V, NOMIKOU K, MANGANA CA et PAPADOPOULOS O. (2001) Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods, *Journal of Virological Methods*, **98**, 77-89
- BORDEN EC, SHOPE RE et MURPHY FA. (1971) Psychochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to bluetongue virus-a new taxonomic group: physicochemical and serological studies, *Journal of general virology*, **13**, 261-271
- BREARD E, SAILLEAU C, COUPIER H, RAVAUD KM, HAMMOUMI S, GICQUEL B, HAMBLIN C, DUBOURGET P et ZIENTARA S. (à paraître) Molecular epidemiological analysis of genome segments 2, 7 and 10 of Bluetongue viruses in Corsica, and differentiation between field isolates and the vaccine strain by RT-PCR
- CARACAPPA S, TORINA A, GUERCIO A, VITALE F, CALABRO A, PURPARI G, FERRANTELLI V, VITALE M et MELLOR PS. (2003) Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily, *The Veterinary Record*, **153**, 71-74
- CHASTEL C, MAIN AJ et COUATARMANACH A. (1984) Isolation of Eyach virus (reovirus, Colorado tick fever group) from *Ixodes Ricinus* and *I. ventallor* ticks in France, *Archives of virology*, **82**, 161-171
- CHUMA T, LE BLOIS H, SANCHEZ-VIXCAINO JM, DIAZ- LAVADIA M et ROY P. (1992) Expression of the major core antigen VP7 of African Horse Sickness Virus by a recombinant baculovirus and its use as a group specific diagnostic reagent, *Journal of general Virology*, **73**, 925-931
- CLAVIJO A, HECKERT RA, DULAC GC et AFSHAR A. (2000) Isolation and identification of Bluetongue virus, *Journal Of Virological Methods*, **87**, 13-23
- DANGLER CA, DE MATTOS CA, DE MATTOS CC et OSBURN BI. (1990) Identifying bluetongue virus ribonucleic acid sequences by the polymerase chain reaction, *Journal of Virological Methods*, **28**, 281-292
- EATON BT et CRAMERI GS. (1989) The site of Bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes, *Journal of general Virology*, **70**, 3347-3353

Fièvre catarrhale du mouton en Corse : Bilan et constat sur l'épizootie 2000, (2001) In : *Ministère de l'agriculture et de la pêche* 2001, [[http://www.agriculture.gouv.fr/spip/IMG/pdf/chronologic\\_1.pdf](http://www.agriculture.gouv.fr/spip/IMG/pdf/chronologic_1.pdf)] (consultée le 02 août 2003)

FLORIO C, STEWART MO et MUGRAGE ER. (1944) The experimental transmission of Colorado tick fever, *Journal of experimental medicine*, **80**, 165-188

GAMBLES RM. (1949), Bluetongue of sheep in Cyprus, *Journal of Comparative Pathology*, **59**, 176-189

GAYA P, MINAKSHI, SUSHILA M et YASHPAL M. (2000) Trends in Bluetongue virus diagnostics: A review, *Indian Journal Of Animal Sciences*, **70**, 103-109

GIBBS PJ et GREINER EC. (1994) The epidemiology of  
, *Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Diseases*, **17**, 207-220

GOULD AR et HYATT AD. (1994) The *Orbivirus* genus, diversity, structure, replication and phylogenetic relationships, *Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Diseases*, **17**, 163-188

GREGORY M, ZIENTARA S et HENDRIKX P. (2002) La fièvre catarrhale du mouton en Corse en 2000 et 2001, *Bulletin épidémiologique*, **4**, 1-3

GREINER EC (1985) *Orbivirus* from *Culicoides* in Florida, In: BERBER TL, JOCHIM MM (editors). *Bluetongue and related Orbiviruses*, 1<sup>st</sup> ed, New-York, 195-200

HARDING MJ, PRUD'HOMME et ROLA J. (1995) Identification of the major North American bluetongue viruses using nucleic acid amplification techniques, *Molecular and Cellular Probes*, **9**, 223-231

HARDY WT et PRICE DA. (1952) Soremuzzle of sheep, *Journal of American veterinary medicine Association*, **120**, 23-25

HAWKES RA, KIRKLAND PD, SANDERS DA, ZHANG F, LI Z, DAVIS RJ et ZHANG N (2000) Laboratory and fields studies of an antigen capture ELISA for bluetongue virus, *Journal of Virological Methods*, **85**, 137-149

HENDRIKX (2003) Les incidences sur la santé animale : l'exemple de la fièvre catarrhale., In : 3<sup>ème</sup> table ronde sur les maladies émergentes consécutives au réchauffement et à l'extension des zones humides, [[http://www.eid-med.org/fr/les\\_Actes/Hendrikx\haut.htm](http://www.eid-med.org/fr/les_Actes/Hendrikx\haut.htm)] (consulté le 25/03/2003)

HOLMES IH. (1979) Viral gastroenteritis, *Progress in medicine Virology*, **25**, 1-36

HOLMES IH. (1991) Classification and nomenclature of viruses. Family *Reoviridae*, In: FRANCKI RIB, FAUQUET CM, *Fifth report of the international Committee on taxonomy of viruses*, *Archives of virology*, **supp 2**, 186-199

HOUSE C, HOUSE JA et BERNINGER ML. (1990) Detection of bluetongue group-specific antibody by competitive ELISA, *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigations*, **2**, 137-139

HUISMANS H, VAN DIJK AA et ELS HJ. (1987) Uncoating of parental Bluetongue to core and subcore particules in infected L-cells, *Virology*, **157**, 180--188

HYATT AD, BROOKES SM, GOULD AR et EATON BT(1992) Morphogenesis of Bluetongue viruses: development of a model for the site of virus synthesis, translocation and release from infected tissue culture cells, *In: Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 358-368

JEGGO M, WRIGHT P, ANDERSON J, EATON B, AFSHAR A, PEARSON J, KIRKLAND P et OZAWA Y. (1996) Review of the IAEA meeting in Vienna on standardization of the competitive ELISA test and reagents for the diagnosis of bluetongue, *In: Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 547-561

JENNINGS DM, BOORMAN JPT et ERGUN H. (1983) *Culicoides* from Western Turkey in relation to Bluetongue disease of sheep and cattle, *Revue d'Elevage et de Medecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **36**, 67-70

JENNINGS DM et MELLOR PS. (1998) The vector potential of British *Culicoides* Species for Bluetongue Virus, *Veterinary Microbiology*, **17**, 1-10

JOCKLIK WK. (1983) The members of the family of *Reoviridae*, *Plenum Press*, 1-7

JOHNSON SJ, HOFFMANN D, FLANAGAN M, POLKINGHORNE IG et BELLIS GA. (1996) Clinico-pathology of Australian Bluetongue virus serotypes for sheep, *In: Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 737-743

JONES PD et WIGLEY TM. (1990) Global warming trends, *Scientific American*, 66-73

KARABATSOS N. (1985) International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrate, *San Antonio, Texas: The American Society of tropical Medecine and Hygiène*, **3<sup>rd</sup> edition**

KATZ J, ALSTAD D, GUSTAFSON G et EVERMANN J. (1994) Diagnosis analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep, *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigations*, **6**, 139-142

KATZ JB, GUSTAFSON GA, ALSTAD AD, ADLER KA et MOSER KM. (1993) Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep, using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids, *American Journal Of Veterinary Research*, **54**, 2021-2025

KETTLE DS. (1984) Ceratopogonidae (Biting midges), *In: Medical and Veterinary Entomology*, Bristol, Leaper and Gard Ltd ,137-159

KNUDSON DV. (1981) Genome of Colorado Tick Fever, *Virology*, **112**, 361

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

KREMER M, LEBERRE G et BEAUCOURNU-SAGUEZ F. (1971) Notes sur les *Culicoides* (*Dipt. Ceratopogonidae*) de Corse. Description de *C. corsicus n. sp*, *Annales de parasitologie*, 1971, **5**, 653-660

KREMER M, WALLER J et DELECOLL JC. (1987) Systematique des *Culicoides* (Diptères, Cératopogonidés). Critères actuels, *Bulletin de la société française de parasitologie*, **5**, 123-132

LANES RS, EMMONS RW, DEVLIN V, DONDER DV et NELSON BC. (1982) Survey for evidence of Colorado tick fever virus outside of the known endemic area in California, *American Journal Of Tropic Medecin Hygien*, **31**, 837-843

LE BLOIS H, MERTENS PPC, FRENCH T, BURROUGH JN et ROY P. (1992) The expressed VP4 protein of Bluetongue virus is the guanylyl transferase, *Virology*, **189**, 757-761

LIU HM, BOOTH TF et ROY P (1992) Interactions between Bluetongue virus core and capsid proteins translated *in vitro*, *Journal Of General Virology*, **73**, 2577-2584

LOSOS GJ. (1986) Bluetongue, *In: Infectious tropical Diseases of domestic animals*, Avon, Longman Scientific and technical, 409-439

LOUDON PT, LIU HM et ROY P. (1996) Genes to complex structures of bluetongue viruses/ structure-function relationships of Bluetongue virus proteins, *In: Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 383-389

MACLACHLAN NJ. (1994) The pathogenesis and immunology of Bluetongue virus infection of ruminants, *Comparative Immunology and Microbiology*, **17**, 197-206

MACLACHLAN NJ, BARRAT-BOYES SM, BREWER AW et STOTT JL. (1996) Bluetongue virus infection of cattle, *In: Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 725-734

MACLACHLAN NJ, NUNAMAKER RA, KATZ JB, SAWYER MM, AKITA GY, OSBURN BI et TABACHNICK WJ. (1994) Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and *in vitro* feeding of *Culicoides variipennis*, *Archives of Virology*, **136**, 1-8

MAC COLL KA et GOULD AR. (1971) Detection and characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction, *Virus Research*, **21**, 19-34

- MAC COLL KA et GOULD AR. (1994) Bluetongue virus infection in sheep: haematological changes and detection by polymerase chain reaction, *Australian Veterinary Journal*, **71**, 97-101
- MATTHEWS REF. (1979) The classification and nomenclature of viruses, *Intervirology*, **11**, 133-135
- MEBUS CA, UNDERDAHI NR, RHODES MB et TWIEHAUS MJ. (1969) Calf diarrhea (Scours) reproduced with a virus from a field outbreak, *Research Bulletin of university of Nebraska*, **233**, 1-16
- MEISWINKEL R. (1989) Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (avaritia) Imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) Bolitinos* sp. Nov. reared from the dung of the African Buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa, *Onderstepoort Journal Of veterinary Research*, **56**, 23-39
- MEISWINKEL R et BAYLIS M. (1998) Morphological confirmation of the separate species status of *Culicoides (Avarita) nudipalpis* Delfinado, 1961 and *C. (A.) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae), *Onderstepoort Journal Of Veterinary Research*, **65**, 9-16
- MELLOR PS. (1990) The replication of Bluetongue Virus in *Culicoides* vectors, *Current Topics Microbiological Immunology*, **162**, 142-158
- MELLOR PS. (2000) Replication of Arbovirus in Insect Vectors, *Journal of Comparative Pathology*, **123**, 231-247
- MELLOR PS, BOORMAN J et BAYLIS M. (2000) *Culicoides* Biting Midges: Their role as Arbovirus Vectors, *Annual Review Of Entomology*, **45**, 307-340
- MELLOR PS, JENNINGS DM, WILKINSON PJ et BOORMAN JPT. (1985) *Culicoides imicola* : A bluetongue virus vector in Spain and Portugal, *Veterinary Record*, **116**, 589-590
- MELLOR PS et WITTMANN EJ. (2002) Bluetongue Virus in the Mediterranean Basin 1998-2001, *The Veterinary Journal*, **164**, 20-37
- MERTENS PPC. (1994) *Orbiviruses* and *Coltivirus*, In: *Encyclopedia of virology*, *academic press Ltd*, 1994, 941-956
- MERTENS PPC, BURROUGHS JN et ANDERSON J. (1987) Purification and properties of virus particles infectious subviral particles and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4, *Virology*, **157**, 375-386
- MOULTON JE. (1961) Pathology of Bluetongue of sheep, *Journal of American veterinary medicine Association*, **138**, 493-498
- NEVILL EM. (1971) Cattle and *Culicoides* biting midges as possible overwintering hosts of Bluetongue virus, *Onderstepoort Journal Of veterinary Research*, **38**, 65-72
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, Bluetongue. (2000) chapitre 2.1.9, In: *Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines*, 4<sup>th</sup> ed

OSBURN BI. (1994) Bluetongue virus, *Veterinary Clinics of North America food animal practice*, **10**, 547-560

OSBURN BI. (1996a) The impact of Bluetongue virus on reproduction, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, **17**, 189-196

OSBURN BI. (1996b) Immune responses to *Orbivirus*, In: *Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 511-522

PAPADOPOULOS O. (1996) Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in Europe and the European community, In: *Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 34-37

PARSONSON IM, (1996) Overview of bluetongue virus infection of sheep, In: *Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 713-723

PARSONSON IM et MAC COLL KA. (1995) Retrospective diagnosis of bluetongue virus in stored frozen and fixed tissue samples using PCR, *Veterinary Microbiology*, **46**, 143-149

PEARSON JE, GUSTAFSON GA, SHAFER AL et ALSTAD AD. (1996) Diagnosis of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease, In: *Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 533-544

PRASAD BVV, ROY P et YAMAGUICHI S. (1992) Three dimensional structure of single shelled bluetongue virus, *Journal of Virology*, **66**, 2135-2142

PURDY M, PETRE J et ROY P. (1984) Cloning the Bluetongue virus L3, *General Journal Of Virology*, **51**, 754-759

REDDINGTON JJ, REDINGTON GM et MACLACHLAN NJ (1991) A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus, *Journal Of Veterinary Investigations*, **3**, 144-147

ROY P. (1989) Bluetongue virus genetics and genome structure, *Virus Research*, **13**, 179-206

ROY P. (1992a) Bluetongue virus proteins, *Journal Of General Virology*, **73**, 3051-3064

ROY P. (1992b) From genes to complex structures of Bluetongue and their efficacy as vaccines, *Veterinary Microbiology*, **33**, 155-168

ROY P, HIRASAWA T, FERNANDEZ M, BLINOV VM et SANCHEZ-VIXCAINO R. (1991) The complete sequence of the group-specific antigen, VP7, of African horse sickness disease serotype 4 reveals a close relationship to Bluetongue virus, *Journal Of Virology*, **72**, 1237-1241

- ROY P, MERTENS PPC et CASAL I. (1994) African horse sickness virus structure, *Comparative immunology and Microbiology of Infectious Disease*, **17**, 214-273
- SABIN AB. (1959) Reoviruses, *Science*, **130**, 1387-1389
- SAINT GEORGES TD et MULLER MJ. (1984) The isolation of a bluetongue virus from *Culicoides brevitarsis*, *The Australian Veterinary Journal*, **61**, 95
- SAVINI G, GOFFREDO M, MONACO F, DE SANTIS P et MEISWINKEL R. (2003) Transmission of bluetongue virus in Italy, *the Veterinary Record*, **152**, 119
- SCHOEPP RJ, BLAIR CD, ROY P et BEATY BJ. (1991) Detection of bluetongue virus RNA by in situ hybridization: comparison with virus isolation and antigen detection, *Journal Of veterinary Investigation*, **3**, 22-28
- SELLERS RF. (1996) Weather, *Culicoides*, and the distribution and spread of Bluetongue and African Horse Sickness viruses, *In: Proceedings of the second international symposium on Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses*, Paris, 1991, Walton TE et Osburn BI, 284-291
- SHAD G, WILSON WC, MECHAM JO et EVERMANN JF (1997) Bluetongue virus detection: a safer reverse-transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep, *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigations*, **9**, 118-124
- SINGER RS, BOYCE WM, GARDNER IA, JOHNSON WO et FISHER AS. (1998) Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep, *Preventive Veterinary Medicine*, **35**, 265-282
- SPREULL J. (1905) Malarial catarrhal fever (Bluetongue) of sheep in South Africa. *The journal of comparative pathology and Therapeutics*, **18**, 321-337
- STANISLAWEK WL, LUNT RA, BLACKSELL SD, NEWBERRY KM, HOOPER PT et WHITE JR. (1996) Detection by ELISA of bluetongue antigen directly in the blood of experimentally infected sheep, *Veterinary Microbiology*, **52**, 1-12
- Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton. (2001a) *In : Ministère de l'agriculture et de la pêche*, **1** (juin)
- Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton. (2001b) *In : Ministère de l'agriculture et de la pêche*, **2** (juillet)
- Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton. (2001c) *In : Ministère de l'agriculture et de la pêche*, **3** (août)
- Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton. (2001d) *In : Ministère de l'agriculture et de la pêche*, **4** (septembre)
- Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton (2001e) *In : Ministère de l'agriculture et de la pêche*, **5** (octobre)

Surveillance de la fièvre catarrhale du mouton. (2001f) In : *Ministère de l'agriculture et de la pêche*, **6** (juin)

TAKAMATSU H, MELLOR PS, MERTENS PPC, KIRKHAM PA, BURROUGHS JN et PARKHOUSE RME. (2003) A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector, *Journal of Virology*, **84**, 227-235

TRAVASSOS DA ROSA AP, TESH RB, PINHEIRO PP, TRAVASSOS DA ROSA JF, PERALTA PH et KNUDSON DL. (1984) Characterization of the Changuilona serogroup viruses (*Reoviridae: Orbivirus*), *Intervirology*, **21**, 38

TYLER K et FIELDS B. (1990) *Virology*, **second edition**, edited by FIELDS BN Raven Press, Ltd., New York, 1271-1327

URBANO P et URBANO FG. (1994) The *Reoviridae* family, *Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease*, **17**, 157-161

WADE-EVANS AM, MERTENS PPC et BOSTOCK CJ. (1990) Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples, **30**, 15-24

WALTON TE et OSBURN BI. (1992) Bluetongue, African horse sickness and related *Orbiviruses*, *Proceedings of the Second Symposium*, edited by Walton TE, Osburn BI

WARD MP, FORBES-FAULKNER JC et DUFFY VL. (1996) Evaluation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect infection of cattle sentinel herds in Queensland, Australia with Bluetongue viruses, *Veterinary Microbiology*, **49**, 117-125

WARD MP, GARDNER IA et FLANAGAN M. (1995) Evaluation of an agar gel immunodiffusion test to detect infection of cattle with bluetongue viruses in Queensland, Australia, *Veterinary Microbiology*, **45**, 27-34

WARD MP et THURMOND MC. (1995) Climatic factors associated with risk of seroconversion of cattle to bluetongue viruses in Queensland, *Preventive Veterinary Medicine*, **24**, 129-136

WELCHER SJ, AUSTIN JK et WILSON WC. (1990) Limits of detection of bluetongue virus with different assay systems, *Journal Of Veterinary Investigation*, **2**, 103-106

WILSON CW. (1990) Preliminary description of a polymerase chain reaction test for bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viral RNA in bovine semen, *Journal Of veterinary Diagnostic Investigations*, **11**, 377-379

WILSON WS et CHASE CCL. (1993) Nested and multiplex polymerase chain reactions for the identification of bluetongue virus infection in the biting midge, *Culicoides variipennis*, *Journal of Virological Methods*, **45**, 39-47

WITTMANN EJ. (2000) *Temperature and the transmission of arboviruses by Culicoides biting midges*, Phd Thesis, University of Bristol, Bristol

WITTMANN EJ et BAYLIS M. (2000) Climate change: Effects on *Culicoides*-transmitted Viruses and Implications for the UK, *The Veterinary Journal*, **160**, 107-117

ZHOU EM, RIDD D, RIVA J, FERNANDO L et CLAVIJO A. (2001) Development and evaluation of an IgM-capture ELISA for detection of recent infection with bluetongue virus in cattle, *Journal Of Virological Methods*, 175-182

ZIENTARA S, BREARD E, HAMMOUMI S, GOURREAU JM, HENDRICKX P et SAILLEAU C. (2002) La fièvre catarrhale du mouton, *In : Pathologie ovine et caprine*, Maisons-Alfort : Le point vétérinaire, 70-73

ZIENTARA S, DE LA ROCQUE S, GOURREAU JM, GREGORY M, DIALLO A, HENDRIKX P, LIBEAU G, SAILLEAU C et DELECOLLE JC. *et al.* (2000) La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000, *Epidémiologie et santé animale*, **38**, 133-144

ZIENTARA S, GRILLET C, DE LA ROCQUE S, GOURREAU JM, GREGORY M, HENDRIKX P, LIBEAU G, SAILLEAU C, ALBINA E et DELECOLLE JC. (2001) La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2001, *Epidémiologie et santé animale*, **40**, 129-134