

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	14
Première partie : LES PESTIVIRUS CHEZ LES RUMINANTS	
I/ LES PESTIVIRUS.....	16
1. Classification.....	16
2. Organisation générale.....	17
3. Les protéines virales.....	17
4. Cycle viral.....	19
5. Variabilité.....	20
5.1. La variabilité d'hôtes.....	20
5.2. La notion de biotypes viraux.....	21
5.3. La variabilité génomique.....	23
5.3.1. Diversité génétique au sein des Pestivirus	
5.3.2. Diversité génétique au sein du BVD	
5.3.3. Diversité génétique au sein de la BD	
5.4. La variabilité antigénique.....	27
5.4.1. Diversité antigénique au sein des Pestivirus	
5.4.2. Diversité antigénique au sein du BVD	
5.4.3. Diversité antigénique au sein de la BD	
II/ LES PESTIVIROSES DES RUMINANTS.....	31
1. Epidémiologie descriptive.....	31
1.1. Les pestiviroses dans le Monde.....	31
1.2. Les pestiviroses en France.....	31
2. Pathogénie.....	32
2.1. Infection transitoire.....	32
2.2. Infection persistante.....	32
3. Signes cliniques.....	33
3.1. Animaux adultes non gravides.....	33
3.2. Animaux adultes mâles reproducteurs.....	34
3.3. Animaux adultes gravides.....	34
III/ LUTTE CONTRE LES PESTIVIROSES DES RUMINANTS.....	39
1. Diagnostic.....	39

1.1.	Diagnostic épidémiologique clinique et nécropsique.....	39
1.2.	Diagnostic de laboratoire.....	39
1.2.1.	Détection virale	
	- Isolement viral en culture cellulaire	
	- Détection des antigènes viraux (ELISA ag)	
	- Détection des acides nucléiques	
1.2.2.	Détection des Anticorps	
	- Test de séroneutralisation	
	- ELISA indirecte	
	- ELISA compétition	
1.3.	Interprétation des résultats de laboratoire.....	42
2.	Les vaccins contre les pestivirus.....	43
2.1.	Bases scientifiques : la réponse immunitaire contre les pestivirus.	43
2.2.	Vaccination BVDV chez les bovins.....	45
2.3.	Vaccination chez les ovins.....	46
3.	Prophylaxie sanitaire et/ou médicale.....	46
3.1.	Contrôle à l'introduction dans un cheptel.....	47
3.2.	Dépistage collectif et prophylaxie sanitaire (modèle BVD).....	47
3.2.1.	Zone à faible prévalence	
3.2.2.	Zone à forte prévalence : exemple de l'Allemagne	
3.2.3.	Zone à forte prévalence : exemple de la France	
3.3.	Prophylaxie sanitaire de la Maladie des Frontières.....	50

Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE

1.	Objectifs.....	53
2.	Matériels et méthodes.....	53
2.1.	Cultures cellulaires.....	53
2.2.	Virus.....	54
2.3.	Infections expérimentales.....	54
2.3.1.	Animaux	
2.3.2.	Protocole expérimental de vaccination	
2.3.3.	Inoculation d'épreuve	
2.4.	Suivi clinique et hématologique.....	56
2.5.	Suivi de la réponse en anticorps.....	56
2.6.	Suivi virologique.....	57
2.7.	Analyses phylogénétiques.....	58

2.8. Statistiques.....	58
3. Résultats.....	59
3.1. Isolement des souches de pestivirus.....	59
3.2. Analyses phylogénétiques des virus isolés.....	59
3.3. Etude de la réponse humorale post vaccination.....	61
3.3.1. Réponse individuelle des animaux contre la souche BVDV NADL	
3.3.2. Réponse individuelle des animaux contre la souche BDV Aveyronite	
3.3.3. Réponse individuelle des animaux contre la souche BDV 10405	
3.3.4. Comparaison des moyennes par groupe en fonction des virus utilisés	
3.3.5. Réponse en anticorps NS2-3	
3.4. Résultats de l'inoculation d'épreuve.....	68
3.4.1. Suivi clinique	
3.4.2. Etude virologique	
3.4.3. Hématologie	
4. Discussion.....	75
CONCLUSION.....	84
BIBLIOGRAPHIE.....	86

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation structurale d'un pestivirus (Meyer 2012).....	17
Figure 2 : Organisation génomique du virus BVD (© 2002 ASM Press).....	17
Figure 3 : Modalités d'entrée des virus enveloppés : endocytose via les vésicules à clathrine, puis fusion des membranes pH dépendante	19
Figure 4 : Phylogénie et classification des pestivirus par la probabilité maximale et approche Bayésienne.....	24
Figure 5 : Dates de divergences des lignées majeures de Pestivirus (Liu <i>et al.</i> 2009).....	25
Figure 6 : Arbre phylogénétique à partir de la comparaison des séquences NPro de souches de BDV isolées en France entre 1985 et 2006 (Dubois <i>et al.</i> 2008).....	27
Figure 7 : Réactivité d'anticorps monoclonaux anti-pestivirus contre différentes souches de pestivirus.....	28
Figure 8 : Conséquences possibles de l'infection par le BDV selon le stade de gestation de la brebis	35
Figure 9 : Arbres phylogénétiques construits à l'aide de 249 bases de 5'UTR (A) et 504 bases de NPro (B) des séquences de pestivirus trouvées pendant cette étude et dans les données de la banque génomique (GenBank)	60
Figure 10 : Titres individuels en anticorps neutralisants le BVDV-1 (souche NADL) dans le groupe 3 vacciné quart de dose (A), groupe 2 vacciné demi-dose (B), et dans le groupe contrôle non vacciné (C). Les moyennes sont représentées en traits rouges dans chaque figure puis regroupées dans la figure D.	62
Figure 11 : Titres individuels en anticorps neutralisants le BDV genotype 5 (souche Aveyronite) dans le groupe 3 vacciné quart de dose (A), groupe 2 vacciné demi-dose (B), et dans le groupe contrôle non vacciné (C). Les moyennes sont représentées en traits rouges dans chaque figure puis regroupées dans la figure D.....	63
Figure 12 : Titres individuels en anticorps neutralisants le BDV génotype 3 (souche ENVT-10405) dans le groupe 3 vacciné quart de dose (A), groupe 2 vacciné demi-dose (B), et dans le groupe contrôle non vacciné (C). Les moyennes sont représentées en traits rouges dans chaque figure puis regroupées dans la figure D.....	65
Figure 13 : Comparaison des moyennes des titres en anticorps neutralisants selon les groupes.....	66
Figure 14 : Titres individuels en anticorps ELISA NS2-3 dans le groupe 3 vacciné quart de dose (A), groupe 2 vacciné demi-dose (B), et dans le groupe contrôle non vacciné (C). Les moyennes sont représentées dans la figure D. Les barres horizontales rouges représentent les	

seuils de la trousse ELISA NS2-3 : négatif >50, douteux entre 40 et 50 et positif < 40.....	68
Figure 15 : Moyenne des températures rectales après inoculation d'épreuve (J0).....	69
Figure 16 : Moyenne du nombre des leucocytes de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.....	70
Figure 17 : Moyennes des pourcentages du nombre de leucocytes après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de leucocytes, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.....	71
Figure 18 : Moyenne du nombre des lymphocytes de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.....	71
Figure 19 : Moyennes des pourcentages du nombre de lymphocytes après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de lymphocytes, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.....	72
Figure 20 : Moyenne du nombre des neutrophiles de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.....	72
Figure 21 : Moyennes des pourcentages du nombre de neutrophiles après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de neutrophiles, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.....	73
Figure 22 : Moyenne du nombre des thrombocytes de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.....	73
Figure 23 : Moyennes des pourcentages du nombre de thrombocytes après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de thrombocytes, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.....	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Charge virale dans les sécrétions nasales des moutons non vaccinés et inoculés avec la souche BDV ENVT-10405, exprimées en Log ₁₀ du nombre de copies d'ARN viral/ml de sécrétions nasales... ..	69
---	----

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photo 1 : Immunohistochimie du BDV sur cellules MDBK.....	59
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

- BDV : virus de la maladie des Frontières
- BVDV : virus de la diarrhée virale bovine
- CP : cytopathique
- CSFV : virus de la peste porcine classique
- INF I : interferon de type I
- NCP : non cytopathique
- ORF : Open Reading Frame
- RT PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction

INTRODUCTION

En 1959, le premier cas de Maladie des Frontières a été mis en évidence à la frontière entre l'Angleterre et le Pays de Galles. Depuis, cette maladie a été diagnostiquée dans l'espèce ovine dans le monde entier. L'agent responsable est le virus de la Border disease ou BDV. Ce virus fait partie de la famille des *flaviridae*, genre pestivirus, qui regroupe aussi le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) et le virus de la Peste Porcine classique (CSFV). Ces trois affections virales entraînent des pertes économiques majeures à travers le Monde. En France, le virus de la maladie des Frontières a entraîné une première épizootie dans le Bassin de Roquefort en Aveyron dans les années quatre-vingt. Le virus a été isolé en 1983 et la souche incriminée a été appelée souche Aveyronite. Cet épisode a eu un impact économique majeur sur les producteurs ovins de la région, avec de nombreuses pertes chez les agneaux et même les animaux adultes. Une nouvelle épizootie a commencé dans cette région en 2009.

Actuellement, il n'existe toujours pas de vaccins commercialisés contre le virus de la Maladie des frontières. Comme les virus BVDV et le BDV montrent des propriétés antigéniques croisées, les éleveurs vaccinent leurs brebis avec des vaccins dirigés contre le BVDV, en utilisant des doses variables (demi ou quart de dose de la dose AMM bovine recommandée). Il n'existe cependant pas d'études scientifiques prouvant l'efficacité de ces vaccinations contre le BDV.

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer la capacité d'un vaccin dirigé contre le BVDV à permettre la production d'anticorps neutralisants dirigés contre les virus BVD et BDV chez la brebis. Les doses utilisées ont été calquées sur celles utilisées en pratique dans les élevages (demi et quart de la dose AMM bovine recommandée).

Le deuxième objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de ces vaccinations lors d'une inoculation d'épreuve des brebis par une souche de BDV.

Dans une première partie, nous aborderons les principales connaissances sur le virus BDV, puis nous présenterons dans une deuxième partie les résultats de notre étude.

Première partie : LES PESTIVIRUS CHEZ LES
RUMINANTS

I/ LES PESTIVIRUS

Le premier pestivirus identifié a été le CSFV, mis en évidence au XIXe siècle aux Etats Unis. Le BVDV a été isolé et identifié pour la première fois en 1946 (Olafson *et al.* 1946). Cet isolement a été effectué dans le cadre d'une infection de nature épidémique. Les animaux touchés étaient des bovins adultes, ils présentaient des diarrhées aiguës de moindre gravité. On parlait alors de « grippe intestinale ».

En 1953, ce virus a de nouveau été isolé sur des animaux âgés de six mois à deux ans. L'infection était de nature sporadique et présentait une létalité d'environ 100%. Les animaux présentaient alors des ulcères buccaux et de la diarrhée. A l'autopsie, des ulcères ont été mis en évidence sur tous les épithéliums pavimenteux malpighiens. Ce tableau clinique fut appelé « maladie des muqueuses » (Ramsey *et al.* 1953). Quelques années plus tard, la maladie des muqueuses et la diarrhée virale bovine ont été reconnues comme étant dues au même agent pathogène (Jubb *et al.* 1963).

En 1959, la maladie des frontières (BDV) fut décrite pour la première fois chez les ovins à la frontière entre l'Angleterre et le Pays de Galles (Hugues *et al.* 1959).

1. Classification

La famille des **Flaviviridae** comprend un grand nombre de virus qui infectent les humains et les animaux. Cette famille comprend des virus à ARN monocaténaire de polarité positive de diamètres compris entre 40 et 60 nm. Les flavivirus sont enveloppés et possèdent tous une nucléocapside icosaédrique.

Au sein de cette famille, trois genres ont été définis : les genres **flavivirus**, **pestivirus** et **hépacivirus**.

Le genre flavivirus regroupe entre autres les virus de la Fièvre Jaune, de la Dengue et de l'Encéphalite Japonaise. Le virus West Nile fait aussi partie de ce genre.

Le genre hépacivirus regroupe plusieurs virus dont le virus de l'hépatite C.

Enfin, le genre pestivirus regroupe trois virus qui sont des pathogènes majeurs des animaux : le CSFV, le BVDV et le BDV.

Initialement, la classification des pestivirus reposait sur l'espèce dans laquelle le virus était isolé. Ainsi les hôtes reconnus du CSFV sont les suidés, ceux du BVDV sont les bovins et ceux du BDV sont les caprins et ovins. La capacité des pestivirus à franchir la barrière

d'espèce et les résultats des analyses phylogénétiques ont par la suite permis de moduler cette classification.

2. Organisation générale

Les flavivirus ont une taille comprise entre 40 et 60 nm. Ils sont **enveloppés** et possèdent une **nucléocapside icosaédrique** (figure 1).

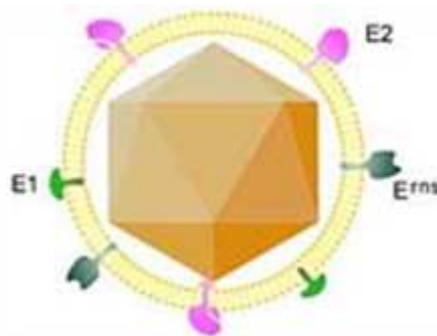


Figure 1 : Organisation structurale d'un pestivirus (Meyer 2012)

Leur génome est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 12 kb. Cet ARN comprend trois parties : deux extrémités 3' et 5' non transcrites et une phase ouverte de lecture (ORF pour Open Reading Frame) qui code pour une **polyprotéine** d'environ 4000 acides aminés. Douze peptides sont synthétisés à partir de cette polyprotéine (Figure 2).

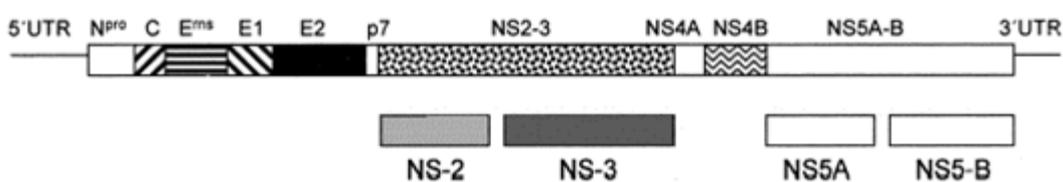


Figure 2 : Organisation génomique du virus BVD (© 2002 ASM Press)

3. Les protéines virales

L'enveloppe contient trois protéines virales structurales (E0 ou Erns, E1 et E2) qui constituent des cibles de choix pour les anticorps protecteurs contre le virus, en particulier E0 et E2. La glycoprotéine **E0** possède une **activité ribonucléasique** avec une spécificité pour les résidus uridines mais son rôle dans la réplication reste inconnu à ce jour.

La glycoprotéine **E2** est transmembranaire. Elle est présente à la surface des virions matures où elle forme des homodimères (E2-E2) ou des hétérodimères (E2-E1). Cette glycoprotéine est à l'origine de la **variabilité antigénique** des pestivirus. Elle est impliquée dans **l'attachement et la pénétration** dans les cellules de l'hôte (Weiland *et al.* 1999). La glycoprotéine E2 joue un rôle primordial dans le phénomène d'inhibition de la surinfection (Lee *et al.* 2005). L'incubation de cellules avec une glycoprotéine E2 recombinante avant ou pendant une infection par une souche cytopathique de BVD inhibe la pénétration du virus (Lee *et al.* 2005). Finalement, E2 est une glycoprotéine immunodominante qui induit une forte réponse en anticorps neutralisants en cas d'infection et/ou de vaccination.

La protéine C est le principal constituant de la capsid, qui participe à la protection du génome viral (Rumenapf *et al.* 1993).

Les deux tiers du génome viral (dans la partie 3') codent pour huit protéines dites non structurales : protéines Npro, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B.

La protéine **p7** semble avoir un rôle dans la maturation glycoprotéique et/ou dans la morphologie du virus (Elbers *et al.* 1996).

La protéine NS2-3 est composée de deux sous unités NS2 et NS3. Cette protéine se scinde en protéine NS2 et protéine NS3 uniquement chez les pestivirus de biotype cytopathique (cf infra).

La protéine **NS3** a trois rôles majeurs : elle contient une **ARN hélicase** qui permet le déenroulement de l'ARN durant la réplication du génome viral (Warrener *et al.* 1995), elle contient aussi une **sérine protéase**, qui permet plusieurs clivages de l'ARN et ainsi la production de NS4a, NS4b, NS5a et NS5b (Lee *et al.* 2005). Elle contient enfin une **nucléoside triphosphatase**. Cette protéine a une activité cytotoxique forte, à l'origine des effets cytopathiques. Couplée à la protéine NS2 (protéine NS2-3), l'activité cytotoxique est minimale. La structure de NS3 est très stable, c'est la protéine la mieux conservée du genre Pestivirus. Elle est très immunogène mais les anticorps sécrétés contre elle ne sont pas neutralisants.

La protéine **Npro** a une activité autoprotéolytique qui lui permet de se cliver elle-même de la polyprotéine. Elle a aussi un effet qui permet un échappement de la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, Npro cible l'interféron de type 3 (IRF 3) et entraîne sa dégradation (Szymanski *et al.* 2009).

Les protéines **NS4a, NS4b et NS5a** sont impliquées dans la réplication de l'ARN viral. En effet, une étude montre que lors de mutations d'une de ces protéines, la réplication ne peut pas s'effectuer correctement (Grassmann *et al.* 2001)

La protéine **NS5b** contient une **ARN polymérase** ARN dépendante qui permet la réplication de l'ARN viral.

4. Cycle viral

Attachement

L'attachement entre le virion et la cellule est possible par l'interaction de glycoprotéines membranaires virales avec des récepteurs cellulaires. Les trois protéines de surface E0, E1 et E2 semblent impliquées dans cet attachement (Hulst *et al.* 1997). La formation de l'hétérodimère E1-E2 paraît essentiel pour l'attachement à la cellule (Ronecker *et al.* 2008). Il n'y a pas d'articles concernant le type de récepteur cellulaire impliqué dans l'attachement du virus. D'après un auteur, la protéine E0 se lierait à un glycosaminoglycane de la membrane cellulaire (Iqbal *et al.* 2000).

Pénétration/Décapsidation

L'entrée des virus enveloppés fait intervenir une étape de fusion entre l'enveloppe du virus et une membrane cellulaire. Les pestivirus utilisent la voie de l'endocytose, via les vésicules à clathrine (coated pits), type de vésicules d'endocytose. La baisse de pH des endosomes engendre une modification de la conformation de la glycoprotéine virale qui déclenche alors la fusion de la membrane du virus (enveloppe) et de celle de la vésicule d'endocytose. Suite à la fusion des membranes, la nucléocapside se retrouve libérée dans le cytoplasme de la cellule (Krey *et al.* 2005).

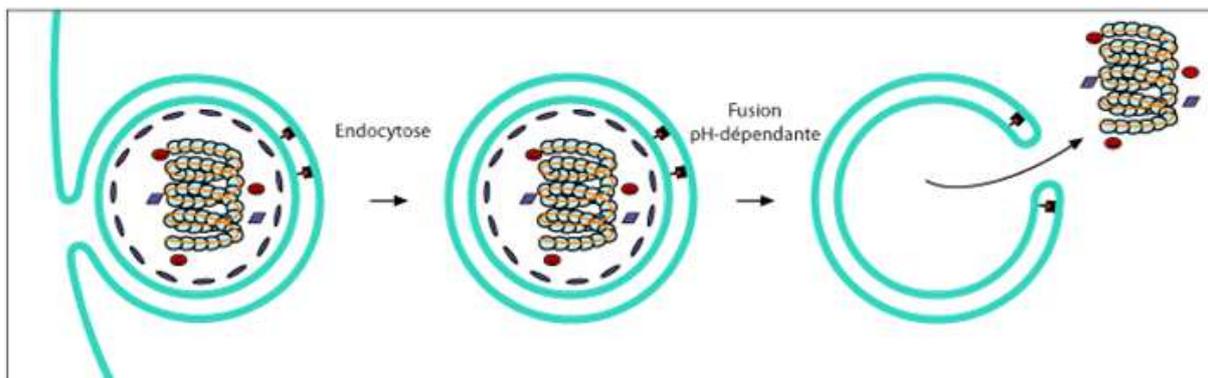


Figure 3 : Modalités d'entrée des virus enveloppés : endocytose via les vésicules à clathrine, puis fusion des membranes pH dépendante (<http://www.afd-ld.org>)

Expression des gènes viraux et réplication

Les virus à ARN+ ont un génome qui possède les signaux requis pour être traduit directement par les ribosomes de la cellule hôte.

Chez les pestivirus, la totalité des protéines virales peuvent être synthétisées à partir de l'ARN génomique. Chez ces virus, un seul cadre de lecture ouvert (ORF pour "open reading frame") assure la synthèse d'une polyprotéine (généralement de grande taille) destinée à subir des clivages protéolytiques pour donner plusieurs protéines matures. Cette polyprotéine est clivée par un processus autocatalytique (protéases virales contenues dans la polyprotéine) pour fournir l'ensemble des protéines virales. La réplication du génome est assurée par une polymérase virale qui recopie l'ARN génomique (+) en ARN anti-génomique (-) et ensuite recopie cet ARN anti-génomique en ARN génomique. Cet ARN sera ensuite encapsidé dans les nouveaux virions (Hamers *et al.* 2001). Le cycle de réplication des virus à ARN+ est cytoplasmique. La réplication et la transcription sont dues à une polymérase virale. La traduction est assurée par la machinerie cellulaire.

Assemblage et sortie

Après la réplication du génome viral et la synthèse des protéines structurales, les virions sont assemblés et libérés par la cellule hôte, de manière à pouvoir se propager à d'autres cellules ou d'autres organismes. Les virus enveloppés sont libérés des cellules infectées par bourgeonnement. Les glycoprotéines codées par ces virus sont insérées dans la membrane plasmique cellulaire.

Les nucléocapsides assemblées dans le noyau ou le cytoplasme vont aller interagir avec les régions de membrane hérissées de glycoprotéines. Le bourgeonnement s'initie alors et aboutit à la libération de nucléocapsides entourées d'une enveloppe correspondant à la membrane plasmique de la cellule productrice, dans laquelle sont insérées les glycoprotéines virales.

A l'inverse de la libération par lyse cellulaire, la production de virus enveloppés par bourgeonnement ne s'accompagne pas forcément de la mort de la cellule productrice

5. Variabilité des Pestivirus

Les pestivirus se caractérisent par une importante variabilité à la fois antigénique et génétique. Cette variabilité se retrouve aussi quand on étudie la pathogénie et les propriétés biologiques du virus. Ainsi la variabilité des pestivirus peut être caractérisée selon différents critères.

5.1. Variabilité d'hôtes

Les pestivirus infectent un grand nombre d'espèces domestiques, captives et sauvages de ruminants.

Les pestivirus ont d'abord été classés selon leurs spectres d'hôtes. Le CSFV infecte majoritairement les suidés domestiques et sauvages. Le BVDV infecte majoritairement les bovins et le BDV infecte majoritairement les ovins. Néanmoins, des études sérologiques en Amérique du Nord, en Europe et en Afrique ont montré que beaucoup d'espèces de ruminants sauvages possèdent des anticorps anti pestivirus (Nettleton *et al.* 1990).

Plusieurs études ont montré que le BVDV pouvait se multiplier chez la plupart des Artiodactyles (bovins, ovins, camélidés, bisons...). Des anticorps anti BVDV ont été mis en évidence chez les cervidés (cerfs, cerfs mullet, cerfs de Virginie, chevreuils, élans, daims et caribous), chez les camélidés (alpaga, lama, guanaco et vigogne), chez les bovidés (oryx algazelle, pronghorn, chamois, mouflon et bison) et chez les girafidés (girafe).

De même, les souches de BDV peuvent infecter les caprins, les petits ruminants sauvages et, plus rarement, les bovins. Ainsi des souches de BDV-4 sont actuellement responsables d'épidémies récurrentes chez les isards (*Rupicapra pyrenaica*) dans les Pyrénées française et espagnole. En effet, un déclin important de la population d'isards dans les Pyrénées a entraîné le développement d'études visant à rechercher un agent responsable de ces mortalités. Une étude a été menée en Espagne entre 2001 et 2002 et a montré une nette diminution de la population d'isards (3880 isards enregistrés en 2000, 2678 enregistrés en 2001). Dix-sept isards ont alors été prélevés dans cette région. Des antigènes de pestivirus ont été mis en évidence par ELISA chez 16 d'entre eux. Des RT-PCR ont été réalisées sur les organes de 12 isards, la présence de BDV a été mise en évidence sur 8 d'entre eux (Hurtado *et al.* 2004). La comparaison de séquences génomiques 5'UTR, NPro et E2 a montré que cette souche chamois-1 forme un nouveau groupe de BDV appelé BDV-4. Des études similaires ont été menées en France (Vautrain, 2007). Les auteurs ont infecté expérimentalement une femelle isard grévise avec la souche française Orly. La femelle a alors donné naissance à un isard IPI. La contamination des animaux sauvages a des conséquences épidémiologiques. En effet, les animaux sauvages peuvent constituer des réservoirs de pestivirus plus ou moins importants en fonction des régions. C'est pourquoi il est important d'inclure une surveillance de la présence de pestivirus chez les animaux sauvages dans les moyens de lutte et de prévention des pestivirus.

5.2. La notion de biotypes viraux

Chaque souche de virus peut être classée selon son biotype : **cytopathique (cp)** ou **non cytopathique (ncp)**.

Une souche cytopathique entraînera la destruction des cellules *in vitro* alors qu'une souche non cytopathique n'entraînera pas de destruction cellulaire. L'effet cytopathique est associé, au plan moléculaire, au clivage de la protéine NS2-3 en protéines NS2 et NS3. Les souches cp émergent de souches ncp chez les animaux infectés permanents par des modifications du génome viral de la souche ncp. Ces modifications sont diverses et font suite à des mutations et/ou des insertions de séquences virales ou cellulaires dans le génome, par recombinaison non homologue entre molécules d'ARN. Chaque type cp possède des modifications spécifiques dans son génome. Toutefois, l'insertion d'un gène cellulaire de type ubiquitine est fréquemment identifiée, associée ou non à une duplication du gène NS3. Ces modifications entraînent, pour les souches cp, une augmentation significative de l'expression de la protéine NS3 qui n'est plus fusionnée avec NS2 au sein du complexe protéique NS2/3 (ex p125). Différents mécanismes ont été proposés, tels que la sur-activation ou la modification de l'activité autoprotéase de NS2, ou un effet chimiotactique sur d'autres protéases cellulaires capables d'exciser NS3. Dans les cellules, la production de NS3 est sous le contrôle de produits d'expression de gènes cellulaires, notamment le gène *Jiv* (J domain protein interacting with viral protein). Ce contrôle aboutit à une faible expression de NS3 pour les souches ncp mais il est débordé pour les souches cp, et finalement NS3 induit une destruction des cellules par mécanisme d'apoptose (Peterhans *et al.* 2010).

Par contre, le caractère cytopathique n'est pas corrélé *in vivo* à la virulence des souches *in vitro*. Les souches ncp sont responsables des principales formes cliniques observées. Elles sont aussi responsables des **infections persistantes** chez toutes les espèces (Brownlie *et al.* 1989) (cf. chapitres suivants). La contamination d'un animal infecté persistant par une souche cp entraînera le développement de la **Maladie des Muqueuses** ou de son équivalent chez les ovins, caprins et porcins (cf. chapitres suivants). Cette contamination peut être extérieure mais en général elle provient d'une mutation de la souche ncp déjà présente chez l'animal.

In vivo, les souches ncp semblent avoir un tropisme pour les leucocytes, les organes lymphoïdes et l'arbre respiratoire. Les souches cp semblent présenter un tropisme pour le tube digestif. La majorité des souches de pestivirus isolées sont ncp (si on exclut les animaux atteints de la maladie des muqueuses) (Hamers *et al.* 2001).

Les souches ncp de pestivirus représentent le réservoir des pestivirus. Les souches cp dérivent accidentellement des souches ncp et constituent un cul de sac épidémiologique par la mort de l'animal porteur (maladie des muqueuses). L'existence de ces souches cp semble maintenir une balance entre génération et élimination des animaux infectés permanents immunotolérants (Hamers *et al.* 2001).

5.3. La variabilité génomique

La variabilité génétique des pestivirus est principalement liée à des mutations ponctuelles produites par l'ARN polymérase ARN-dépendante lors de chaque cycle de réplication virale. Les fréquences de mutation ont été estimées à 10^{-4} substitutions/nucléotide, soit environ une erreur toutes les 10kb, ce qui est à peu près la taille du génome du BVDV. Les conséquences de ces mutations dépendent de leur localisation. Par ailleurs, des mécanismes d'insertion-délétion et de recombinaison ont aussi été démontrés chez les pestivirus. Ces mécanismes seraient responsables du passage du biotype ncp vers le biotype cp.

5.3.1. Diversité génomique au sein des pestivirus

Il existe quatre espèces reconnues officiellement au sein des pestivirus :

- **BVDV-1** : Diarrhée virale bovine de type 1
- **BVDV-2** : Diarrhée virale bovine de type 2
- **BDV** : Virus de la Maladie des Frontières
- **CSFV** : Virus de la Peste Porcine classique

Une cinquième espèce de pestivirus (pestivirus de la girafe) est en cours d'homologation. Elle a été mise en évidence chez des girafes en 1969. En 2009, Liu *et al.* (2009) a proposé une classification phylogénétique plus précise des pestivirus sur base d'analyses comparatives des séquences codant 5'UTR, NPro et E2 (Figure 4). En plus des groupes précités, il existerait trois groupes de pestivirus non classifiés :

- Le 1^{er} groupe comprend des pestivirus isolés de bovins ou de sérums bovins utilisés pour les cultures cellulaires : D32/00_Hobi Brazil, CH_Kaho/cont South America et TH/04_Khonkaen Thailand (**BVDV-3**). Ces pestivirus sont génétiquement proches de BVDV1 et BVDV2. C'est pour cela qu'on les regroupe sous l'appellation BVDV-3.
- Le 2^{ème} groupe comprend des pestivirus isolés d'antilopes aux Etats-Unis (**Antelope**), et de porcs en Australie (**Bungowannah**).
- Le 3^{ème} groupe comprend des souches Tunisiennes isolées sur des ovins (**TSV**), qui ne rentrent pas dans la sous espèce du BDV. Ces pestivirus sont en effet proches génétiquement du CSFV.

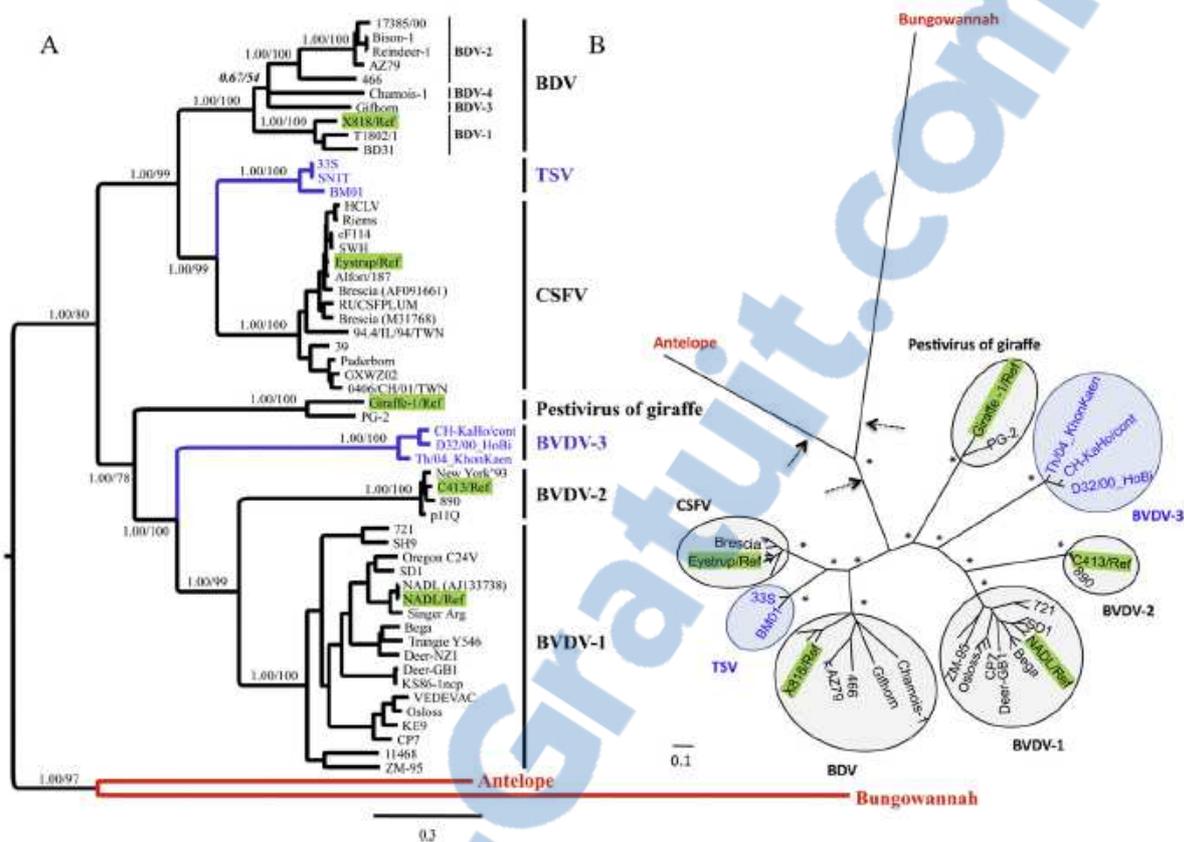


Figure 4 : Phylogénie et classification des pestivirus par la probabilité maximale et approche Bayésienne. Les données moléculaires comprennent 56 échantillons de pestivirus et 2089 caractères, comprenant les régions génétiques 5'UTR, NPro et E2. C'est un arbre représentatif : arbre A mi enraciné et arbre B sans racine. Les séquences servant de références sont surlignées en vert. Les nouvelles espèces proposées dans l'étude sont en bleu (TSV et BVDV-3) et en rouge (Antelope et Bungowannah) (Liu *et al.* 2009).

5.3.2. Diversité génomique au sein du BVD

Il existe deux espèces de BVDV, les **types 1 (BVDV-1)** et **2 (BVDV-2)**. Ces deux espèces de BVD sont **très proches** au niveau génomique. Le degré de différences entre BVDV-1 et BVDV-2 n'est pas défini car la séparation entre ces deux types est basée à la fois sur les différences génétiques, le lieu d'isolement et les relations antigéniques. La variabilité génomique au sein du BVDV-2 (comparaison des séquences 5'UTR) est comprise entre 81 et 99%. Celle du BVDV-1 (comparaison des séquences 5'UTR) est comprise entre 76 et 99% (Vilcek *et al.* 2004).

Au sein du BVDV-1, il existe douze sous-génotypes BVDV-1a à BVDV-1l (mis en évidence aux Etats Unis) et au sein du BVDV-2 il existe deux sous-génotypes **BVDV-2a** et **BVDV-2b** (mis en évidence en Amérique du Sud). Les deux sous-génotypes de BVDV1 les plus représentés en France sont **BVDV-1b** et **BVDV-1e** (<http://bvdobservatoire.fr>). Les différences entre génotypes et sous génotypes sont dues majoritairement à des mutations de type erreur d'incorporation de base par l'ARN polymérase.

D'après Liu *et al.* (2009), la première divergence au sein des pestivirus a eu lieu en 1483, les deux lignées majeures étaient celle d'origine bovine (comprenant BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3 et pestivirus de la girafe) et celle d'origine ovine et porcine (comprenant CSFV, BDV et TSV). (Figure 5)

Autour de 1615, le pestivirus des girafes divergea et évolua indépendamment de la lignée bovine probablement en Afrique. Autour de 1681, ce sont les souches appartenant au BVDV-3 qui ont divergé de la lignée bovine probablement en Amérique du Sud ou dans l'est de l'Asie.

La séparation entre BVDV-1 et BVDV-2 a eu lieu autour des années 1743 lorsque le BVDV-2 évolua indépendamment en Amérique du Nord.

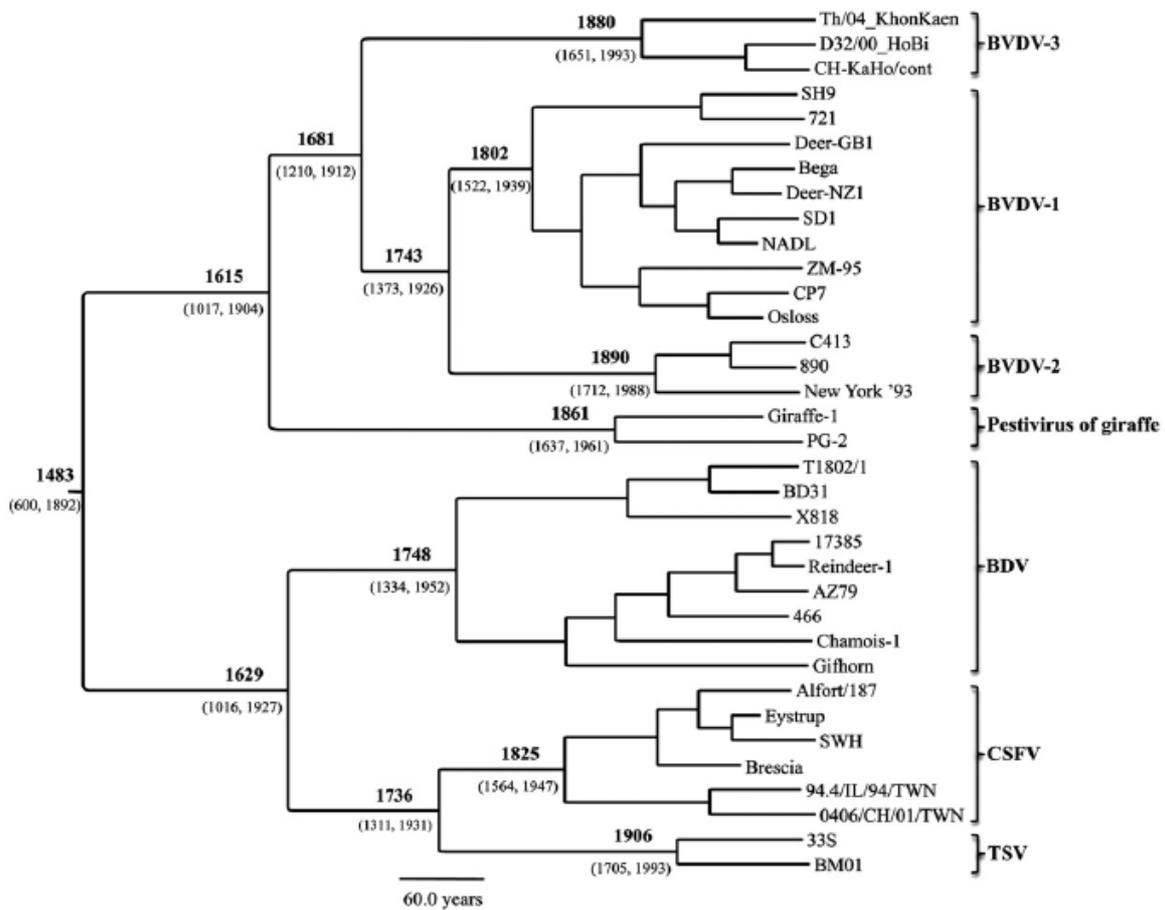


Figure 5 : Dates de divergences des lignées majeures de pestivirus (Liu *et al.* 2009)

Les virus appartenant au BVDV-2 peuvent être très virulents. Pour exemple, une épidémie de diarrhée virale bovine au Québec et au Canada a entraîné la mort de 32000 sur 143000 animaux (22,4%) autour des années 1993. (Liu *et al.* 2009).

D'après l'étude de Ridpath *et al.* (2000), les épidémies de forme hyper virulente de BVDV en Amérique du Nord sont le plus souvent liées à la présence de souches appartenant au BVDV-2. Cependant la présence de virus appartenant à l'espèce BVDV-2 n'implique pas

systématiquement l'apparition de forme hypervirulente. Ceux-ci peuvent aussi entraîner des formes « classiques » de BVD (forme subclinique ou peu clinique). Par ailleurs des formes hypervirulentes de pestivirus ont aussi été observées avec du BVDV-1.

5.3.3. Diversité génomique au sein du BDV

Au sein des pestivirus, les souches de BDV sont plus homogènes génétiquement que les souches de BVD puisqu'elles sont regroupées dans un seul groupe phylogénétique. Au sein du groupe, il existe cependant une variabilité génétique assez importante. Jusqu'en 2008, quatre génotypes majeurs étaient identifiés, les BDV-1, BDV-2, BDV-3 et BDV-4.

Les BDV-1, 2 et 3 ont des génotypes séparés, la variabilité des séquences de la région Npro est située entre 4,1 et 13,8 % entre les virus isolés d'un même sous-groupe. Entre les sous-groupes différents, cette variabilité nucléotidique est située entre 16,4 et 27,7 %. Enfin, entre les génotypes différents (BDV-1/BDV-2, BDV-1/BDV-3, BDV-2/BDV-3), la gamme de divergence des séquences de la région Npro est située entre 28,9 et 37,6 % (Dubois *et al.* 2008).

Dans une étude de 2008 (Dubois *et al.* 2008), deux nouveaux génotypes de BDV ont pu être mis en évidence les BDV-5 et BDV-6 (figure 6).

Le **BDV-5** comprend des souches proches de la souche Aveyronite (AV), isolée pour la première fois en France en 1983 et responsable d'affections sévères dans les élevages de petits ruminants. Au niveau génétique, la séquence 5'UTR présente des similitudes avec les souches espagnoles et françaises isolées à partir de petits ruminants sauvages. Par contre, la séquence NPro ne présente aucune similitude avec des souches déjà connues. Ainsi les chercheurs de cette étude ont classé ces souches dans un nouveau groupe, le BDV-5 avec comme modèle la souche AV déjà connue.

Certaines souches ont été mises en évidence aux mêmes endroits et lors des mêmes périodes que le BDV-3. Ces souches présentaient des divergences notables avec les classes de BDV existantes ce qui a permis de créer une nouvelle classe : le **BDV-6**.

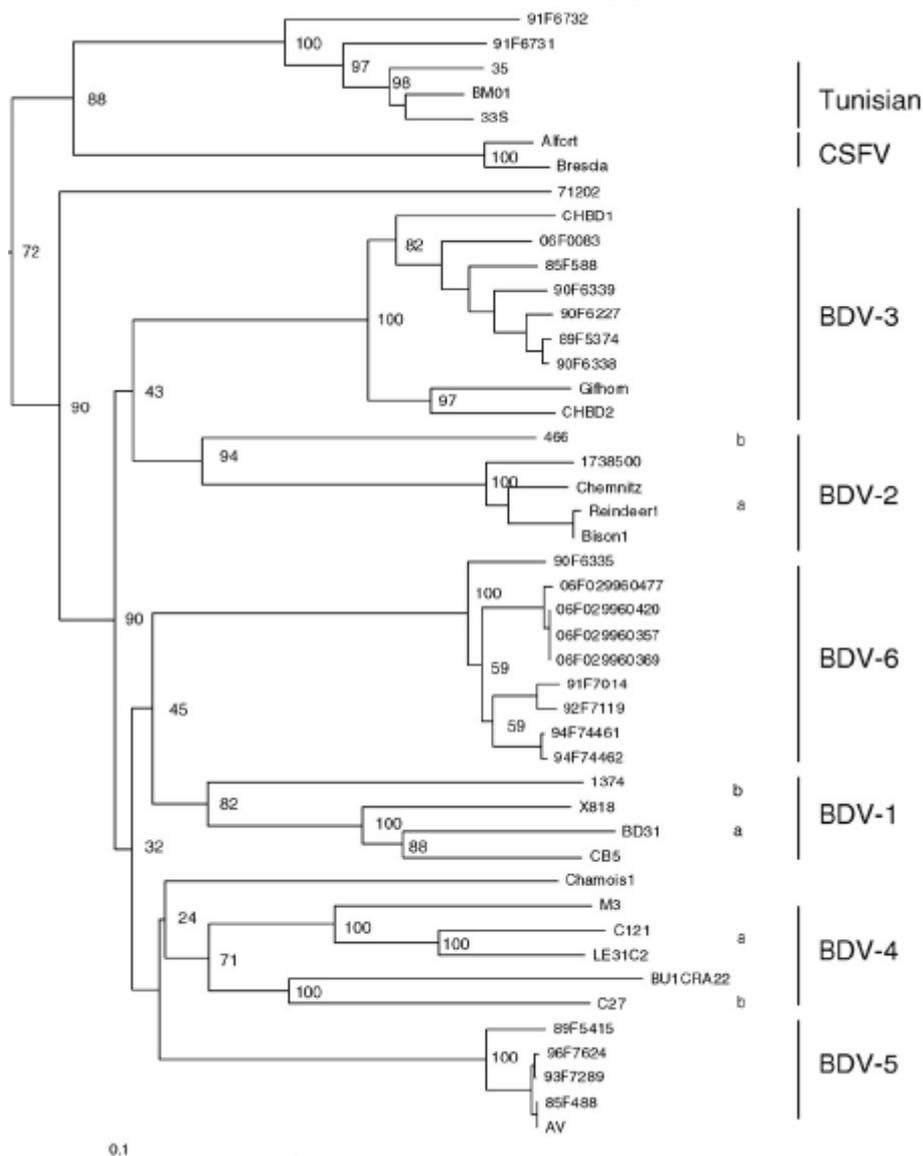


Figure 6 : Arbre phylogénétique à partir de la comparaison des séquences NPro de souches de BDV isolées en France entre 1985 et 2006 (Dubois *et al.* 2008)

5.4. La variabilité antigénique

5.4.1. Variabilité antigénique au sein des pestivirus

Une étude a été publiée en 1989 pour définir les réactions croisées entre anticorps monoclonaux des différentes souches de pestivirus (Cay *et al.* 1989). Cette étude prenait en compte 31 souches de pestivirus (16 souches de BVDV, 7 souches de CSFV et 8 souches de BDV). Les auteurs ont utilisé des anticorps monoclonaux anti CSFV (19), anti BVDV (42) et anti BDV (13). Cette étude a montré que les anticorps monoclonaux anti CSFV réagissaient uniquement avec les souches de CSFV. La moitié des anticorps monoclonaux anti BVDV réagissaient avec les souches BVDV et BDV. Enfin, l'autre moitié des anticorps

monoclonaux anti BVDV et les anticorps monoclonaux anti BDV, réagissaient avec toutes les souches (CSFV, BVDV et BDV). (Figure 7)

Il existe donc des réactions croisées entre les anticorps anti BVDV et anti BDV. Ces deux espèces de pestivirus semblent être proches sur le plan antigénique. Le CSFV semble être éloigné antigéniquement des deux autres espèces.

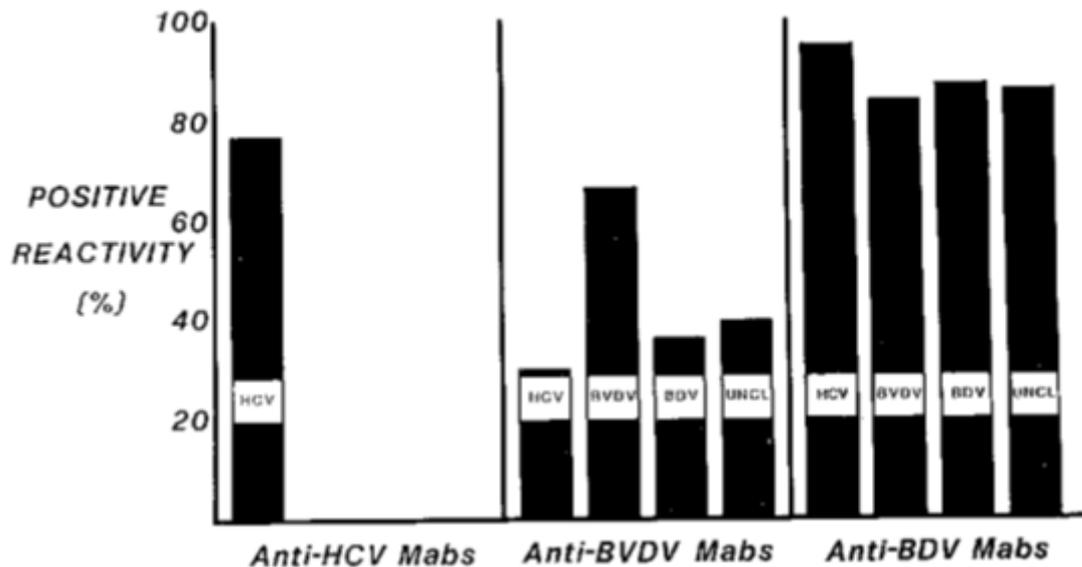


Figure 7 : Réactivité d'anticorps monoclonaux anti-pestivirus contre différentes souches de pestivirus

D'autres études menées en 1988 et 1991, ont montré que des souches de BVDV et BDV pouvaient être distinguées par l'utilisation de certains anticorps neutralisants (Edwards *et al.* 1988, Shannon *et al.* 1991).

Des anticorps monoclonaux spécifiques de la Border Disease n'ont pu être mis en évidence dans aucune des études publiées.

Des études ont été menées avec des anticorps polyclonaux pour différencier antigéniquement les pestivirus. La distinction des pestivirus par l'utilisation de ces anticorps est impossible selon plusieurs études (Wensvoort *et al.* 1989). Ceci montre que toutes les espèces de pestivirus présentent des antigènes communs.

La variabilité antigénique des pestivirus est due majoritairement à la **glycoprotéine E2**. Cette glycoprotéine est transmembranaire. Elle est à l'origine de la sécrétion des anticorps neutralisants. Plusieurs épitopes ont été mis en évidence sur cette protéine (Van Rijn *et al.* 1994). Il semble que cette protéine possède deux séquences hydrophiles très variables (Deng *et al.* 1992). Dans une autre étude, il a été montré que E2 présentait deux domaines antigéniques, l'un conservé d'une espèce à l'autre, l'autre non (Paton *et al.* 1992).

5.4.2. Variabilité antigénique au sein du BVD

Il y a des différences antigéniques entre les différents sous génotypes de BVDV-1. Le sérum dirigé contre le BVDV-1k neutralise de manière très faible les autres sous génotypes, alors que les sérums dirigés contre les autres sous génotypes semblent être efficaces contre le BVDV-1k (Bachofen *et al.* 2008).

Les réactions croisées entre les différents sous génotypes de BVDV-1 sont plus importantes que les réactions croisées entre BVDV-1 et BVDV-2. Par ailleurs, l'immunisation contre le BVDV-1 entraîne une protection croisée limitée contre le BVDV-2 (Ridpath *et al.* 2000). Cette absence de protection croisée totale a permis l'apparition d'épidémies à BVDV-2 en Amérique du Nord dans les années 1990 sur des cheptels vaccinés contre le BVDV-1 (Bachofen *et al.* 2008).

D'après l'étude de Cortese *et al.* (1998), un vaccin vivant atténué dirigé contre le BVDV-1 a induit l'apparition d'anticorps neutralisants contre les BVDV-1 et BVDV-2 un mois et demi après vaccination. Toutefois, le titre en anticorps produits contre les souches de BVDV-1 est d'un log plus important que celui en anticorps produits contre les souches de BVDV-2. Les titres en anticorps anti BVDV-2 étaient en moyenne inférieurs à 1/16. Une épreuve d'inoculation avec une souche hypervirulente de BVDV-2 sur des veaux a montré qu'un titre inférieur à 1/16 en anticorps neutralisants entraînait des signes cliniques sévères. La réaction croisée entre BVDV-1 et BVDV-2 existe mais la protection dépend du taux d'anticorps neutralisant produit et ce taux est souvent insuffisant.

5.4.3. Variabilité au sein des BDV

Il n'existe pas d'étude de la variabilité antigénique au sein du BDV.

5.4.4. Conséquences de la variabilité des pestivirus

La diversité des pestivirus est étroitement associée à leur capacité à franchir la barrière d'espèce, notamment pour le virus BVD. Les conséquences portent sur le rôle éventuel de l'infection de la faune sauvage par le BVD sur l'épidémiologie et les moyens de contrôle de cette maladie chez les ruminants domestiques.

Cette diversité peut entraîner des problèmes de diagnostic. La diversité génétique des pestivirus oblige à adapter les outils diagnostics (amorces et sondes PCR). Théoriquement la variabilité génétique pourrait être à l'origine de résultats faux négatifs en cas d'infection par une souche très éloignée génétiquement des souches reconnues par les trousseaux diagnostiques.

En pratique, la plupart de ces trousseaux utilisent des régions très conservées pour l'amplification de l'ARN et sont contrôlées vis-à-vis d'un large panel de souches de pestivirus. La variabilité antigénique peut aussi poser des problèmes de sensibilité des tests antigéniques (ELISA).

La variabilité des pestivirus oblige aussi à adapter les connaissances en termes de protection vaccinale. Il est communément admis une protection croisée entre différents sous-types du BVDV-1. Par contre la diversité antigénique des souches virales pourrait être à l'origine de certains échecs vaccinaux, notamment lorsqu'il s'agit d'une variation inter génotype entre BVDV-1 et BVDV-2. S'il est communément admis une protection croisée des animaux infectés par du BVDV-2 et préalablement vaccinés avec du BVDV-1, il semblerait que les souches de BVDV-2 confèreraient moins de protection croisée vis-à-vis des souches de génotype 1. Par ailleurs la protection croisée entre BDV et BVDV-1 n'a jamais été évaluée.

II/ LES PESTIVIROSES DES RUMINANTS

1. Epidémiologie descriptive

1.1. Les pestiviroses dans le Monde

Les pestivirus sont présents dans le monde entier.

Le BVDV a été décrit pour la première fois à la fin des années 40 par les chercheurs du New York State Veterinary College. La maladie s'est développée à travers le monde entier et entraîne encore aujourd'hui d'énormes pertes économiques. Elle touche majoritairement les bovins, mais aussi les petits ruminants, les camélidés, les cervidés, etc...

La maladie des Frontières (ou Border Disease) a été décrite pour la première fois en 1959 à la frontière entre l'Angleterre et le Pays de Galles (Hughes *et al.* 1959). Cette maladie touche les ovins et les caprins (plus rare). Un article paru en 2009 au Royaume Uni fait part de quelques cas de contamination de bovins (Strong *et al.* 2009). On rencontre la maladie des Frontières partout en Europe ainsi qu'en Amérique du Nord, en Australie et en Nouvelle Zélande.

La transmission de ces deux maladies peut être verticale ou horizontale (voie oro-nasale).

1.2. Les pestiviroses en France

Le virus de la diarrhée virale bovine est présent dans la plupart des départements Français. Des mesures de contrôle sont mises en place par divers départements pour tenter de limiter la maladie. La plupart des souches détectées en France sont des BVDV-1. Les régions les plus touchées par le BVDV sont l'Auvergne, le Pays de la Loire et la Bourgogne. D'après la carte cumulative régionale de l'Observatoire du BVD, les souches les plus représentées en France font partie des BVDV-1e et 1b (<http://bvdobservatoire.fr>).

Le virus de la Border Disease a été à l'origine d'une épizootie majeure en Aveyron dans les années 1980. La forme aigue observée alors avait été appelée « Petega Ovina ». En tout, en six mois, cette épizootie a atteint 112 troupeaux causant la mort de 1501 brebis et 23908 agneaux (Bernardin, 2011). Les commémoratifs chez la brebis mentionnent de façon constante un aspect ébouriffé et une entérite hyperthermisante avec diarrhée très liquide souvent noirâtre, parfois hémorragique. Des saignements, une baisse de l'appétit et de la production laitière, des troubles respiratoires et des avortements ont aussi été rapportés. La mortalité a atteint 5 à 20% en fonction des élevages. Les symptômes disparaissaient en 4 à 12

semaines. Les mêmes manifestations cliniques furent observées chez les agneaux. Aucun traitement spécifique ne s'est révélé efficace : antibiotiques, substances immunostimulantes ; seuls les traitements symptomatiques ont permis de limiter les pertes. L'agent infectieux n'était alors pas connu. Depuis cet évènement, un suivi sérologique a été mis en place dans le département de l'Aveyron. Il s'agit du seul département français dans lequel une surveillance de la Border Disease est organisée à échelle collective. La gestion du plan de surveillance est réalisée par la Fédération des organismes de défense sanitaire de l'Aveyron (FODSA GDS 12) en partenariat avec la filière ovine. Ce dépistage permet de repérer les cheptels infectés et de leur proposer un plan de maîtrise de la maladie (Cf Lutte contre les pestivirus des ruminants).

2. Pathogénie

2.1. Infection transitoire

Après pénétration par voie oro-nasale, le virus se multiplie au niveau de l'arbre respiratoire et gagne le système lymphoïde. Cette phase est suivie d'une virémie lors de laquelle le virus infecte les cellules mononuclées sanguines et/ou reste sous forme libre dans le compartiment sanguin.

La virémie n'est donc pas exclusivement associée aux cellules mais la détection du virus est plus efficace à partir des cellules mononuclées, en rapport avec une charge virale plus importante. La durée de cette phase est de quelques jours.

2.2. Infection persistante

Les pestivirus ont la particularité de pouvoir traverser la barrière placentaire et infecter le fœtus, lors d'infection transitoire de la mère. Si l'infection du fœtus se fait entre la fin de l'embryogénèse et l'acquisition de l'immunocompétence (entre J20 et J65 de gestation chez les ovins et entre J42 et J125 de gestation chez les bovins) et que le fœtus survit, le veau naîtra infecté permanent et immunotolérant (IPI). Il reconnaît les antigènes viraux comme des antigènes du soi, présentera alors une virémie persistante, ne fabriquera pas d'anticorps contre le virus et sera une excellente source de contamination : sécrétion du virus dans les sécrétions nasales et oculaires, l'urine, la semence, le lait et les fèces. Ces animaux IPI sont la principale source de dissémination du virus.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce processus d'infection persistante. La période à risque correspondrait à la période d'apparition des récepteurs viraux lors du développement des cellules fœtales. Cette phase de sensibilité du fœtus correspondrait aussi à la période pendant laquelle le système immunitaire spécifique du veau est encore non compétent tandis que cesse l'immunité maternelle et notamment l'immunité antivirale conférée par l'interféron τ d'origine maternelle placentaire (effet jusqu'à 30 jours). Pendant cette fenêtre si la réponse immune adaptative du fœtus est incapable de se mettre en place, la réponse innée antivirale est, elle, active dès le début de la gestation, notamment via le système des interférons de type I (INF-I). Or les souches ncp possèdent des mécanismes qui permettent de limiter la réponse en INF-I des cellules, contrairement aux souches cp. Deux mécanismes sont mis en jeu : l'un par l'action de la protéine Npro qui cible la protéine cellulaire IRF3 et bloque la production d'INF-I ; l'autre par la protéine secrétée Erns qui a une action Rnase et qui limite la réponse des INF-I induite par les molécules ARN simple et double brins. Les souches CP produisent, elles, de très grandes quantités d'ARN viraux car leurs cycles de réplication sont amplifiés, contrairement aux souches ncp. La présence de grandes quantités d'ARN déborderait ainsi le système de régulation Erns, le tout dans un contexte fœtal particulier.

3. Signes cliniques

Les signes cliniques dépendront :

- De l'hôte : de son immunocompétence vis-à-vis du virus, de son âge et du stade de gestation au moment de l'infection.
- De la souche virale en cause

Les manifestations cliniques provoquées par les virus de la diarrhée virale bovine et de la Maladie des Frontières sont assez proches.

3.1. Animaux adultes non gravides

Les bovins ou ovins adultes touchés par la maladie ne souffrent en général que d'une infection peu clinique ou subclinique. Il peut y avoir apparition d'un syndrome fébrile, d'une légère leucopénie ou de troubles diarrhéiques banaux après la contamination.

Cependant, dans de rares cas, certaines souches de BDV et BVDV entraînent des symptômes plus graves comme une forte fièvre, de l'anorexie, du jetage, une conjonctivite, de la dyspnée,

de la diarrhée et une mortalité des agneaux de 50% environ. Une épidémie de cette forme a eu lieu en France en 1984 avec la souche AV du BDV (Aveyron).

De plus, certaines formes de BVDV (en grande majorité du BVDV-2) peuvent entraîner un syndrome thrombo-hémorragique avec l'apparition d'hyperthermie, d'abattement, de diarrhée hémorragique, de pétéchies et diverses hémorragies. Cette forme est associée à une mortalité élevée.

3.2. Animaux adultes mâles reproducteurs

Les pestivirus se retrouvent dans la semence des mâles IPI ou infectés transitoires. La semence des animaux IPI sera néanmoins plus contaminée que celle des animaux infectés de manière transitoire. Le virus survit aux procédés de préparation à l'insémination artificielle.

3.3. Animaux adultes gravides

La femelle gravide infectée par le virus ne présentera pas de signes cliniques par contre le fœtus risque de souffrir de cette infection. L'infection par le virus BVD entraîne ainsi de nombreux troubles de la reproduction, tels que des anomalies du fonctionnement ovarien (croissance folliculaire, ovulation, fécondation), du développement embryonnaire puis fœtal, une mortalité de l'embryon et du fœtus ou diverses malformations fœtales, ainsi qu'une morbidité et une mortalité néonatales (figure 8). Les troubles de la reproduction lors d'infection transitoire peuvent être consécutifs à une contamination du tractus génital, suite à l'insémination chez la femelle, mais ils apparaissent le plus fréquemment à la suite d'une contamination par voie nasale (aérosol) ou digestive.

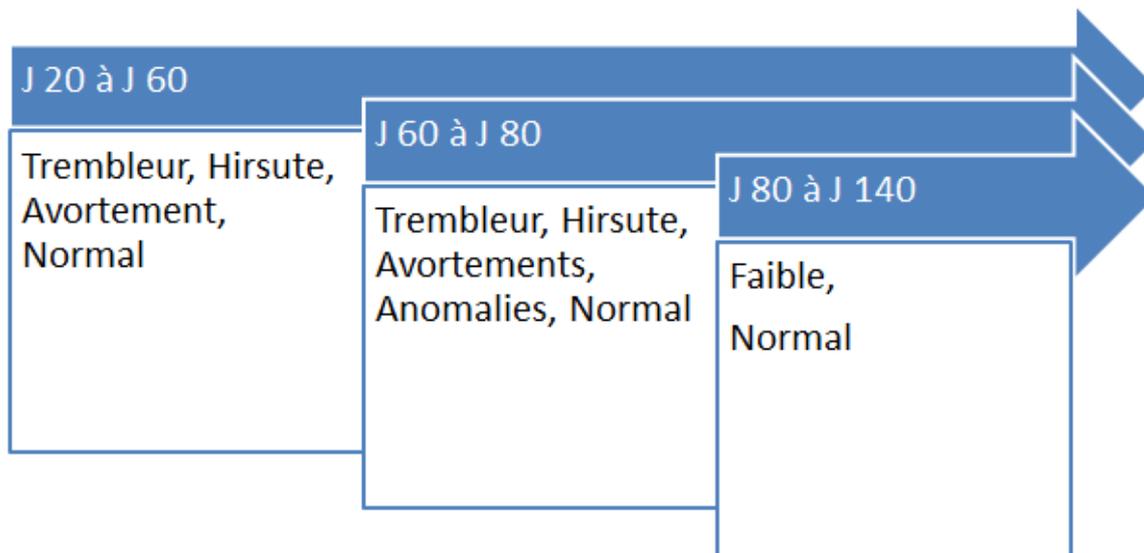


Figure 8 : Conséquences possibles de l'infection par le BDV selon le stade de gestation de la brebis (Meyer 2012)

Anomalie du fonctionnement ovarien

Lors de l'infection transitoire de la femelle par le BVD, on peut observer une ovarite interstitielle diffuse et une perturbation de l'ovulation. La femelle exprime moins ses chaleurs et il est plus difficile de l'inséminer au bon moment.

Mortalité embryonnaire

Tout d'abord, l'infection par les pestivirus peut entraîner des effets délétères directs sur l'embryon. L'infection peut aussi rendre le milieu utérin hostile au développement embryonnaire. La mortalité de l'embryon peut être consécutive à l'infection de la mère par la voie oro nasale ou intra utérine (insémination avec du sperme contaminé, miction de taureau lors de saillie naturelle, auto contamination avec urine contaminée de la femelle lors des chaleurs).

Avortement

Les virus du BVD et de la BD peuvent entraîner des avortements tout au long de la gestation. Dans le cas d'infection par le BVDV, l'avortement a lieu entre neuf jours et trois mois après l'infection. Lorsqu'un troupeau est infecté, en raison des conséquences différentes de l'infection en fonction du stade de la gestation, l'éleveur observe d'abord les avortements, puis les anomalies du veau nouveau-né. Les dégâts peuvent être importants, jusqu'à 60% de pertes

(avortements et mortalité néonatale) dans un troupeau. L'incidence des avortements est significativement supérieure dans les troupeaux qui viennent de s'infecter, avec un risque 2,6 fois plus important que dans les troupeaux témoins non infectés (séronégatifs) dans l'année qui suit l'introduction du virus et plus de onze fois supérieur au cours de la deuxième année.

Malformations

Lorsque l'infection transplacentaire a lieu entre le 90^e et le 150^e jour (autour du 70^e jour pour les ovins), le pestivirus peut induire la destruction ou l'endommagement des cellules souches et diverses malformations du cerveau telles que l'hydrocéphalie, l'hydranencéphalie ou l'hypoplasie cérébelleuse (d'où ataxie), ainsi qu'une hypomyélinisation ou une dysmyélinisation. Ces anomalies se traduisent à la naissance par des veaux et d'agneaux faibles, tremblants, incapables de se lever et de téter, ataxiques ou dont la posture est anormale. Des atteintes de la vision font également partie des malformations les plus répandues des fœtus infectés. Une autre cible principale du virus est le squelette entraînant une stature trapue et courte, des torticolis, des malformations faciales, de l'arthrogrypose. Certains présentent un pelage hirsute.

Mortalité néonatale

Le BVDV est responsable d'un retard de croissance intra-utérine qui se manifeste à la naissance par un poids faible des veaux nés IPI, l'incapacité à se lever et se nourrir. Lors de l'infection des ovins, on va observer que les agneaux vont avoir du mal à se tenir debout, ils vont présenter des anomalies de la toison et des signes nerveux (tremblements). Les symptômes nerveux pourront disparaître entre 3 et 6 mois d'âge. Ces agneaux risquent néanmoins de mourir à n'importe quel moment.

Naissance d'animaux IPI

Les pestivirus ont la particularité de pouvoir traverser la barrière placentaire et infecter le fœtus, lors d'infection transitoire de la mère. Si l'infection du fœtus se fait entre la fin de l'embryogénèse et l'acquisition de l'immunocompétence (entre J20 et J65 de gestation chez les ovins et entre J42 et J125 de gestation chez les bovins) et que le fœtus survit, le veau naîtra infecté permanent et immunotolérant (IPI).

Les animaux IPI ne présenteront pas ou peu de signes cliniques à la naissance, ils présenteront par la suite une espérance de vie courte, d'environ 2 à 4 ans pour les bovins. L'IPI peut être peu viable (syndrome du veau faible), avoir un développement retardé (retard de croissance) ou souffrir de diverses surinfections. Cependant les animaux IPI ne sont pas systématiquement atteints de retards de croissance ou d'anomalies congénitales, il est donc possible qu'ils soient choisis comme taureaux reproducteurs. Les animaux naissant IPI qui arrivent à l'âge adulte et sont mis à la reproduction, donneront naissance à des animaux IPI à leur tour. La qualité de leur semence est variable. Beaucoup présentent des semences de mauvaise qualité (faible motilité, faible concentration, nombreuses anomalies), tandis que d'autres ont des spermatozoïdes apparemment normaux d'après les critères habituels du spermogramme. De même, la fertilité des taureaux IPI varie selon les animaux.

Les bovins IPI peuvent développer une maladie qu'on appelle la maladie des muqueuses soit sous la forme aiguë (syndrome fébrile, inflammations buccales, ulcères interdigités, dermites, larmolement et mortalité de 80 à 90%), soit sous la forme chronique (mêmes symptômes mais moins sévères, signes cutanés plus développés que dans la forme aiguë).

Dans le cas d'une forme aiguë de la maladie des muqueuses, à l'autopsie on pourra observer des lésions ulcérales du mufle, des narines, de la lèvre supérieure et de la cavité buccale associées à une congestion diffuse de la muqueuse. Les lésions de l'œsophage sont fréquentes dans le tiers proximal : ulcères ou érosions irrégulières de petite taille. Les piliers du rumen et les lames du feuillet peuvent présenter des ulcères à base congestive ou hémorragique. La caillette est fréquemment atteinte et présente une muqueuse congestive avec pétéchies et petits ulcères ronds entourés d'un liseré congestif. La muqueuse de l'intestin grêle apparaît souvent normale, parfois une entérite catarrhale est mentionnée. Les plaques de Peyer présentent des lésions marquées : nécrose, hémorragies et ulcérations. Au niveau du caecum et du colon, les lésions sont variables : une typhlocolite fibrino-hémorragique est le plus souvent rapportée.

Dans le cas d'une forme chronique de la maladie des muqueuses, les lésions rencontrées sont généralement modifiées par les traitements qui ont été entrepris ou par les surinfections (bactériennes ou mycosiques). Elles diffèrent peu de celles de la forme aiguë. Les atteintes de la cavité buccale et de l'œsophage apparaissent moins marquées. Par contre, les lésions jéjuno-iléite ulcérales sont plus étendues et ne sont pas limitées au tissu lymphoïde. Une typhlo colite fibrineuse ou fibrino-nécrotique avec ulcération focale ou étendue, particulièrement au niveau du caecum et du rectum, une vasculite nécrosante de la sous muqueuse peuvent s'observer. Une dermatite interdigitée exsudative ainsi qu'une inflammation ulcérale au niveau des sabots se rencontrent lors de formes chroniques. Une

ulcération chronique cutanée est rapportée principalement au niveau du périnée (Cherel *et al.* 2006).

Les ovins IPI peuvent développer un syndrome proche de la maladie des muqueuses avec des écoulements nasaux et oculaires, détresse respiratoire et ulcères des muqueuses. A l'autopsie des ovins IPI, on observe un épaissement de la muqueuse de l'ileum distal, du caecum et du colon.

III/ Lutte contre les pestiviroses des ruminants

1. Diagnostic

1.1. Diagnostic épidémio-clinique et nécropsique

La suspicion clinique est un élément important pour la première étape du diagnostic de la maladie, cependant elle ne constitue pas en elle-même un diagnostic de certitude.

Le diagnostic différentiel se fera avec l'ataxie enzootique (carence en cuivre provoquant des anomalies de la toison et des troubles nerveux), et les autres maladies abortives comme la brucellose, la chlamydie, la fièvre Q et la toxoplasmose.

1.2. Diagnostic de laboratoire

Il n'y a pas de laboratoires de référence pour le diagnostic de la Border Disease. La plupart des laboratoires départementaux réalisent le diagnostic des pestiviroses de ruminants et deux laboratoires nationaux de référence pour le BVD sont aussi en charge du diagnostic de la BD. Le diagnostic de la maladie repose sur des techniques directes de détection du virus ou indirectes de détection des anticorps anti BDV.

1.2.1. Détection du virus

Plusieurs méthodes de détection existent :

- Isolement viral en culture cellulaire

Cette technique consiste à mettre en culture un échantillon sur des cellules cibles. Si cet échantillon est contaminé par le virus, le virus se développera et on le mettra alors en évidence grâce à des techniques immunologiques (immunofluorescence, immunoperoxydase) dans la mesure où la plupart des souches circulantes sont ncp.

Les cellules utilisées pour la mise en culture sont surtout des cellules rénales, testiculaires ou pulmonaires d'origine ovine.

Les échantillons à tester sur les animaux vivants peuvent être préférentiellement du sang total, voire du sperme ce dernier type d'échantillon nécessite une dilution au 1/10 au moins (cytotoxicité du sperme complet)

Les échantillons à tester sur les animaux morts peuvent être préférentiellement du tissu splénique, du tissu thyroïdien, du tissu rénal, voire du tissu encéphalique, du tissu lymphatique et du tissu intestinal. Le délai de réponse de ce test est de 6 à 8 jours si c'est positif et le double si c'est négatif.

Cette méthode de mise en évidence du virus est encore considérée comme la méthode de référence, bien que peu utilisée. Elle apparaît moins sensible que la PCR et risque de fournir des résultats faussement positifs si le virus est inactivé par des anticorps colostraux (prélèvement chez le jeune < 4 mois) ou par des anticorps présents dans le sérum de veau fœtal utilisé pour les cultures cellulaires par exemple.

Cette technique est adaptée à la recherche des IPI mais est déconseillé pour les animaux de moins de trois mois car les anticorps colostraux peuvent empêcher l'isolement viral.

- Détection des antigènes viraux (ELISA ag)

Les détections virales peuvent se faire par tests ELISA antigène. Ces tests consistent à mettre en contact les échantillons et des anticorps monoclonaux spécifiques au virus conjugués ou non à la peroxydase. S'ils ne sont pas marqués, un système de détection secondaire (anticorps couplés à la peroxydase dirigés contre les anticorps monoclonaux spécifiques) est utilisé. Les antigènes recherchés sont surtout NS2-3, voir E0 ou E2. Il n'existe pas de tests spécifiques pour la détection du BDV. Dans la mesure où NS2-3 est très conservée entre pestivirus, ces sont les tests NS2-3 BVD qui sont utilisés pour le BDV.

Lors d'infection permanente, la sensibilité est très bonne et s'approche de celle de l'isolement viral (titres viraux élevés). Lors d'infection transitoire, la sensibilité est plus réduite (titres viraux plus faibles).

Chez les animaux de moins de 3 mois, le test ELISA reste néanmoins peu fiable en raison de la présence possible d'anticorps colostraux.

C'est une méthode simple, peu coûteuse et rapide pour classer un grand nombre d'échantillons.

- Détection des acides nucléiques (RT-PCR)

La technique consiste, après rétrotranscription de l'ARN viral en ADN complémentaire, à amplifier un fragment de génome présent dans un échantillon. Les prélèvements peuvent être du sang total, du sérum, du plasma, du lait et des biopsies d'organes. Compte tenu de la

grande variabilité des pestivirus, les kits commerciaux ont été conçus pour détecter l'ensemble des souches connues de BVDV et BDV, souvent en utilisant deux à trois couples d'amorces différentes.

C'est une technique plus sensible et plus spécifique que l'isolement viral, notamment si on utilise une RT-PCR quantitative, qui est la technique la plus utilisée actuellement. Elle permet la détection de quantité très faible d'ARN viral et peut être effectué sur des mélanges de prélèvements de plusieurs individus (mélange de 20 pour le sang, lait de tank). Par ailleurs, ce test est indiqué pour la recherche du statut des jeunes animaux encore sous immunité colostrale.

Les aspects négatifs de ce test restent son prix et l'équipement nécessaire pour l'effectuer. Néanmoins, la possibilité de tester plusieurs échantillons mélangés diminue nettement les coûts.

1.2.2. Détection des anticorps

- Test de séroneutralisation

La technique consiste à quantifier le nombre d'anticorps neutralisants présent dans un échantillon, la plupart du temps le sérum. On met en contact le sérum à différentes dilutions avec un titre constant de virus. Le virus non neutralisé est révélé par la suite, soit par visualisation de l'effet cytopathique soit par immunohistochimie pour les souches virales ncp. On utilise préférentiellement des souches cytopathiques pour détecter plus facilement la neutralisation du virus (virus non neutralisé => cellules lysées).

Certains auteurs ont étudié l'efficacité de vaccins dirigés contre le BVDV par cette technique (Hamers *et al.* 2002). Pour les souches ncp, les virus non neutralisés étaient détectés par réaction avec une immunoperoxydase ou par immunofluorescence. Pour les souches cp, les virus non neutralisés étaient détectés par coloration au cristal violet. Chaque puit était soit positif soit négatif pour la présence de virus. Les différentes techniques utilisées en fonction du biotype peuvent affecter les résultats obtenus. Cette technique de diagnostic est controversée, en effet il n'existe pas de méthode universellement reconnue pour déterminer le titre en anticorps neutralisants. De plus, il n'existe pas de challenge standardisé ni de définition standardisée de protection.

C'est une méthode de référence car sensible et spécifique. Cependant, elle présente un coût important et est compliquée à mettre en œuvre. Il y a un délai de 5 à 7 jours pour obtenir les résultats.

- ELISA indirecte et ELISA compétition

Ces tests sont peu coûteux, automatisables et rapides.

Le principe de l'ELISA indirecte consiste à verser l'échantillon à tester sur un tapis d'antigènes (protéine E0 et/ou NS3). Les anticorps présents dans l'échantillon se fixent aux antigènes et sont révélés secondairement par un révélateur. Cette méthode est qualitative mais non quantitative même si la densité lumineuse est reliée à la quantité d'anticorps présents.

La sensibilité de ce test paraît souvent meilleure que celle de la séroneutralisation. La spécificité est quant à elle plus basse.

L'ELISA compétition consiste à mettre en compétition les anticorps de l'animal avec un anticorps monoclonal anti NS3 marqué à la peroxydase. Les échantillons sont mis au contact avec de la NS3 (fixée dans des puits). Si des anticorps spécifiques sont présents ils se fixent sur la NS3 qui est alors masquée. On ajoute ensuite des anticorps monoclonaux anti NS3 couplés à une enzyme. S'il y a des anticorps dans l'échantillon, il n'y aura pas de fixation possible. Sinon, ils se fixeront sur les NS3 des puits.

1.3. Interprétation des tests de laboratoire

Une *virémie positive* indique que l'animal est IPI ou infecté transitoire. Si le test est deux fois positif à 4 semaines d'intervalle l'animal est IPI dans la mesure où la virémie lors d'infection transitoire est de 15-21 jours.

Une *virémie négative* indique que l'animal n'est pas IPI ni infecté transitoire. L'animal a cependant pu être infecté transitoire. Il ne représente pas de risques pour ces congénères sauf s'il est en tout début d'infection. Ce dernier point est extrêmement rare car un début d'infection ne justifie pas de prélèvements sur le terrain.

Une *sérologie positive* en séroneutralisation indique que l'animal est immunocompétent suite à une infection et/ou une vaccination. Les anticorps neutralisants peuvent persister plus de 3 ans. Chez un jeune de moins de 4-6 mois un test positif peut aussi révéler la présence d'anticorps colostraux. Enfin un animal IPI ne produit pas d'anticorps contre la souche ncp qui l'infecte. Par contre, il peut produire des anticorps contre la protéine E2 (non conservée) s'il est surinfecté par une souche antigéniquement éloignée.

Une *sérologie négative* indique que l'animal n'a pas été infecté, qu'il est en cours de séroconversion ou IPI.

2. Les vaccins contre les pestivirus

La vaccination a plusieurs objectifs : éviter l'apparition de signes cliniques, réduire l'excrétion virale des animaux infectés transitoires et des animaux IPI et limiter la naissance de nouveaux animaux IPI. Pendant longtemps, les vaccins visaient aux deux premiers objectifs, notamment parce que la pathogénie des IPI était peu connue. Depuis, et dans la mesure où les IPI représentent la principale source de contamination, la protection fœtale des mères vaccinées contre une infection à pestivirus est une priorité absolue des vaccins. Selon les pays, les exigences quant à la démonstration d'une protection fœtale peuvent être différentes. En France, pour avoir une indication de protection fœtale, il faut, lors d'une inoculation d'épreuve, obtenir 100% d'animaux IPI dans le groupe contrôle (au moins 12 bovins) et une protection fœtale dans plus de 90% des animaux vaccinés (au moins 8 bovins). Les vaccins doivent de plus être sûrs et faciles d'utilisation. Il faut aussi prendre en compte les interférences qu'une vaccination peut entraîner lors d'un dépistage. Il n'existe pas, à l'heure actuelle de vaccins spécifiques contre le BDV. Par contre de nombreux vaccins contre le BVD ont été produits.

2.1. Bases scientifiques : la réponse immunitaire contre les pestivirus

La réponse immunitaire innée est active avant la réponse immunitaire adaptative.

L'interferon de type I (IFN-I) est un agent clé de la réponse immunitaire antivirale innée. La réponse immunitaire innée est spécifique par certains aspects. Elle détecte des éléments qui sont communs à plusieurs agents pathogènes (« pathogen-associated molecular patterns », PAMP). Ces éléments peuvent être détectés par des récepteurs se trouvant sur les cellules du système immunitaire (intra ou extracellulaire) : il peut s'agir de Toll-like receptors (TLR), de RIG-I-like receptors (RLR) ou de NOD-like receptors (NLR). La reconnaissance des pathogènes par le système immunitaire inné est un prérequis pour l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans la réponse immunitaire primaire et jouent aussi un rôle important dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules dendritiques sont activées par les PAMP et produisent des cytokines, dont la plus importante est IFN-I, qui font le lien entre réponse immunitaire innée et adaptative. Par la suite la réponse immunitaire cellulaire et humorale sont activées (Peterhans *et al.* 2010).

La réponse immunitaire adaptative est à la fois humorale et cellulaire. L'infection par le BVD entraîne à la fois une sécrétion de lymphocytes T CD4+ et lymphocytes T CD8+. Les

lymphocytes T CD4+ jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire contre le BVDV : ils ont un rôle à la fois dans la régulation de la réponse immunitaire cellulaire mais aussi dans la régulation de la réponse immunitaire humorale. Lors d'une diminution des lymphocytes T CD4+, les signes cliniques des animaux infectés transitoirement sont prolongés. Ces lymphocytes peuvent reconnaître des protéines structurales (Erns et E2), et des protéines non structurales (NPro et NS2-3) (Collen *et al.* 2000). Les réponses cellulaires spécifiques sont détectables après 6 à 8 semaines après une infection par une souche ncp, alors qu'ils sont détectables après 3 à 4 semaines après une infection par une souche cp (Brackenbury *et al.* 2003).

Les anticorps spécifiques du virus sont détectés rapidement après l'infection et dans les mêmes laps de temps que cela soit lors d'une infection par souche cp ou ncp. L'immunité humorale est insuffisante pour éliminer les cellules infectées par le virus (Collen *et al.* 2000).

Le BVDV entraîne une immunodéficience chez la plupart des animaux touchés. Ceci pourrait être dû à de nombreux facteurs : une baisse de la production de lymphocytes, à une augmentation de sécrétion de la prostaglandine E2, à une diminution de l'activité microbicide, à une migration aléatoire des granulocytes neutrophiles, à une diminution de la sécrétion d'immunoglobulines et à une diminution de l'expression du complément et de la production de récepteurs Fc et de chémokines. L'immunodéficience liée à l'infection par le BVDV est encore un sujet de débats (Peterhans *et al.* 2003).

Lors d'une infection transitoire chez un adulte qui n'a jamais été en contact avec le BVDV, celui-ci présente une réaction immunitaire innée qui fait intervenir l'IFN-I quel que soit le biotype du virus infectant. (Peterhans *et al.* 2010)

Lors d'infection d'un fœtus, on observe une différence dans la réponse immunitaire selon le biotype. Les souches ncp ne provoquent pas de réponse par l'IFN-I alors que les souches cp entraînent cette réponse. C'est cette absence de réponse par l'IFN-I qui entraîne l'infection permanente du fœtus et son statut d'animal IPI. Pendant la réplication, les deux biotypes expriment Npro et Erns. Lorsque Npro est exprimé par une cellule infectée, il cible le facteur de transcription IRF-3, ce qui inhibe la sécrétion d'IFN. De plus, la protéine structurale Erns a aussi une action qui bloque la synthèse des IFN par les cellules infectées mais aussi les non infectées. (Peterhans *et al.* 2010)

Le biotype cp produit plus d'ARN double brin que le ncp, ceci augmente le nombre de PAMP. L'hypothèse principale est que, dans le cadre de l'infection permanente du fœtus, ces nombreux signaux dépassent les capacités de Npro et Erns à inhiber la synthèse des IFN. Ce qui expliquerait que lors de la contamination par une souche ncp du fœtus, il n'y ait pas de sécrétion d'IFN (Peterhans *et al.* 2010).

2.2. Vaccination BVDV chez les bovins

Les premiers vaccins BVD ont été produits aux Etats Unis dans les années soixante et plus d'une cinquantaine de vaccins existent dans ce pays. En France, les vaccins actuellement disponibles sont soit des vaccins vivants modifiés soit inactivés. Ils peuvent être monovalents ou associés à d'autres valences comme le virus respiratoire syncytial, le virus parainfluenza 3 et *Mannheimia haemolytica*.

Les vaccins vivants modifiés peuvent être atténués par passages successifs sur des cultures cellulaires homologues (exemple : Mucosiffa nd) ou mutés par thermosensibilisation (exemple : Rispoval BVD nd).

Les côtés positifs de ces vaccins sont leur capacité à induire une réponse immunitaire efficace et rapide, ils nécessitent une seule injection de primovaccination. Après vaccination, la durée de la réponse en anticorps neutralisants est supérieure à une année, le plus souvent 2 à 3 ans. De plus ces vaccins sont capables d'induire une réponse immunitaire cellulaire plus importante que pour les vaccins inactivés, bien que peu d'études analysent la réponse cellulaire. Néanmoins, ces vaccins se répliquent dans l'organisme après immunisation et peuvent théoriquement passer la barrière placentaire. Ils peuvent donc présenter des risques pour les femelles gravides ce qui explique leur contre-indication lors des six premiers mois de gestation. En fait, seules les souches ncp semblent être capables d'infecter le fœtus et la plupart des vaccins modifiés contiennent des souches cp atténuées, comme le vaccin Mucosiffa nd.

Par ailleurs certaines souches (vaccin Rispoval nd) ne sont pas capables de se multiplier à la température corporelle du bovin et ne présentent donc pas de risque d'utilisation durant la gestation.

Les vaccins inactivés le sont par différents agents chimiques.

Ils sont sûrs d'utilisation, et ne présentent pas de risques particuliers pour les animaux. Néanmoins, ils sont moins rapides pour déclencher une immunité (deux injections de primovaccination), ils sont donc plus chers à utiliser. Trois vaccins de ce type ont montré leur efficacité pour la protection fœtale : Bovilis BVD nd, Pregsure nd, et Bovidec nd (non utilisé en France).

Le vaccin Pregsure nd n'est plus commercialisé dans le monde en raison de son implication probable dans l'apparition de la Pancytopenie Néonatale Bovine (suspension d'AMM en 2010) (Foucras *et al.* 2012)

Les deux vaccins qui vont nous intéresser lors de cette étude sont :

- Bovilis BVD nd (Intervet) : type inerte, BVDv1 souche C86 cytopathique, primovaccination en 2 injections, rappel tous les 6 mois, AMM pour la protection fœtale, pas de contre- indications.
- Mucosiffa nd (Merial) : type vivant modifié, BVDv1 souche Oregon cytopathique, primovaccination en 1 injection, rappel tous les ans, protection fœtale, contre indiqué chez les femelles gravides entre 0 et 6 mois de gestation. Pas d'AMM pour la protection fœtale mais démonstration lors d'une étude expérimentale (Meyer et al. 2012)

2.3. Vaccination chez les ovins

Il n'existe pas de vaccins spécifiques contre les pestivirus ovines. Les vaccins utilisés chez les bovins contre le BVDV n'ont pas d'AMM ovins.

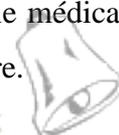
Néanmoins, ces vaccins sont utilisés sur le terrain chez les ovins, sans qu'il n'y ait de démonstration expérimentale de leurs efficacités. Les durées de protection vaccinales sont là aussi inconnues, et le protocole vaccinal n'est pas clairement déterminé.

Enfin, les doses utilisées sont, pour des raisons économiques, systématiquement divisées par deux, parfois par quatre, sans qu'aucune étude n'ait prouvé l'efficacité de ces vaccins à ces dosages.

Malgré tout cela, ces vaccins sont utilisés. Le plus couramment utilisé est le vaccin Mucosiffa nd. C'est le seul vaccin à avoir fait l'objet d'une étude définissant la dose minimale utilisable chez l'ovine pour être efficace (1/2 dose du bovin). L'utilisation de ce vaccin entraîne néanmoins un souci de détection sérologique. Ils entraînent une réponse en anticorps totaux et NS2-3 et interfèrent par la suite avec une réponse post-infectieuse. L'utilisation du vaccin inactivé (Bovilis BVD nd) n'a pas encore fait l'objet d'études chez les ovins.

3. Prophylaxie sanitaire et/ou médicale

Prophylaxies sanitaire et médicale sont utilisées conjointement ou séparément dans les plans de contrôle de la BVD ou BD, selon les situations épidémiologiques. La prophylaxie sanitaire repose sur la détection et l'élimination des animaux IPI et sur l'ensemble des mesures de biosécurité pour empêcher l'introduction de la maladie. En Europe, la fréquence d'animaux IPI varie entre 0,5 et 2% des animaux selon les pays. La prophylaxie médicale repose sur la vaccination, le plus souvent en complément de la prophylaxie sanitaire.



La détection des animaux IPI se fait sur base d'une suspicion clinique, à l'introduction d'un animal dans un nouveau cheptel ou lors d'un plan de détection massif. En général, on privilégie la recherche du virus par PCR individuelle ou de mélange de sang ou par antigénémie ELISA sur sang ou tissu auriculaire.

3.1. Contrôle à l'introduction dans un cheptel

La première mesure à effectuer lors d'achats d'animaux est la mise en quarantaine des animaux nouvellement introduits, le temps de réaliser les analyses biologiques. On effectue alors un dépistage individuel. Ce type de dépistage est aussi utilisé lors d'une volonté d'assainissement ou lorsqu'un élevage est certifié non IPI.

S'il s'agit d'un animal de moins de 6 mois, on privilégiera un test PCR pour éviter les interactions avec les anticorps colostraux. S'il s'agit d'une femelle gravide, on recherche les anticorps ou le virus. Dans les autres cas, on privilégie la RT-PCR. En effet, cette technique a une grande sensibilité.

Si la PCR se révèle positive, il convient de faire un deuxième test à quatre semaines pour déterminer s'il s'agit d'un infecté transitoire ou d'un IPI.

3.2. Dépistage collectif et prophylaxie sanitaire (modèle bovin)

La première étape dans le contrôle de la maladie est toujours d'identifier et d'éliminer les animaux infectés permanents immunotolérants (IPI). La deuxième étape dépend de la séoprévalence de BVD dans la zone géographique.

3.2.1. Zones à faible prévalence : exemple de la Suède

S'il s'agit d'une zone à *faible prévalence de BVD*, comme la Suède par exemple, l'éradication est possible. La vaccination contre le BVD est quasi inexistante dans ce type de pays.

Dans un premier temps on va chercher à séparer les troupeaux « infectés » des troupeaux « non infectés ». On détecte alors les troupeaux infectés grâce à une détection d'anticorps anti BVD par une méthode ELISA (SVANOVA ELISA) directement dans le lait de tank.

Les troupeaux sont alors classés en diverses catégories (0 à 3).

Pour que le troupeau soit considéré comme indemne de BVD, il faut :

- Deux échantillons négatifs à la détection d'anticorps anti BVD à 7 mois d'intervalle

- Lait de tank stade 0 ou 1
- Lait mélangé de 5 à 10 primipares anticorps anti BVD négatif
- Sérum mélangé de 5 à 10 jeunes de plus de 15 mois anticorps anti BVD négatif
- Tests à renouveler tous les ans sur le troupeau pour garder le statut indemne de BVD
- Certificats individuels de tous les animaux du troupeau.

Les éleveurs détenteurs du statut indemne de BVD doivent respecter certaines règles de sécurité pour éviter de réintroduire la maladie dans leur élevage : introduction uniquement d'animaux certifiés indemnes, pas de pâtures communes avec des animaux non indemnes, quarantaine de trois semaines pour l'introduction de nouveaux animaux...

Lorsque les troupeaux sont considérés comme infectés (stade 2 ou 3 ELISA SVANOVA), des mesures sont prises pour éradiquer le virus. Tous les animaux de plus de 10 semaines sont testés individuellement par une méthode ELISA détectant les antigènes du BVD. Si des animaux sont détectés positifs, des isolements viraux sont effectués, et les animaux en question sont abattus. Par la suite, tous les veaux doivent être testés à 10-12 semaines, s'ils sont séronégatifs ils doivent être retestés à la fin de l'année.

Grâce à cette méthode appliquée à partir de 1993 en Suède, le pays est passé d'une séroprévalence de 65% à une séroprévalence de 13%. Cette méthode a aussi permis aux îles Shetland d'être le premier pays à éradiquer totalement le BVD.

Ce type d'éradication a aussi été utilisé au Danemark, en Norvège et en Finlande.

3.2.2. Zones à forte prévalence : exemple de l'Allemagne

S'il s'agit d'une zone à forte séroprévalence de BVD, comme en Allemagne, en général la vaccination est couramment pratiquée et l'éradication est quasi impossible en tout cas dans un premier temps. On met alors en place un contrôle qui limite l'impact économique de la maladie. Ce contrôle a été mis en place avec des éleveurs volontaires soutenus par des aides nationales en Allemagne.

Tout d'abord on cherche à détecter et éliminer les animaux IPI :

- On teste tous les animaux de plus de 3 ans par détection d'antigène du BVD par méthode ELISA.
- Si le test est positif, on refait un test 14 jours plus tard, si ce test est de nouveau positif, l'animal est abattu (IPI).
- Pendant une période de 12 mois après l'élimination du dernier animal IPI tous les veaux nouveaux nés doivent être testés, s'ils sont positifs, ils sont abattus.

- Toutes les vaches de plus de 6 mois doivent être vaccinées au moins 10 semaines avant la mise à la reproduction.

En parallèle de ces mesures, l'éleveur doit surveiller l'introduction des animaux en introduisant uniquement des animaux certifiés indemnes de BVD.

La vaccination est un élément important de contrôle dans des pays comme l'Allemagne. La méthode de vaccination utilisée en Allemagne est une méthode en deux étapes : tout d'abord vacciner avec un vaccin inactivé (Mucobovin nd souche BVDv1 ncp + BDv Aveyronnité) puis 30 jours plus tard vacciner avec un vaccin vivant atténué (Vacoviron nd souche BVDv1 cp Oregon). Cette technique a montré une grande efficacité et une grande fiabilité. Néanmoins, la production du vaccin Mucobovin a été arrêtée en 2011.

Tous ces contrôles ont montré une efficacité, le problème est que par la suite les éleveurs relâchent la surveillance et le risque est que la maladie réapparaisse. Il faut donc maintenir une surveillance efficace des élevages. A ce titre l'Allemagne s'est engagée dans un plan de contrôle national, financé par l'état fédéral qui repose sur la détection des animaux IPI par RT-PCR individuelle et leur élimination.

3.2.3. Zones à forte prévalence : exemple de la France

Aujourd'hui, en France, la détection des veaux IPI se fait majoritairement par PCR sur mélange d'échantillons (lait ou sérum). Les mélanges détectés positifs sont repris ensuite en détection individuelle. Les veaux IPI alors détectés sont éliminés.

Il est nécessaire de mettre en place un suivi des statuts infectieux des cheptels comme en Allemagne. Certains départements Français ont suivi cet exemple et ont mis en place une certification (pas reconnue par l'Etat). Pour les troupeaux laitiers, le statut BVD est évalué par dépistage des anticorps anti NS3 dans le lait de tank. En fonction du pourcentage d'inhibition entraîné par les anticorps présents, on classe les laits de tank (de 0 à 2 ; 2 contenant le plus d'anticorps). On effectue ces prélèvements sur lait de tank 3 fois à quatre mois d'intervalle. En fonction des résultats, on peut classer l'élevage : élevage non infecté, élevage douteux, élevage suspect d'infection.

Il est important aussi de contrôler le statut des bovins introduits. On fait pour cela des tests sérologiques. On effectue aussi des tests virologiques si les tests sérologiques sont négatifs. Ces contrôles sont systématiques dans les départements ayant adopté la stratégie d'évaluation du statut BVD. Il est recommandé de garder l'animal introduit au moins 3 semaines en quarantaine.

Il est important d'éviter la contamination entre troupeaux dans les pâtures. Pour cela on peut envisager la mise en place de doubles clôtures. On peut aussi envisager de mettre les femelles gravides dans des prairies sans contact avec les autres troupeaux.

Enfin, les consignes d'hygiène doivent être respectées à la lettre pour le contrôle de la maladie (contamination par le sperme, les vaccins, les équipements, les vêtements...).

En Bretagne et dans les Pays de la Loire, certains départements ont eu l'idée de créer une base de données des animaux certifiés « non IPI ». Celle-ci permet de limiter les dépistages lors d'introduction de ces animaux. La quarantaine est quand même conseillée (animaux possiblement infectés de façon transitoire).

3.3. Prophylaxie sanitaire de la maladie des Frontières

Pour la maladie des Frontières, peu d'articles rapportent la mise en place de campagne d'éradication.

Cependant, depuis l'épizootie ayant touché l'Aveyron dans les années 80, une épidémiologie surveillance a été mise en place dans ce département.

Au début de cette surveillance, les sélectionneurs et les cheptels fournisseurs d'agneaux d'engraissement étaient testés annuellement par analyse sérologique. Suite à cela, le nombre de cheptels atteints a fortement diminué passant de 20% en 1998 à une prévalence de 4% en 2005. Cette diminution a conduit la filière à modifier le système de surveillance.

A partir de 2006, le statut sérologique des cheptels de plus de 130 brebis a été évalué par alternance tous les quatre ans. Par ailleurs, les cheptels sélectionneurs, les cheptels figurant sur une liste fournie par les opérateurs commerciaux acheteurs d'agneaux d'engraissement et les cheptels positifs à la prophylaxie de l'année précédente faisaient l'objet d'une surveillance annuelle. Ainsi, en 2008, sur les 1909 cheptels de plus de 130 ovins que comptait l'Aveyron, 1097 ont été programmés. Le suivi sérologique consistait en l'analyse de 30 sérums issus de la campagne de prophylaxie réglementaire pour la brucellose. Les brebis de 1 an devaient être prélevées de préférence. L'analyse sérologique était effectuée sur 6 petits mélanges de 5 sérums. La présence de mélanges positifs, sur les jeunes animaux, signalait une circulation virale récente. Ainsi, entre 2006 et 2008, 123 élevages ont été testés positifs.

Fin 2008, une reprise de la circulation virale de la Border disease a été observée. Ce constat a été confirmé en 2009, par la présence de formes cliniques de la maladie et d'une augmentation significative de la mortalité sur les agneaux dans quelques élevages naisseurs et dans certains ateliers d'engraissement. Il a été décidé, en mars 2009, d'élargir les recherches

sérologiques, en évaluant le statut de la moitié des cheptels ovins de plus de 50 ovins tout en continuant de tester les cheptels positifs l'année précédente et les cheptels sélectionneurs.

Grace à ce suivi, entre 2009 et 2010, l'ensemble des cheptels aveyronnais de plus de 50 ovins a été analysé au moins une fois. En outre, une augmentation du nombre d'animaux testés par troupeau a été convenue (9 mélanges de 5 sérums individuels). Par ailleurs, il a été conseillé de prélever des animaux « tout venant » si aucune circulation virale n'était connue dans le troupeau et des brebis de 1 an en cas de circulation virale déjà observée. Enfin lorsqu'un seul mélange se révélait positif, une reprise en analyse individuelle des 5 sérums le constituant a été réalisée, afin de limiter les faux positifs. Au total, ce sont 1700 cheptels sur 2160 de plus de 50 ovins qui ont été programmés en 2009 et environ 1700 cheptels ovins testés en 2010.

Soixante-trois cheptels aveyronnais ont été nouvellement détectés positifs en 2010. Au total, entre 2009 et 2010, 209 cheptels sont connus comme étant positifs soit environ 10% des cheptels. Les cheptels sont inégalement touchés en fonction de leur production : 6% des éleveurs cheptels lait sont séropositifs contre 21% des cheptels ovins viande.

Afin de renforcer le dispositif de surveillance, la FODSA a souhaité mettre en place un dépistage sur le lait de grand mélange, à l'image de ce qui est réalisé en élevage bovin en Bretagne. Cette méthode semble intéressante car elle permet des contrôles plus réguliers (Bernardin, 2011).

Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE

1. Objectifs

Les objectifs de ce travail étaient doubles, tout d'abord, caractériser l'espèce et le (les) génotype(s) responsables des foyers de Border disease en Aveyron depuis 2008, puis poser des premiers éléments scientifiques sur l'intérêt de la vaccination BVD pour lutter contre l'infection par le BDV. Nous nous sommes focalisés, dans cette thèse, sur l'étude de la réponse en anticorps neutralisant le BVDV et le BDV, après immunisation de moutons avec différentes doses d'un vaccin inactivé commercialisé. Nous avons par la suite essayé d'évaluer l'efficacité de cette vaccination lors d'une inoculation d'épreuve avec une souche BDV isolée par nos soins en Aveyron. .

L'épizootie de 2008 qui sévit en Aveyron est à l'origine de ce travail de thèse. En complément des études épidémiologiques et diagnostiques, il avait pour objectif initial d'isoler et d'identifier les souches virales circulantes en Aveyron, de nature BVD ou BDV.

De plus, la vaccination BVD étant un des moyens de lutte majeur contre les pestivirus, il nous est apparu important de pouvoir apporter des premiers résultats scientifiques sur son intérêt pour la protection contre le BDV. Nous avons donc évalué la capacité des sérums de moutons vaccinés, par différentes doses de vaccin Bovilis BVD nd, à neutraliser différents isolats de BDV, notamment les souches isolées dans cette étude. Par la suite nous avons tenté d'évaluer la capacité du vaccin à protéger les moutons sur des critères cliniques et virologiques contre une inoculation d'épreuve par une des souches isolées de BDV.

2. Matériels et méthodes

2.1. Cultures cellulaires

Les cellules utilisées sont des cellules MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney cells). Ce sont des cellules rénales bovines (ATCC CCL22) adhérentes qui forment une monocouche à confluence. Les cellules sont cultivées en étuve à 37°C et 5% de CO₂, en Milieu Essentiel Minimum contenant des sels de Earle et de la L-glutamine (MEM complet 1X), additionné d'acides aminés non essentiels (AANE, 1X), de pénicilline (1 UI/mL) de streptomycine 100µg/mL. Pour l'entretien des cellules, on ajoute du sérum de veau fœtal (FCS) à 10%, ne possédant pas d'anticorps antipestivirus, ni de pestivirus (vérification au laboratoire). Pour les séroneutralisations, 5% de sérum de cheval a été utilisé en remplacement du FCS.

2.2. Virus

Isolement des virus

Les différents pestivirus ont été isolés en 2010-2011 à partir de rates et de sang total provenant d'agneaux certifiées infectés par un pestivirus (résultats RT-PCR par le laboratoire départemental de l'Aveyron) et très probablement de statut IPI, en provenance de trois foyers d'épizooties situés à une vingtaine de kilomètres autour de la commune de Salmiech en Aveyron.

Les échantillons ont été envoyés, sous froid positif dans un bloc de glace, le plus rapidement au laboratoire (arrivée entre 24 et 48 heures après l'envoi).

Le virus a été isolé à partir des broyats de rate ou à partir des leucocytes (prélèvement de sang total). Brièvement, des dilutions au $1/5^e$, $1/20^e$ et $1/100^e$ ont été déposées sur des boîtes- 6 puits de culture cellulaire MDBK- puis agitées doucement à 37°C pendant 2 heures. L'inoculum a ensuite été éliminé et remplacé par 2 mL de milieu de base + 3 % de FCS. Les plaques ont été congelées à -80°C sept jours après inoculation. Trois passages en aveugle ont été réalisés avant de lancer une détection des pestivirus par immunohistochimie. A chaque passage, un cinquième de la production virale a été utilisé pour infecter de nouvelles boîtes de cellules. Le reste de la suspension cellulaire est conservé à -80°C en tube de 5 ml.

L'absence d'autres pathogènes respiratoires bovins a été vérifiée par différents tests commerciaux (PCR et RT-PCR).

Détection des BDV par immunohistochimie

Les cellules MDBK infectées sont fixées avec de l'acétone diluée (90% acétone, 10 % eau distillée) pendant 15 minutes. La présence d'antigènes BVDV est révélée par un anticorps monoclonal spécifique de groupe pestivirus de ruminants WB 103/105 (ref RAE 0801 Veterinary Laboratories Agency, Weybridge UK), utilisé au $1/100^e$.

L'anticorps secondaire est un polyclonal de lapin dirigé contre les immunoglobulines de souris et marqué à la peroxydase de raifort ($1/500^e$, ref P0260 DakoCytomation Glostrup, Danemark). Le complexe antigène anticorps est ensuite révélé par un chromogène, l'aminoéthylcarbazole (ref 101 AEC chromogène Kit Sigma St Louis USA). Une coloration brun rouge du cytoplasme cellulaire révèle la présence du virus.

2.3. Infections expérimentales

2.3.1. Animaux

- Caractéristiques

Les animaux utilisés étaient des brebis Lacaune adultes non gravides. Ces brebis ont initialement été testées par RT-PCR quantitative (test BVD Tavet, pan-pestivirus, Lsi, France) pour la présence de BVDV ou de BDV. Ce test a été validé pour plus de 60 souches de BVD et BDV regroupant l'ensemble des différents génotypes de chaque virus. Par ailleurs, les animaux ont été confirmés comme séronégatifs par un test commercial ELISA NS2-3 (kit Serelisa® BVD p80, Synbiotics, Lyon, France) et par séroneutralisation, pour la présence d'anticorps anti BVDV ou anti BDV.

- Entretien

Les brebis ont été logées dans une bergerie (niveau expérimental A1) de l'École Vétérinaire de Toulouse. Elles étaient séparées physiquement des autres espèces de ruminants et des porcins. Elles ont été alimentées du foin et des concentrés, entretenues selon les conditions réglementaires et infectés selon les normes de la Directive Européenne (86/609/CEE).

2.3.2. Protocole expérimental de vaccination

Trois groupes expérimentaux de 6 moutons ont été constitués :

Groupe 1 : Témoins non vaccinés

Groupe 2 : Vaccination Bovilis, 1ml (½ dose utilisée pour les bovins dans le cadre de l'AMM)

Groupe 3 : Vaccination Bovilis, 0,5ml (¼ dose utilisée pour les bovins dans le cadre de l'AMM)

Les moutons des groupes 2 et 3 ont été vaccinés deux fois à 28 jours d'intervalle (J0 et J28) par voie intramusculaire à l'encolure avec le vaccin Bovilis BVD (lot commercial, A035A01, 01)0873184058584, *6767547*) à raison de moitié dose (1 ml) pour le groupe 2 et quart de dose (0,5ml) pour le groupe 3, selon les recommandations du fabricant.

Le vaccin Bovilis BVD est un vaccin inactivé et adjuvé à l'alun, en suspension aqueuse injectable, qui contient l'antigène de la souche cp C-86 du virus BVD-1, équivalant à 50 unités ELISA (EU) et induisant au moins 4,6 log₂ unités de neutralisation virale (VN) par dose de 2ml.

2.3.3. Inoculation d'épreuve

Une inoculation d'épreuve a été réalisée à J196, soit 168 jours après la 2^e injection de vaccin. Les moutons ont alors reçus par voie intranasale et par nébulisation (embout Tracherine, Bayer), une dose de 5×10^5 TCID₅₀ par animal de la souche BDV non cytopathique ENVV-10405 (titre de l'inoculum = 10^5 TCID₅₀/ml, 2,5 mL dans chaque narine). La souche ENVV-10405 de génotype 3 a été isolée en 2010 en Aveyron à partir d'un agneau IPI. Un titrage viral a été réalisé sur l'inoculum, 2 heures après la fin de l'inoculation d'épreuve. Le titre était de $5,5 \times 10^3$ TCID₅₀/ml.

Un calendrier des prélèvements pour le suivi virologique, hématologique et sérologique lors de la période qui a suivi l'inoculation du virus d'épreuve est fourni en annexe 1.

2.4. Suivi clinique et hématologique

Un suivi clinique a été réalisé pendant 10 jours après chaque injection de vaccins et pendant 21 jours après l'inoculation d'épreuve, par le même examinateur. Les signes ont été rapportés sur une fiche clinique (annexe 2).

Les numérations formules ont été obtenues à partir des prises de sang sur EDTA. Elles ont été analysées directement après le prélèvement au moyen d'un automate (*MS9-5 analyser, Melet Schloesing Laboratories*) au laboratoire de biologie de l'ENVV. Des frottis sanguins ont été réalisés en parallèle, pour la numération formule des leucocytes.

2.5. Suivi de la réponse en anticorps

2.5.1. ELISA

Un suivi de la réponse en anticorps NS2-3 a été réalisé sur les ovins du groupe 1 (témoins non vaccinés puis infectés) et sentinelles toutes les 2 semaines jusqu'à l'inoculation d'épreuve. La réponse NS2-3 a ensuite été évaluée chez tous les animaux à J196 (inoculation d'épreuve), J224, J252 et J280. La réponse a été testée par un test ELISA NS2/3, selon le protocole du kit Serelisa® BVD p80 Ag Mono blocking (Synbiotics, Lyon, France).

2.5.2. Réponse neutralisante

La réponse en anticorps neutralisants a été analysée par test de neutralisation en microplaque à quantité de virus constant (Hamers *et al.*, 2002) vis-à-vis de différentes souches du BVD et

du BDV. Brièvement, les dilutions (facteur 2, allant des dilutions $\frac{1}{4}$ à $\frac{1}{5096}$) des sérums ont été incubées 1 heure à 37°C en présence de virus BVD ou BDV, de manière à avoir au final entre 150 à 200 TCID₅₀ (100 µL) par puit de plaques à 96 puits. Les sérums sont ensuite déposés sur cellules MDBK confluentes à 95%, en plaques 96 puits, pendant 2 heures à 37°C. Le milieu est ensuite enlevé, trois lavages en milieu MEM sont réalisés et les cellules sont ensuite incubées en milieu MEM base avec 5% de HS (Horse sérum). Les plaques sont mises à incuber pendant 4-5 jours à 37°C en étuve à 5% de CO₂. La présence de virus est révélée par immunohistochimie (*cf supra*). Les titres ont été évalués comme l'inverse de la dilution de sérum protégeant 50% des puits de cultures cellulaires (cellules MDBK, ATCCC CCL-22). Ils sont exprimés en ED₅₀ selon la méthode de Spearman-Kärber.

Les souches utilisées dans le cadre de la séroneutralisation étaient les suivantes:

- *Souches BVDV* : BVDV1a souche cp NADL
- *Souches BDV* :
 - BDV souche Aveyronite (1984) typée comme BDV-5
 - BDV ncp, souche ENVT-6390, isolée à l'ENVT en 2010, typée comme BDV-6
 - BDV ncp souche ENVT-10405 isolée à l'ENVT en 2010, typée comme BDV-3, souche utilisée pour l'inoculation d'épreuve.

Pour les souches BDV, les SN ont été réalisées pour les prélèvements à J0, J28, J56, J84, J112, J140, J168, J196, J224 et J280. Pour la souche BVD NADL, des prélèvements intermédiaires à J35, J42, J49, J63, J210, J252 ont été testés en supplément.

2.6. Suivi virologique

Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN viral a été réalisée sur les isollements de BDV pour les études phylogénétiques et à différents temps après infection expérimentale. Pour l'expérimentation en station, des prises de sang sur tubes EDTA ont été réalisées 2 jours avant l'inoculation d'épreuve, le jour de l'inoculation puis tous les 2 jours jusqu'à J21 post-inoculation pour le suivi de la virémie. Parallèlement des écouvillonnages nasaux ont été effectués à J0, J1 puis tous les 2 jours jusqu'à J15 post-inoculation pour le suivi de la charge virale. Les échantillons d'écouvillonnage ont été directement conservés en milieu d'extraction (tampon RLT de Quiagen) à -80°C et les échantillons sanguins utilisés directement pour extraction de l'ARN total.

L'ARN a été isolé par utilisation du kit Qiagen RNeasy (QIAGEN France Courtaboeuf), selon les recommandations du fabricant. La solution récupérée, contenant de l'ARN total, a été conservée à -80°C .

La même technique d'extraction a été utilisée pour l'extraction de l'ARN à partir des prélèvements de terrain (analyses phylogénétiques)

Détection par RT-PCR quantitative

Le BDV a été détecté par RT-PCR en temps réel (RT-qPCR, 7500 Real Time PCR system) au moyen du kit Taqvet BVD (Société Lsi, France). La quantification a été réalisée par rapport à une gamme étalon comportant plusieurs dilutions d'un plasmide contenant le fragment d'amplification. Les charges virales sont exprimées en nombre de copies par ml de sang ou de sécrétions nasales, selon les recommandations du fabricant.

2.7. Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées sur les séquences conservées du gène Npro et de l'extrémité 5' UTR du génome viral. La région génomique contenant la région conservée 5' UTR du génome a été amplifiée et séquencée à l'aide des amorces 324 et 326 encadrant un fragment de 249 nucléotides (Vilcek *et al.* 1994). La région Npro (504 nucléotides) a été amplifié au moyen des amorces BD1 et BD2 primers (Vilcek *et al.* 1997)

Il n'a pas été possible d'affiner les résultats par analyse comparative des séquences du gène E2.

L'alignement des séquences d'origine avec les séquences des banques de données a été réalisé grâce au programme CLUSTAL X (Thompson *et al.* 1997). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode neighbor-joining algorithm et finalisés grâce au programme TreeGraph 2 (Stöver et Müller *et al.* 2010).

2.8. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées au service de biostatistiques de l'ENVIT (logiciel Systat 10 Software, SPSS, Richmond, CA) Une analyse de variance à 3 paramètres sans mesures répétées a été utilisée pour la comparaison des données. Quand un effet jour et traitement était significatif, un test de Bonferroni a été utilisé pour comparer les différents traitements, à chaque jour post-inoculation.

3. Résultats

3.1. Isolement des souches de pestivirus

Dans une première étape, nous avons choisi d'isoler les pestivirus responsables de la recrudescence de foyers depuis 2009 en Aveyron. Des échantillons ont été obtenus en 2010 à partir de 8 foyers identifiés, sur des agneaux très probablement IPI, présentant des tremblements, un aspect ébouriffé de la laine et une entérite hyperthermisante. L'ensemble des prélèvements ont été testés après cinq passages en aveugle sur cellules MDBK par RT-PCR quantitative (Taqvet-BVD, Lsi) et par immunohistochimie. Quatre isolats ont pu être obtenus et identifiés comme étant des pestivirus. Les isolats 10F405 et 10F404 provenaient d'un même foyer alors que les isolats 10F6390 et 10F6678 provenaient d'un deuxième foyer, distant d'une vingtaine de kilomètres. Les isolats 10F405, 10F404 and 10F6390, étaient non cytopathiques (photo 1) alors que l'isolat 10F6678 contenait très probablement à la fois des virions cp et ncp (présence d'un effet cytopathique faible et de nombreuses cellules individuelles infectées).



Photo 1 : Immunohistochimie du BDV sur cellules MDBK

3.2. Analyses phylogénétiques des virus isolés

Pour chaque échantillon, les séquences nucléotidiques des régions 5'-UTR et Npro ont été amplifiées et séquencées. Les séquences ont ensuite été alignées avec les séquences d'autres pestivirus, présentes dans la banque de données Genbank (Figure 10). Les résultats ont montré que les virus isolés appartiennent au BDV et non au BVD. Pour chaque foyer, les séquences des isolats étaient identiques (entre 99.4 et 100% d'identité). Par contre entre deux foyers, même proches de vingt kilomètres, les isolats montraient des séquences divergentes

entre 74,2 et 86,2% d'identité. Deux génotypes au moins, le BDV-3 et le BDV-6, co-circulaient dans une même région. Ces résultats corrélaient avec ceux de Dubois et coll. (2006), à partir de prélèvements positifs en Border obtenus entre 1985 et 2006 dans quatre régions françaises (Centre, Aquitaine, Midi Pyrénées et Alpes Provence Cote d'Azur). Cette étude avait montré que 3 génotypes existaient en France le BDV-3, BDV-5, BDV-6. Le génotype BDV-3 circule en Allemagne, en Suisse et en France entre 1985 et 2006. Le génotype BDV-6 circule en France depuis les années quatre-vingt-dix. Ces deux génotypes avaient déjà été détectés sur la même année 2006 (Dubois *et al.*, 2008). Les données de 2010 montrent que deux génotypes différents de BDV peuvent circuler en même temps et dans une aire géographique restreinte. Après ce travail, 4 autres isolats ncp ont pu être obtenus. Trois ont été caractérisés comme du BDV-3 et le 4^e est en cours d'analyse complémentaire car les premiers résultats sur Npro indiqueraient plutôt du virus BVDV.

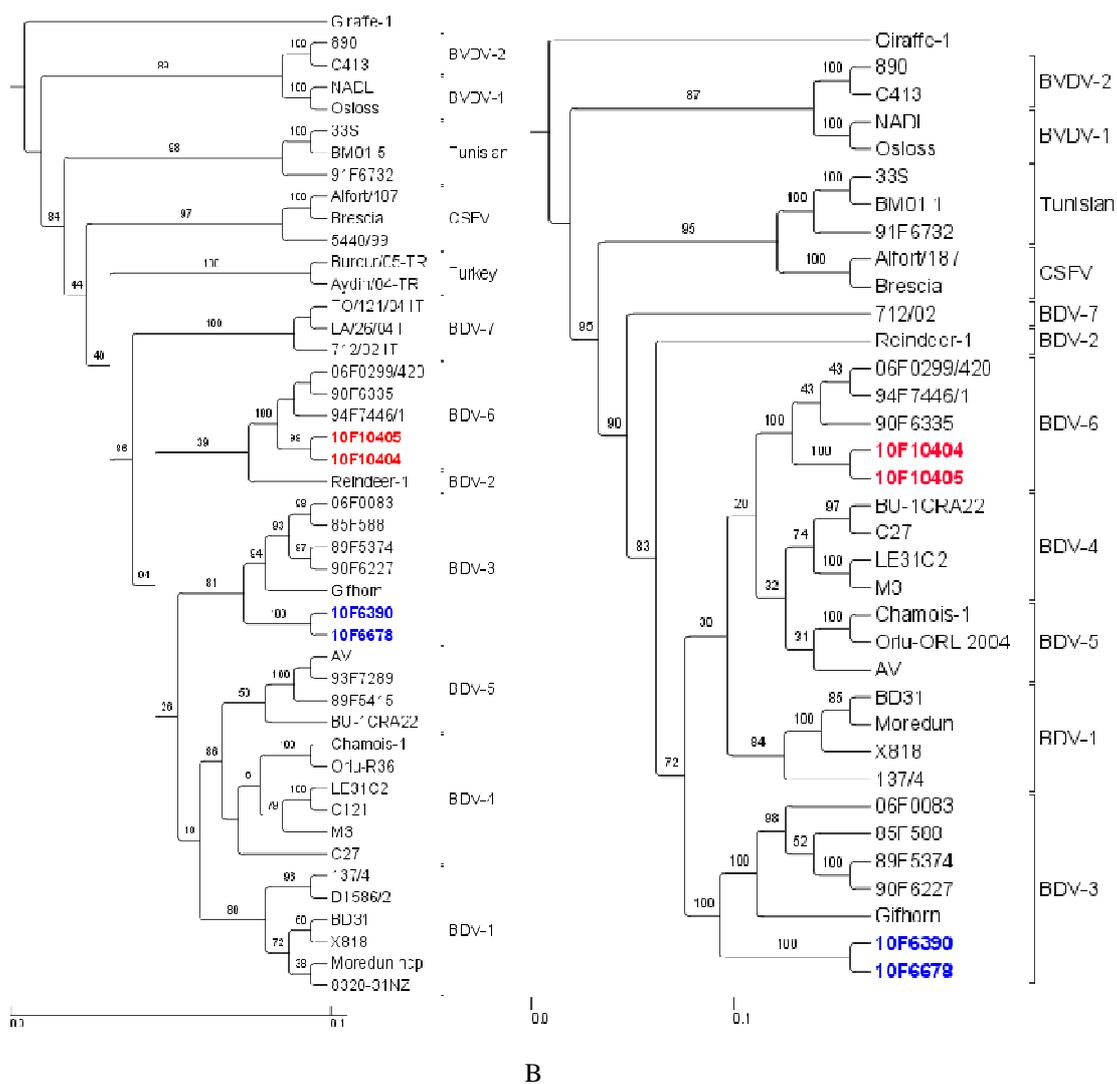


Figure 9 : Arbres phylogénétiques construits à l'aide de 249 bases de 5'UTR (A) et 504 bases de NPro (B) des séquences de pestivirus trouvées pendant cette étude et dans les données de la banque génomique (GenBank).

3.3. Etude de la réponse humorale après vaccination

Nous avons suivi la réponse en anticorps neutralisants pendant environ 6 mois après vaccination des moutons (J0 à J196) puis trois mois après inoculation d'épreuve avec la souche BDV ENVT-10405 (J196 à J280). Les séroneutralisations ont été effectuées vis-à-vis de la souche cytopathique NADL de BVDV-1 et normalement, de trois souches de virus Border, une souche Aveyronite de génotype 5 isolée en 1984 et deux souches récentes 10405 (génotype 3) et 6390 (génotype 6) isolées en 2010. La souche BVDV-1a NADL a été choisie comme contrôle positif de réponse vis-à-vis du vaccin Bovilis BVD, qui contient une souche C86 inactivée de BVDV-1. La souche C86 est une souche cytopathique. Par ailleurs la souche NADL est une souche de référence très fréquemment utilisée pour les études de neutralisation virale. Pour les souches BDV, nous avons fait le choix de tester une souche récemment isolée sur le terrain par comparaison avec la souche d'origine isolée en 1984.

3.3.1. Réponse individuelle des animaux contre la souche BVDV NADL (Figure 10)

Tous les animaux vaccinés à demi-dose ont développé des anticorps neutralisants à partir de J35, soit 7 jours après la 2^e injection de vaccin. Trois animaux présentaient déjà des anticorps neutralisants à J28 avant la seconde injection de vaccin, à des titres intermédiaires. Le pic ($10,2 \text{ Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{ml}$) se situe à J35, puis les titres ont tendance à décliner légèrement jusqu'à J192 (titres entre 6,3 et 9,3 $\text{Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{ml}$). Tous les animaux présentaient des anticorps neutralisants au jour de l'inoculation d'épreuve (J192).

Pour les moutons vaccinés à quart-de-dose, ces moutons étaient séronégatifs à J28 et ont tous séroconverti à J35. Les titres moyens sont inférieurs à ceux du groupe 2 avec un pic moyen de 8 $\text{Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{ml}$ à J35. Par la suite, deux moutons sont devenus négatifs à J49 et J56 et le sont restés jusqu'à l'inoculation d'épreuve. Les quatre autres moutons présentaient des anticorps neutralisants à J192 avec des titres allant de 5,5 à 9,1 $\text{Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{ml}$.

Des différences significatives ($p < 0,05$) ont été observées pour les moyennes, entre les groupes 2 ou 3 et le groupe contrôle de J35 à J196 et entre les groupes 2 et 3 de J56 à J112 puis à J196.

L'inoculation d'épreuve a été suivie d'une augmentation rapide des titres en anticorps neutralisants chez tous les moutons vaccinés, y compris les deux moutons vaccinés quart-dose et négatifs à J196. Dans le groupe 2, les titres se sont harmonisés entre les différents individus. Dans le groupe contrôle, deux moutons n'ont développé une réponse neutralisante que trois mois après l'inoculation. Pour les trois autres moutons du groupe, une réponse en anticorps neutralisants était détectable un mois après inoculation. En général les titres étaient moins homogènes, moins élevés et d'apparition plus tardive dans le groupe contrôle par rapport aux groupes 2 et 3.

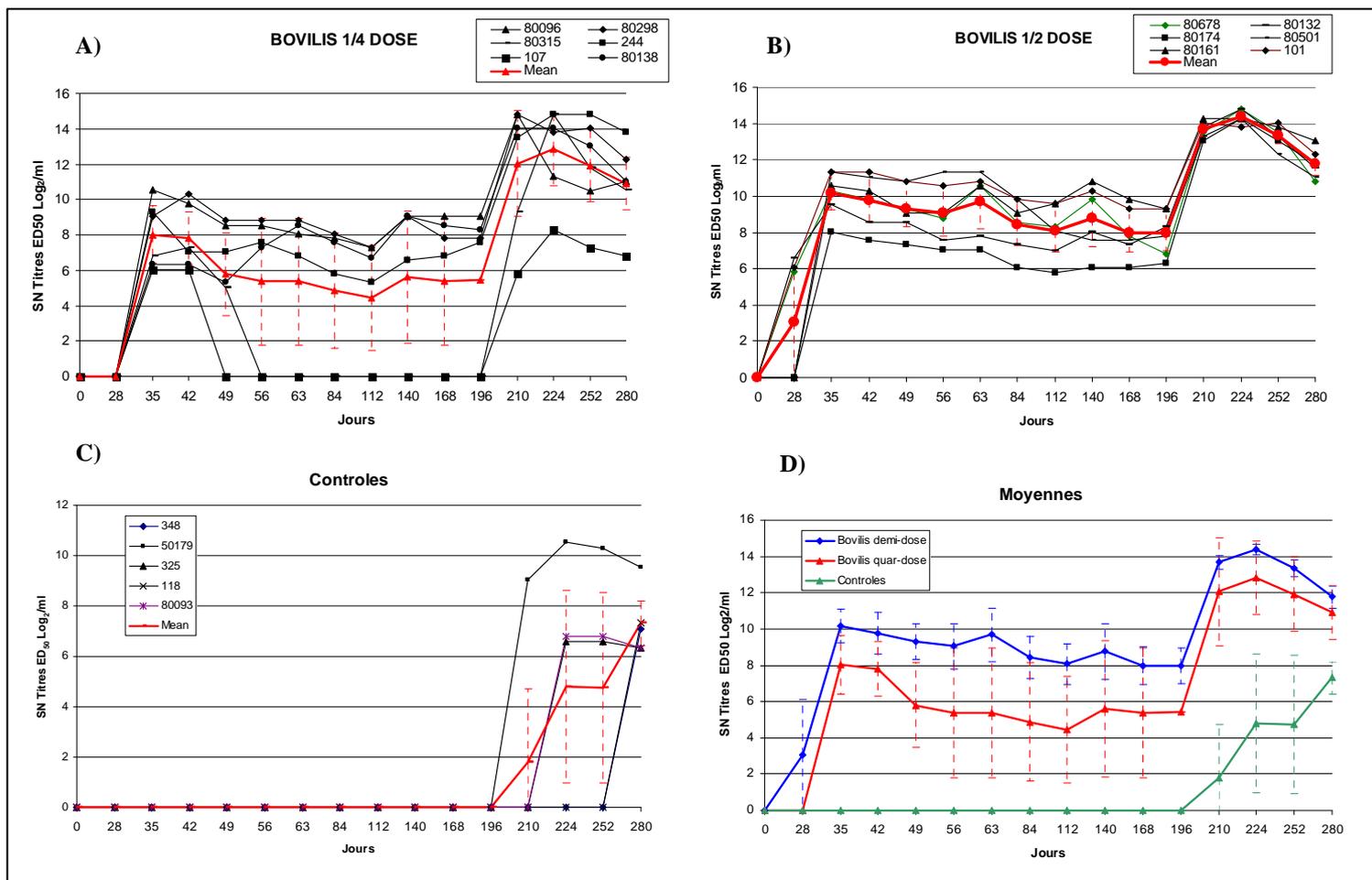


Figure 10: Titres individuels en anticorps neutralisants le BVDV-1 (souche NADL) dans le groupe 3 vacciné quart de dose (A), dans le groupe 2 vacciné demi-dose (B), et dans le groupe contrôle non vacciné (C). Les moyennes sont représentées en traits rouges dans chaque figure (A, B, C) puis regroupées dans la figure D. Les écart-types (sd) sont indiqués pour les moyennes.

3.3.2. Réponse individuelle des animaux contre la souche BDV Aveyronite (Figure 11)

Tous les animaux vaccinés à demi-dose (groupe 2) ont développé des anticorps neutralisants après vaccination. Toutefois la variabilité individuelle apparaît importante dans ce groupe. A J28, deux moutons présentaient des titres importants, trois des titres intermédiaires et un mouton était séronégatif. Ce dernier n'a séroconverti qu'à partir de J56 avec des titres relativement faibles. Les titres ont par la suite progressivement déclinés et au jour J196 de l'inoculation, deux moutons sur six ne possédaient plus d'anticorps neutralisants détectables.

Dans le groupe vacciné à quart-de-dose, la répartition entre individus apparaît plus homogène avec un pic moyen à J56 (11,3 Log₂ ED₅₀/ml), similaire à celui du groupe 2. Les anticorps ont été détectés plus tardivement après vaccination et ont aussi déclinés plus

rapidement par rapport au groupe demi-dose. A J196, les moutons étaient tous séronégatifs en neutralisation.

Des différences significatives ont été observées pour les moyennes, entre les groupes 2 et le groupe contrôle de J28 à J196, entre le groupe 3 et le groupe contrôle à J56 et J112 et entre les groupes 2 et 3 à J28, J140 et J168.

Après inoculation de la souche ENVT-10405, tous les moutons vaccinés, y compris ceux qui étaient négatifs à J196, ont rapidement développé une réponse anamnésique en anticorps neutralisants avec des titres homogènes et élevés à J224, soit un mois après l'inoculation d'épreuve. Dans le groupe contrôle 1, quatre moutons sur cinq présentaient des anticorps à J224 avec des titres moins élevés que ceux des moutons vaccinés. A J280 tous les animaux du groupe 1 ont séroconverti et les titres étaient similaires à ceux des groupes 2 et 3. Des différences significatives ($p < 0,05$) ont été observées pour les moyennes, entre les groupes 2 et le groupe contrôle de J196 à J224 et entre le groupe 3 et le groupe contrôle à J224.

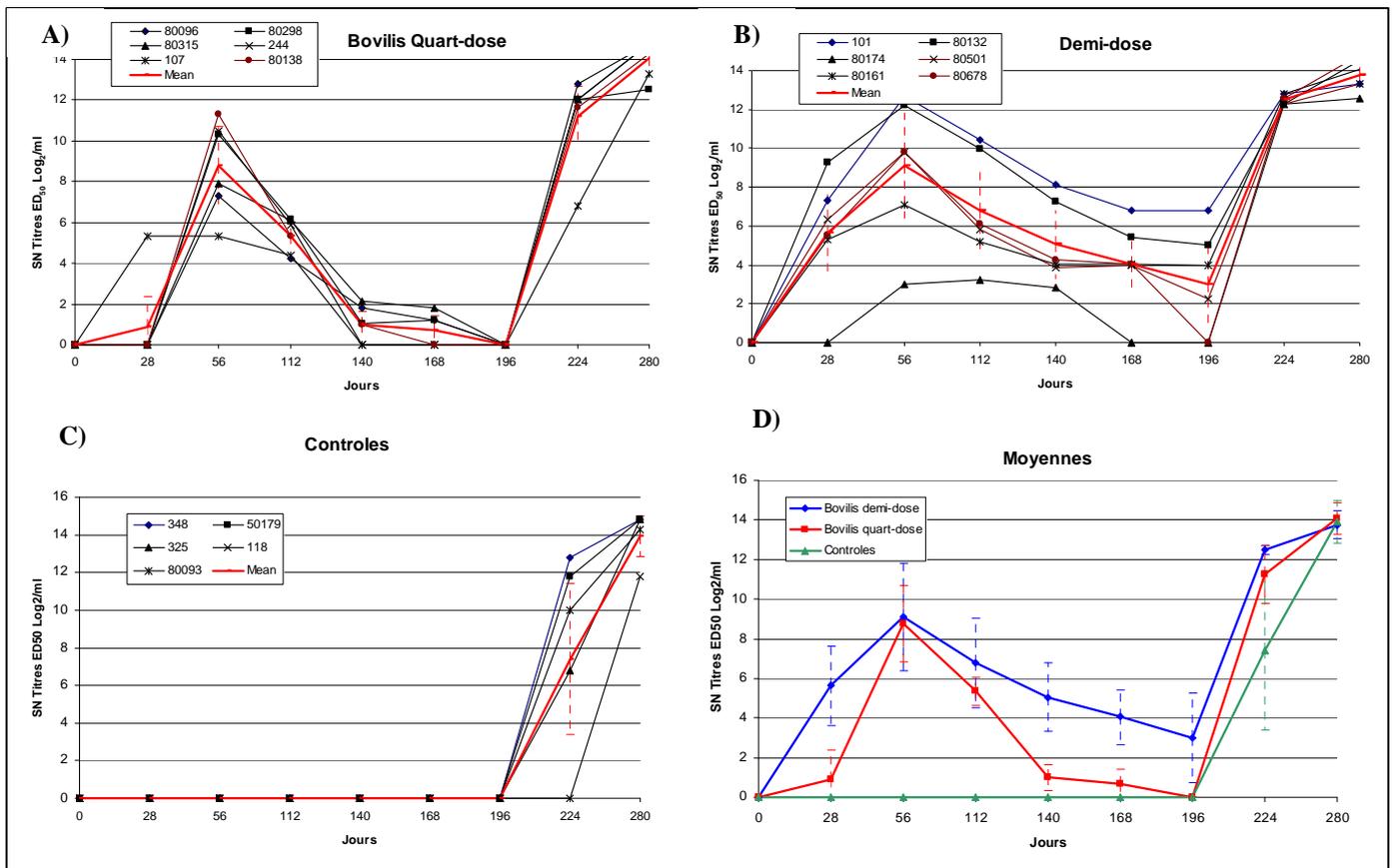


Figure 11: Titres individuels en anticorps neutralisants le BDV genotype 5 (souche Aveyronite) dans le groupe 3 vacciné quart de dose (A), dans le groupe 2 vacciné demi-dose (B), et dans le groupe contrôle non vacciné (C). Les moyennes sont représentées en traits rouges dans chaque figure (A, B, C) puis regroupées dans la figure D. Les écart-types (sd) sont indiqués pour les moyennes.

3.3.3. Réponse individuelle des animaux contre la souche BDV 10405 (Figure 12)

Tous les animaux vaccinés à demi-dose (groupe 2) ont développé des anticorps neutralisants après vaccination. Comme pour la souche Aveyronite, la variabilité individuelle apparaît importante dans ce groupe. A J28, quatre moutons présentaient des titres importants et deux des titres intermédiaires. Le pic a été observé à J56 puis les titres ont progressivement déclinés. A J196, un seul des cinq moutons était séronégatif, les autres possédant des titres modérés en anticorps neutralisants.

Dans le groupe vacciné à quart-de-dose, la répartition entre individus est là aussi variable en fonction des individus testés. A J28 deux animaux étaient séronégatifs. Le pic moyen ($7,34 \text{ Log}_2 \text{ ED}_{50}/\text{ml}$) a été observé à J56. A J196, quatre moutons étaient négatifs et deux moutons présentaient des titres faibles et modérés d'anticorps neutralisants.

Des différences significatives ($p < 0,05$) ont été observées pour les moyennes, entre les groupes 2 et le groupe contrôle de J28 à J196, entre le groupe 3 et le groupe contrôle de J28 à J140 entre les groupes 2 et 3 à J140 et J168. Les données individuelles sont présentées en annexe 5.

Après inoculation de la souche ENVT-10405, tous les moutons vaccinés, y compris ceux qui étaient négatifs à J196, ont rapidement développé une réponse en anticorps neutralisants avec des titres plus homogènes et élevés à J224, soit un mois après l'inoculation d'épreuve. Dans le groupe contrôle, quatre moutons sur cinq présentaient des anticorps à J224 avec des titres élevés et un mouton possédait un titre faible. A J280, tous les animaux du groupe contrôle ont séroconverti et les titres étaient similaires, quoique légèrement inférieurs à ceux des groupes 2 et 3.

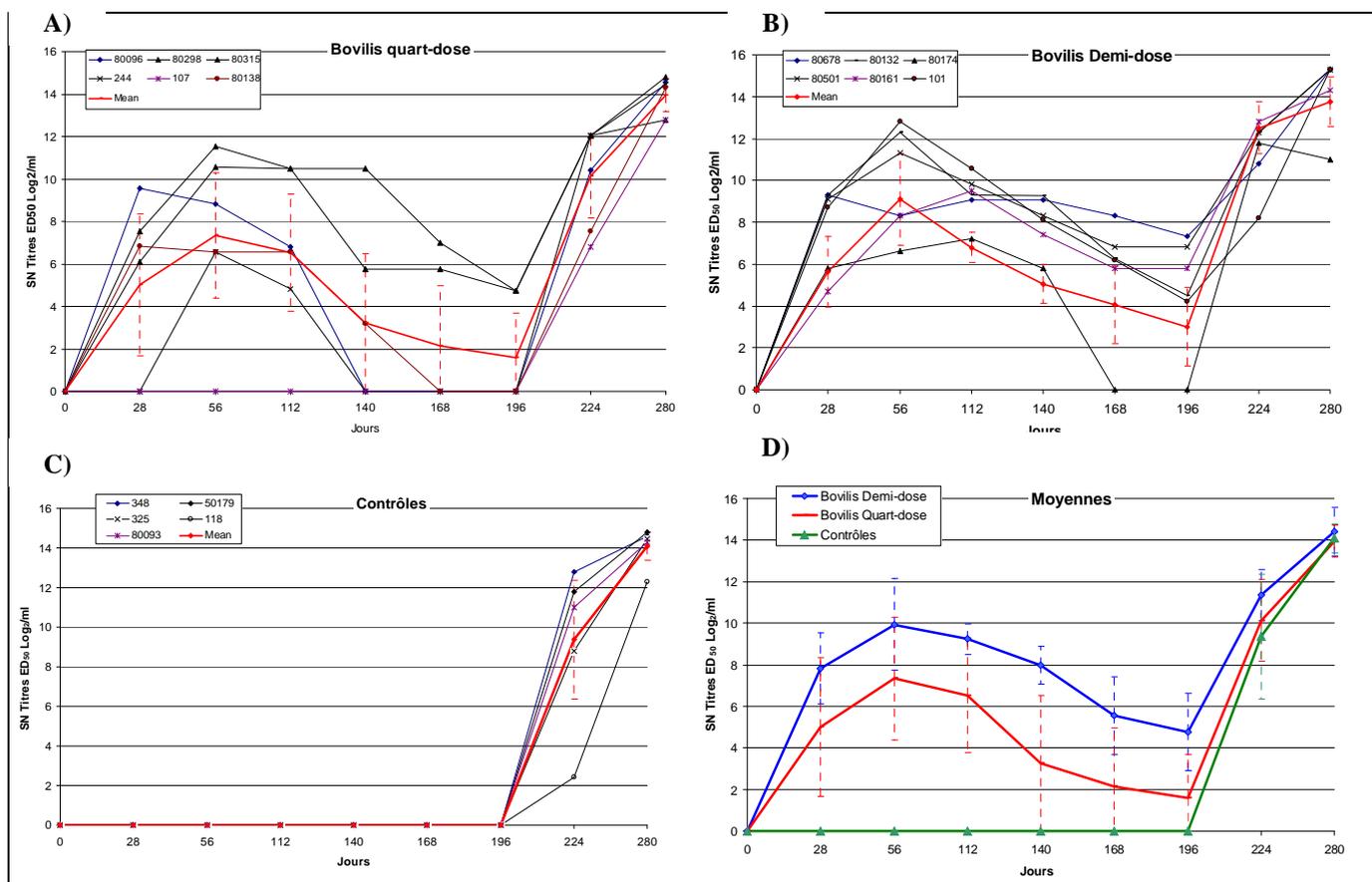


Figure 12: Titres individuels en anticorps neutralisants le BDV génotype 3 (souche ENVT-10405) dans le groupe 3 vacciné quart de dose (A), dans le groupe 2 vacciné demi-dose (B), et dans le groupe contrôle non vacciné (C). Les moyennes sont représentées en traits rouges dans chaque figure (A, B, C) puis regroupées dans la figure D. Les écart-types (sd) sont indiqués pour les moyennes.

3.3.4. Comparaison des moyennes par groupe en fonction des virus utilisés

La Figure 13 représente une comparaison des moyennes des titres en anticorps neutralisants selon la souche virale utilisée pour le test et en fonction des différents groupes.

Pour le groupe demi-dose, la réponse moyenne est détectable dès J28 avec des titres moyens plus élevés pour les souches Border. Le pic est observé à J56 pour les trois virus testés à des titres similaires. Par contre, les titres déclinent pour les séroneutralisations contre le BDV alors qu'ils restent relativement stables contre la souche BVD NADL. Au jour J196 de l'inoculation, tous les moutons avaient des anticorps neutralisants contre la souche BVD NADL, le mouton 101 était négatif pour la souche Aveyronite et le mouton 80174 était négatif pour les deux souches BDV testées. Après inoculation d'épreuve, les titres apparaissent similaires, avec cependant une décroissance plus rapide des titres des anticorps neutralisant BVD NADL à J280 alors que les titres BDV 10405 et Aveyronite semblent progresser.

Pour le groupe quart-de-dose, les titres de séroneutralisation apparaissent globalement plus faibles, quel que soit le virus utilisé, sauf pour la souche Aveyronite à J56. La réponse contre la souche BDV ENVT-10405 est plus rapide à se mettre en place, avec des titres moyens supérieurs à J28. A J56, les titres contre les deux souches de BDV semblent plus importants que ceux obtenus contre la souche BVD NADL. Après J56, le profil est similaire au groupe demi-dose avec une décroissance des titres pour les SN contre les deux souches de BDV. A J196 il est à noter que deux moutons ne possédaient plus d'anticorps détectables contre la BVD NADL, quatre moutons contre la BDV ENVT-10405 et les six moutons contre la BDV Aveyronite. Après inoculation d'épreuve les titres apparaissent similaires, avec les mêmes tendances que celles observées dans le groupe demi-dose. Enfin dans le groupe contrôle, l'inoculation d'épreuve avec la souche BDV ENVT-10405 a entraîné la production d'anticorps neutralisants chez tous les moutons. La réponse vis-à-vis des deux souches de BDV apparaît quantitativement plus importante par rapport à la BVD NADL, au moins pour les trois mois post-inoculation.

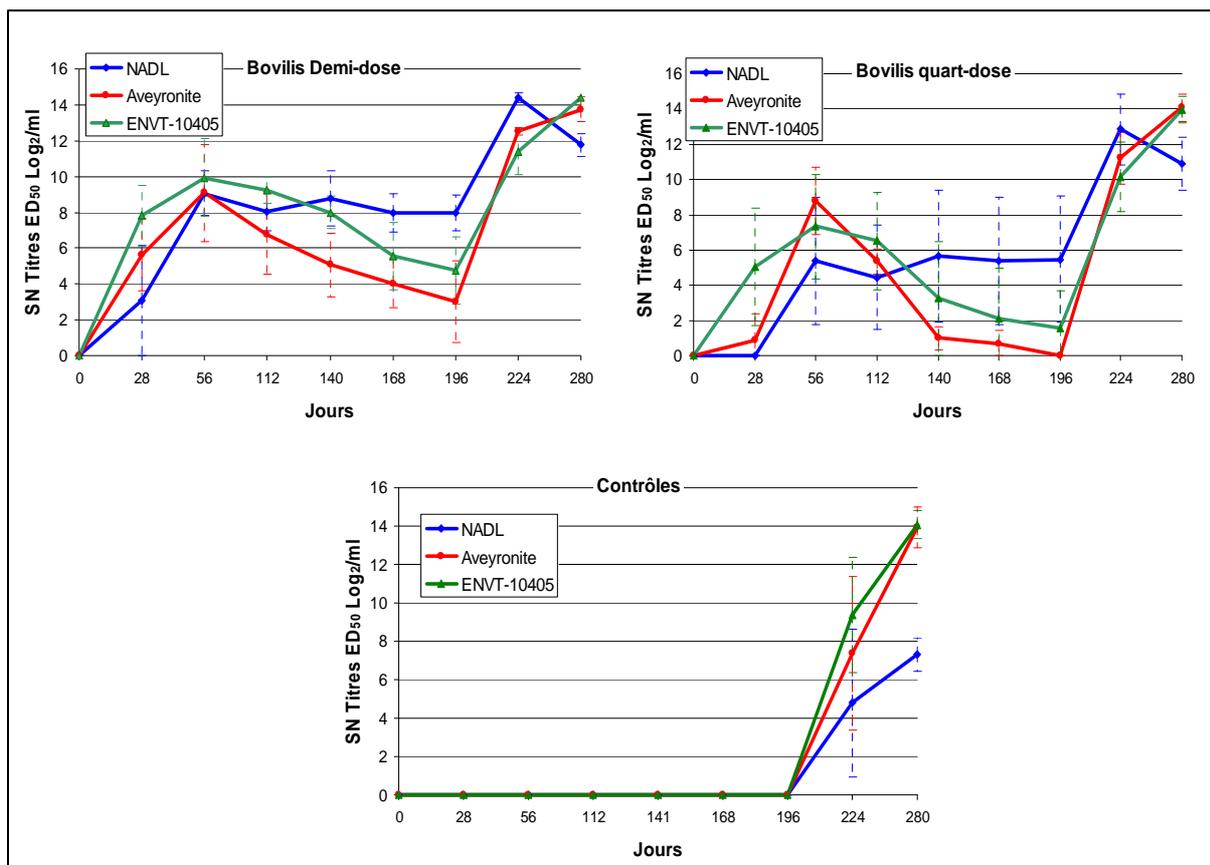


Figure 13 : Comparaison des moyennes des titres en anticorps neutralisants selon les groupes.

3.3.5. Réponse en anticorps NS2-3 (Figure 14)

Les moutons-sentinelles sont restés séronégatifs tout au long de l'expérimentation. Les animaux vaccinés (groupes 2 et 3) ou non vaccinés (groupe 1) puis inoculés n'ont séroconverti qu'après l'inoculation d'épreuve. Les résultats sont présentés à la Figure 5.

Brièvement, après inoculation d'épreuve, on note une production d'anticorps NS2-3 (baisse du pourcentage de compétition) pour l'ensemble des animaux inoculés avec le BDV ENVT-10405, avec une variabilité individuelle importante, que les moutons soient préalablement vaccinés ou non. Si on se réfère par rapport aux seuils fixés par la trousse ELISA (barres rouges de la Figure 5), deux moutons du groupe demi-dose ont séroconverti à partir du premier mois post-inoculation et un troisième était douteux. Dans le groupe quart-dose, aucun mouton ne s'est positif après inoculation, bien qu'un mouton fût douteux, près du seuil de positivité, à J252.

Dans le groupe non vacciné trois animaux sur cinq ont séroconverti à partir de J224, un mouton était positif à J280 et un dernier mouton est resté séronégatif en anticorps NS2-3. Aucune différence statistique n'a été observée pour la comparaison des moyennes entre les trois groupes, il semble que la réponse en anticorps NS2-3 dans le groupe vacciné quart-dose soit, en moyenne, moins importante et plus lente à se mettre en place.

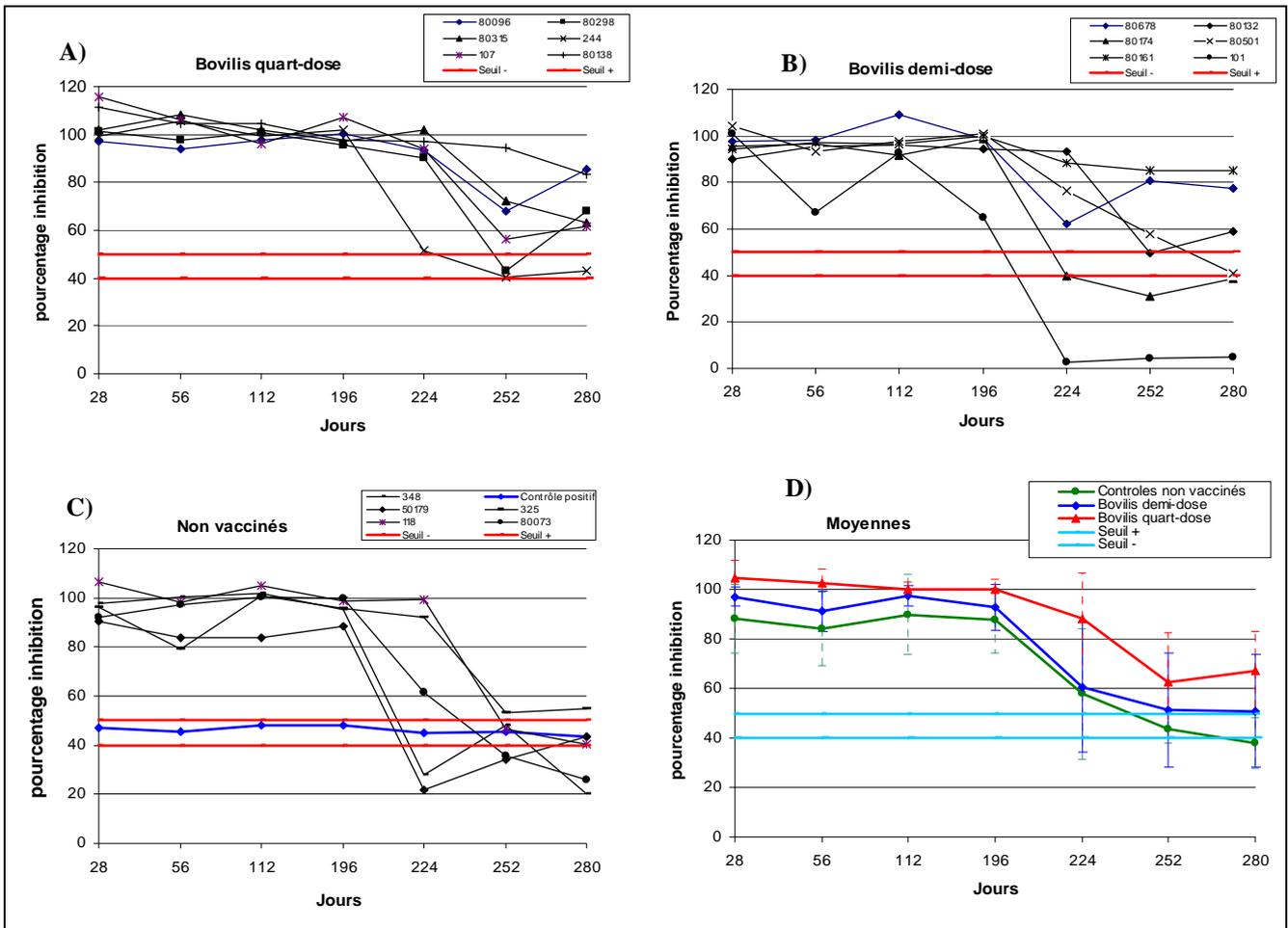


Figure 14: Titres individuels en anticorps ELISA NS2-3 dans les groupes 2 (B), 3 (A) et contrôles (C). Les moyennes sont représentées dans la figure D. Les barres horizontales rouges représentent les seuils de la trousse ELISA NS2-3 : négatif >50, douteux entre 40 et 50 et positif < 40.

3.4. Résultats de l'inoculation d'épreuve

3.4.1. Suivi clinique

Il n'a pas été observé de signes cliniques après chaque injection de vaccination.

Après inoculation de la souche BDV 10-405, il n'a pas été observé de signes cliniques majeurs chez les animaux non vaccinés. Un très léger jetage nasal séreux, sans conséquences cliniques, a été observé dans les trois groupes. Aucun signe clinique n'a été observé chez les animaux vaccinés et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre groupes vaccinés et le groupe contrôle non vacciné. Par ailleurs il n'y avait aucune différence significative entre le groupe non vacciné et inoculé (groupe 1) et le groupe sentinelle non vacciné et non inoculé. Pour exemple, le tracé des courbes d'hyperthermie est présenté en Figure 15.

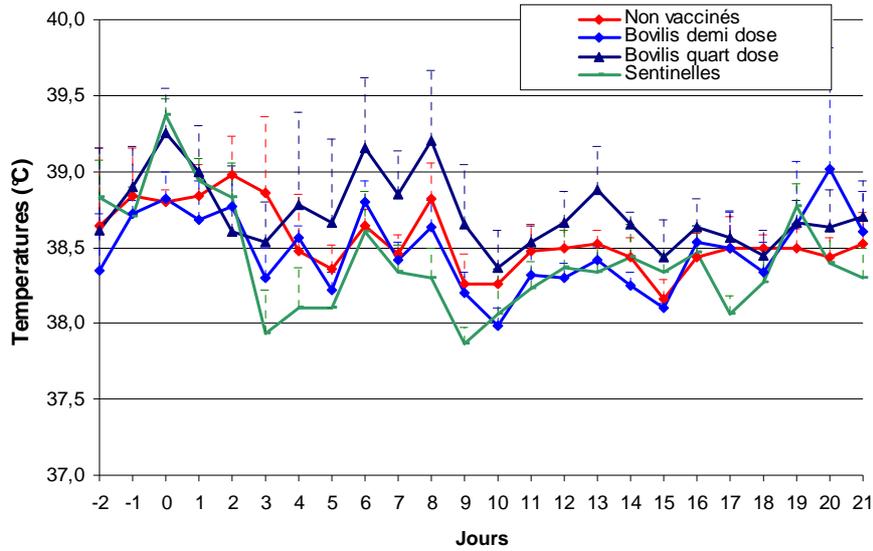


Figure 15 : Moyenne des températures rectales après inoculation d'épreuve (J0).

3.4.2. Etude virologique

Il n'a pas pu être détecté de virus BDV par RT-qPCR dans les échantillons sanguins prélevés entre J0 et J21 post-inoculation, quels que soient les groupes testés, vaccinés ou non vaccinés. Pour les échantillons nasaux, du BDV a été détecté, à des charges virales faibles, dans les sécrétions nasales des animaux non vaccinés et inoculés (Tableau 1). Aucun virus n'a pu être détecté dans les écouvillons nasaux des brebis vaccinées, quelle que soit la dose de vaccin utilisée.

Jours/Brebis	348	40155	50179	325	118	80073
J0	0	0	0	0	0	0
J1	0	0	0	0	0	0
J3	3	0	0	3,13	0	0
J5	0	0	0	0	0	3
J7	3,02	0	0	3,24	3,08	0
J9	0	0	0	0	0	0
J11	0	0	0	0	0	0
J13	0	0	0	0	0	0
J15	0	0	0	0	0	0

Tableau 1: Charge virale dans les sécrétions nasales des moutons non vaccinés et inoculés avec la souche BDV ENVT-10405, exprimées en Log_{10} du nombre de copies d'ARN viral/ml de sécrétions nasales

3.4.3. Hématologie

Les résultats de l'hématologie sont présentés sous deux formes :

- La première est la transcription des résultats bruts des analyses, exprimée sous forme de moyenne pour chaque groupe.
- La deuxième forme représente la moyenne (exprimée en pourcentage) pour chaque groupe et chaque jour, du pourcentage de chaque population cellulaire ramené à une ligne de base. La ligne de base est calculée pour chaque individu et pour chaque population de cellules, comme la moyenne des données obtenues sur les 3 jours qui précèdent l'inoculation virale. Pour chaque population cellulaire, les données individuelles ont été transformées $((X/\text{ligne de base}) \times 100)$ puis les analyses statistiques ont été effectuées sur les données transformées.

Leucocytes

Après inoculation d'épreuve, on constate une baisse du nombre moyen de leucocytes dans les trois groupes de J2 à J8 post-inoculation. Cette baisse apparaît toutefois plus sensible dans les groupes contrôle et vaccinés demi-dose (Figure 16). Des différences significatives ont été obtenues entre les groupes 1 et 3, pour le 4^e jour post-inoculation.

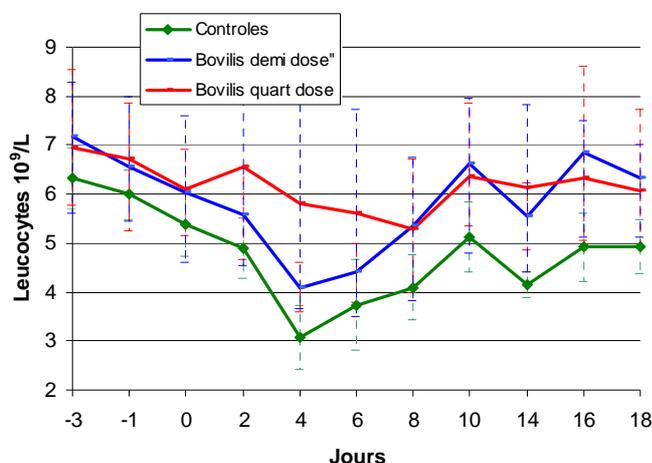


Figure 16 : Moyenne du nombre des leucocytes de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.

Lorsque les données sont exprimées par rapport à la moyenne des données récoltées les 3 jours qui précèdent l'inoculation, une baisse significative du nombre moyen de leucocytes est observée pour les groupes non vaccinés et vaccinés demi-dose (Figure 17). Des différences significatives ($p < 0,05$) ont été observées entre le groupe 3 (Bovilis quart-de-dose) et les 2 autres groupes 1 et 2 pour le jour 4 post-inoculation.

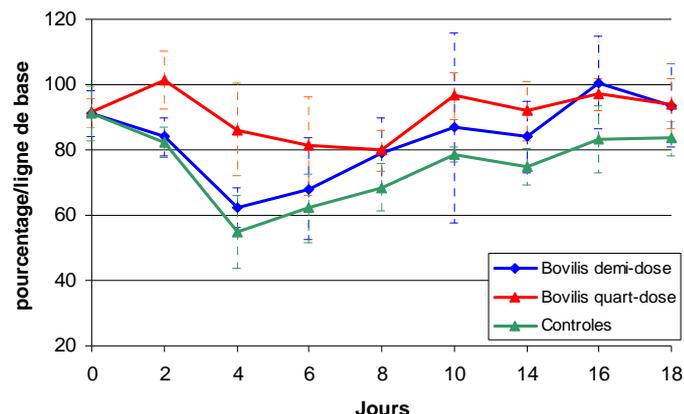


Figure 17 : Moyennes des pourcentages du nombre de leucocytes après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de leucocytes, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.

Lymphocytes

Nous avons pu observer une baisse du nombre de lymphocytes, dans les 3 groupes sans différences significatives, en partie due à une grande variabilité individuelle (Figure 18).

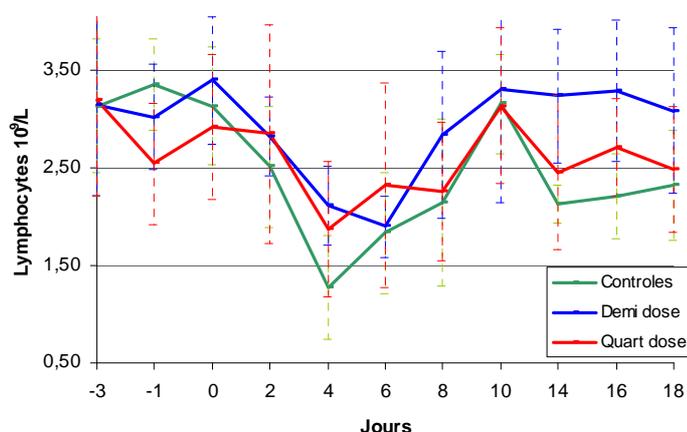


Figure 18 : Moyenne du nombre des lymphocytes de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.

Ramenée au pourcentage (figure 19), la baisse du nombre de lymphocytes est observée dans les trois groupes. Elle est sévère à J4 et J6 (perte de + de 40% de lymphocytes, avec un maximum moyen de 66% à J4) pour le groupe 1 non vacciné et inoculé. La baisse apparaît moins sévère (maximum de 33% à J4 pour le groupe 2 et 38% à J6 pour le groupe 3) dans les 2 groupes vaccinés, avec des différences significatives pour le jour 4 post-inoculation, par rapport au groupe contrôle.

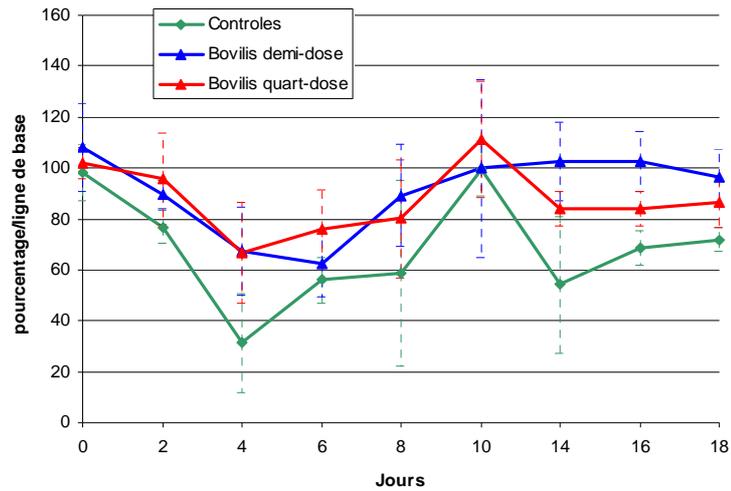


Figure 19 : Moyennes des pourcentages du nombre de lymphocytes après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de lymphocytes, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.

Neutrophiles

D'importantes variations ont été observées quant au nombre de neutrophiles, entre les groupes avant inoculation d'épreuve, mais aussi entre individus à l'intérieur d'un même groupe, plus particulièrement le groupe 2 vacciné demi-dose. Cette forte variabilité limite fortement l'interprétation des résultats, notamment pour les analyses statistiques, où aucune différence n'a été observée entre les 3 groupes.

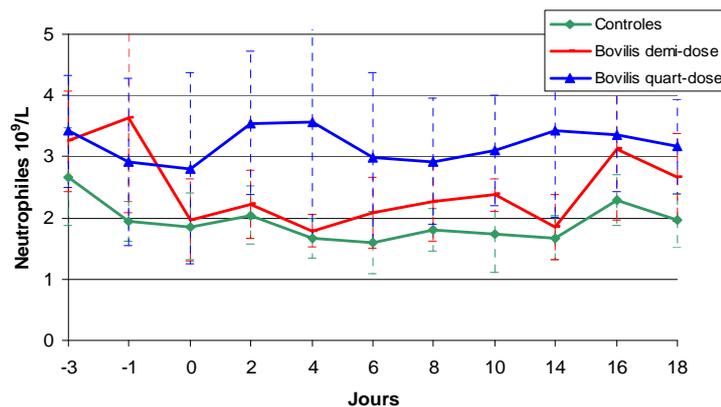


Figure 20 : Moyenne du nombre des neutrophiles de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.

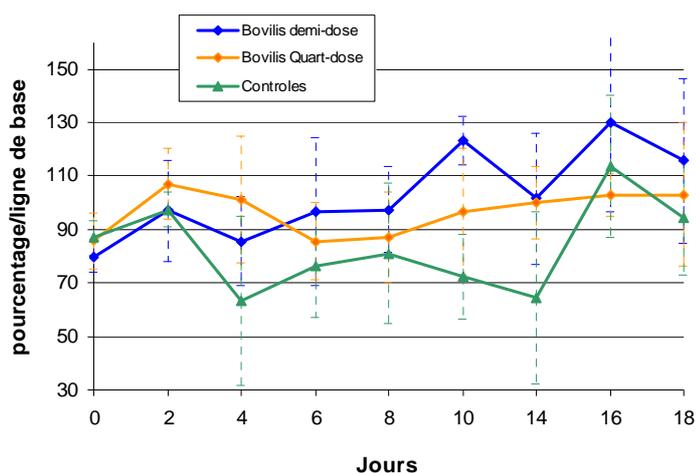


Figure 21 : Moyennes des pourcentages du nombre de neutrophiles après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de neutrophiles, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.

Thrombocytes

Le nombre moyen de thrombocytes diminue légèrement de J4 à J8 post-inoculation, sans montrer toutefois de différences significatives entre les 3 groupes d'animaux (Figure 22).

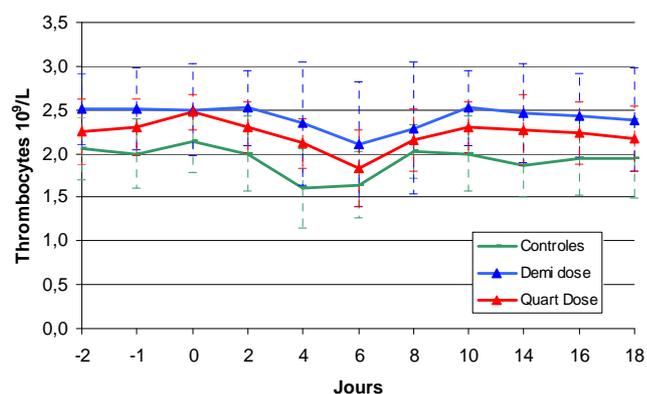


Figure 22 : Moyenne du nombre des thrombocytes de J-2 avant inoculation à J18 post-inoculation.

Ramené en pourcentage de perte par rapport à la ligne de base (Figure 23), on observe une baisse de plus de 30% du nombre moyen de thrombocytes à J4 et J6 post inoculation pour le groupe non vacciné. Cette baisse est moins importante pour les groupes vaccinés avec une perte maximum à J4 de 19% et 23% du nombre moyen de thrombocytes pour les groupes 2 et 3, respectivement.

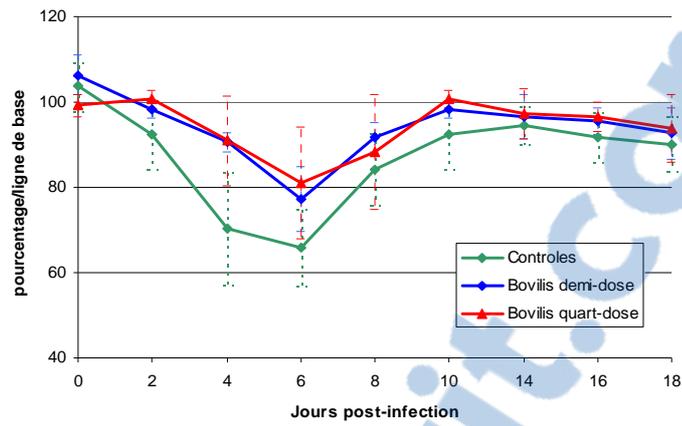


Figure 23 : Moyennes des pourcentages du nombre de thrombocytes après inoculation, par rapport à un référentiel constitué de la moyenne (M) du nombre de thrombocytes, prélevés les 3 jours qui précèdent l'inoculation d'épreuve.

4. Discussion

Le virus de la Maladie des Frontières a été mis en évidence pour la première fois en France en 1983 dans le département de l'Aveyron. La sévérité de la maladie, entre 1983 et 1987, a été à l'origine de la mise en place d'un réseau d'épidémiologie-surveillance dans ce département depuis les années 1990. Jusqu'en 2008, la prévalence de la Border Disease a diminué progressivement. En 2009, une nouvelle épizootie à pestivirus est apparue, avec, dans le département de l'Aveyron, une incidence de la maladie de 1,9% en élevage laitier et 8,5% en élevage allaitant (données 2010). Si la sévérité des signes cliniques apparaît moins sévère que lors de l'épisode de « Petega Ovina » de 1983, il n'en reste pas moins que la mortalité observée depuis 2008 est plus élevée que les années précédentes, notamment dans les élevages d'engraissement des agneaux.

Une des premières étapes de cette thèse a été de confirmer l'origine du ou des pestivirus impliqués dans cette épizootie. Il est en effet clair, d'après la littérature, que les ovins peuvent être infectés par les virus BDV ou BVDV et que l'importance des infections croisées varie en fonction des localisations géographiques. Sur 42 pestivirus isolés de petits ruminants sur une période de 18 années au Royaume-Uni (38 isolats), en Suède (2 isolats) et en Nouvelle-Zélande (2 isolats), 25 isolats étaient du BDV, 13 du BVDV-1 et 4 du BVDV-2 (Vilcek *et al.*, 1997). En Italie du Sud, sur 9 prélèvements d'agneaux IPI, 2 étaient du BVDV-1, 7 du BVDV-2 et aucun du BDV (Pratelli *et al.*, 2001).

En Autriche, il a été démontré l'importance des infections à communes à BVDV ou BDV lors des transhumances communes entre ovins et bovins avec une prévalence troupeau de 62,9% (Krametter-Froetscher *et al.*, 2007a, 2007b). Par des études comparatives de neutralisation croisée, les auteurs ont trouvé une réaction plus importante (écart d'un facteur 4 au moins) pour le BVDV-1 chez 336 animaux, pour le BVDV-2 chez 3 animaux et pour le BDV chez 55 animaux. Plus récemment, dans ce même Pays, une étude sur 3112 moutons (185 élevages) et 1196 chèvres (163 élevages) a permis de détecter 10 ovins IPI (prévalence, 0,32%) et 1 caprin IPI. Les ovins étaient tous infectés par du BDV-3 et le caprin par du BVDV-1 (Krametter-Froetscher *et al.*, 2010). En Espagne, il semble que l'infection à BDV soit majoritaire chez les petits ruminants. Sur 1413 prélèvements (21 élevages) de petits ruminants, de 2001 et 2002, des pestivirus ont pu être isolés et caractérisés chez 14 animaux, ils appartenaient tous au BDV et se regroupaient dans le sous-groupe génétique 4 du BDV, avec les souches isolées d'isards dans les Pyrénées (Valdazo-Gonzalez *et al.*, 2006 ; 2007).

Dans notre étude, nous sommes partis d'échantillons prélevés en 2010, dans deux élevages proches géographiquement (environ dix kilomètres) qui avaient été confirmés infectés par un pestivirus (laboratoire départemental). Nous avons confirmé la présence de pestivirus sur 4 agneaux IPI, par RT-PCR et par immunohistochimie avec les anticorps monoclonaux WB101 et WB112. Il est à noter que ces deux types de test ne permettent pas de différencier une infection à BDV d'une infection à BVDV. Les études phylogénétiques des séquences NPro et 5'UTR ont montré que les pestivirus isolés étaient du type BDV. Par la suite, d'autres isolats (n=12) provenant de l'Aveyron ont été analysés, 11 ont été typés comme du BDV et un isolat présente des résultats divergents entre les séquences Npro et 5'UTR. Ces résultats indiquent que c'est très probablement des virus du type BDV qui sont responsables des troubles cliniques observés dans les élevages ovins aveyronnais. Toutefois, compte-tenu du faible nombre d'échantillons, on ne peut exclure totalement la présence de BVDV dans cette région, notamment si on considère que ce département est aussi un important département d'élevage bovin.

Les isolats que nous avons obtenus appartiennent à deux géotypes différents, les BDV-3 et BDV-6. Cette découverte confirme la co-circulation de BDV-3 et BDV-6 en France (Dubois *et al.* 2008). Les virus de ces deux types de BDV ont aussi été retrouvés dans la région PACA en 2006 à des distances toutefois supérieures, sans toutefois que l'on connaisse l'historique clinique de ces isolats. Si le BDV-3 a été isolé dans plusieurs pays européens (Suisse, Autriche Allemagne, UK), les souches de BDV-6 n'ont jusqu'à présent jamais été décrites ailleurs qu'en France.

A l'heure actuelle, on ne connaît pas l'histoire évolutive des différentes souches de BDV en France et ailleurs. La souche de BDV responsable de la première épizootie de Border Disease en Aveyron fut la souche Aveyronite (Av), classée ultérieurement en BDV-5. Dubois *et al.* (2008) ont isolé six échantillons proches génétiquement de cette souche. Ces six échantillons ont été prélevés en France entre 1985 et 1996. Il semble donc que le BDV-5 ait circulé au moins jusqu'en 1996, à une date où l'on commençait à isoler du BDV-3. La question se pose alors de savoir si les souches de BDV-3 proviennent, par dérive génétique, des souches de BDV-5, de même pour le BDV-6 dérivant du BDV-3. Sinon peut-être s'agit-il d'une simple évolution géographique du BDV-3 (d'abord isolé en Allemagne et en Suisse) qui aurait progressivement évolué génétiquement pour donner le BDV-6.

Pourrait-on essayer de trouver un lien entre le géotype et la pathogénicité des BDV ? Quand on s'intéresse à son proche parent, le BVDV, l'association géotype et pathotipe n'apparaît

pas exclusif, bien que pour ce virus il existe clairement des souches virales plus pathogènes que d'autres. On a d'abord pensé que le BVDV-2 était plus pathogène que le BVDV-1, la plupart des épizooties sévères observées aux Etats Unis étaient liées à la présence de BVDV-2. Cependant d'autres études ont montré que certaines souches de BVDV-2 montraient des formes cliniques légères voire des formes subcliniques et d'autres études ont montré que certaines souches de BVDV-1 pouvaient montrer des formes cliniques sévères avec syndrome hémorragique majeur. Il semble que dans le cadre du BVDV, on ne puisse pas définir la pathogénicité en classant seulement les souches dans le BVDV-1 ou le BVDV-2. Par contre l'identification de facteurs de pathogénicité est en cours pour ce virus.

Pour le virus BDV, il n'existe aucune donnée sur une association entre génotypes de BDV et pathotypes. Le nombre de génotypes isolés avec un historique de la pathologie est bien trop faible pour pouvoir en tirer des conclusions. De même, il n'existe pas d'études d'infections expérimentales comparatives entre génotypes de BDV. Enfin, la diversité des souches de BDV est bien moins grande que celles des souches de BVDV, bien que cela puisse en partie s'expliquer par le faible nombre des souches de BDV étudiées. Nos souches de BDV (BDV-3 et BDV-6) ont été isolées dans un même contexte clinique de mortalité sévère chez des agneaux. Pour les autres isolats disponibles (Dubois *et al.*, 2008), nous ne disposons pas de commémoratifs sur l'isolement. Dans le cadre de la première épizootie observée en Aveyron dans les années quatre-vingt, le contexte clinique apparaissait plus sévère avec des syndromes hémorragiques marqués. La souche isolée alors était la souche Av de génotype 5. Toutefois la situation épidémiologique et biologique (pas d'immunité acquise, pas de vaccins, maladie mal connue) était totalement différente et les isolats de BDV-5 obtenus ces dernières années n'ont pas été décrits comme associés à une pathologie sévère (BDV-5).

En bilan, même si les implications biologiques de la diversité du BDV ne sont pas encore connues, il reste nécessaire de pouvoir caractériser l'évolution et la diversité des pestivirus ovins, ne serait-ce que pour les études de protections croisées et l'impact possible de cette diversité sur le diagnostic de la Border Disease.

Le fait d'avoir isolé dans cette étude de nouvelles souches de BDV est intéressant pour l'avancée de la recherche car jusqu'à présent très peu de souches de BDV étaient disponibles. La plupart des études sur la phylogénie du BDV ne se sont en effet contentées que d'extraire l'ARN viral. Ces nouvelles souches participent ainsi à l'étude de l'évolution des pestivirus. De plus, d'un point de vue plus pratique, la découverte de ces nouvelles souches récentes et sans passage sur cultures cellulaires, permet des études fonctionnelles. C'est dans ce cadre

que nous nous sommes intéressés à l'étude de la neutralisation virale par des anticorps sériques obtenus après vaccination.

La vaccination serait en effet un moyen intéressant pour essayer de juguler l'épizootie sévissant en Aveyron. Cependant, aujourd'hui aucun vaccin contre le BDV n'est commercialisé et les seuls vaccins utilisés sont des vaccins contre le BVDV. Dans la mesure où il n'existait aucune donnée scientifique sur l'intérêt de ces vaccins, nous avons étudié, dans une première étude, la réponse en anticorps neutralisants suite à la vaccination de moutons par un vaccin BVDV inactivé et utilisé à deux doses différentes. Le choix des doses, la moitié et le quart de la dose utilisée chez les bovins, n'a pas de fondements scientifiques. Il repose uniquement sur les observations du terrain. C'est en effet à ces doses que le vaccin Bovilis BDV est utilisé, pour des raisons purement économiques.

Sur base de nos résultats, on remarque que la vaccination avec une demi-dose entraîne une production plus importante et plus longue dans le temps d'anticorps neutralisants que la vaccination avec un quart de dose. Ceci est observable à la fois sur les souches de BVDV NADL et sur les souches de BDV (Aveyronite et 10405). Cependant la différence est plus marquée pour les souches BVDV NADL et BDV 10405 que pour la souche Aveyronite. De même, les différences entre groupe demi-dose et quart-de dose apparaissent plus importantes à partir de J56, où on constate une baisse plus significative au cours du temps pour le groupe quart-de-dose, voire une disparition de la présence d'anticorps neutralisants chez les animaux de ce groupe, six mois (J196) après la vaccination. Toutefois, compte-tenu de la variabilité individuelle et du faible nombre d'animaux utilisés par groupe, il faut rester prudent sur toute extrapolation, même si ces différences sont statistiquement significatives. Cette différence de production d'anticorps neutralisants lors de l'utilisation de deux dosages différents de vaccins est sûrement liée au fait que le vaccin utilisé est un vaccin inactivé. En effet, celui-ci est composé de virus tué donc qui ne se multiplie pas dans l'organisme de l'animal donc il paraît logique que la dose administrée soit directement liée à l'efficacité en terme de production d'anticorps neutralisants. Toutefois, la différence de dose ne varie que d'un facteur 2 dans cette étude, ce qui est très peu. Pour exemple, les vaccins sont couramment testés à la dose commercialisée et au $1/10^{\circ}$ de cette dose dans leurs essais d'efficacité. Il aurait été sûrement très intéressant d'ajouter deux groupes, un groupe vacciné pleine dose et un groupe vacciné au $1/10^{\circ}$ de la dose initiale, pour évaluer le rapport entre la dose utilisée et la production en anticorps neutralisants. Jusqu'à présent aucun essai n'avait été fait avec Bovilis BVD chez le mouton, de même il existe pratiquement aucune étude sur la réponse immunitaire post vaccinale chez les ovins et très peu sur la réponse post-infectieuse.

En l'état des connaissances actuelles, il est donc difficilement possible de corrélérer un titre en anticorps neutralisants à une protection clinique et virologique contre une infection à BVDV, et à fortiori à BDV pour lequel les données bibliographiques sont inexistantes.

La vaccination par Bovilis BVD nd chez le bovin avec la dose entière doit entraîner la production d'un titre en anticorps neutralisants de plus de $4,6 \log_2$ d'après l'AMM. Certains auteurs ont étudié l'efficacité de vaccins dirigés contre le BVDV par séroneutralisation (Hamers *et al.* 2002). Si l'on regarde les valeurs obtenues dans cette étude, on voit que la moyenne des titres obtenues en anticorps après vaccination sont en moyenne de $5,65 \pm 1,13 \log_2$ (souches BVDV-1 et BVDV-2 confondues). La séroneutralisation des souches de BVDV-1 donne en moyenne un titre en anticorps neutralisants de $6,37 \pm 1,33 \log_2$ et celle des souches de BVDV-2 donne en moyenne un titre en anticorps neutralisants de $4,19 \pm 1,10 \log_2$. Les valeurs obtenues lors de notre étude sont supérieures notamment pour la souche NADL. En effet, lors de vaccination par la demi-dose, on observe une moyenne située entre 8 et $10 \log_2$ sur toute la durée de l'étude. Lors de la vaccination par le quart de dose, on observe une moyenne située à $8 \log_2$ environ à J56 puis une chute entre 4 et $6 \log_2$ par la suite. Il apparaît peu logique qu'un vaccin BVDV induise plus d'anticorps neutralisants chez les moutons que chez les bovins, pour lesquels le vaccin a été formulé. Il faut cependant noter que les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes : dans le cadre de l'étude de Hamers *et al.*, les animaux étaient des veaux privés d'anticorps maternels alors qu'ici nous avons fait nos prélèvements sur des brebis adultes. De plus, les vaccins utilisés ne sont pas les mêmes dans son étude et dans la nôtre. Dans ces conditions, nous pouvons difficilement conclure sur la pertinence de ce comparatif. Nos différences pourraient aussi s'expliquer par la méthode utilisée. Si cette méthode est très similaire, dans notre étude les souches virales testées sont majoritairement ncp et nous avons donc dû réaliser une IHC pour confirmer la présence de virus. Peut-être avons-nous surestimé le nombre de cellules positives par rapport à une détection par visualisation de l'effet cytopathique. Il est aussi à noter que nos résultats sont similaires à ceux réalisés lors d'une étude sur la protection fœtale par un vaccin BVDV atténué (Meyer *et al.*, 2012). Enfin (données non publiées), nous avons aussi testé l'efficacité de la vaccination à l'aide d'un vaccin atténué (Mucosiffa nd) à demi dose et les résultats de séroneutralisation sont similaires à ceux de cette étude.

Quand on s'intéresse aux différentes souches virales testées dans cette étude, nous pouvons tirer deux informations :

- Les résultats de neutralisation ne sont pas significativement différents quand on compare les souches BDV-3 et BDV-5, à savoir l'induction d'une réponse avec un pic dans les premiers mois et une décroissance assez rapide des titres neutralisants. Le titre en anticorps neutralisants de la souche de BDV-5 semble toutefois chuter plus vite et plus bas que le titre de la souche de BDV-3. Des données ultérieures ont aussi montré qu'une souche BDV-6 se comporte de la même façon que la souche BDV-3. Il n'y a donc pas lieu de différencier la réponse neutralisante post vaccinale par rapport au génotype de BDV.
- Les titres en anticorps sont relativement similaires entre J28 et J112 post-vaccination pour les différents virus testés, et ce, que ce soit pour les groupes demi-dose et quart-dose. L'effet souche virale sur la qualité de la réponse neutralisante est un phénomène communément admis pour les pestivirus, y compris au sein d'un même genre de BVDV. Après J112, il est clair que la réponse neutralisante chute pour les souches BDV et reste stable pour la BVDV NADL. Les différences observées s'expliqueraient par la spécificité du priming de la réponse immunitaire contre le virus BVDV compris dans le vaccin et, par conséquent, une moindre avidité des anticorps neutralisants pour les souches BDV. Cela pourrait aussi expliquer la variabilité individuelle de la réponse neutralisante observée pour les souches BDV 10405 (demi-dose et quart de dose) et BDV 6390 (demi-dose). En général les différences individuelles se reproduisent pour les différents virus utilisés. Toutefois il est probable qu'une partie de la variabilité individuelle puisse aussi s'expliquer par la méthodologie utilisée pour détecter le BVDV (effet cytopathique) et les BDV (IHC).

Enfin, dans cette étude nous ne nous sommes intéressés qu'à une partie de la réponse protectrice contre les pestivirus. Outre la réponse neutralisante, la réponse immunitaire cellulaire joue un rôle majeur dans l'élimination du BVDV, elle n'est pas connue pour le BDV. Les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques sont les effecteurs les plus puissants de l'élimination des cellules infectées par le BVDV de biotype ncp. Certaines protéines comme par exemple les protéines E2, NS2-3 et NS4 pourraient jouer un rôle dans l'induction de cette immunité cellulaire. Une étude a montré que la vaccination de veaux à l'aide d'ADN des protéines E2 et NS3 a montré une réponse cellulaire protectrice. Les épitopes permettant l'activation de la réponse cellulaire se trouveraient sur ces protéines (Nobiron *et al.* 2003, Young *et al.* 2005). Cependant, ces épitopes n'ont pas encore été localisés sur celles-ci. L'immunité cellulaire post vaccinale est considérée comme plus efficace lors de l'utilisation de vaccins atténués répliatifs. En effet, des études de 2003 et 2004 ont montré qu'une

vaccination par un virus atténué entraînait une activation des lymphocytes T spécifiques (activation CD4+, CD8+, et cellules T gamma et delta) alors qu'une vaccination par un virus tué n'entraînait pas cette réaction (Endsley *et al.* 2003, Endsley *et al.* 2004, Ridpath *et al.* 2003). Toutefois une étude récente a montré que le vaccin Bovilis BVD induisait une réponse immunitaire cellulaire après vaccination (Makoschey *et al.*,)

Pour tester l'efficacité de la vaccination Bovilis-BVD, nous avons choisi d'effectuer l'épreuve reine, à savoir l'étude de l'efficacité contre une inoculation d'épreuve. Le choix de tester le vaccin contre une infection transitoire chez l'adulte n'est pas forcément le meilleur, dans la mesure où ce qui est recherché sur le terrain est une efficacité contre l'infection foetale et la prévention d'animaux IPI. Nous avons choisi ce modèle pour une première évaluation car ce modèle était plus simple à mettre en place. La souche utilisée pour inoculer les animaux était une souche ncp de BDV isolée à partir d'un animal IPI dans un élevage touché par la Maladie des Frontières (problèmes d'agnelage, agneaux chétifs, hirsutes, trembleurs). Dans cet élevage, 50% de morbidité et 15% de mortalité ont été observées. Toutefois nous n'avons pas de données préalables de son utilité lors d'infection expérimentale.

En bilan, même en simplifiant le système, il n'a pas été possible de valider le modèle d'infection expérimentale. Même si certaines données de l'hématologie indiquent une lymphopénie et une thrombocytopénie après inoculation d'épreuve, il n'a pas été possible de reproduire de signes cliniques ni d'identifier l'infection virale. En effet, aucun signe clinique n'a été observé même chez les brebis témoins. Ces brebis étant adultes, on pouvait supposer que, comme sur le terrain, elles soient peu sensibles cliniquement à l'infection virale. Néanmoins, l'infection a bien eu lieu chez toutes les brebis car une séroconversion (anticorps NS2-3 et anticorps neutralisants) a été observée après inoculation d'épreuve. Plus décevant, nous n'avons pas été capables de détecter de virus dans le sang des animaux contrôles et de très faibles charges virales dans les sécrétions nasales. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce défaut d'efficacité du modèle d'épreuve :

- Des biais méthodologiques ont pu exister. Nous avons utilisé une souche virale ncp avec peu de passages en cultures cellulaires mais dont nous ne disposions d'aucune information en modèle expérimental. Cette souche utilisée est peut-être faiblement pathogène ce qui peut expliquer l'absence de signes cliniques. Nous avons utilisé la voie intranasale, qui est la voie communément utilisée pour les infections à BVDV chez les bovins. Peut-être cette voie n'est-elle pas la plus efficace lors d'infection de

moutons par le BDV. Plus probablement nous étions sensé administrer 10^5 TCID₅₀ par mouton. Or après vérification du titre viral (2 heures après inoculation intranasale), nous avons calculé que les animaux avaient reçu quinze fois moins de virus que prévu. Cela pourrait s'expliquer par une dégradation très rapide du virus lors de l'inoculation d'épreuve ou plus probablement lors de la conservation du virus au -80°C. Nous ne savons pas, dans le cadre du BDV, si une réduction de la dose infectieuse peut expliquer l'absence de virémie détectable mais cela a souvent été incriminé pour le BVDV.

- Si l'on regarde les autres études qui ont travaillé sur les efficacités vaccinales contre le BVDV, on voit que la plupart des auteurs ont préféré utiliser des animaux jeunes (en général des veaux de moins de 6 mois). Dans cette étude, nous avons utilisé des brebis adultes, qui ont toutes été testées négatives par ELISA et RT PCR pour les pestivirus. Toutefois, la sensibilité des adultes à l'infection virale, ou du moins à la clinique, pourrait être moins importante. A l'extrême, on peut même imaginer, qu'utilisant des animaux adultes, il aurait été plus judicieux d'utiliser un modèle de protection fœtale. Dans la plupart, où les infections fœtales sont très efficaces avec certaines souches ncp, les auteurs observent finalement des virémies faibles, de courte durée et variables entre individus, chez les mères lors de l'inoculation d'épreuve.

Quoiqu'il en soit, cette étude a cependant apporté quelques informations. Dans la mesure où la réponse en titres neutralisants est plus forte chez les animaux vaccinés par rapport aux contrôles, on peut supposer la présence d'une réponse anamnestic chez les brebis vaccinées, y compris celles qui étaient séronégatives le jour de l'inoculation d'épreuve. Nous n'avons pas observé de différences significatives de titre en anticorps neutralisants post inoculation selon les doses vaccinales utilisées.

Les données hématologiques récoltées pendant cette épreuve ont quant à elles montré une leucopénie avec lymphopénie et une thrombocytopénie plus sévère chez les animaux non vaccinés. Ceci peut nous inciter à penser que la vaccination a permis une certaine protection des animaux vaccinés contre la leucopénie et la thrombocytopénie et dans une moindre mesure contre la lymphopénie. En l'absence de différences significatives, cela reste uniquement une supposition à confirmer ou infirmer dans une autre étude.

En conclusion, notre étude a permis de montrer que la vaccination des brebis par le vaccin Bovilis BVD nd permettait la sécrétion d'anticorps neutralisants que cela soit lors de

l'utilisation de demi ou de quart de dose et ce pour une période d'au moins six mois lorsque les animaux sont vaccinés à demi-dose. En pratique, avec le vaccin Bovilis BVD, il est conseillé de faire une primovaccination avec deux injections à 4 semaines d'intervalle avec la deuxième injection 4 semaines avant la mise à la reproduction. Dans ce cas, la période de production des IPI se situant globalement entre 20 et 65 jours post-fécondation, on se situe entre 50 et 95 jours après la vaccination, à une période où les titres en anticorps neutralisants sont supérieurs à $6 \log_2 ED_{50}$ (l'indication Bovilis assure un titre neutralisant minimal de $4,6 \log_2$ chez les bovins). Par la suite, on peut se poser la question d'un rappel de vaccination tous les 6 mois (vu les résultats) ou tous les ans, en fonction de la période de mise à la reproduction. Toutefois il reste à démontrer la protection fœtale contre le BDV avec ce vaccin.

De plus, il est intéressant de regarder les résultats obtenus avec les tests ELISA commerciaux spécifiques des anticorps anti- NS2-3. Comme on pouvait le prévoir, les animaux restent séronégatifs après vaccination. Ceci est normal car le kit ne détecte que les anticorps anti NS2-3 or cette protéine est produite lors de la multiplication virale. Dans le cadre de cette étude, nous utilisons un vaccin inactivé donc il n'y a pas eu de multiplication virale post vaccinale. Par contre, même si dans les groupes témoins et vaccinés on note une séroconversion NS2-3 après inoculation d'épreuve, un grand nombre d'animaux seraient déclarés douteux, voir négatifs en utilisant les recommandations du kit utilisé. Cela pose des questions sur l'utilisation du kit NS2-3 pour la détection des infections à Border virus.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons posé les premières bases de l'utilisation de vaccins dirigés contre le BVDV pour la prévention du BDV. Nous avons notamment montré que la vaccination à l'aide d'un vaccin inactivé contre le BVDV (Bovilis BVD) entraînait la production d'anticorps neutralisants à la fois contre des souches de BVDV mais aussi contre des souches de BDV. Les anticorps neutralisants produits étaient efficaces à la fois pour la neutralisation d'une souche ancienne de BDV (Av) mais aussi pour la neutralisation de souches récemment mises en évidence (BDV-3 et BDV-6). Le titre en anticorps neutralisants semble assez important pour conférer une protection aux animaux pendant au moins six mois. Notre étude représente le début d'une longue série d'études nécessaires à la lutte contre le BDV.

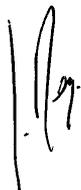
En effet, pour démontrer l'efficacité de la vaccination BVDV dans la prévention de la Border Disease, de nombreux travaux sont encore nécessaires. Tout d'abord, il serait intéressant de faire une étude de faisabilité économique d'une vaccination en plus chez les ovins. En effet, il serait judicieux de commencer par cela avant de faire plusieurs études qui pourraient ne pas entraîner d'application pratique (car vaccination peu ou pas utilisée par les éleveurs). Il pourrait aussi être intéressant de mettre au point un modèle de protection fœtale pour le vaccin Bovilis BVD afin d'établir son efficacité chez la brebis gravide. Ensuite, il pourrait être intéressant d'approfondir les recherches sur l'immunité induite par le vaccin en étudiant la réponse immunitaire cellulaire. Enfin, il serait intéressant de poursuivre en comparant les protections des différents vaccins dirigés contre le BVDV disponibles sur le marché. Nous pourrions ainsi comparer l'efficacité de vaccins atténués et de vaccins inactivés chez la brebis.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

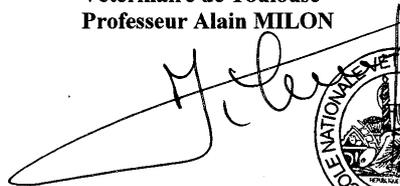
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Gilles MEYER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **ANNE Stéphanie** intitulée « *Vaccination contre la maladie des frontières (Border disease) chez le mouton : premiers essais d'efficacité du vaccin inactivé Bovilis-BVD* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 4 Octobre 2012
Docteur Gilles MEYER
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



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




Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jacques IZOPET



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT




Mlle ANNE Stéphanie
a été admis(e) sur concours en : 2007
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 30/06/2012
a validé son année d'approfondissement le : 12/07/2012
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

BIBLIOGRAPHIE

- BACHOFEN C., STALDER H., BRAUN U., HILBE M., EHRENSPERGER F., PETERHANS E. (2008), Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhea viruses in an endemic situation, *Veterinary Microbiology* 131, 93-102
- BECHER P., SHANNON A., TAUTZ N., THIEL H.J. (1994), Molecular characterization of Border Disease virus, a pestivirus from sheep, *Virology* 198, 542-551 1994
- BERNARDIN E.(2011), Utilisation du lait de tank pour l'évaluation de la séroprévalence intra-troupeau vis-à-vis de la Border Disease en élevage ovin lait : une étude pratique en Aveyron, Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
- BOLIN S., MOENNIG V., KELSO GOURLEY N.E., RIDPATH J. (1988), Monoclonal antibodies with neutralizing activity segregate isolates of bovine viral diarrhea virus into groups, *Archive of virology*, 99, 117-123
- BRACKENBURY L.S., CARR B.V., CHARLESTON B. (2003), Aspects of the innate and adaptative immune responses to acute infections with BVDV, *Vet microbiology* 96, 337-344
- CAY B., CHAPPUIS G., COULIBALY C., DINTER Z., EDWARDS S., GREISER-WILKE I., GUNN M., HAVE P., HESS G., JUNTTI N., LIESS B., MATEO A., MCHUGH P., MOENNIG V., NETTLETON P., WENSVOORT G. (1989), Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an International workshop, *Veterinary microbiology*, 20, 123-129
- CHEREL Y, COUILLANDEAU P., LECOMTE O., SPINDLER C., LARCHER T. (2006), *Autopsie des Bovins*, Editions Wolters Kluwer France, Collection Atlas, Maisons Alfort, 247p. ISBN : 2863262297, 9782863262290,
- COLLEN T., CARR V., PARSONS K., CHARLESTON B., MORRISON W.I. (2002), Analysis of the repertoire of cattle CD4+ T cells reactive with bovine viral diarrhea virus, *Vet Immunology and immunopathology* 87, 235-238
- COLLEN T., MORRISON I. (2000), CD4+ T-cell responses to bovine viral diarrhea virus in cattle, *Virus research* 67, 67-80
- COLLETT M.S., LARSON R., BELZER S.K., RETZEL E. (1988), Proteins encoded by BVDv: the genomic organization of a pestivirus, *Virology* 165, 200-208

- CORTESE V.S., WHITTAKER R., ELLIS J., RIDPATH J.F., BOLIN S.R. (1998), Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea, *Am Vet Res*, 59 (7), 848-850
- DENG R., BROCK K.V. (1992), Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, non cytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1, *Virology* 191, 867-879
- DUBOIS E., RUSSO P., PRIGENT M., THIERY R. (2008), Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006, *Veterinary microbiology* 130, 69-79
- EDWARD S., SANDS J.J., HARKNESS J.W. (1988), The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain, *Archives of virology*, 102, 197-206
- ELBERS K., TAUTZ N., BECHER P., STOLL D., RUMENAPF T., THIEL H.J. (1996), Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7, *Journal of virology*, p 4131-4135
- ENDSLEY JJ, RIDPATH JF, NEILL JD, SANDBULTE MR, ROTH JA. (2004), Induction of T lymphocytes specific for bovine viral diarrhoea virus in calves with maternal antibody. *Viral Immunol*; 17:13-23.
- ENDSLEY JJ, ROTH JA, RIDPATH J, NEILL J. (2003), Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*; 31:123
- FOUCRAS G, CORBIERE F, TASCA C, PICHEREAUX C, CAUBET C, TRUMEL C, LACROUX C, FRANCHI C, BURLET-SCHILTZ O, SCHELCHER F. (2011), Alloantibodies against MHC class I: a novel mechanism of neonatal pancytopenia linked to vaccination. *J Immunol*. 187(12):6564-70
- FULTON R.W, BRIGGS R.E., PAYTON M.E., CONFER A.W., SALIKI J.T., RIDPATH J.F., BURGE L.J., DUFF G.C. (2004), Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV-1b, BVDV-2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 22, 643-649
- GRASSMANN C.W., ISKEN O., TAUTZ N., and BEHRENS S.E (2001), Genetic Analysis of the Pestivirus Nonstructural Coding Region: Defects in the NS5A Unit Can Be Complemented in *trans*, *J Virol.* ; 75(17): 7791–7802.

- GREISER WILKE I., LIESS B., SCHEPERS J., STAHL HENNIG C., MOENNIG V. (1991), Correlation of bovine viral diarrhoea virus induced cytopathic effects with expression of a biotype specific marker, *Archives of virology*, 55-65
- GREISER WILKE I., MOENNIG V., COULIBALY C.O.Z., DAHLE J., LEDER L., LIESS B. (1990), Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein, *Archives of virology*, 111, 213-225
- HAMERS C., DEHAN P., COUVREUR B., LETELLIER C., KERKHOFS P., PASTORET P. (2001), Diversity among bovine pestiviruses, *The Veterinary journal*, 161, 112-122
- HAMERS C., DI VALENTIN E., LECOMTE C., LAMBOT M., JORIS E., GENICOT B., PASTORET P. (2002), Virus neutralising antibodies against 22 Bovine viral diarrhoea virus isolates in vaccinated calves, *The Veterinary journal*, 163, 61-67
- HUGUES L.E., KERSHAW G.F., SHAW I.G. (1959), "B" or Border disease. An undescribed disease of sheep, *Veterinary record*, 71, 313-317
- HULST MM, MOORMANN RJ (1997), Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E(rns) and E2 of classical swine fever virus: E(rns) and E2 interact with different receptors. *J Gen Virol* vol. 78 no. 11 2779-2787
- IQBAL M, FLICK-SMITH H, MCCAULEY JW (2000), Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{rns} with cell surface glycosaminoglycans *J Gen Virol* vol. 81 no. 2 451-459
- JUBB K.V.P., KENNEDY P.C.(1963), *Pathology of domestic animals*, 2, 12-21
- KRAMETTER-FROETSCHER R, DUENSER M, PREYLER B, THEINER A, BENETKA V, MOESTL K, BAUMGARTNER W. (2010), Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Vet J.*; 186(3):342-6.
- KRAMETTER-FROETSCHER R, KOHLER H, BENETKA V, MOESTL K, GOLJA F, VILCEK S, BAUMGARTNER W (2007), Influence of communal alpine pasturing on the spread of pestiviruses among sheep and goats in Austria: first identification of border disease virus in Austria., *Zoonoses Public Health.*;54(5):209-13.
- KREY T., THIEL H.J., RUMENAPF T. (2005), Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry, *Journal of virology*, p.4191-4200
- LEE Y.M., TSCHERNE D.M., YUN S.I., FROLOV I., RICE C.M. (2005), Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication, *Journal of virology*, p. 3231-3242

- LIU L., XIA H., WAHLBERG N., BELAK S., BAULE C. (2009), Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses, *Virology* 385, 351-357
- MAKOSCHEY B, FRANKEN P, MARS JM, DUBOIS E, SCHROEDER C, THIRY J, ALVAREZ M, RYPULA K, CAVIRANI S, HOUTAIN JY, BARTAK P, BROWNLIE J, WOLF G, MEYER G, KLEES W, BEER M, MOENNIG V, THIRY E (2010). IBR and BVD control: the key to successful herd management ; 123(11-12): 519-21
- MEYER G, DEPLANCHE M, ROUX D, MOULIGNIE M, PICARD-HAGEN N, LYAZRHI F, RABOISSON D, MATHEVET P, SCHELCHER F. (2012), Fetal protection against bovine viral diarrhoea type 1 virus infection after one administration of a live-attenuated vaccine. *Vet J.*; 192(2):242-5.
- MEYERS G., RUMENAPF T., THIEL H.J. (1989), Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of Hog Cholera Virus, *Virology* 171, 555-567
- NOBIRON I, THOMPSON I, BROWNLIE J, COLLINS ME (2003), DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine* ; 21: 2082-92.
- OLAFSON P., MAC CALLU A.D., BITSH V. (1946), An apparently new transmissible disease of cattle, *Cornell Vet*, 36, 205-213
- PATON D.J, LOWINGS J.P., BARRETT A.D.T. (1992), Epitope mapping of the gp 53 envelope protein of bovine viral diarrhoea virus, *Virology* 190, 763-772
- PATON D.J., SANDS J.J., ROCHE P.M. (1991), BVD monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity, *Archives of virology*, 47-54
- PETERHANS E., BACHOFEN C., STALDER H., SCHWEIZER M. (2010), Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction, *Vet res.*, 41:44
- PETERHANS E., JUNGI T.W, SCHWEIZER M. (2003), BVDV and innate immunity, *Biologicals* 31, 107-111
- PETERHANS E., SCHWEIZER M. (2010), Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts, *Vet microbiology*, 142, 18-25
- PETERS W., GREISER-WILKE I., MOENNIG V., LIESS B. (1986), Preliminary serological characterization of BVDV strains using monoclonal antibodies, *Veterinary microbiology* 12, 195-200

- PRATELLI A, MARTELLA V, CIRONE F, BUONAVOGLIA D, ELIA G, TEMPESTA M, BUONAVOGLIA C. (2001), Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy, *J Virol Methods.*; 94(1-2):81-5.
- RAMSEY F.K., CHIVERS W.H. (1953), Mucosal disease of cattle, *North American veterinary*, 34, 629-634
- RIDPATH JE, NEILL JD, ENDSLEY J, ROTH JA. (2003), Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am J Vet Res*; 64: 65-9.
- RIDPATH J.F., NEILL J.D., FREY M., LANDGRAF J.G. (2000), Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America, *Veterinary microbiology* 77, 145-155
- RONECKER S, ZIMMER G, HERRIER G, GREISER-WILKE I, GRUMMER B (2008), Formation of bovine viral diarrhea virus E1–E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains *J Gen Virol* vol. 89 no. 9 2114-2121
- RUMENAPF T., UNGER G., STRAUSS J.H., THIEL H.J. (1993), Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses, *Journal of virology*, 3288-3294
- SCHELCHER, F., FOUCAS, G., MEYER G., VALARCHER, J.F (2001). Vaccins et vaccinations contre le virus de la Border Disease. *Proc.Journées nationales GTV*, 215-217.
- STOVER B.C., MULLER K.F. (2010), TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses, *BMC Bioinformatics*. 5;11:7.
- SZYMANSKI MR, FIEBACH AR, TRATSCHIN JD, GUT M, RAMANUJAM VMS, GOTTIPATI K, PATEL P, YE M, RUGGLI N, CHOI KH (2009), Zinc Binding in Pestivirus N^{pro} Is Required for Interferon Regulatory Factor 3 Interaction and Degradation, *Journal of molecular biology*, Volume 391, 2, 438-449
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G. (1997), The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res*. 15;25(24):4876-82.
- VALDAZO-GONZALEZ B, ALVAREZ-MARTINEZ M, GREISER-WILKE I.(2006) Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. *Vet Microbiol* ; 117(2-4):141-53.

- VALDAZO-GONZALEZ B, ALVAREZ-MARTINEZ M, SANDVIK T (2007), Genetic and antigenic typing of border disease virus isolates in sheep from the Iberian Peninsula. *Vet J.*; 174(2):316-24.
- VAN GELDER P, MAKOSCHEY B (2012), Production of viral vaccines for veterinary use. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*; 125(3-4):103-9.
- VAN RIJN PA, MIEDEMA GK, WENSWOORT G, VAN GENNIP HG, MOORMANN RJ. (1994), Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J Virol*; 68: 3934-42.
- VAN RIJN P.A., VAN GENNIP H.G.P., DE MEIJER E.J., MOORMANN R.J.M. (1993), Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia, *Journal of general virology*, 74, 2053-2060
- VAUTRAIN G. (2007), Les pestivirus de l'isard, étude expérimentale de l'infection intra et interspécifique. Thèse de doctorat vétérinaire
- VILCEK S., EASTON L.A., NETTLETON P.F. (1994), Evaluation of a 'one tube' reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of ruminant pestiviruses, *J Virol Methods.*; 50(1-3):343-8.
- VILCEK S., URKOVI B., KOLESÁROVÁ M., GREISER-WILKE I., PATON D. (2004), Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group, *Vet. Res.* 35; 609–615
- VILCEK S. (1997), Secondary structure of the 5'-noncoding region of border disease virus genome RNAs. *Vet Med (Praha).* ; 42(5):125-8.
- WARRENER P., COLLETT M.S. (1995), Pestivirus NS3 protein possesses RNA helicase activity, *Journal of virology*, p. 1720-1726
- WEILAND E., AHL R., STARK F., WEILAND F., THIEL H.J. (1992), A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, Hog Cholera virus, *Journal of virology*, 3677-3682
- WEILAND E., STARK R., HAAS R., RUMENAPF T., MEYERS G., THIEL H.J. (1990), Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide linked heterodimer, *Journal of Virology*, 3563-3569
- WEILAND F., WEILAND E., UNGER G., SAALMULLER A., THIEL H.J. (1999), Localization of pestiviral envelope proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles, *Journal of general virology*, 80, 1157-1165
- WENSWOORT G. (1989), Topographical and functional mapping of epitopes on HCV with monoclonal antibodies, *J. gen. virol.*, 70, 2865-2876

- WENSVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUIJVER E.P., KRAGTEN C., WARNAAR J.C. (1989), Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus, *Veterinary microbiology*, 21; 9-20
- YOUNG NJ, THOMAS CJ, THOMPSON I, COLLINS ME, BROWLIE J. (2005), Immune responses to non-structural protein 3 (NS3) of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in NS3 DNA vaccinated and naturally infected cattle. *Prev Vet Med*; 72: 115-20

ANNEXE 1

Date		Evenement	Samples	Séroneutralisation	RT-qPCR	Hemato	score clinique
14/06/2011	Ma	J-7	Tube EDTA (2)		x		
16/06/2011	Je	J-4	Tube EDTA (1)			x	x
17/06/2011	Ve	J-3	Tube EDTA (1)			x	x
18/06/2011	Sa	J-2	Tube EDTA (1)			x	x
19/06/2011	D	J-1	Tube EDTA (1)			x	x
20/06/2011	Lu	J0 CHALLENGE	Tube sec (3), Tube EDTA (3), NS(2)	SN	x	x	x
21/06/2011	Ma	J1	NS (2)		x		x
22/06/2011	Me	J2	Tube EDTA (3),		x	x	x
23/06/2011	Je	J3	NS (2)		x		x
24/06/2011	Ve	J4	Tube EDTA (3)		x	x	x
25/06/2011	Sa	J5	NS (2)		x		x
26/06/2011	Di	J6	Tube EDTA (3)		x	x	x
27/06/2011	Lu	J7	Tube secs (x3), NS (2)	SN	x		x
28/06/2011	Ma	J8	Tube EDTA (3)		x	x	x
29/06/2011	Me	J9	NS (2)		x		x
30/06/2011	Je	J10	Tube EDTA (3)		x	x	x
01/07/2011	Ve	J11	NS (2)		x		x
02/07/2011	Sa	J12	Tube EDTA (3)		x	x	x
03/07/2011	Di	J13	NS (2)		x		x
04/07/2011	Lu	J14	Tube sec (3), Tube EDTA (3)	SN	x	x	x
05/07/2011	Ma	J15	NS (2)		x		x
06/07/2011	Me	J16	Tube EDTA (3)		x	x	x
07/07/2011	Je	J17	NS (2)		x		x
08/07/2011	Ve	J18	Tube EDTA (3)		x	x	x
09/07/2011	Sa	J19	NS (2)		x		x
10/07/2011	Di	J20	Tube EDTA (3)		x	x	x
11/07/2011	Lu	J21	Tubes secs (3), NS (2)	SN	x		x
12/07/2011	Ma	J22	Tube EDTA (2)		x		x
13/07/2011	Me	J23	NS (2)		x		x
15/07/2011	Ve	J24	Tube EDTA (2)		x		x
16/07/2011	Sa	J25	NS (2)		x		x
18/07/2011	Lu	J27	Tube EDTA (2)		x		x
19/07/2011	Ma	J28	Tubes secs (3), NS(2)	SN			x

ANNEXE 2

Groupe:
N° identification:

	J-2	J-1	J0	J1	J2
	18/06/2011	19/06/2011	20/06/2011	21/06/2011	22/06/2011
Température °C					
Comportement (Normal 0/apathique 1:déprimé 2/prostré 3)					
Appétit (1: léger; 2: modéré, 3: anorexie)					
Fréquence respiratoire					
Jetage nasal 0 absent, 1 séromuqueux, 2 purulent					
Toux					
Lésions du mufle et chanfrein					
Bruits respiratoires renforcés (1: léger; 2: modéré, 3: anorexie)					
Jetage oculaire 0 absent, 1 séromuqueux, 2 purulent					
Ptyalisme 0 absent, 1 séromuqueux, 2 purulent					
Lésions cavité buccale - nature - extension					
Diarrhée					
Etat corporel					

RESUME

En 2009, une nouvelle épizootie due aux pestivirus apparut dans des élevages ovins du centre de la France avec une incidence de 1,9% et de 8,5% dans les élevages laitiers et allaitants, respectivement. Lors de cette épizootie, nous avons, dans un premier temps, isolé des pestivirus chez des animaux atteints du syndrome « hirsute-trembleurs ». Les études phylogénétiques, réalisées sur les séquences 5'UTR et Npro, ont permis d'incriminer le virus Border (BDV). Des souches de deux génotypes différents, le BDV-3 et le BDV-6, co-circulent dans la même zone géographique et pendant la même période. Nous avons ensuite tester l'efficacité d'un vaccin inactivé contre le BVD à induire une réponse en anticorps neutralisants contre le BDV. Nous avons montré que la vaccination de moutons, avec une demi-dose de celle recommandée pour la vaccination des bovins, induit sur une période de 6 mois, une réponse en anticorps capables de neutraliser le BVDV-1 et les différentes souches de BDV isolées lors de cette étude. La vaccination avec un quart de la dose induit aussi la sécrétion d'anticorps neutralisants mais avec plus de variations individuelles chez les ovins et des titres neutralisants plus faibles.

ABSTRACT

In 2009, a new epizootic due to pestivirus occurred in sheep breeding in a central region of France with an incidence of 1.9% and 8.5% in dairy and meat units respectively. In this study, we isolated viruses of this epizootic from small weak lambs that suffer of 'hairy-shaker' syndrome. Phylogenetic studies, performed on the 5'-non-coding and the Npro-coding regions, indicated a border disease virus (BDV) origin with a circulation of two different genotypes (BDV-3 and BDV-6) at the same time and in the same geographical location. We further tested the efficacy of a commercialised inactivated Bovine viral diarrhoea vaccine to induce a neutralizing antibody response in sheep against the new BDV isolated viruses. We showed that vaccination, with half of the vaccine dose recommended for cattle vaccination, induce neutralizing antibodies against BVDV-1 and all tested BDV strains for 6 months post-immunisation. Vaccination with the quarter vaccine dose also induce a neutralizing antibody response but with more individual variability and probably less efficacy.