

761THV-2

République Algérienne Dém

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique

Université SAAD DAHLEB BLIDA

Faculté Des Sciences Agrovétérinaires et Biologiques

Département des sciences vétérinaires

Thème :

**Séroprévalence de la Rhinotrachéite infectieuse bovine
Et de la vulvo-vaginite pustuleuse infectieuse
dans la région de la Kabylie**

Projet de fin d'études

En Vue de l'obtention du diplôme de Docteur en médecine vétérinaire

Année 2012 /2013

Présenté par

MOUAICI Abderrahmane

&

HAOUA Asmaa

Promoteur:

Dr KADDOUR Abdennour

Jury:

President: Dr BENSID Abdelkader

Examineur : Dr SAIDANI Khelaf

REMERCIEMENTS

En préambule à ce modeste travail, nous souhaitons adresser ici tous nos remerciements aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce projet.

Nous tenons à remercier Dr KADDOUR Youcef et l'ensemble de l'équipe de laboratoire vétérinaire de Draa Ben Khedda, pour leur accueil bienveillant et cela malgré leur emploi du temps chargé.

Nous remercions tous nos enseignants de Médecine Vétérinaire qui nous ont suivis pendant notre cursus.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches qui nous ont soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce projet.

Que toutes ces personnes trouvent l'expression de notre reconnaissance.

DEDICACES

A ma très chère mère et mon très cher père

En témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation.

A mes chers frères et sœurs

Pour leur affection compréhension et patience

A mon beau frère Noureddine

A qui je ne trouve pas les mots.

Et à tous ceux qui ont eu une relation de proche ou de loin avec la réalisation de ce travail.

Abderrahmane

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

✿ Je dédie cette thèse à ... ✿

Mes chers parents affables, honorables, aimables : vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Votre prière et bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

A mon frère que j'aime tant, lui et ses belles surprises sucrées. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

A mes chères sœurs pour la complicité qui nous lie, en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

A tous les membres de la famille HAOUA grands et petits,

A mes amis et amies :

Abir ; Gala ; Salma ; Nadia ; Nassima ; Refka ; Marwa ; Hada ; Maghnia ;

Sousou ; Said ; Mouhamed ; Dawed ; Wahab ; pour leur fidélité et avec qui j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Asma

Resumé :

L'enquête sur le virus de l'IBR *Herpesvirus bovin type 1* dans le cheptel bovin en Kabylie, nous a conduit à recenser 19 élevages semi extensifs avec un type de production mixte (viande et laitier) ainsi nous avons pu réaliser 136 échantillons sanguins des bovin adulte plus de 2 ans de race née en Algérie.

L'analyse des sérums avec la technique Elisa a pu obtenir 14 réactions positives sur 136 sérums analysés, ce qui fait 10.29%. Cependant grâce à la séroneutralisation virale sur les 14 prélèvements positifs, nous avons trouvé 13 prélèvements très positifs. Ainsi on a identifié 7 élevages touchés sur 19 par l'IBR.

ملخص:

إن البحث عن فيروس الإلتهاب الأنفي و الرغامى البقري المعدي 1 في مزارع تربية المواشي بمنطقة القبائل، قد أدى بنا إلى إحصاء 19 مزرعة شبه داخلي لإنتاج صنفين (اللحوم والألبان) و أخذت 136 عينة دم من أبقار تفوق أعمارها سنتين ، مولودة في الجزائر.

بعد تحليل الأمصال بتقنية إليزا تحصلنا على 14 تفاعل إيجابي من بين 136 مصل تم اختبارهم، والذي يمثل نسبة 10.29%. و بفضل تقنية تحديد الفيروس التي أجريت على العينات الإيجابية المتحصل عليها سابقا، وجدنا 13 عينة إيجابية للغاية. وهكذا حددنا سبعة مزارع مصابة بفيروس الإلتهاب الأنفي و الرغامى البقري المعدي 1 من أصل 19 مزرعة.

Summary

The research on bovine herpes virus type 1 (IBR) in cattle's in Kabylia land led us to identify 19 farms, semi extensive with mixed production of meat and dairy. We collected 136 blood samples of adults over 2 years old of Algerian race. The serum was analyzed with the ELISA technique, 14 positive reactions were obtained from the 136 blood samples tested, which is 10.29%. However due to the neutralization of the virus on the 14 positive sample, we found 13 samples very positive. Thus we have identified seven touchdowns on 19 farms by IBR.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : sous-famille des *betahepesvirinaes*

Tableau 2 : sous-famille des *gammaherpesvirinaes*

Tableau 3 : sous famille des *alphahepesvirinaes*

Tableau 4 : infection des ruminants domestiques et sauvages par BHV-1

Tableau 5: classification et fonction des glycoprotéines BHV-1

Tableau 6: âge des animaux séropositifs

Tableau 7: Types d'élevages étudiés

Tableau 8: Résultat Elisa individuel

Tableau 9: Résultat Elisa selon les élevages

Tableau 10: Résultats de la séroneutralisation virale

Liste des Figures

Figure 01: Structure du virus BHV-1

Figure 02: Organisation du génome des alphaherpesvirus des ruminants

Figure 03: Cycle de réplication des alphaherpesvirus

Figure 04: Description d'une primo-infection par le BoHV-1 jusqu'à l'établissement de l'état latent

Figure 05: Physiopathologie de l'infection à BoHV-1

Figure 06: Réponse immunitaire à l'infection par le BoHV-1

Figure 07: Cinétique de production d'anticorps en cas d'infection ou de reactivation

Figure 08: nombre des animaux séropositifs selon l'âge

Figure 09: Taux d'individus séropositifs

Figure 10 : Séropositifs selon les élevages

Figure 11: Résultats de la séroneutralisation virale

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

BHV: bovid herpes virus

BoHV-1: bovine herpes virus-1

BoHV-2: bovine herpes virus-2

BoHV-4: bovine herpes virus-4

BoHV-5: bovine herpes virus-5

CapHV: caprin herpes virus

CerHV-1: cerf herpes virus-1

DBK: Draa ben Khedda

DICC: dose infectante en culture cellulaire

ECP: effet cytopathogène

IBR: rhinotrachéite infectieuse bovine

Ig: immunoglobuline

IPB: balanoposthite pustuleuse infectieuse

IPV: vulvo-vaginite pustuleuse infectieuse

LRVDBK : laboratoire régional de Draa Ben khedda

MEM: Milieu Minimum Essentiel

ml: milliliter

nm: nanometer

OvHV-1: ovin herpes virus-1

RanHV-1: Ran herpes virus-1

SHV-1: suid herpes virus-1

SVF : sérum de veau fœtal

TMP: Tétraméthylbenzidine

U: université

V: vache

μl: microlitre

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : AGENT ETIOLOGIQUE D'IBR L'HERPESVIRUS BOVINS DE TYPE 1	
1. CLASSIFICATION.....	2
1.1 Famille des herpesviridae.....	2
2. STRUCTURE DU VIRION	5
3. GENOME.....	5
4. CYCLE DE MUTIPLICATION.....	8
4-1. Adsorption ou attachement.....	8
4-2. Pénétration dans la cellule.....	8
4-3. Transcription et réplication d'ADN.....	8
4-3-1. La décapsidation.....	8
4-3-2. La synthèse des protéines	9
4-3-3. Réplication d'ADN et encapsidation	9
4-4. Maturation.....	9
4-5. Libération du virus.....	10
5. GLYCOPROTEINES VIRALES.....	11
6. PATHOGENIE.....	12
6-1. Généralité.....	12
6-2. Primo-infection.....	12
6-2-1. Pénétration dans l'organisme.....	12
6-2-1-1. Contamination	12
6-2-1-2. Réplication et ré-excrétion.....	12
6-2-2. Désamination dans l'organisme	14
6-2-2-1. Virémie	14

6-2-2-2. Voie neurale.....	14
6-2-2-3. Transmission de cellule en cellule.....	14
6-2-3. Manifestation clinique.....	15
6-2-3-1. Infection sub-clinique.....	15
6-2-3-2. Forme IPV.....	15
6-2-3-3. Forme IBR.....	16
6-2-3-4. Avortement.....	16
6-2-3-5. Mammite.....	17
6-2-3-6. Symptômes digestifs.....	17
6-2-3-7. Mortalités néonatales.....	17
6-3. Latence.....	17
6-4. Réactivation et ré-excrétion virale.....	18
7. REPONSE IMMUNITAIRE DE L'HOTE.....	19
7.1 Réponse non spécifique.....	19
7.2 Réponse cellulaire.....	20
7.3 Réponse humoral.....	20

DEUXIEME PARTIE: PARTIE EXPERIMENTALE

1. INTRODUCTION.....	22
2. MATERIEL ET METHODE DE TRAVAIL.....	22
2-1. Matériel.....	22
2-2. Méthodes.....	22
A. Recensement du cheptel rencontrant des problèmes d'avortement.....	22
B. Réalisation des prélèvements sanguins.....	22
C. Analyse des prélèvements (LRVDBK et Anses Sophia-A) de 02 avril à ce jour.....	23
a-TECHNIQUE D'ELISA : ELISA INDIRECTE.....	23
b-ELISA COMPETITION gE et gB.....	25
c-LA NEUTRALISATION VIRALE DE L'IBR.....	25
RESULTATS.....	31
DISCUSSION.....	35

CONCLUSION.....37

ANNEXE 1 REACTIFS ELISA

ANNEXE 2 SERONEUTRALISATION

REFERENCES

Introduction :

Les pathologies de la reproduction des bovins sont nombreuses et variées, allant des métrites, infertilités jusqu'aux avortements. Ces pathologies ont un impact économique important. Les éleveurs désirent tous avoir un bon élevage, rentable et exempt de maladies. Cependant, un certain virus qui est largement distribué dans la population de bovin est susceptible de toucher une entreprise lorsqu'elle s'y en attend le moins. En effet, La vulvovaginite infectieuse (IPV) ou la rhinotracheïte infectieuse bovine (IBR) sont présentes dans tous les continents, bien que la prévalence et l'incidence soient différentes (Straub, 1991; Ackermann et Engels, 2006). En Algérie la pathologie est mal connue, En effet, les recherches ponctuelles réalisées jusqu'à présent sur cette pathologie ont montré la circulation de cet agent dans les élevages (Dechicha 2003, Bouaziz, O, et Tainturier, D. 2009) sans toutefois parvenir à estimer convenablement la prévalence de cette infection ni à caractériser les souches impliquées.

L'objectif de notre travail est la recherche de la séroprévalence de la vulvovaginite infectieuse (IPV) ou la rhinotrachiète infectieuse bovine (IBR) responsables d'avortements chez des bovins en Algérie et de les comparer avec celles isolées jusqu'à présent sur les différents continents. Ces données permettront d'apprécier plus finement la situation épidémiologique de l'IBR dans les cheptels ciblés.

Notre travail comporte une étude bibliographique faisant le point sur la maladie et le virus et une partie pratique qui met en évidence le recensement du cheptel, avant de faire des prélèvements sanguins et analyser sérologiquement avec la technique Elisa et la neutralisation virale (culture cellulaire).

**PREMIERE PARTIE : AGENT ETIOLOGIQUE
D'IBR L'HERPESVIRUS BOVINS DE TYPE 1**

1 Classification :

1-1 Famille des *herpesviridae* :

Les *herpesviridae* constituent une famille de virus très répandus dans les espèces animales et humaine : une centaine est décrite. Les *herpesviridae* se divisent en trois sous-familles : *alpha*, *bêta* et *gammaherpesvirinae*. L'appartenance à la famille des *herpesviridae* a été initialement définie par l'architecture de virion : le génome est un ADN bicaténaire linéaire de très grande taille, situé dans une capsidie est entourée d'une enveloppe protéique à symétrie cubique, et cette capsidie est entourée d'une enveloppe lipidique dérivée de la membrane cellulaire, dans laquelle sont insérées de nombreuses glycoprotéines [2].

La sous-famille des *betaherpesvirinae* est constituée des genres *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus* et *Roseolovirus*. Elle a très peu d'importance en médecine vétérinaire, ils ont une étroite spécificité d'hôtes [3]. Aucune espèce de ruminants n'est affectée par les représentants de cette sous-famille [4].

Tableau 1: sous-famille des *betaherpesvirinae* : [16]

Genre	Virus de l'homme	Virus des animaux
<i>Cytomegalovirus</i>	Human cytomegalovirus	Porcine cytomegalovirus Cercopithecine herpesvirus 5 et 8
<i>Muromegalovirus</i>		Murid herpesvirus 1 Guinea pig cytomegalovirus
<i>Roseolovirus</i>	Human herpesvirus 6 Human herpesvirus 7	

La sous-famille des *gammaherpesvirinae* contient le genre *lymphocryptovirus* dont les cibles sont des poissons d'eau douce et d'eau salée et le genre *Rhadinovirus* ayant pour cibles des singes dont les ouistitis [5]. Et chez les ruminants est représenté par l'herpesvirus bovin type 4 (BoHV-4) et les virus impliqués dans les différentes formes de coryza gangreneux [6].

Tableau 2 : sous-famille des *gammaherpesvirinaes* [6]

Nom du virus	Especies sensibles	Maladie
Herpesvirus bovin de type 4	Bovin, accessoirement autres ruminants	Vulvovaginite, metrite post partum, avortement, infections subcliniques
Herpesvirus ovin type 2 (OvHV-2)	Ovin, bovins, cervidés	Coryza gangreneux, forme europeenne
Herpesvirus des alcelaphine (AlcHV-1)	Gnou bleu (<i>conchoaetes taurinus</i>), bovins	Coryza gangreneux, forme africaine
Herpesvirus des alcelaphine (AlcHV-2)	Bubale (alcelaphus buselaphus), bovins	Coryza gangreneux atypique, infection non fatale chez bovin

La sous-famille des *alphaherpesvirinae* on peut distinguer deux genres : le genre *simplexvirus* (herpesvirus bovin de type 2) et le genre *varicellovirus* (herpesvirus bovin de type 1, herpesvirus bovin de type 5, herpesvirus porcine de type 1, virus responsable de la maladie de Marek chez les volailles, virus responsable de la laryngo-trachéite infectieuse chez les volailles) [3].

Tableau 3 : sous famille des *alphaherpesvirinaes* [6]

Nom du virus	Especies sensibles	Maladie
Herpesvirus bovin type 1 (BHV-1)	Bovin, ovin,(caprin)	Rhinotracheite infectieuse bovine
Herpesvirus bovin type 2 (BHV-2)	Bovin, autre ruminant africain	Maladie d'Allerton, théilite infectieuse bovine
Herpesvirus bovin type 5 (BHV-5)	Bovin	Encéphalite bovine
Virus de la maladie d'Aujeszky (SHV-1)	Porc, accessoirement ruminants, carnivores	Encéphalite mortelle
Herpesvirus du cerf (CerHV-1)	Cerf élaphe (<i>cervus elaphus</i>)	Maladie oculaire
Herpesvirus du renne (RanHV-1)	Renne (<i>rangifer tarandus</i>) (bovin)	Infection génitale subclinique
Herpesvirus caprin (CapHV-1)	Caprins (ovin, bovins)	Vulvo-vaginite néonatale mortelle
Herpesvirus du buffle	Buffle d'asie (<i>bubalus bubalis</i>)	Infection subclinique
Herpesvirus ovin de type 1(OvHV-1)	Ovin	Adenomatose pulmonaire ovine (agent causal primitif est un retrovirus)

1-1-1 Herpesvirus bovin type1 (BHV-1) :

Le BHV-1 est à l'origine du complexe rhino-trachéite infectieuse bovine / vulvo-vaginite pustuleuse infectieuse bovine (IBR/IPV). Il possède un tropisme pour les cellules épithéliales

les cellules mononuclées sanguines et neurones [9], selon [6;2] il existe deux sous-types de BoHV-1 :

Le BoHV-1.1 est principalement impliqué dans la forme clinique respiratoire (IBR) [2].

Le sous-type BHV1.2 est responsable principalement de la forme clinique génitale (Vulvo-vaginite infectieuse pustuleuse (IPV), balanoposthite infectieuse pustuleuse (IPB), et est lui-même divisé en sous-types BoHV1.2a et BoHV1.2b, ce dernier ne présente pas la capacité de provoquer des avortements [3].

Un troisième sous-type de BoHV-1 (BoHV-1.3) était auparavant décrit. Ce virus appartient désormais à une nouvelle espèce virale, l'herpesvirus bovin de type 5 (BoHV-5), responsable d'encéphalite chez les bovins [6].

D'autres espèces peuvent être affectées par le BoHV-1 qui est soit isolé, soit des anticorps spécifiques ont été détectés. Certaines espèces sont présentées dans le tableau suivant

Tableau 4: infection des ruminants domestiques et sauvages par BHV-1: [3]

Espèces	Infection primaire	Excrétion virale	Réponse sérologique	Latence	Réactivation - ré excrétion
Chèvre	+	++	++	+	++
Cerf	+/-	+	+/-	-	-
Renne	+/-	+	-	-	-
Mouton	+	++	++	+	++

Mais la présence d'anticorps anti-BoHV-1 dans une espèce peut être due à l'infection par un autre herpesvirus. Donc seul l'isolement viral du virus et la caractérisation du virus comme BoHV-1 est la preuve de l'entière réceptivité d'une espèce de ruminant [6].

1-1-2 Souches et mutants :

Dans un sous-type, existent de nombreuses souches. Elles varient par leur tropisme, leur virulence ou leur répartition géographique. Elles sont utilisées pour faire des sérums de référence pour les tests diagnostiques ou pour faire des vaccins. Dans le sous-type BoHV-1.1, on peut nommer les souches : Iowa, Cooper, Jura, Malaysia...

Certaines souches comportent des mutations, comme la souche Salwa qui est naturellement déletée pour la protéine gE [10].

2 Structure du virion :

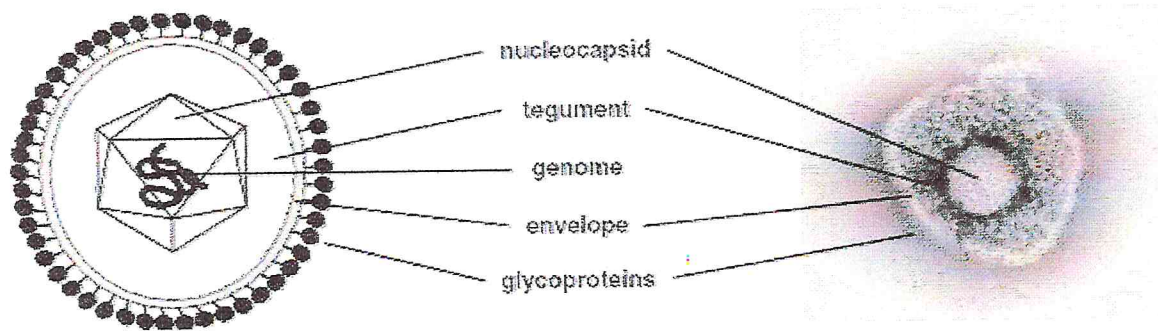


Figure 1: Structure du virus BHV-1 : [8]

Le virus possède une taille allant de 150 à 200 nm [3]. Les herpes virus sont des virus enveloppés selon [6] il possède :

- Génom est composé d'un ADN bicaténaire de 120 à 160 kilo paires de bases.
- La capsid (nucléocapsid) est un icosaèdre, composé de 162 capsomère, dont 12 sont pentamériques, et 150 sont hexamériques.
- Le tégment est une structure protéique amorphe située entre la capsid et l'enveloppe.
- L'enveloppe est issue d'une membrane cellulaire, constituée d'une bicouche phospholipidique, hérissée de spicule glycoprotéique.
- Glycoprotéines : on dénombre dix glycoprotéines d'enveloppe connues : gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL et gM. Ils sont ancrés dans l'enveloppe virale et jouent des rôles essentiels dans l'attachement et la pénétration du virus dans la cellule [6].

3 Génom :

Le matériel génétique des herpes virus est constitué d'un double brin d'ADN linéaire, qui se circularise immédiatement après sa séparation de la capsid et la pénétration dans le noyau de la cellule infectée [31;33].

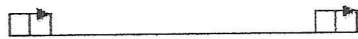
La composition en bases (G+C) varie de 31 à 75%, cette proportion étant particulièrement élevée chez les alphaherpèsvirus, Le poids moléculaire de cet ADN varie entre 120 et 230 kpb [31;33].

Selon l'organisation des séquences nucléotides constituant l'ADN, Le génome des herpèsvirus est classé en six groupes désignés par les lettres A à F [31;33].

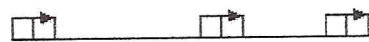
A : une séquence longue unique avec à chaque extrémité une séquence terminale de même orientation.



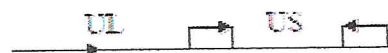
B : les séquences terminales ont des motifs répétés de part et d'autre de la séquence unique avec une même orientation. Le nombre de ces séquences répétées peut varier d'une extrémité à l'autre.



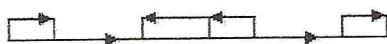
C : le nombre de motifs répétés dans les séquences terminales est faible, la séquence unique contient une séquence répétée en tandem.



D : une seule séquence unique courte à une extrémité avec une orientation inverse que la séquence unique, et une séquence répétée dans la séquence unique avec une même orientation que la séquence unique. Il y a alors deux séquences uniques, une longue UL et une courte US.



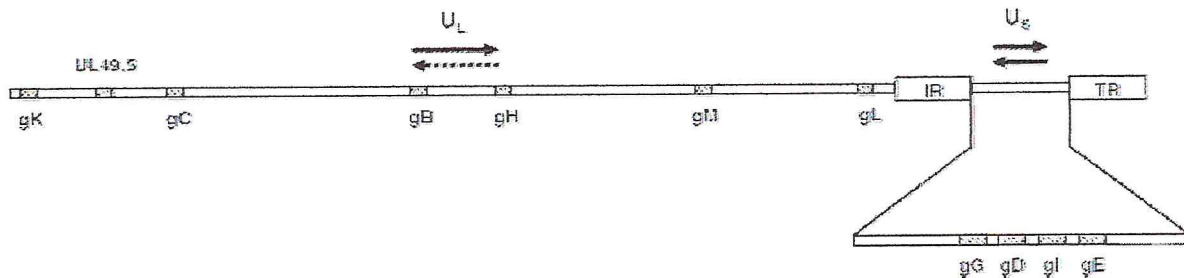
E : deux séquences terminales de même orientation que la séquence unique, deux séquences de taille différente au sein de la séquence unique de sens inverse.



F : une seule séquence unique.

Les génomes du BHV-1 et de tous les alphaherpèsvirus qui lui sont apparentés appartiennent au groupe D. ils sont composés d'une unité longue (U_L) et d'une unité

courte (U_s) flanquée de deux séquences répétées inverses IR (séquence répétée interne) et TR (séquence répétée terminale) [31].



(U_L : unité longue ; U_s : unité courte ; IR et TR : séquences répétées terminales et internes)

Figure 02: Organisation du génome des alphaherpesvirus des ruminants. [36]

Un projet de collaboration internationale a permis le séquençage complet du génome du BoHV-1, principalement à partir de la souche Cooper. Celui-ci est composé de 67 gènes uniques répartis entre l'unité longue et l'unité courte, et de 2 gènes dupliqués dans les régions IR et TR [37].

Le génome de BHV-1 code un grand nombre de protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN, le métabolisme des acides nucléiques... Les gènes codant ces protéines peuvent être classés en quatre catégories [38] :

1/ les gènes codant des protéines responsables de la multiplication du virus

2/ les gènes codant des protéines permettant la diffusion du virus dans l'organisme

hôte à partir de son lieu d'inoculation.

3/ les gènes codant des protéines altérant les défenses immunitaires de l'hôte.

4/ les gènes codant des protéines responsables de la pathogénicité du virus sur les cellules hôtes.

4 Cycle de multiplication virale :

Les herpèsvirus sont capables de suivre un cycle de multiplication en fonction des conditions de l'infection : appelé le cycle lytique qui assure la multiplication virale.

Le programme lytique correspond à l'expression séquentielle et ordonnée de l'ensemble des gènes viraux. Le cycle de multiplication aboutit à la formation d'une nouvelle génération de particules infectieuses et à la lyse cellulaire qui est objectivable via à l'effet cytopathogène du virus (altération dans l'apparence microscopique des cellules en culture faisant suite à l'infection virale) [39].

Les virus vont pénétrer dans les cellules hôtes grâce à plusieurs molécules, ou récepteurs, qui sont situées sur un nombre limité de cellules hôtes. L'absence ou la présence de ces récepteurs influence sur la réceptivité de l'espèce, le tropisme tissulaire et les symptômes de la maladie engendrée [40;41].

Une fois que le virus du BoHV-1 pénètre dans les cellules cibles, le cycle viral de réplication commence, il comprend cinq étapes : [42]

4-1 Adsorption ou attachement :

Attachement du virus à la cellule cible par les glycoprotéines d'enveloppes (gB et gC). Cette fixation faible est relayée par l'interaction entre gD et des récepteurs cellulaires spécifiques [42].

4-2 Pénétration dans la cellule hôte :

Cette étape implique la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique [42]. Par l'intermédiaire de quatre glycoprotéines : B, D, H et L (leur rôle est l'expansion de la fusion), libérant ainsi la nucléocapside et le tégument dans le cytoplasme [42;43;44].

4-3 Transcription et réplication de l'ADN :

4-3-1 La décapsidation : s'effectue au niveau d'un pore nucléaire (il s'agit de l'éclipse). [43;44].

L'acheminement des particules virales jusqu'aux pores du noyau, par des microtubules, en étant fixée à la dynéine par le biais de la protéine virale UL 34 [43;45].

Dès qu'il y est libération de l'ADN viral dans le noyau, cet ADN viral se circularise alors immédiatement ou débute la transcription des gènes viraux qui requiert la participation de l'ARN polymérase II cellulaire, sous le contrôle de facteurs viraux. [43]

4-3-2 La synthèse des protéines: [43; 44]

Certaines protéines du tégument interagissent avec des composants transcriptionnels de l'hôte de façon à stimuler la transcription des gènes α . La synthèse s'effectue en cascade, on distingue trois types de protéines en fonction de leur ordre d'apparition dans la cellule infectée :

- *Protéine précoce immédiate (IE ou α)*: protéine de régulation, non structurale, induit la synthèse des protéines \bar{E} et \bar{L} en exerçant un rétrocontrôle négatif sur leur propre synthèse.
- *Protéines précoces (E ou β)* : elles sont impliquées dans le métabolisme nucléotidique et les événements liés à la réplication de l'ADN viral et induisent la transcription des gènes \bar{L} . Ces protéines atteignent leur pic d'expression au bout de 4 à 8 heures suivant l'infection.
- *Protéines tardives (L ou γ)* : protéines structurales (capside, tégument, enveloppe), glycoprotéines ou protéines régulatrices, ces dernières sont synthétisées alors que la réplication de l'ADN a déjà débuté alors que la traduction des \bar{IE} et \bar{E} commence avant la réplication de l'ADN.

Au total, plus de 70 protéines ont été synthétisées.

4-3-3 Réplication de l'ADN et encapsidation: [43;44]

L'ADN viral se réplique par un mécanisme de cercle roulant « rolling-circle ». Ceci génère des concatémères, structures complexes composées d'unités génomiques se suivant en tête à queue. Ces intermédiaires de réplifications sont clivés en unités génomiques par une activité endonucléasique puis intégrées à l'intérieur des capsides.

4-4 Maturation : [43;44]

Après maturation des protéines de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule infectée celles-ci reviennent vers le noyau où se produit l'assemblage du noyau viral.

5 Glycoprotéines virales :

Le BoHV-1 est un virus enveloppé qui possède donc des glycoprotéines qui jouent un rôle primordial dans les interactions avec les cellules hôtes, et des cibles importantes pour la réponse immunitaire [6]. On dénombre 10 glycoprotéines d'enveloppe connues six d'entre elles sont localisées sur le segment UL (gK, gC, gB, gH, gM, gL) et quatre sur le segment Us (gG, gD, gI, gE), certaines glycoprotéines semblent être indispensables à la réalisation du cycle de multiplication virale c'est les glycoprotéines essentielles qui sont : gB, gD, gH, gK et gL et les autres glycoprotéines sont non essentielles leurs délétions dans un gène codant n'affectent que d'une façon mineure leur multiplication virale [4].

Les glycoprotéines gB, gC, gD sont très immunogènes et sont qualifiées de majeures et les autres glycoprotéines gE, gH, gI, gK, gL, gG sont qualifiées de mineures. Cette distinction est importante pour réaliser des vaccins dirigés contre le BHV-1 [20].

Tableau : classification et fonction des glycoprotéines BHV-1 [1;26]

Nom	Gene	Propriété	Fonction	Interaction
gB	UL	Hautement Immunogène	Essentielle Attachement, entrée dans la cellule, passage de cellule à cellule, fusion	Récepteur héparine-like
gC	UL	Hautement Immunogène	Non essentielle Attachement, virulence (hémagglutinine)	Récepteur héparine-like complément (C3b)
gD	Us	Hautement Immunogène	Essentielle Entrée dans la cellule, passage de cellule à cellule	Associée à gH
gE	Us	Faiblement Immunogène	Non essentielle Passage de cellule à cellule	gI
gG	Us	Faiblement Immunogène	Non essentielle Maintien des jonctions intercellulaires	
gH	UL	Faiblement Immunogène	Essentielle Entrée dans la cellule, passage de cellule à cellule, sortie	Forme un complexe avec gL qui permet l'ancrage de gL dans la membrane cellulaire
gI	Us	Faiblement Immunogène	Non essentielle Passage de cellule à cellule	Associée à gE, permet la fusion cellulaire
gK	UL	Faiblement Immunogène	Essentielle Transport intracellulaire vers la surface de la cellule des composants viraux contrôlant la fusion des cellules	
gL	UL	Faiblement Immunogène	Essentielle Entrée dans la cellule	Complexe avec gH
gM	UL	Faiblement Immunogène	Non essentielle Influence la fluidité membranaire donc favorise l'entrée et la sortie du virus de la cellule hôte	

6 Pathogénie:

6-1 Généralités:

Le virus BoHV-1 possède une spécificité cellulaire. Il infecte les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur et de la muqueuse génitale, ainsi que les lymphocytes TCD4+, les monocytes, les macrophages, les amygdales, les conjonctives et les neurones [42].

Comme tout virus, BoHV-1 est dépendant de la machinerie cellulaire pour se répliquer. Il provoque l'arrêt de la synthèse des protéines cellulaires de l'hôte par l'intermédiaire de la protéine Virion Host Stutthof (VHS) [49]. Cette protéine codée par le gène tardif UL41, provoque la destruction des ARN messagers de la cellule des premières heures suivant l'infection. L'arrêt de la synthèse des protéines cellulaires de l'hôte provoque une nécrose [42].

Ensuite, la multiplication intensive du virus dans les cellules épithéliales respiratoires ou génitales conduit à une lyse des cellules par induction de l'apoptose [50], qui se traduit cliniquement par l'apparition d'ulcères. Le virus BoHV-1 induit également l'apoptose des autres cellules infectées, hormis les neurones [42].

6-2 Primo-infection :

6-2-1 Pénétration dans l'organisme :

6-2-1-1 Contamination :

Dans les conditions naturelles, les herpes virus des ruminants se transmettent principalement par contact direct entre individus ou par l'intermédiaire d'aérosols sur des courtes distances, par contre l'infection génitale requiert un contact direct, soit de façon directe au cours de la saillie, soit par les paillettes d'insémination artificielle ou le transfert d'embryons. Il existe d'autres sources d'infection mais peu courantes, comme l'alimentation, l'eau, ou du matériel contaminé comme les manchons trayeurs de la machine à traire [43]. Les voies d'entrée naturelles du BoHV-1 sont le tractus respiratoire supérieur et génital [42].

6-2-1-2 Réplication et excrétion virale:

Suite à l'interaction entre le virus et la cellule hôte, il y a une rapide pénétration et la réplication virale à lieu dans les cellules épithéliales de la muqueuse ayant servi de porte d'entrée, Le site de réplication primaire dépend donc du site d'inoculation virale soit : [42;43;44]

a- Inoculation oculo-nasale : BoHV-1 : multiplication dans les épithéliums de la muqueuse nasale, du pharynx et des amygdales [51].

Il s'ensuit une perturbation des mécanismes broncho-dilatateurs, ce qui prédispose à une invasion bactérienne secondaire. Les lésions de nécrose consécutives à la multiplication virale et à la forte réaction inflammatoire engendrée conduisent à une maladie pulmonaire obstructive avec une augmentation de la résistance au passage de l'air, une rétention de gaz carbonique et une perte du volume pulmonaire utile [52].

b- Inoculation génitale : BoHV-1 [53;54]: multiplication dans les muqueuses vaginales et prépucciales.

Suite à cette répllication intense, de nouveaux virions sont assemblés et excrétés à des titres élevés dans le mucus nasal jusqu'à 10¹⁰ DIC50 (Dose Infectante en Culture Cellulaire) par gramme de mucus. L'excrétion débute entre 7 et 8 heures post-infection.

La période d'excrétion primaire correspond à une forte dissémination du virus dans le milieu extérieur. Elle dure entre 10 et 16 jours, avec un pic d'excrétion entre le quatrième et le sixième jour après l'infection [42].

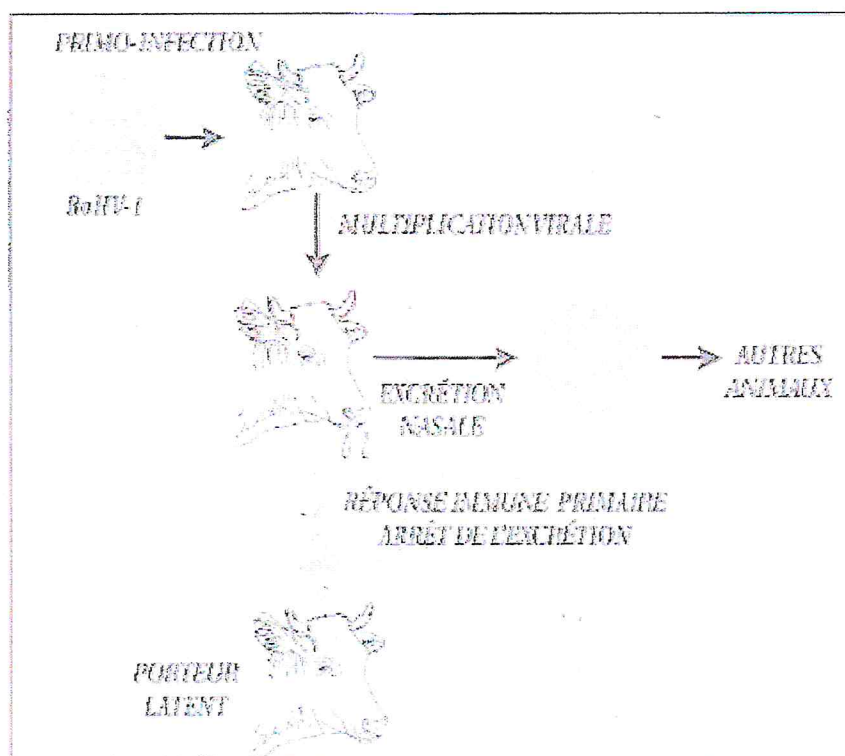


Figure 04 : Description d'une primo-infection par le BoHV-1 jusqu'à l'établissement de l'état latent [55].

6-2-2 Dissémination dans l'organisme :

La dissémination de l'infection par les herpes virus emprunte trois voies différentes : le sang ; le système nerveux et la transmission de cellule à cellule (transmission locale) [56].

6-2-2-1 Virémie :

L'infection primaire provoque une virémie transitoire avant l'apparition des anticorps spécifiques, le virus est associé aux cellules mononucléées sanguines qui peut entraîner chez l'adulte des localisations secondaires du virus au niveau d'organes cibles provoquant ainsi une grande variété de symptômes [43;44].

C'est le cas du BVH-1 où le virus peut être responsable d'avortements, d'entérites, et d'infections généralisées mortelles chez les nouveau-nés non protégés par l'immunité colostrale [57].

Après une inoculation intra nasale par une souche hyper virulente de BoHV-1, on peut isoler le virus du BoHV-1 dans le sérum de veaux infectés pendant plusieurs jours [58]. Il semblerait que le passage du virus dans le sang est permis par les lymphocytes et les monocytes. De plus il a été montré in vitro que les leucocytes peuvent être un support au virus du BoHV-1, ainsi qu'un lieu de réplication limitée [59,60]. Ainsi les lymphocytes permettent de transporter les virions, adsorbés a leur surface, alors que les monocytes permettent une réplication limitée du virus avant de le relâcher [61].

6-2-2-2 Voie neurale : neuroprobasié

Lors de la phase de multiplication, le virus du BoHV-1 atteint la terminaison des nerfs périphériques innervant le site initial d'infection et remontent par voie axonale rétrograde jusqu'au ganglions nerveux régional, siège de latence [62]. Les premiers neurones à être infectés sont les cellules du ganglion trijumeau, et les cellules olfactives de la muqueuse nasale lors d'une inoculation intra nasale, les cellules du ganglion sacral lors de contamination vénérienne [53,63].

6-2-2-3 Transmission de cellule en cellule :

Les virions du BoHV-1 sont capables de se propager d'une cellule infectée a une autre non infectée, sans passer par le milieu extracellulaire, donc a l'abri des anticorps spécifiques

[43]. La majorité des glycoprotéines d'enveloppe joue un rôle dans cette dissémination de cellule à cellule et en particulier gE et gG [64]. Et cette voie est importante lors de la réactivation du virus à l'état latent chez un individu immunisé [53;63].

6-2-3 Manifestations cliniques: [53;63;65]

Le BoHV-1 responsable de la forme IBR, la rhinotrachéite infectieuse bovine ainsi que de multiples autres signes cliniques s'expliquant à la suite de la virémie et le BoHV-1.2 responsable de la forme IPV, vulvo-vaginite pustuleuse infectieuse bovine et d'une forme respiratoire discrète.

La sévérité des symptômes varie en fonction de la virulence des souches et du statut immunitaire de l'animal [66]. Les formes les plus fréquentes sont les formes subcliniques et l'IBR.

6-2-3-1 Infection subclinique:

L'animal peut être infecté et excréter du virus sans aucun signe clinique. C'est notamment le cas lors de la ré-excrétion virale suite à une levée de latence ainsi que lors de réinfection.

Ces animaux représentent un danger épidémiologique puisqu'ils peuvent contaminer le reste du troupeau en étant asymptomatiques donc non détectables cliniquement. Cette forme reste la plus fréquente [44].

6-2-3-2 Forme IPV : vulvo-vaginite pustuleuse infectieuse, balanoposthite [67;68]

- **Femelle** : Vulvo-vestibulo-vaginite ulcéro-pustuleuse infectieuse bovine

Tableau clinique :

- Incubation de 4 à 5 jours

-Les signes généraux sont discrets, l'infection restant localisée dans les dernières portions du tractus génital.

-Les symptômes associés sont une pollakiurie liée à l'inflammation vulvaire, la queue étant par ailleurs constamment levée.

En liaison avec la douleur et les efforts de pousser, il peut se produire un prolapsus vaginal voire utérin.

- **Mâle** : balanoposthite

Tableau clinique :

Une hyperthermie (41,5°C) ainsi qu'une inflammation du pénis et du fourreau.

Les complications bactériennes peuvent conduire à des inflammations (une funiculite ;une orchite).

6-2-3-3 Forme IBR : rhinotrachéite infectieuse bovine : [66;67;69]

Les dommages causés par une infection virale sont une inflammation, des changements vasculaires, un œdème, une exsudation de fibrine et de cellules inflammatoires

Tableau clinique :

- Le veau est sensible à partir de l'âge de 3-4 mois, avant il était protégé par les anticorps colostraux de la maladie mais pas de l'infection.
- L'incubation dure de 2 à 7 jours, le virus est présent dans le mucus nasal dès 24 heures après infection.les bovins infectés présentent ensuite de l'hyperthermie (parfois jusqu'à 42°C), deviennent anorexiques et toussent.
- Chez les vaches laitières, la production chute brutalement. Fréquemment, on observe du jetage +nasal, séreux les premiers jours puis muco-purulent par la suite. Le muflle est sévèrement congestionné
- présence de foyers nécrotiques sur la muqueuse nasale. D'autres symptômes sont parfois rencontrés : hyperexcitabilités, conjonctivite, dyspnée, détresse respiratoire (due à l'obstruction des voies aériennes supérieures par des débris fibrino-purulents), hypersalivation. En l'absence de surinfection bactérienne, la mortalité est faible et les animaux récupèrent en quelques jours.
- A l'autopsie, la muqueuse des voies respiratoires supérieures comportent des lésions nécrotico-hémorragiques : dépôts fibrino-purulents, fausses membranes nécrotico-diphthéroïdes recouvrant une muqueuse ulcérée ou fortement congestivo-hémorragiques.
- Des lésions de broncho-pneumonie peuvent être associées à ce tableau lésionnel, notamment en cas de surinfection par Mannheimia Haemolytica [70].

6-2-3-4 Avortement: [71;72]

- L'avortement se produit dans tous les stades de gestation mais on note une prédominance lors du dernier tiers de la gestation (entre 4 et 7 mois de gestation), quel que soit l'âge de la vache.

6-2-3-5 Mammite:

Une inoculation intra-mammaire provoque une mammite [73].

6-2-3-6 Symptômes digestifs :

Tableau clinique : [44]

- L'animal présente une stomatite associée à une laryngo-trachéite, La gastro-entérite se traduit par une diarrhée profuse incoercible, chargée de mucus et de fausses membranes.
- Une infection double IBR/BVD intensifie les signes cliniques de chaque une d'elles.

6-2-3-7 Mortalité néonatale: [74]

La contamination du veau s'effectue pendant le dernier tiers de la gestation (transmission verticale) ou bien dans les premiers jours de vie. Les signes cliniques débutent 3 ou 4 jours après la naissance et la mort survient 3 à 4 jours après l'apparition des signes cliniques.

6-3. La latence :

Le phénomène de latence correspond à la persistance du virus dans l'organisme en l'absence de détection possible de celui-ci. Le virus peut persister ainsi de nombreuses années, donc après une infection primaire ou une vaccination par un virus vivant atténué ou délété, le virus du BHV-1 rentre en latence dans les noyaux des neurones de certains ganglions [27]. Si l'infection primaire est respiratoire, le lieu de latence est le ganglion trigéminal [13]. Si l'infection primaire est génitale, le lieu de latence est le ganglion sacré [28 22].

Dans les conditions naturelles la latence virale fait systématiquement à une primo infection, donc un animal infecté sera à vie porteur.

Après contamination et réplication locale, BHV-1 pénètre les terminaisons nerveuses des nerfs sensitifs de l'épithélium infecté, migre par voie axonale vers le corps cellulaire, dans le noyau de ce dernier le génome se circularise sous forme d'épisome et persiste sans réplication virale, le virus rentre alors en latence [16]. Pendant la latence, l'animal ne présente aucun signe clinique. Seuls des tests sérologiques peuvent mettre en évidence le passage du virus [3].

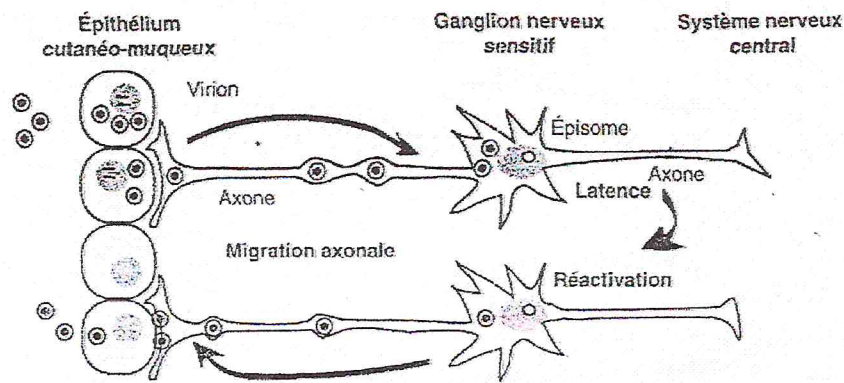


Figure 05: physiopathologie de l'infection à BoHV-1 [16]

6-4 Réactivation et ré-excrétion:

Le virus BHV1 peut sortir de sa latence jusqu'à plusieurs années après l'infection primaire, suite à divers stimuli. Après la réactivation il y a synthèse de nouveaux virions dans le site de latence [4].

Il existe différents stimuli déclenchant la réactivation du virus, comme la mise-bas, le transport la surinfection par le virus parainfluenza[25], la bronchite vermineuse *Dictyocaulus viviparus* [29].

Des injections de dexaméthasone a raison 0.1 mg/kg de poids vif /jpar voie intraveineuse pendant 3 à 5 jours provoquant une réactivation mais l'immunodépression qui pourrait découler de l'injection répétée de glucocorticoïdes n'est pas en cause. La dexaméthasone aurait une action directe sur le neurone hébergeant le BHV-1[30].

Une injection de 3-Méthylindole, qui est un produit de la transformation du tryptophane qui peut engendrer des lésions pulmonaires aux ruminants qui en ingèrent [32].

Tous ces événements induisent une augmentation de la concentration de cortisol circulant dans le sang.

La ré-excrétion virale est faite après réactivation dans les neurones du ganglion trigéminé, BHV-1 débute un cycle de réplication lytique qui peut conduire à la mort du neurone [34].

Les nouvelles particules virales migrent par voie axonale jusqu'à leur porte d'entrée initiale : la muqueuse respiratoire. Le virus est capable de passer des axones aux cellules gliales accolées au neurone mais ensuite, il ne peut pas passer de la cellule gliale à une cellule non nerveuse sans sortir des cellules nerveuses [75].

Le niveau de l'immunité de l'animal infecté influe sur le degré de ré-excrétions. En effet des bovins ont été immunisés avec une souche virale thermosensible contre BHV-1 puis inocule

avec une souche sauvage virulente, ont développé une immunité forte et il a été impossible de mettre en évidence une ré-excrétion, même après un traitement de dexaméthazone. Donc la réactivation virale ne s'accompagne de la ré-excrétion [3].

7 Réponse immunitaire :

La réponse immunitaire selon [18] induit trois sortes de réponses immunitaires :

- une première réponse non spécifique, cellulaire avec l'action des polynucléaires neutrophiles et la production précoce de cytokines.
- une réponse spécifique cellulaire au cours de laquelle interviennent les lymphocytes T.
- une réponse spécifique humorale faisant intervenir les lymphocytes B.

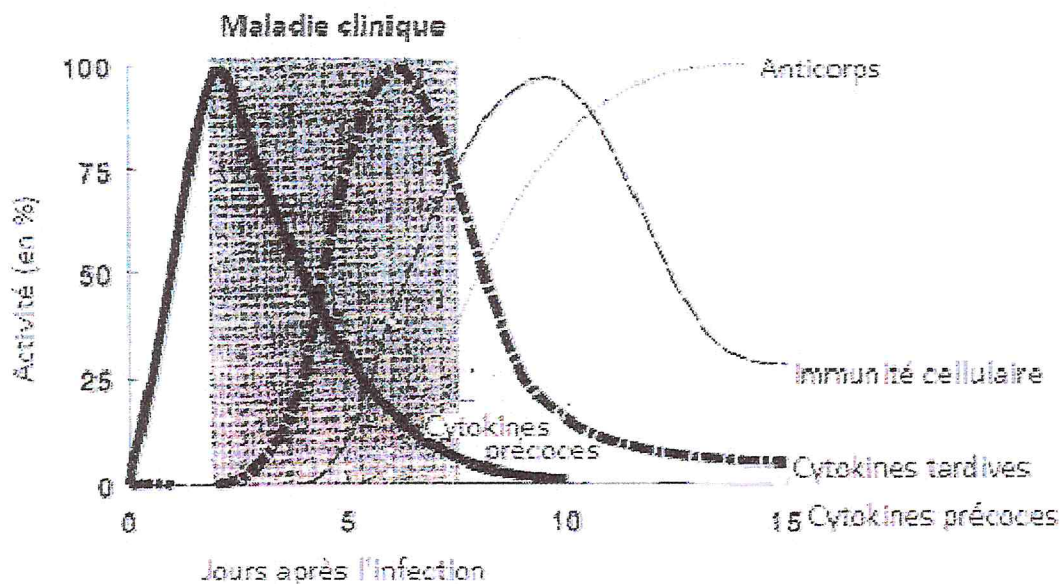


Figure 06: Réponse immunitaire à l'infection par le BoHV-1[7].

7.1 Réponse immunitaire non spécifique :

La réponse immunitaire non spécifique est réalisée par les Polynucléaires Neutrophiles (PNN), les macrophages, les cellules Natural Killers (NK), les fibroblastes, le complément, les interférons et d'autres facteurs qui limitent l'attachement du virus aux cellules de l'épithélium respiratoire [12]. Suite à une infection, les interférons α et β sont présents dès la

cinquième heure post-infection, qui sont produits par les fibroblastes et les macrophages, et ils sont retrouvés dans les sécrétions nasales et dans, leurs concentration atteints un pic dans 36 à 72 heures et elle reste élevée jusqu'à l'arrêt de la multiplication virale [3;15;20].

Les cytokines qui initient la réponse inflammatoire, ils sont libérées par les cellules qui intervient dans le site de l'infection (macrophage, les polynucléaire neutrophile, les cellules NK) puis sont relayés par l'immunité spécifique [11]. Les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine (IL)-1 β et le *tumor necrosis factor* (TNF)- α , sont responsable du syndrome fébrile observé rapidement après l'infection, une réaction inflammatoire ainsi qu'une infiltration parenchymateuse pulmonaire par les polynucléaires neutrophiles 24 à 48 heures après infection par le BoHV-1. Ces cytokines sont produits par les cellules alvéolaires et les Pneumocytes [9 ; 20].

Les cytokines chémotactiques, les chémokines, induisent l'expression de molécules d'adhésion (ICAM 1) sur les cellules endothéliales, ce qui favorise l'adhésion des leucocytes. Leur synthèse est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires.

7.2 Réponse cellulaire:

Après la mise en place précoce de la réponse immunitaire non spécifique, la réponse immunitaire à médiation cellulaire s'établit, 7 à 10 jours après l'infection. Les glycoprotéines virales gB, gC et gD, qui sont les glycoprotéines majeures d'enveloppe, déclenchent la réponse immunitaire spécifique et en sont les cibles [3]. La glycoprotéine gC agit notamment en stimulant les lymphocytes T_{CD4} [7]. gC et gD constituent également des cibles pour les lymphocytes T_{CD8+} cytotoxiques [14]. Les autres acteurs de cette réponse sont les macrophages, les cellules NK, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes T_{h1} et T_{h2}. Ils produisent des interférons γ qui sont dirigés contre les antigènes viraux. Ces éléments de la réponse immunitaire détectent et détruisent les cellules de l'hôte qui sont infectées [3]. Lors d'une seconde infection ou de la réactivation d'une phase de latence les polynucléaires neutrophiles détruisent les cellules infectées par cytotoxicité dépendante des anticorps [20].

7.3 Immunité humorale:

La réponse humorale faisant intervenir les anticorps intervient surtout pour prévenir une nouvelle infection par BoHV-1, plus que pour la guérir. Lors d'une primo-infection les anticorps ont un rôle moins important que l'immunité à médiation cellulaire [23].

Par contre, en cas de seconde infection, la réponse de type humorale avec production d'anticorps est plus efficace que la réponse cellulaire [3].

Ces anticorps produits par les lymphocytes B, cette synthèse ne commence qu'entre 7 et 12 jours après l'infection, avec un taux maximal au bout de 20 jours. Il y a d'abord production d'IgM puis d'IgG. Localement, au niveau des muqueuses, il peut y avoir sécrétion d'IgA (dans les sécrétions bronchiques et nasales), qui apparaissent au bout de 2 à 3 jours et disparaissent au bout de 7 à 14 jours [24].

Les anticorps n'empêchent pas le passage du virus de cellule à cellule. Les anticorps agissent en neutralisant les particules virales extracellulaires et en limitant la diffusion extracellulaire de l'infection. Un taux élevé d'anticorps anti-BoHV-1 dans la muqueuse nasale va permettre, même en cas de réactivation virale, de neutraliser le virus et d'empêcher sa transmission à d'autres animaux.

Les anticorps persistent deux à trois ans chez l'animal, et on peut les détecter plus de 5 ans après la première infection [9;20]. En particulier les anticorps anti-gB [23], comme lors de la réponse spécifique à médiation cellulaire, les glycoprotéines gB, gC et gD sont la principale cible des anticorps [4].

La cinétique de la réponse humorale par anticorps après exposition au virus BoHV-1 par voie intra-nasale est représentée sur la Figure [19].

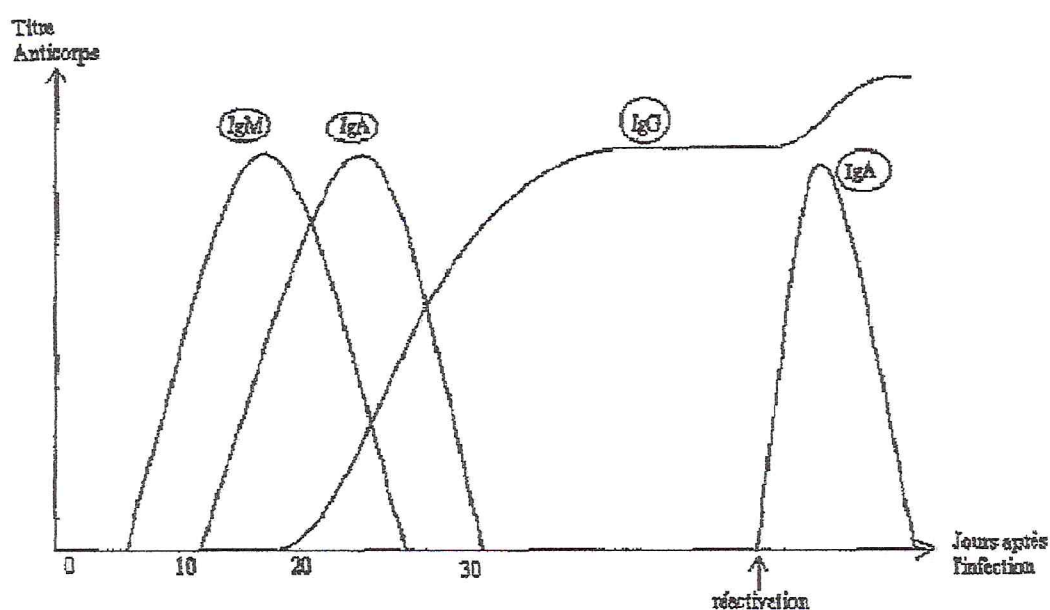


Figure07 : Cinétique de production d'anticorps en cas d'infection ou de réactivation [19]

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

1-Objectif :

Ce travail a comme objectif de donner une idée sur la présence ou l'absence dans les cheptels bovins algériens le virus de l'IBR, le BHV-1. Donc une enquête a été effectuée en Kabylie, du janvier 2012 jusqu'à juin 2013.

La méthode de diagnostic consiste à prélever du sang sur des bovins, les prélèvements seront envoyés au laboratoire, pour faire la séroprévalence ou une mise en évidence et le taux d'anticorps anti BHV-1 et une culture cellulaire.

Ces échantillons prélevés dans la wilaya de Tizi-Ouzou et de Boumerdes, sont conservés au frais et acheminés vers le laboratoire vétérinaire de DBK sous chaîne de froid.

2-matériels et méthode:

2-1.matériels:

Pour le prélèvement sanguin nous avons utilisé: aiguille, porte aiguille, gants, tube et glacière.

Sur des bovins de race locale ou bovins nés en Algérie

Sérum sanguin

Kit Elisa

Culture cellulaire sero neutralisation virale gB, gE, gD

2-2.méthode:

A. Recensement de cheptels rencontrant des problèmes d'avortement:

- Espèces cibles : bovine et caprine.

- Elevages :

- différentes exploitations agricoles privées;

- centres d'élevages étatiques ;

- Région : Kabylie

- Nombre d'élevages à inclure dans l'étude : n= 100 à 200.

B. Réalisation des prélèvements sanguins :

Nous avons réalisé des prélèvements sanguins (en tube sec) sur des animaux âgés plus de 2 ans de race locale ou nés en Algérie, pour le moment on est à 138 exploitations.

Préparation et identification des échantillons :

Prétraitement des prélèvements sanguins réalisés en Kabylie du 5 au 20 mars (136 prélèvements) du juin au septembre (580 prélèvements).

- centrifugation des échantillons et extraction des sérums ;
- identifications des sérums de V1 – V136 et de V137- V580;
- conservation des sérums au froid (de 2 à 8C° durant une semaine, plus d'une semaine de congélation à -20C°).

C. Analyse des prélèvements (LRV DBK et Anses Sophia-A) de 02 avril à ce jour:

a-TECHNIQUE D'ELISA : ELISA INDIRECTE (kit IDEXX IBR Individual, lot : 1243 exp le 18/05/2013)

Description et principe :

Les microplaques sont pré-sensibilisées avec un lysat de BHV-1. Les échantillons à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits de la microplaque. En présence d'anticorps spécifiques du BHV-1 dans l'échantillon à tester, il se forme des immun-complexes Antigène-Anticorps. Après lavage, un Conjugué immunoglobuline anti-ruminants couplé à une enzyme est mis à incuber. Ce conjugué se fixe sur les immun-complexe Antigène-Anticorps, après lavage le substrat de l'enzyme (TMB) est distribué dans les puits. En présence d'enzyme, le substrat est oxydé développe une coloration bleu virant au jaune. La réaction est stoppée après distribution de la solution d'arrêt. L'intensité de la coloration qui en résulte est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-BHV-1 présente dans l'échantillon à tester.

Le diagnostic est établi en comparant la densité optique de l'échantillon à la densité optique (DO) moyenne du contrôle positif (se reporter aux paragraphes « calculs » et « interprétation » des résultats).

Mode opératoire :

Réserver le nombre de plaque(s) nécessaire(s). Établir le(s) plan(s) de plaque(s) correspondant(s).

Les contrôles peuvent être déposés n'importe où sur la microplaque.

Porter tous les réactifs à 18-26°C avant utilisation et bien homogénéisé par agitation douce ou au Vortex. Utiliser un embout de pipete différent pour chaque échantillon.

- 1- Diluer les contrôles et les échantillons au 1/10 directement dans la plaque :
 - Distribuer 180 µl de tampon de dilution N°2 dans chaque puits de la microplaque sensibilisée.
 - Distribuer 20 µl de contrôle négatif non dilué dans le puits approprié.
 - Distribuer 20 µl de contrôle positif non dilué dans les deux puits appropriés.
 - Distribuer 20 µl de chaque échantillon dans les puits appropriés.
- 2- Homogénéiser le contenu de la microplaque à l'aide d'un agitateur de microplaques.
- 3- Couvrir la microplaque (adhésif) et incuber 1 heure (+ou- 5min) à +37°C (+ou- 3°C).
- 4- Laver 3 fois chaque puits avec approximativement 300 µl de la solution de lavage. Eliminer la solution de lavage contenue dans la microplaque entre chaque lavage. Après le dernier lavage éliminer le liquide résiduel contenu dans les puits par retournement et tapotement de la microplaque sur le papier absorbant. Eviter la dessiccation des puits.
- 5- Distribuer 100 µl de conjugué dilué dans chaque puits.
- 6- Couvrir la microplaque et incuber 30 minutes (+ou-3mn) à +37°C (+ou-3°C).
- 7- Lavage 3 fois chaque puits.
- 8- Distribuer 100 µl de substrat TMB N°9 par puits.
- 9- Incuber 20 minutes (+ou- 3mn) à 18-26°C à l'abri de la lumière.
- 10- Distribuer 100 µl de solution d'arrêt N°3 par puits.
- 11- Placer la microplaque dans le lecteur en monochromatisme à 450nm.
- 12- Calculer les rapports de DO.
- 13- La réaction est validée si la valeur moyenne de DO de contrôle positif (cpx) est supérieure ou égale à 0,350 et si le rapport entre la valeur moyenne de densité optique du contrôle positif (cpx) et la valeur de la densité optique du contrôle négatif (CNA₄₅₀) est supérieure ou égale à 3,50.

b-ELISA COMPETITION gE et gB : ont été également réalisés au laboratoire Anses Sophia-Antipolis.

c-LA NEUTRALISATION VIRALE DE L'IBR :

Le principe :

La détection d'anticorps neutralisants contre le BoHV-1 dans un sérum est réalisée en microplaque par la technique de neutralisation virale, selon protocole décrit dans la norme NF U 47-030.

Mode opératoire :

Neutralisation viral (J0 12/04/2012)

Filtration et dé-complémentation des sérums à étudier.

- Le volume minimum nécessaire est de 300 µl de sérum à étudier pour 1 essai. Les sérums (sérums à analyser et sérums de contrôle) sont débarrassés des contaminants bactériens par filtration sur des membranes de 0,22 µm.
- Déposer 300 µl sur une membrane de filtration.
- Centrifugé 10 min à 6000 rpm à température ambiante.
- Collecter l'éluât (sérum filtré).
- Les sérums filtrés (sérums à analyser et sérums de contrôle) sont inactivés au bain-marie à 59°C ±1°C, pendant 30 minutes pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques et virus éventuels.

Suspension virale ajustée à 100 DECP50 / 50 µl

- Son titre est obtenu par dilution de la suspension stock selon l'exemple suivant :

Titre de la suspension stock : $10^{4,1}$ DECP50 / 50 µl

Le titre ciblé de 100 DECP50 équivaut à 10^2 DECP50)

Pour l'obtenir, il faut diluer de $10^{4,1}$ à 10^2 soit $10^{2,1}$ fois, soit au 1/125,89 ($\log 125,89=2,1$).

- La dilution doit se faire sous PSM dans du milieu de culture. Prévoir pour une microplaque de titration environ 9 ml de suspension virale à 100 DECP50 / 50 µl.

NB : la suspension virale est gardée dans la glace jusqu'à sa distribution dans la microplaque

Remarque : respecter d'un essai à l'autre les mêmes proportions de chaque dilution. *Exemple de dilution du BoHV-1 lot 5 pour 4 plaques :*

- Dilution 1 (1/60) : 100 µl solutions viral stock + 2,7 ml de milieu de culture.*
- Dilution 2 (1/10) : 500 µl de la dilution 1 + 4,5 ml de milieu de culture.*
- Dilution 3 (1/10) : 4 ml de la dilution 2 + 36 ml de milieu de culture.*

Bien homogénéiser (par agitation au Vortex) entre chaque dilution.

Neutralisation du virus par les anticorps des sérums

- Chaque sérum (ainsi que les témoins internes) sera dilué, sous PSM, du pur au 1/4 au minimum (dilution de raison 2) dans du milieu de culture.
- Chaque dilution de sérum à étudier sera répétée sur deux rangées.
- Les dilutions des témoins internes sont déposées dans une rangée.

Remarque : pour éviter les contaminations lors des dépôts, gardez dans une main le couvercle de la plaque pendant le dépôt et veillez à le replacer sur la plaque entre les dépôts.

Dilution des sérums et témoins internes

- Pour les sérums et témoins internes, procéder comme suit :
- Déposer 50µl de milieu de culture dans chaque cupule, excepté la première cupule de chaque rangée de dilution.
- Déposer 100µl de sérum à tester dans la première cupule.
- Homogénéiser à la pipette et prélever 50 µl du mélange de la première cupule et les transférer dans la deuxième cupule.
- Changer les pointes de la pipette.
- Homogénéiser à la pipette et reprélever 50 µl dans la deuxième cupule pour les déposer dans la troisième. Changer de pointes. Continuer ainsi les dilutions de raison 2 jusqu'à la dernière cupule. Dans la dernière cupule, retirer et jeter 50µl.

- Pour le témoin virus, procéder comme suit :
- Ajouter 50 µl de SVF [3.6.] dans chaque cupule, excepté la première.
- Déposer 100 µl de suspension virale à 100 DECP₅₀/ 50µl dans la première cupule (voir 3.4.1.2).
- Réaliser des dilutions de raison 2 du pur au 1/2048, en changeant de pointes à chaque fois.
- Pour le témoin cellule, procéder comme suit :
- Ajouter 50 µl de milieu de culture MEM dans chaque cupule.

Éliminer 50 µl

	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	...
T+	110ul T+	M	M	M	M	M	

T-	100ul T-						
N°1	100ul N°1						
N° 2	100ul N°2						
T virus	100ul Virus à 100 DECP ₅₀ /50µl	S 50µl	s	S	S	s	...
T virus	100ul Virus à 100 DECP ₅₀ /50µl	S 50µl	s	S	S	s	...
T virus	100ul Virus à 100 DECP ₅₀ /50µl	S 50µl	s	S	S	s	...
T cellule	50ul milieu	M	M	M	M	M	...

S : 50 µl de SVF

M : 50 µl de milieu de culture MEM

-Ajout du virus à 100 DECP₅₀/50 µl :

- T+, T-, Sérums à tester (n°1 et n°2) : Ajouter 50 µl de dilution virale à 100 DECP₅₀/50µL dans chaque cupule.
- Pour le témoin virus, ajouter 50 µl de milieu de culture dans chaque cupule.
- Pour le témoin cellule ajouter 50 µl de milieu de culture dans chaque cupule.

Exemple d'une demi-microplaque :

	pur	1/2	¼	1/8	1/16	1/32	...
T+	A	A	A	A	A	A	A
T-	A	A	A	A	A	A	A
N°1	A	A	A	A	A	A	A
N° 2	A	A	A	A	A	A	A
T virus	M	M	M	M	M	M	M
T virus	M	M	M	M	M	M	M
T virus	M	M	M	M	M	M	M

T cellule	M	M	M	M	M	M	M
------------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

A : 50ul de dilution virale à 100 DECP₅₀/50 µl

M : 50 µl de milieu de culture MEM

Recouvrir les microplaques de leur couvercle.

- Incuber les microplaques 24 heures dans une étuve à 37°C ± 2°C, 5 % CO₂ ± 1%
- Noter l'heure de début d'incubation sur la feuille de paillasse (ANA.E2.FDP.02).

-Mise en contact des échantillons avec les cellules (J+1 13/04/2012)

Préparation des cellules :

- Utiliser des cellules confluentes d'une culture d'environ 4 jours.
- Sous PSM, trypsiner des cellules sensibles confluentes et les reprendre avec du milieu d'entretien à 10 % de SVF : suspension A.
- Prévoir environ 20 ml de suspension cellulaire pour une plaque (soit 3 ml de trypsine + 17 ml de MEM à 10% SVF).
- Numération des cellules : dénombrer les cellules selon la procédure ANA-P2.PRT.05.

- Ajout des cellules :

- Au bout de 24 heures de neutralisation, ajouter 150 µl de cellules homogénéisées à la pipette (à la concentration de $\approx 2 \times 10^5$ cellules / ml) par puits.
- Incuber les microplaques 72 heures dans une étuve à 37°C ± 2°C, 5 % CO₂ ± 1%
- Noter l'heure de début d'incubation sur la feuille de paillasse (ANA.E2.FDP.02).

Exemple de demi-microplaque :

	pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	...
T+	B	B	B	B	B	B	B
T-	B	B	B	B	B	B	B

T+	B	B	B	B	B	B	B
N° 2	B	B	B	B	B	B	B
T virus	B	B	B	B	B	B	B
T virus	B	B	B	B	B	B	B
T virus	B	B	B	B	B	B	B
T cellule	B	B	B	B	B	B	B

B : 150 µl de cellules MDBK

Lecture des plaques (J+2 et J+4)

- 24 h après l'ajout des cellules (J+2 post-neutralisation virale) :
 - évaluer l'effet cytotoxique des sérums, notamment au pur ;
 - vérifier dans les cupules « témoin cellule » que le tapis cellulaire soit complet (que les cellules forment une monocouche).
- Les plaques seront incubées 3 jours (J+4 post-neutralisation virale) à $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $5\% \text{ CO}_2 \pm 1\%$.

Lecture au microscope inversé par recherche de l'effet cytopathogène (ECP)

- Après 72 h d'incubation (noter le jour et l'heure de lecture sur la feuille de paillasse ANA.E2.FDP.02), parcourir en première intention les puits avec l'objectif x 4 pour repérer rapidement l'ECP caractérisé par des cellules en grappes et un tapis cellulaire se rétractant, puis passer si nécessaire à l'objectif x10.

Remarque : bien balayer les bords des cupules où se trouvent souvent les foyers isolés.

- Si un doute persiste, il est possible de relire à J+5 ou J+6 post-neutralisation virale à condition que les tapis ne présentent pas de signes de destruction dus au vieillissement.
- Enregistrer les résultats sur la feuille de paillasse (ANA.E2.FDP.02) comme suit :
 - Les puits protégés (tapis non détruits donc présence d'anticorps neutralisants) sont notés (-).
 - Les puits présentant un ECP (foyer(s) de cellules détruites) sont notés (+).
 - Les puits ayant présenté un effet cytotoxique à 24h (J+2 post-neutralisation virale) sont hachurés.

La lecture des résultats le lundi 16/04/2012 : on a 13 échantillons positifs pour neutralisation.

Les résultats:

Nombre d'animaux prélevés était de 136 sur un nombre d'élevages de 19

1. **L'âge des animaux** prélevés était entre 2ans et 10ans.

Tableau 06 : âge des animaux séropositifs

Age	3ans	4ans	5ans	6ans	7ans	9ans
Résultat +	4	1	3	1	2	3

On trouve les séropositifs pratiquement chez toutes les tranches d'âges des animaux.

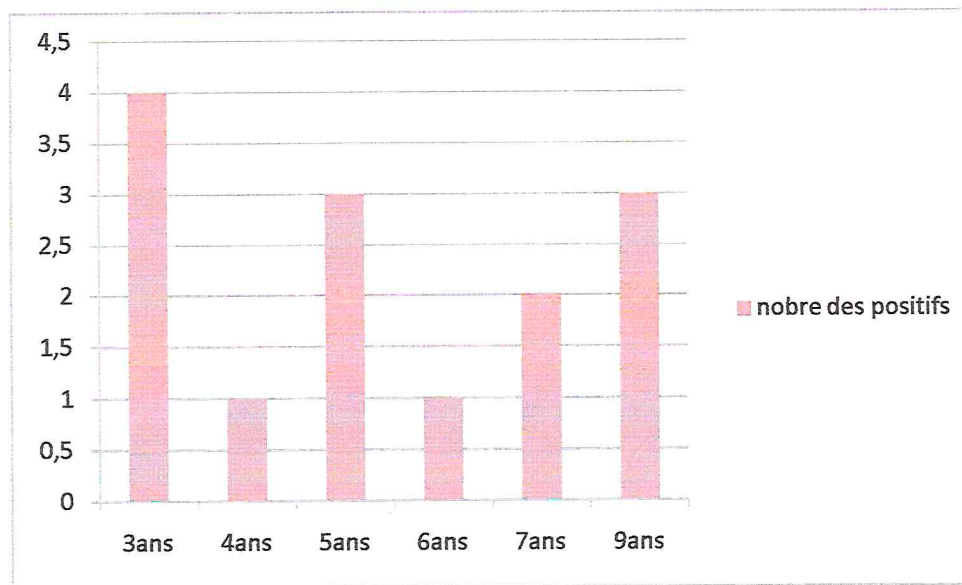


Figure 08: Nombre des animaux séropositifs selon l'âge.

Type d'élevage: aucun élevage n'était intensif ou extensif, tous les élevages étaient semi intensif (19 élevages).

Tableau 07: Types d'élevages étudiés

Type	Nombre d'élevage
Intensif	0
Semi intensif	19
Extensif	0

2. **Type de production :** d'après notre étude, la totalité de nos élevages étaient des élevages de production mixte (viande et laitier).

3. **État d'hygiène de nos élevages** : Il est moyen voire insuffisant, la majorité de nos élevages ne respectent pas les conditions d'hygiène.

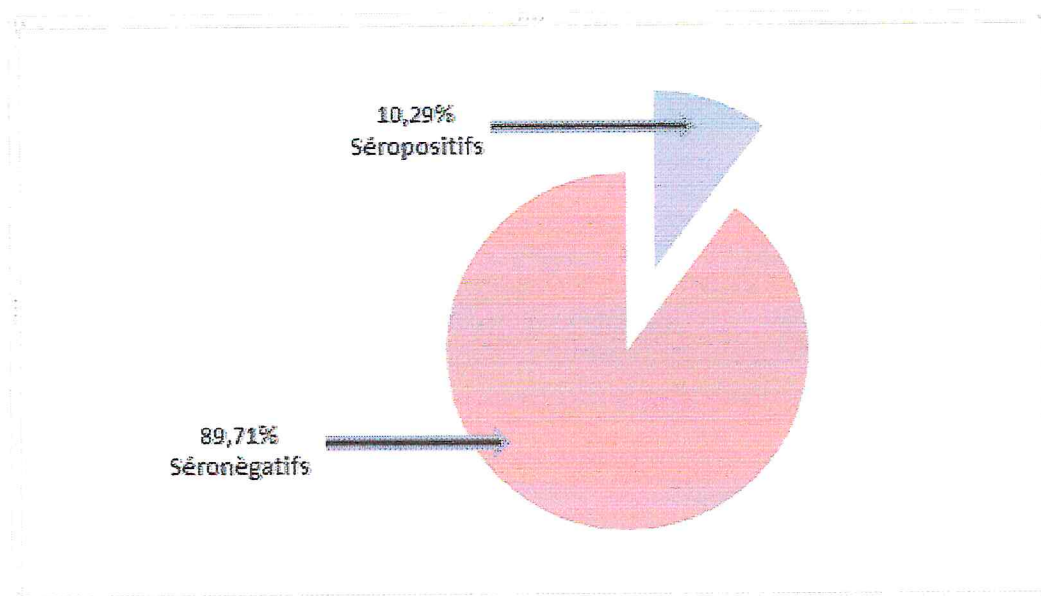
4. **État sanitaire** : En générale il était mauvais malgré un suivi sanitaire correcte ; vaccination et dépistage assurés par nos vétérinaires privés et étatiques. Ainsi, des problèmes de la reproduction sont signalés dans tous les élevages.

5. **Résultats de l'Elisa** :

Tableau 08: Résultat Elisa individuel:

sérum	v2	v7	v9	v11	v14	v16	v17	v24	v44	v75	v91	v92	v99	v112
Résultat +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La réaction positive est observée à partir de 14 sérums pour toutes les analyses ELISA : indirect, compétition gB et gE



Figures 09: Taux d'individus séropositifs

Tableau 09: Résultat Elisa selon les élevages :

Élevage n°	7	8	9	11	12	15	18
Résultat +	1	2	3	2	1	4	1

Selon nos résultats 7/19 des élevages soit 36,84% présentaient des séropositifs.

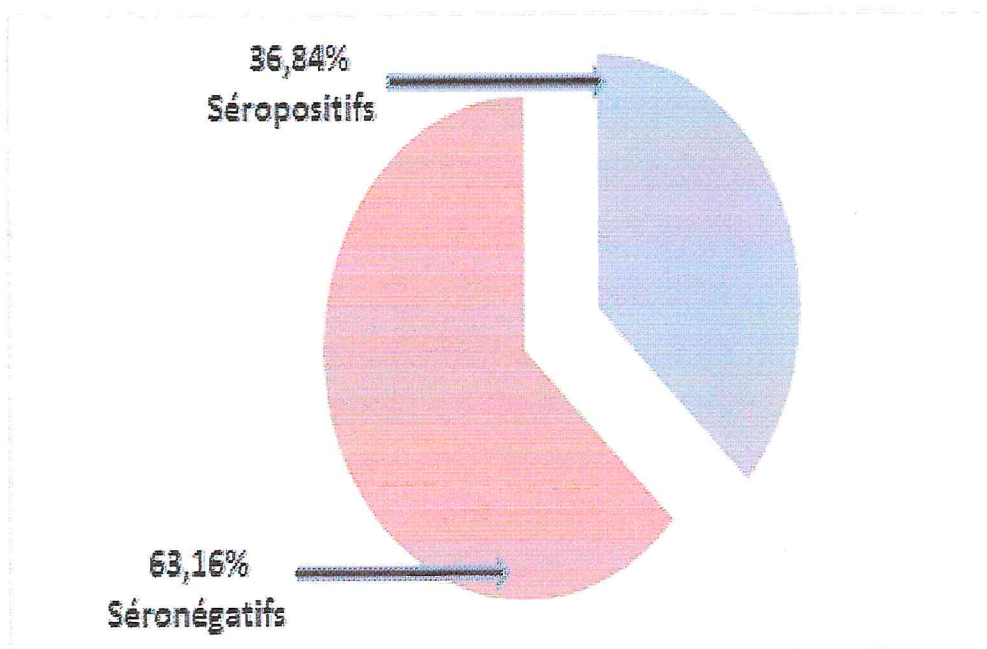

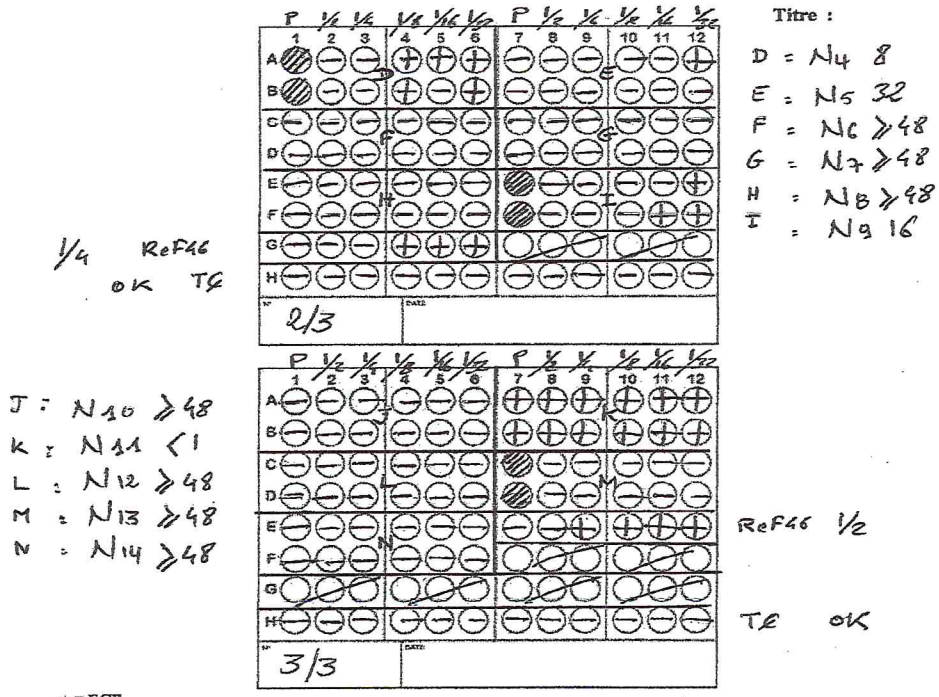


Figure 10: Séropositifs selon les élevages

COPIE CONFORME
A L'ORIGINAL

	ENREGISTREMENT LABORATOIRE DE SOPHIA ANTIPOLIS Fiche de Paillasse : FDP	
	2-RUM	
	SERONEUTRALISATION IBR (IS 380 selon NF U 47 - 030)	
Codification : ANA-E2.FDP.02.	Révision : 01	Page 2 / 3

Virus / n° lot : **BoHV-1 lot n° 5**
 Identification des échantillons :



+ = ECP
 Titre viral en DECP50/50µl
 Titre sérique en DNS0/50µl

Opérateur : **KA + E.D.**
 Observations :

Document ne pouvant être reproduit sans l'accord l'Anses laboratoire de Sophia Antipolis
 TEL : 04-92-94-37-00 Fax : 04-92-94-37-01

Figure 11: Résultats de la séroneutralisation virale

13 séropositifs sur 14 de l'Elisa étaient très positifs même à des dilution 1/8 à 1/32.

Tableau 10: Résultats de la séroneutralisation virale

sérum	v2	v7	v9	v11	v14	v16	v17	v24	v44	v75	v91	v92	v99	v112
Résultat +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

DISCUSSION

Les avortements sont les principales causes de pertes économiques dans les élevages des bovins laitiers. A la perte sèche des fœtus s'ajoutent une perte de production laitière et les coûts d'entretien des femelles non productives. Parmi les causes d'avortements, la part d'intervention des causes infectieuses est une donnée très importante à connaître dans chaque région pour le choix judicieux des mesures de lutte.

L'âge des animaux prélevés était entre 2ans et 10ans : selon notre travail on trouve les séropositifs pratiquement chez toutes les tranches d'âges des animaux.

D'après (Castrucci et al., 2000) tous les groupes d'âge d'un troupeau peuvent en être atteints. Cependant, les cas de morbidité et les cas fatals sont plus importants en période néonatale et pour les nourrissons que chez les adultes (Patel, 2005). L'IBR a une distribution mondiale et près de 50% des cheptels de bovins adultes ont déjà été en contact avec cette maladie (Seal, 2007).

Type de production : d'après notre étude, la totalité de nos élevages étaient des élevages de production mixte (viande et laitier). La Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR) est présente sur tous les continents bien que la prévalence et l'incidence soient différentes (Straub, 1991; Ackermann et Engels, 2006).

État sanitaire : En générale il était mauvais malgré un suivi sanitaire correcte ; vaccination et dépistage assurés par nos vétérinaires privés et étatiques. Ainsi, des problèmes de la reproduction sont signalés dans tous les élevages. Le virus peut causer, entre autre, des pertes économiques importantes souvent sous-estimées (Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (RSIA), 2004). De plus, il est responsable de divers problèmes au niveau de la production et de la reproduction ce qui est un point important pour la vie d'une entreprise.

Résultats de l'Elisa : selon notre travail, la réaction positive est observée à partir de 14 sérums (10,29%) sur 136 prélèvements pour toutes les analyses ELISA indirect, compétition gB et gE ce qui permet de les distinguer des vaccinés. Ainsi plusieurs méthodes peuvent être mise en place pour prévenir les infections des animaux par la Rhinotrachiète Infectieuse Bovine (IBR). Différentes techniques sont utilisées pour mettre en évidence une infection au BHV-1. La confirmation du virus et/ou de l'antigène est possible par des méthodes conventionnelles telles que la culture de cellules, l'immunofluorescence, l'analyse d'immunoperoxydase et l'ÉLISA (Straub,

1991). Donc, une prise de sang peut être effectuée pour mettre en évidence les anticorps et une technique d'immunofluorescence sur des coupes d'organes peut aussi être effectuée sur un cadavre (Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (RSIA), 2004). La recherche d'anticorps spécifiques se fait au niveau d'échantillon de sérum, mais peut aussi se faire à l'aide d'un échantillon de lait (Bulletin des GTV, 1997). Des techniques immunoenzymatiques de type ÉLISA sont alors utilisées. Il existe aussi sur le marché un test ÉLISA permettant de distinguer les animaux infectés de ceux ayant été vaccinés (Bulletin des GTV, 1997).

Les nouveaux vaccins sont marqués (vaccin contenant des virus n'exprimant pas la glycoprotéine gE) ce qui permet de les distinguer facilement (Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (RSIA), 2004). De plus, les animaux ayant été vaccinés démontrent un taux plus élevé d'anticorps que ceux ayant reçu aucune immunité et ce pour un nombre similaire de jours suivant l'infection (Clavet, 2007).

la séroneutralisation virale : selon notre travail la confirmation des réactions positives ainsi 13 séropositifs sur 14 de l'Elisa étaient très positifs avec des dilution 1/8 à 1/32.

D'après Straub (1991), la confirmation du virus et/ou de l'antigène est possible par des méthodes conventionnelles telles que la culture de cellules (séroneutralisation virale).

Epidémiologie : selon nos résultats la réaction positive est observée chez 10,29% des animaux et 7/19 des élevages soit 36,84% présentaient des séropositifs. En France (1997) ils ont démontré que 10 à 30 % des cheptels étaient infectés par le virus BHV1 (Thiry E., Lemaire M., Shyntsf., Vanderheljden.N Meyer G., Dispas M., Pasdtoret P.P,1997) . En Europe, la situation des différents pays vis-à-vis de l'IBR est très variable.

Au premier septembre 2007 on recensait 07 états indemnes de l'IBR : Autriche, Danemark, la Suède, la Finlande, la Norvège, la région de Bolzano en Italie et hors Union Européen la Suisse et d'autre pays présentent une prévalence faible ou moyenne de l'IBR ; Allemagne, la France, le reste de l'Italie et en fin certains états ont une prévalence élevée de l'IBR ; la Belgique et les pays- Bas (Benard Geneviève, 2007). En Algérie aucune enquête à l'échelle nationale n'a été menée avec une méthodologie suffisamment rigoureuse pour pouvoir correctement estimer le taux de l'infection de l'IBR.

Hormis les génisses importées qui sont contrôlées pour l'IBR aux niveaux des lazarets, aucun système de contrôle n'a été adopté contre l'IBR en Algérie.

CONCLUSION

Notre recherche a abouti à une présence de *l'Herpesvirus bovin type 1* en Kabylie, ceci prouve sa présence dans le cheptel bovin algérien, entraînant la rhino trachéite infectieuse bovine (IBR) ainsi la vulvo-vaginite infectieuse (IPV). Par conséquent ces maladies causent une baisse de la production laitière et des avortements, ce que signifie une perte économique.

Actuellement il n'y a pas de grands travaux de recherches mis en place pour enquêter sur le virus de IBR *l'Herpesvirus bovin type 1* en Algérie, et de contrôler les problèmes de reproduction chez les bovins. Or, le cheptel algérien n'est pas dans les bonnes conditions zootechniques et sanitaires, Cependant au cours de ces dernières années, nos éleveurs ont l'intention de les améliorer et avoir les normes de productivité.

L'objectif est à présent d'étendre les travaux sur l'IBR afin d'aboutir à la situation épidémiologique de cette maladie en Algérie, et introduire des techniques de recherche directe du virus BHV1 au niveau de son site de latence, qui apportent des résultats concrets et des réponses précises sur le virus.

Annexe 1 réactifs Elisa:

Il faut stocker tous les réactifs entre 2 et 8°C.

Numéro de produit	Le réactif	quantité	quantité
1	plaques sensibilisées avec des antigènes du BHV-1	5	10
2	Contrôle positif	2ml	2ml
3	Contrôle négatif	2ml	2ml
4a	Conjugué concentré	1,5ml	1,5ml
4b	Tampon de dilution N°1	120ml	120ml
5	Tampon de dilution N°2	120ml	2x120ml
A	Substrat TMB N°9	60ml	120ml
B	Solution d'arrêt N°3	60ml	120ml
C	Solution de lavage concentrée (20x)	100ml	2x100ml

Matériel nécessaire :

- Centrifugeuse à 2.000 x g.
- Agitateur (type Vortex).
- Micropipettes et pipette multicanaux (la précision requise pour la mesure des volumes indiqués au « mode opératoire » doit être de + ou – 5%).
- Embouts de pipettes à usage unique.
- Agitateur de microplaques.
- Eau distillée et déminéralisée.
- Système de lavage manuel, semi automatique ou automatique.
- Couvercles adhésifs pour les microplaques.
- Lecteur de microplaques équipé d'un filtre à 450 nm.
- Incubateur de plaque à 37°C + ou – 3°C.

Mise en garde et précaution d'emploi :

- Ne pas pipeter les réactifs à bouche.
- Porter des gants de protection.
- Les contrôles, le substrat TMB et la solution de lavage concentrée (20x) peuvent provoquer des irritations des yeux.

- La solution d'arrêt provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
- Décontaminer l'ensemble du matériel intervenant dans la manipulation avant élimination. Eliminer l'ensemble du matériel selon la réglementation en vigueur.

Préparation des réactifs

Solution de lavage :

Diluer la solution de lavage concentrée (20x) au 1/20 dans de l'eau distillée/démonisée avant utilisation.

NB : remettre la solution de lavage concentré (20x) à 18-26°C et bien homogénéiser pour assurer la dissolution complète d'éventuels cristaux. La solution de lavage est stable pendant trois jours à 2-8°C.

Conjugué :

Diluer le conjugué concentré au 1/100 dans le tampon de dilution N°1.

Note : le conjugué dilué est stable pendant 8 heures à 18-26°C.

Annexe 2 séroneutralisation virale

Matériel utilisé :

- Bain-marie thermostaté à 56°C +ou - 1(décomplémentation SVF).
- Bain-marie thermostaté à 59°C +ou - 1(décomplémentation des sérums à étudier).
- Poste de sécurité microbiologique (PSM) de niveau II.
- Plaque de microtitration à fond plat, stériles, avec couvercle et traitée pour la culture cellulaire.
- Gouttière stériles à réactif
- Etuve à 37°C +ou -2°C à 5% CO₂ + ou -1%.
- Réfrigérateur (5°C + ou - 3°C)
- Microscope inversé
- Pipettes et micropipettes
- Centrifugeuse de microtubes.

Réactifs utilisés :

- Milieu de culture (MEM) supplémenté en sels de Earle, glutamine et acides aminés non essentiels).
- Trypsine-EDTA.
- Si nécessaire, une solution de pénicilline-streptomycine est utilisée à une concentration maximale de 1%. Elle est conservée à une température de $\leq -16^{\circ}\text{C}$.
- Cellules Madin-Darby bovine kidney (MDBK) sensibles au BoHV-1.
- Sérum de veau foetal, inactivé 30 mn à 56°C +ou -1°C , indemne de pestivirus, de BoHV-1, et indemne des anticorps dirigés contre ces virus.
- Sérum de contrôle positif : Ref46 (sous étalon français du sérum OIE EU2)
- Sérum de contrôle négatif : 9355.
- Membrane de filtration type « Spin colonne ».

REFERENCES:

1 BARANOWSKI E., KEIL G., LYAKU J., RIJSEWIJK F.A., VAN OIRSCHOT J.T., PASTORET PP, THIRY E.

Structural and functional analysis of Bovine Herpesvirus 1 minor glycoproteins.
Veterinary Microbiology, 1996, 53 (1-2), 91-101.

2 ETIENNE THIRY

Maladies virales des ruminantes collections virologie clinique
Edition: le point vétérinaire, 2000, p17

3 F.M.H. GRADEUX

Recherche de virus BHV-1 dans les ganglions trijumeaux des bovins dans le cadre de la gestion nationale de reinotrachéite infectieuse bovine
Thèse : Med. Vet. : Toulouse: 2007, p 13, 15, 19, 20, 18, 29, 30, 31, 37

4 Thomas DELOST

Evolution de la certification IBR en France
Thèse : Med. Vet. : Alfort : 2011, p11, 34, 35, 23, 39

5 *The biology of Bovine Herpes Virus 1*, Australian Government, Department of Health and Ageing,

Office of the Gene Technology Regulator, August 2005.
www.ogtr.gov.au/rtf/ir/biologybovineherpesvirus.rtf (page consultée le 31/01/07).

6 P.C.LEFEVRE, J.BLANCOU, R.CHERMETTE

Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail en Europe et régions chaudes
chp Herpesvirus des ruminants E.THIRY
édition : TEC & DOC : 2003, p485, 486, 491, 490, 489

7 BABIUK LA, VAN DRUNEN LITTLE-VAN DER HURK S, TIKOO SK.

Immunology of bovineherpesvirus 1 infection.
Vet. Microbiol., 1996, 53, 31-42.

8 THIRY J, KEUSER V, MUYLKENS B, MEURENS F, GOGEV S, VANDERPLASSCHEN A et al.

Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1,
Vet. Res., 2006, 37, 169-190.

9 GALAIS-DUHAMEL Charlene

LES HERPESVIRUS BOVINS CHEZ LES RUMINANTS
These : Med. Vet. : Alfort, p16, 29, 30

10 EGYED L, ROS C, BELAK S.

Genomic and pathogenic studies on a glycoprotein E variant field isolate of bovine herpesvirus 1. *Vet. Res. Commun*, 24, 423-431.

11 THIRY E., LEMAIRE M., SCHYNTS F., MEYER G., DISPAS M., GOGEV S.

Les conséquences de l'infection des bovins par le virus de l'IBR.
Le Point vétérinaire, 1999, 199 (30), 19-26.

12 DENIS M, SPLITTER G, THIRY E, PASTORET PP, BABIUK LA.

Infectious bovine rhinotracheitis (Bovine Herpesvirus 1) : Helper T Cells, Cytotoxic T Cells and NK Cells. In : GODDEERIS BM, MORRISON WI. Cell-mediated immunity in ruminants. London, Tokyo, CRC Press, 1994, 157-172.

13 ACKERMANN M, PETERHANS E, WYLER R.

DNA of bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. American Journal of Veterinary Research, 1982,43, 36-40.

14 WELLENBERG GJ, VAN DER POEL WHM, VAN OIRSCHOT JT.

Viral infections and bovinemastitis : a review. Vet. Microbiol., 2002, 88, 24-45.

15 VAN DRUNEN LITTLE-VAN DER HURK S, VAN DONKERSGOED J, KOWALSKI J, DAN DENHURK J, HARLAND R, BABIUK LA et al.

A subunit gIV vaccine produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus 1 in cattle. Vaccine, 1994, 12, 1295-1302.

16 C.PASQUIER, S.BERTAGNOLI, F.MESSUD, J.IZOPET

Virologie humain et animale
Edition DUNOD, 2005, p105, 106

17 P.C.LEFEVRE, J.BLANCOU, R.CHERMETTE

Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail en Europe et régions chaudes
chp Herpesvirus des ruminants E.THIRY
édition : TEC & DOC : 2003, 485p

18 BABIUK, L.A, VAN DRUNENE LITTEL-VAN DEN HURK, S and TIKOO, S.K.

Immunology of bovine herpesvirus 1 infection.
Vet. Microbiol, 1996, 53, 1-2, 31-42.

19 GUY JS, POTGIETER L.

Kinetics of antibody formation after the reactivation of bovineherpesvirus-1 infection in cattle. Am. J. vet. Res., 1985, 56, 179-192.

20 Louis CASARD

Infections croisées à alphaherpèsvirus chez les ruminants :
Application au contrôle de la reinotracheite infectieuse bovine
These: Med. Vet : Toulouse : 2003, p44, 47, 48, 38

21 HUTCHINGS DL, VAN DRUNEN LITTLE-VAN DER HURK S, BABIUK LA.

Lymphocyteproliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. J. Virol.,1990, 64, 5114-5122.

22 TEMPESTA, M, PRATELLI, A., GRECO, G., MARTELLA , V. and BUONAVOGLIA ,

Detection of caprine herpesvirus 1 in sacral ganglia of latently infected goats by PCR.
J.Clin. Microbiol., 1999, 37,5, 1598-1599.

23 KAASHOEK MJ, RIJSEWIJK FA, VAN OIRSCHOT JT.

Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two or three years after infection. Vet. Microbiol.,1996, 53, 103-110.

24 Delle Cave J.

Données étiologiques pathogéniques diagnostiques et épidémiologiques pour le choix d'une prophylaxie du complexe rhinotrachéite bovine infectieuse vulvo-vaginite pustuleuse infectieuse (IBR/IPV) en France. Première partie : étiologie pathogénie diagnostic ;
Thèse med. Vet.Lyon, 1983, 90 p.

25 MENSİK, J., POSPISIL, Z., SUCHANKOVA, A., CEPICA, A., ROZOSNY, V. and MACHATKOVA, M.

Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis after experimental infection with parainfluenza 3 virus in young calves.

26 NAKAMICHI K., MATSUMOTO Y., OTSUKA H.

Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells.
Virology, 2002, 294 (1), 22-30

27 LEMAIRE M., SCHYNTS F., MEYER G., GEORGIN J.P., BARANOWSKI E., GABRIEL A., ROS C., BELAK S., THIRY E.

Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies.
Vaccine, 2001, 19 (32), 4795-4804.

28 ACKERMANN M, WYLER R.

The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia latency after intravaginal infection.
Veterinary Microbiology, 1984, 9, 53-63.

29 MSOLLA P.M., ALLAN E.M., SELMAN I.E., WISEMAN A.

Reactivation and shedding of bovine herpesvirus 1 following *Dictyocaulus viviparus* infection.
Journal of Comparative Pathology, 1983, 93 (2), 271-274.

30 RABEYRIN

Rhinotrachéite infectieuse bovine organisations des moyens de lutte dans le cadre d'une certification nationale
Thèse : Med. Vet : Lyon : 2007, 18p

31 ROIZMANN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C. and STUDDERT, M.J.

The family Herpesviridae : an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of viruses.
Arch. Virol., 1992, 123, 3-4, 425-449.

32 ESPINASSE J, VISO M, LAVAL Z, LE LAYEC C, MONPETIT C.

Reactivation and shedding of infectious bovine rhinotracheitis virus caused by 3-methylindole.
Vet. Rec., 1983, 113, 15-16

33 Roizman B., Baines J.

The diversity and unity of herpesviridae;
Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis., 1991, 14, 63-79.

34 ROCK D., LOKENSGARD J., LEWIS T., KUTISH G.

Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent Bovine Herpesvirus 1.
Journal of Virology, 1992, 66 (4), 2484-2490.

35 VAN DRUNEN LITTLE-VAN DER HURK S, VAN DONKERSGOED J, KOWALSKI J, DAN DEN HURK J, HARLAND R, BABIUK LA et al.

A subunit gIV vaccine produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus 1 in cattle.
Vaccine, 1994, 12, 1295-1302.

36 THIRY J, KEUSER V, MUYLKENS B, MEURENS F, GOGEV S, VANDERPLASSCHEN A et al

.Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1,
Vet. Res., 2006, 37, 169-190.

37 SCHWYZER, M. and ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses.

Vet. Microbiol., 1996, 53, 1-2, 17-29.

38 MUYLKENS B, THIRY J, KIRTEN P, SCHYNTS F, THIRY E.

Bovine Herpesvirus infection and infectious bovine rhinotracheitis.
Veterinary Research, 2007, 38, 181-209.

39 Muylkens B., Meurens F., Schynts F., Thiry E.

Les facteurs de virulence des alphaherpesvirus ;
Virology, 2003, 7, 401-415.

40 Meyer G.

Etude comparative de la neuropathogénicité des herpesvirus bovins de type 1 et 5 et caractérisation des produits d'expression des gènes codant pour la glycoprotéine gH ;
Thèse med. Vet., Liège, 1999, 258 p.

41 Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D.

Virus taxonomy, sixth report of the international committee on taxonomy of viruses; ed. Springer-Verlag Wien New York, 1995, 114-127.

42 Thomas DELOST .

Évolution de la certification IBR en France ;
École nationale vétérinaire d'ALFORT. ; Année 2011, 26-27-28-29p

43 Hervé, Max, Louis CASSARD

Infections croisées à alphaherpesvirus chez les ruminants : Application au contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine.
École nationale vétérinaire de TOULOUSE. ; Année 2003. ; These : 2003-TOU 3-4159.35-37-39-40p

44 GALAIS-DUHAMEL Charlene. ;

Les Herpesvirus bovins chez les ruminants
École nationale vétérinaire d'ALFORT. Année 2006. 23-24-25-26-35-41p

45 Muylkens B., Meurens F., Schynts F., Thiry E.

Les facteurs de virulence des alphaherpesvirus ; *Virology*, 2003, 7, 401-415.

46 Egyed L.

Bovine herpesvirus type 4 : a special herpesvirus (review article) ;
Acta Vet. Hungaricae, 2000, 48 (4), 501-513.

47 BABIUK, L.A., VAN DRUEN LITTEL-VAN DEN HURK ,S. and TIKOO,S.K.

Immunology of bovine herpesvirus 1 infection
Vet.Microbiol., 1996, 53, 1-2, 31-42.

48 UNIVERSITE DE LIMOGES. (Page consultée le 14 juin 2011). Adresse URL [en ligne]

<http://www.unilim.fr/theses/2003/sciences/2003limo0017/images/image004.jpg>

49 MUYLKENS B, MEURENS F, SCHYNTS F, THIRY E.

Les facteurs de virulence des alphaherpesvirus. Virologie, 2003, 7, 401-415.

50 DELHON GA, GONZALEZ MJ, MURCIA PR.

Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by BHV1.
J. Gen. Virol., 2002, 83, 2257-2267.

51 Allemand S.

Les herpesvirus bovins encéphalithogènes, cas particulier du BHV5 ;
Thèse med. Vet., Toulouse, 1998, 89 p.

52 Coste T.

Le virus herpes bovin de type 1 (BHV1) et sa pathologie ;
Thèse de med. Vet., Lyon, 1991, 121 p.

53 Thiry E.

Maladies virales des ruminants,

le point vétérinaire, collection virologie clinique, 2000.

54 Thiry E., Lemaire L., Schynts F., Vanderheijden N., Meyer G., Dispas M., Pastoret P.P.

La rhinotrachéite infectieuse bovine : caractéristiques du virus, l'infection et ses manifestations cliniques ;

Bull. GTV, 1997, 4B 559, 7-16.

55 THIRY E.

Virologie clinique des Ruminants. 2eme ed.,
Les Editions du Point Veterinaire, 2007, 301p.

56 PASTORET,P.P.,THIRY,E.,BROCHIER,B.and DERBOVEN,G.

Bovid Herpèsvirus 1 infection of cattle:pathogenesis,latency,consequences of latency.

Ann.Rech.Vét.,1982,13,3,221-235.

57 KOPTOPOULOS,G.

Goat Herpèsvirus 1 infection:

a review. Vet. Bull.,1992,62,2,79-84.

58 KAASHOEK MJ, STRAVER PH, VAN ROOIJ EM, QUAK J, VAN OIRSCHOT JT.

Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains : clinical and virological aspects.

Vet. Record, 1996, 139, 416-421.

59 HANON E, VANDERPLASSCHEN A, LYAKU S, KEIL G, DENIS M, PASTORET PP.

Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells.

J. Virol., 1996, 70, 4116-4120.

60 NYAGA PN, McKERCHER DG.

Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections :interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components.

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1979, 2, 587-602.

61 ENGELS M, ACKERMANN M.

Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections.

Vet. Microbiol., 1996, 53, 3-15.

62 ENGELS M, ACKERMANN M.

Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections.

Vet. Microbiol., 1996, 53, 1-2,3-15.

63 Thiry E., Lemaire L., Schynts F., Vanderheijden N., Meyer G., Dispas M., Pastoret P.P.

La rhinotrachéite infectieuse bovine : caractéristiques du virus, l'infection et ses manifestations cliniques

Bull. GTV, 1997, 4B 559, 7-16.

64 TRAPP S, OSTERRIDER N, KEIL GM, BEER M.

Mutagenesis of a bovine herpesvirus 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome : analysis of a glycoprotein E and G double deletion mutants.

J. Gen. Virol., 2003, 84, 301-306.

65 Blanc R.

BHV-1 et reproduction ;

Thèse med. Vet., Alfort, 2002, 57 p.

66 Cutler K.L., Harwood D.G.

An outbreak of infectious bovine rhinotracheitis with atypical and severe signs (haemorrhagic tracheobronchitis) in a naïve dairy herd ;

Cattle Pract., 2000, **8** (1), 21-23.

67 Cassard H.

Infections croisées à alphaherpèsvirus chez les ruminants : application au contrôle de la rhinotrachéite infectieuse bovine ;

Thèse med. Vet., Toulouse, 2003, 111

68 Cook N.

Bovine herpesvirus 1 : clinical manifestations and an outbreak of infections pustular vulvovaginitis in a UK dairy herd ;

Cattle Pract., 1998, **6** (4), 341-344.

69 Narita M., Kimura K., Tanimura N., Tsuboi T.

Pneumonia induced by endobronchial inoculation of calves with bovine herpesvirus 1 ;

J. Comp. Pathol., 2000, **122**, 185-192.

70 STRAUB,O.C

Infectious bovine rhinotracheitis virus *In:Z. Dinter and B.Morein.Virus infections of ruminants.*
Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier Science publishers,1990,71-108.

71 Campero C.M., Moore D.P., Odeon A.C., Cipolla A.L., Odriozola E.

Aetiology of bovine abortion in Argentina ;

Vet. Res. Commun., 2003, **27** (5), 359-369.

72 Rocha M.A., Barbosa E.F., Guedes R.M.C., Lage A.P., Leite R.C., Gouveia A.M.G.

Detection of BHV1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay ;

Vet. Res. Commun., 1998, **23**(2), 133-141.

73 Wellenberg G.J., van der Poel W.H.M., van Oirschot J.T.

Viral infections and bovine mastitis:

A review; *Vet. Microbiol.*, 2002, **88**, 27-45.

74 Penny C.D., Howie F., Nettleton P.F., Sargison N.D., Schock A.

Upper respiratory disease and encephalitis in neonat beef calves caused by bovine herpesvirus type 1;

Vet. Rec., 2002, **151** (3), 8

75 TOMISHIMA MJ, ENQUIST LW.

In vivo egress of an Alphaherpesvirus from axons.

J.Virol., 2002, **76**, 8310-8317